

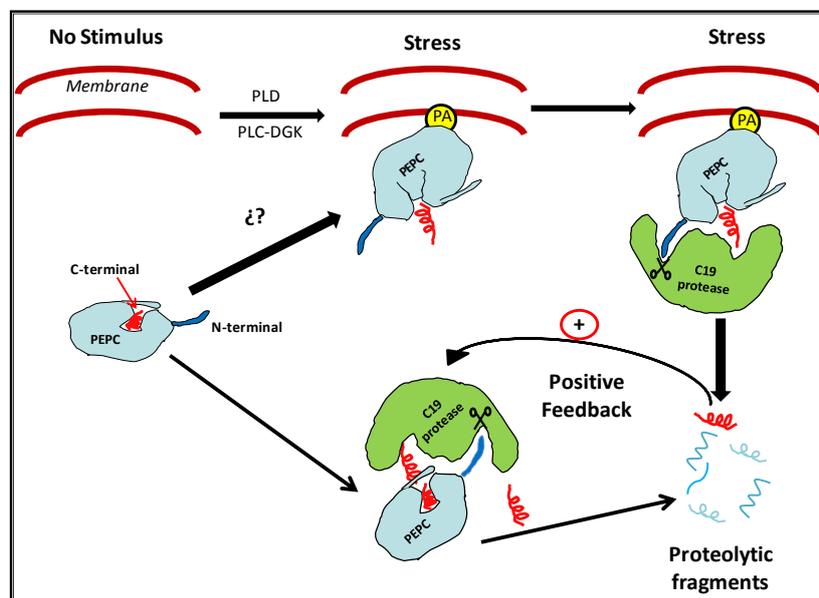
Departamento de Biología Vegetal y Ecología

Área de Fisiología Vegetal

Facultad de Biología

Tesis Doctoral

**“IMPLICACIÓN DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN LA DEGRADACIÓN Y FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA”**



JACINTO MANUEL GANDULLO TOVAR

Sevilla, Septiembre de 2010



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA  
ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL

**IMPLICACIÓN DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA  
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN LA DEGRADACIÓN  
Y FOSFORILACIÓN DE LA PROTEÍNA.**

Trabajo de investigación presentado por  
el licenciado **Jacinto Manuel Gandullo Tovar**  
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Sevilla, Septiembre de 2010

Directoras de la Tesis

**Dra. Cristina Echevarría Ruíz de Varga**  
Profesora Titular de Fisiología Vegetal

**Dra. María del Rosario Álvarez Morales**  
Profesora Contratada Doctora



A mis padres



Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Área de Fisiología Vegetal de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

La financiación se realizó con cargo a los proyecto de investigación:

- Regulación de enzimas claves del metabolismo del carbono por factores ambientales y antrópicos en cereales y remolacha azucarera. Proyecto BFU2007-61431, programa del Plan Nacional I+D. 2007-2010.
- Regulación de enzimas claves del metabolismo del carbono por factores ambientales y antrópicos en cereales y remolacha azucarera. Proyecto P06-CVI-02186. Programa, Junta de Andalucía Proyectos de Excelencia. 2007-2010.
- Fosforilación de proteínas y metabolismo del carbono. Ayudas grupo PAI 2007. Proyecto CVI292006. Programa Plan Andaluz de Investigación. 2007.
- Fosforilación de proteínas y metabolismo del carbono. Ayudas grupo PAI 2008. Proyecto BIO298-2007. Programa Plan Andaluz de Investigación. 2008.
- Fosforilación de proteínas y metabolismo del carbono. Ayudas grupo PAI 2009. Proyecto BIO298-2009. Programa Plan Andaluz de Investigación. 2009.
- Proyecto de fortalecimiento del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Nacional autónoma de León (Nicaragua). Proyecto D/08154/08. Programa Agencia española de cooperación internacional (AECI) 2009-2010.
- Proyecto de fortalecimiento del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de Nacional autónoma de León (Nicaragua). Proyecto D/025486/09. Programa Agencia española de cooperación internacional (AECI) 2010-2011.

Desde el año 2007 estoy en posesión de una beca predoctoral adscrita a un Proyecto de Investigación de Excelencia en Equipos de Investigación de la Junta de Andalucía.



## AGRADECIMIENTOS

La elaboración de esta tesis es fruto de cuatro años de trabajo en un gran grupo humano, y supone el final de mi primera etapa en este largo y duro camino que es la carrera investigadora. No hubiera sido posible la realización de esta tesis sin la ayuda inestimable de cuantos forman el área de Fisiología Vegetal.

Quiero agradecer a la Dra. Sofía García-Mauriño por los buenos consejos que siempre me ofrece y por servirme de ejemplo de dedicación y entusiasmo por su trabajo, al Dr. José Antonio Monreal por adentrarme en el útil pero complejo mundo de la Biología Molecular y por permitirme compartir tres magníficos meses con su familia durante mi estancia en Glasgow, al Dr. José María Maldonado por despertar en mí el interés en la fisiología con sus magníficas clases, a los doctores Francisco Gil, Alfonso de Cires y Alfredo Rubio por estar siempre de bromas y por los buenos momentos entorno a la prince, y a Pilar por tener siempre una sonrisa que ofrecerme y su amistad. También quisiera agradecer al Dr. Jean Vidal por sus magnificas y estresante estancias, por contagiarme de su gran vitalidad y por ayudarme a la realización de algunos experimentos de esta tesis a horas intempestivas.

A la savia nueva, Isabel y Cirenia, y a los que volvieron, Ana Belén, agradeceros vuestra amistad, vuestro compañerismo y los buenos momentos que echamos juntos durante el día.

Un especial agradecimiento es para mis dos directoras de tesis, las doctoras Rosario Álvarez y Cristina Echevarría, pues me permitieron entrar en este grupo y disfrutar de la investigación.

Rosario tú has sido madre y maestra, de ti he aprendido no sólo a desenvolverme en el laboratorio, a proyectar los ensayos y el manejo de técnicas en el laboratorio, sino que también me has enseñado a ser mejor persona. Siempre me has ofrecido tu apoyo, comprensión y cariño en los momentos más difíciles tanto personales como profesionales.

Cristina, tú eres veleta y norte de mis aspiraciones como investigador, tú me has enseñado a interpretar la ciencia y a sacar el mayor partido a cualquier resultado obtenido. Tu capacidad de reflexión, análisis e invención cada día me sorprende más. Te agradezco sinceramente tu amistad, confianza y continuo estímulo durante este tiempo.

Quisiera daros las gracias por el esfuerzo titánico que habéis realizado durante estos últimos meses para la culminación de este proyecto que tanto significa para mí.

En este momento tan especial para mí, no puedo olvidarme de las dos personas más importantes en mi vida, mis padres. Para agradecerles todo lo que han hecho por mí y cuanto se han sacrificado a lo largo de sus vidas, para ofrecerme lo mejor, no sería suficiente con todas las páginas que ocupa este volumen. Mis logros como científico son sus logros como padres, ellos me han enseñado a valorar todas las oportunidades que la vida me ha ofrecido y de las que ellos no pudieron disfrutar. Sin vuestro incondicional apoyo y profundo cariño nunca hubiera conseguido nada.

A mi hermana Azahara y a mi cuñado Daniel por su apoyo, comprensión , por estar siempre a mi lado y por darme una de las mayores alegrías de mi vida, mi sobrino Daniel que es la nueva luz de nuestra familia, su energía y ganas de vivir lo cubren todo y te hace mirar al futuro con más esperanza.

A mi abuelo Jacinto referente durante toda mi vida, el siempre me ha enseñado a respetar y ser respetado y a ser mejor persona.

A José María, Laura y Francisco por hacerme sentir como de su propia familia y por los buenos momentos que hemos compartido juntos.

Quisiera hacer una dedicatoria muy especial a todos los que estuvieron pero ya no están y que formaron parte esencial de mi vida.

También agradecer a todos mis amigos y amigas por su amistad y a la asociación Logrosán Acoge por los buenos momentos vividos.

Por último no puedo olvidarme de María, mi amiga, mi compañera, mi otra mitad. Tu comprensión, tu apoyo, tu cariño, tu amistad son esenciales en mi vida. Admiro e intento emular tu implicación y dedicación en todo lo que haces en tu vida y aprovecho para darte la enhorabuena por tu último logro. De este trabajo de tesis eres coautora pues, yo no lo hubiera conseguido sin tu ayuda. Siempre has estado ahí en mis peores momentos y en las celebraciones también quiero que estés a mí lado.

GRACIAS A TODOS/AS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han dado lugar a varias publicaciones y se han presentado en diferentes congresos nacionales e internacionales.

## **PUBLICACIONES**

- J. Gandullo, R. Álvarez & C. Echevarría. (2008). A protease activity co-purified with the C4 PEPC from sorghum leaves is specifically activated by a synthetic peptide from its C-terminal. *Physiología Plantarum*, 133 (3):P11-024.
- R. Álvarez, J. M. Castillo, E. Mateos-Naranjo, J. Gandullo, A. E. Rubio Casal, F. J. Moreno & M. E. Figueroa. (2010) Ecotypic variations in PEPC activity of the cordgrass *Spartina densiflora* through its latitudinal distribution range. *Plant Biology*, 12: 154-160.
- E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gomez, R. Álvarez, J. Cambrollé, J. Gandullo & M. E. Figueroa. (2010). Synergic effect of salinity and photosynthetic response of the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. *Journal of Experimental Botany*, 61(6): 1163-1654.
- R. Álvarez, J. Gandullo, A. B. Fera, L. V. Dever, J. Vidal & C. Echevarría. (2010). Characterisation of seed of a C4 phosphoenolpyruvate carboxylase-deficient mutant of *Amaranthus edulis*. *Plant Biology* DOI: 10.1111/j.1438-8677.2010.00347.x
- J. Gandullo, R. Álvarez, J. Vidal & C. Echevarría. Proteolysis of the C<sub>4</sub>-Phosphoenolpyruvate carboxylase by a peptide-dependent protease activity in sorghum leaf extracts. *FEBS letter* (en preparación).

## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

- ✓ R. Álvarez, J. Gandullo, J. Vidal & C. Echevarría. (2007). Caracterización de la regulación de la Fosfoenolpiruvato carboxilasa de plantas C<sub>4</sub> por interacción con un péptido sintético que contiene los últimos 19 aminoácidos de su región

- C-terminal. XVII Reunión de la SEFV y X Congreso Hispano-Luso. Poster, p365. SEFV, Madrid (2007). Congreso Internacional.
- ✓ J. Gandullo, R. Álvarez, J. Vidal & C. Echevarría. El estado de la fosforilación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa, el ácido fosfatídico y el pH modulan la exposición de los últimos 19 aminoácidos de su extremo N-terminal. XVIII Reunión de la SEFV y XI Congreso Hispano-Luso. Comunicación oral (S7-03), p 246. SEFV, Zaragoza (2009). Congreso Internacional.
  - ✓ E. Mateos-Naranjo, S. Redondo-Gomez, R. Álvarez, J. Cambrollé, J. Gandullo & M. E. Figueroa. Effect of increasing carbón dioxide on the invasive cordgrass *Spartina densiflora*. BIOLIFE World conference on biological invasion and ecosystem functioning. Poster, pag 41. BIOLIFE, Oporto (Portugal) (2009). Congreso internacional.
  - ✓ J. Gandullo, R. Álvarez & C. Echevarría. PEPC proteolysis by the C19-PEPC-Protease is activated by phophatidic acid. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Poster, pag 171-172. FESPB, Valencia (Spain) (2010). Congreso internacional.
  - ✓ R. Álvarez, J. Gandullo, J. Vidal & C. Echevarría. Characterization of Seeds of a C<sub>4</sub> Phosphoenolpyruvate carboxylase-deficiente Mutant of *Amaranthus Edulis*. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Poster, pag 171. FESPB, Valencia (Spain) (2010). Congreso internacional.
  - ✓ J. Moreal, C. M. Dolmus, N. N. Gutierrez Chavarria, M. J. Molina Mendoza, M. I. Loasida Zapata, R. M. Pastora de Velásquez, M. I. Dávila de Guerrero, J. R. Dolmus, R. Esteban Terradillos, B. Fernandez-Marín, J. I. García Plazaola, D. Morales Méndez, M. S. Jiménez Parrondo, R. Álvarez Morales, J. Gandullo, A. E. Rubio Casal, C. Echevarría, A. León, E. T. Jiménez Segovia, S. García Mauriño & C. D. Silva Maldonado. Regeneración of the Mangrove Forest at the Pacific coast of Nicaragua after tropical storm Alma. XVII Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB). Poster, pag 132-133. FESPB, Valencia (Spain) (2010). Congreso internacional.

# ÍNDICE

INDICE	I
INDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS	XI
I.- INTRODUCCIÓN	1
1.- FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA	3
1.1.- Estructura	5
1.2.- Funciones	6
1.2.1.- <i>La PEPC en la fotosíntesis de tipo C<sub>4</sub> y CAM</i>	6
1.2.2.- <i>La PEPC en otros contextos fisiológicos</i>	9
1.3.- Familia génica de la PEPC	10
1.4.- Regulación de la actividad PEPC	11
1.4.1.- <i>Regulación transcripcional</i>	11
1.4.2.- <i>Regulación Postraducciona</i>	12
<u><i>Regulación por metabolitos, pH, estado oligomérico y estado rédox</i></u>	12
<u><i>Regulación de la PEPC por fosforilación reversible</i></u>	15
1.5.- Papel regulador del extremo C-terminal de la PEPC	18
2.- FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASAS QUINASA	19
2.1.- Familia génica PEPC-quinasa	19
2.2.- Regulación de la PEPC-quinasa	20
3.- PROTEASAS DE PLANTAS	22
3.1.- Mecanismo general de acción de las proteasas	23
3.2.- Clasificación y tipos de proteasas	24

3.3.- Funciones de las proteasas	26
3.4.- Proteólisis de la fosfoenolpiruvato carboxilasa	28
4.- REGULACIÓN FOSFOLIPÍDICA EN PLANTAS	30
4.1.- Señalización fosfolipídica	30
<u>Señalización fosfolipídica en plantas</u>	32
4.2.- Acido fosfatídico	32
4.2.1.- Síntesis de PA	33
4.2.2.- Funciones del PA	34
<u>Regulación de la PEPC por PA</u>	36
II.- OBJETIVOS	39
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	43
1.- MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	45
1.1.- Material vegetal	45
1.2.- Condiciones de cultivo	45
1.3.- Péptidos sintéticos	45
2.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS Y FRACCIONES PROTEICAS	46
2.1 Obtención de extractos crudos	46
2.2. Obtención de la fracción PEPC semipurificada (PEPC + Proteasa C19)	46
2.3.- Purificación de la PEPC por electroelución	48
2.4.- Purificación de la proteasa C19 por cromatografía de afinidad en una columna Hi-Trap <sup>TM</sup> activada con NHS y con péptido C-terminal acoplado	49
3.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS	50
3.1.- Determinación de la actividad PEPC	50
3.2.- Determinación del grado de fosforilación de la PEPC mediante el test malato	51

3.3.- Incubación de la PEPC con el péptido C19 y determinación de la actividad proteasa C19	51
3.4.- Determinación de la actividad proteasa en zimogramas	52
3.5.- Fosforilación <i>in vitro</i> de la PEPC-OH semipurificada con PKA	52
3.6.- Fosforilación <i>in vitro</i> de los péptidos sintéticos	53
3.7.- Incubación de la PEPC con ácido fosfatídico (PA)	54
4.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS	55
4.1.- Purificación de anticuerpos en cromatografía de afinidad en gel de proteína A Sepharosa	56
4.2.- Inmunoprecipitación de la PEPC	56
5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS	57
5.1.- Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida	57
5.2.- Tinción y secado de geles	59
5.3.- Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Western blot)	59
6.- OTROS MÉTODOS	60
6.1.- Eliminación de sales y moléculas pequeñas	60
6.2.-Concentración de muestras	61
6.3.- Determinación de proteínas solubles	61
6.4.- Determinación del pH	61
7.-. REACTIVOS	62
IV.- RESULTADOS	63
1.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEASA ACTIVADA POR EL PEPTIDO C19	65
1.1.- Efecto del péptido sintético C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC	65
1.1.1.- <i>Protección de la inhibición por metabolitos</i>	68
1.1.2.- <i>La pérdida de actividad PEPC en presencia del péptido C19</i>	70

<i>conlleve una pérdida en la cantidad de proteína</i>	
1.1.3.- <i>El efecto del péptido C19 es muy específico</i>	71
1.1.4.- <i>La pérdida de la proteína en presencia del péptido C19 no es debida a la formación de macroagregados ni a precipitación</i>	74
1.2.- <i>Pruebas experimentales de la presencia de una proteasa en la fracción de PEPC semipurificada</i>	76
1.2.1.- <i>El análisis de la fracción PEPC-OH semipurificada en zimogramas revela la presencia de actividad proteasa C19 dependiente de péptido C19</i>	76
1.2.2.- <i>Separación de la PEPC y de la proteasa por electroelución</i>	77
1. 3. <i>Caracterización de la Proteasa C19</i>	79
1.3.1.- <i>Efecto del pH sobre la actividad de la proteasa C19</i>	79
1.3.2.- <i>Constante de afinidad para el péptido C19 y efecto del EGTA</i>	80
1.3.3.- <i>Efecto de la desnaturalización sobre la actividad proteasa C19</i>	81
1.3.4.- <i>La presencia de actividad proteasa C19 no está regulada por cambios luz-oscuridad</i>	83
1.3.5.- <i>Efecto de inhibidores de proteasas</i>	85
1.4.- <i>Purificación de la proteasa por cromatografía de afinidad al C-terminal</i>	88
1.5.- <i>La proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 comienza en el extremo N-terminal</i>	90
1.6.- <i>La fosforilación de la PEPC regula la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19</i>	92
1.6.1.- <i>La proteasa C19 tiene baja afinidad por el péptido N-terminal fosforilado</i>	92
1.6.2.- <i>La PEPC fosforilada es menos susceptible a ser proteolizada por la proteasa C19</i>	95
2.- <i>ESTUDIO DE LA ACCESIBILIDAD DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PEPC</i>	99
2.1.- <i>Accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de fracciones de PEPC semipurificadas</i>	100
2.1.1.- <i>Efecto del pH de incubación y del estado de fosforilación</i>	100

2.1.2.- Regulación redox	103
2.1.3.- Efecto de metabolitos reguladores	105
2.2.- Grado de accesibilidad del C-terminal de la PEPC en extractos crudos de hojas de sorgo	106
2.2.1.- Accesibilidad del C-terminal de la PEPC de Extractos crudo en presencia de G6P	108
3.- EL ÁCIDO FOSFATÍDICO (PA): ELEMENTO REGULADOR DE LA PEPC	110
3.1.- El PA promueve la exposición del extremo C-terminal de la PEPC	110
3.2.- El PA activa la proteólisis de la PEPC	113
3.3.- Principales factores que afectan a la cinética de proteólisis de la PEPC en presencia de PA	116
3.3.1.- Influencia del estado de la PEPC semipurificada	116
3.3.2.- Concentración efectiva de PA	118
3.4.- El bloqueo del extremo C-terminal de la PEPC con anticuerpos específicos inhibe la proteólisis de la proteína incluso en presencia de PA	119
3.5.- La proteólisis inducida por PA comienza por el extremo N-terminal de la PEPC	122
3.5.1.- El primer producto proteolítico carece del extremo N-terminal	122
3.5.2.- Efecto de los péptidos N-terminales sobre la proteólisis de la PEPC activada por PA	124
4.- EFECTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO C19 (péptido C19) EN LA FOSFORILACIÓN DE LA PEPC: POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN	127
4.1.- La fosforilación del péptido N-terminal es inhibida por el péptido C19	129
4.2.- El péptido C-terminal es fosforilado por una quinasa Ca <sup>2+</sup> -independiente que podría ser la PEPC-quinasa	132
4.3.- El sitio de fosforilación en el C19 está por dilucidar	134
V.- DISCUSIÓN	135
1.- CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEASA QUE DEGRADA A LA PEPC Y QUE ES ACTIVADA POR EL C-TERMINAL DE SU SUSTRATO	137

(PROTEASA C19)

2.- EL ÁCIDO FOSFATÍDICO INDUCE LA EXPOSICIÓN DEL C- TERMINAL DE LA PEPC Y SU DEGRADACIÓN POR LA PROTEASA C19	148
3.- EFECTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO C19 EN LA FOSFORILACIÓN DE LA PEPC: POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN	151
VI.- CONCLUSIONES – CONCLUSIONS	155
1.- CONCLUSIONES	157
2.-CONCLUSIONS	159
VII.- RESUMEN – SUMMARY	161
1.- RESUMEN	163
2.- SUMMARY	165
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXOS	187

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Representación química de las tres fases que componen el mecanismo de reacción de la PEPC	4
Figura 2.- Modelo tridimensional de la PEPC C <sub>4</sub> de maíz	6
Figura 3.- Esquema de la ruta C <sub>4</sub> en el subtipo fisiológico NADP <sup>+</sup> -enzima málico	8
Figura 4.- Filogenia de los genes de PEPC en sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> ), arroz ( <i>Oriza sativa</i> ) y maíz ( <i>Zea mays</i> )	11
Figura 5.- Regulación de la PEPC por fosforilación reversible en plantas C <sub>4</sub>	16
Figura 6.- Distribución y número de genes de proteasas en arroz y Arabidopsis	23
Figura 7A.- Mecanismo catalítico general de las proteasas	23
Figura 7b.- Implicación de las proteasas en la fisiología y desarrollo de plantas	27
Figura 8.- A) Estructura general de los fosfolípidos y posiciones sujetas a acción de fosfolipasas. B) Estructura y composición del ácido fosfatídico (PA)	31
Figura 9.- Síntesis y atenuación del ácido fosfatídico	33
Figura 10.- Purificación de la PEPC de hojas de sorgo de oscuridad por cromatografía de intercambio iónico	66
Figura 11. Inhibición de la actividad PEPC en presencia del péptido C19	67
Figura 12. Efecto del péptido C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC en presencia de G6P ó PEP	69
Figura 13. Desaparición de la PEPC por incubación con el péptido C19 y efecto de la G6P	70
Figura 14.- Efecto de los péptidos L1, L2 y L3 sobre la PEPC	71
Figura 15.- Efecto de los péptidos C15 y C19 mutado sobre la PEPC-OH semipurificada	73

Figura 16. La desaparición de la PEPC no media a través de la formación de un macroagregado	74
Figura 17. El péptido C-19 no provoca la precipitación de la PEPC	75
Figura 18. Análisis de la actividad proteasa contenida en la fracción de PEPC-OH semipurificada	77
Figura 19. La PEPC electroeluída no se proteoliza <i>in vitro</i> en presencia del péptido C19	78
Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad proteasa C19 en presencia del péptido C19	79
Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad proteasa en ausencia del péptido C-19	80
Figura 22. Constante de activación ( $K_a$ ) de la proteasa C19 por el péptido C19	81
Figura 23.- Efecto del EGTA sobre la actividad proteasa C19	81
Figura 24.- Estimulación de la actividad proteasa C19 por SDS	82
Figura 25.- Análisis de la presencia de actividad proteasas C19 en fracciones de PEPC semipurificada de luz y oscuridad	84
Figura 26.- Determinación de la sensibilidad de la proteasa C19 a distintos inhibidores	86
Figura 27.- Purificación de la proteasa C19 por cromatografía de afinidad en una matriz con péptido C19 inmovilizado	89
Figura 28. Efecto de los anticuerpos APS-IgGs, PEPC C <sub>4</sub> -IgGs y C19-IgGs sobre la degradación de la PEPC en presencia del péptido C19	91
Figura 29. Efecto del péptido N-terminal sobre la proteólisis de la PEPC en presencia del péptido C19	91
Figura 30.- Ensayo de actividad proteasa C19 en presencia de los péptidos N-terminales desfosforilado (N-t-OH) y fosforilado (N-t-OP)	94
Figura 31.- La PEPC fosforilada (PEPC-OP) con PKA es más resistente a la proteólisis	97
Figura 32.- Efecto de la fosforilación de la PEPC procedente de extractos crudos de hojas de sorgo sobre la actividad proteasa C19	98

Figura 33.- Efecto del pH de incubación y del estado de fosforilación sobre la accesibilidad de extremo C-terminal de la PEPC	102
Figura 34.- Efecto del estado rédox de la PEPC sobre la exposición del C-terminal	104
Figura 35.- Grado de accesibilidad del C-terminal de la PEPC semipurificada en presencia de G6P	106
Figura 36.- Accesibilidad del C-terminal de la PEPC en extractos crudos de luz y de oscuridad	107
Figura 37.- Efecto de la G6P sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de extractos crudos	109
Figura 38.- Efecto del PA sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de una fracción de PEPC semipurificada	112
Figura 39.- Efecto del PA sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad	112
Figura 40.- Efecto del PA (8:0) ó (18:1) sobre la proteólisis de la PEPC semipurificada	115
Figura 41.- La PEPC se proteoliza en ausencia de PA	117
Figura 42.- Efecto de la concentración de PA sobre la proteólisis de la PEPC	119
Figura 43.- Inhibición de la proteólisis por los anticuerpos C19-IgGs	121
Figura 44.- Efecto del tiempo de calentamiento en la disociación de la banda de alto peso molecular	121
Figura 45. Análisis de los fragmentos proteolíticos mediante western blot	123
Figura 46.- Efecto de los péptidos N-terminales (OH y OP) sobre la inhibición de la actividad catalítica de la PEPC-C <sub>4</sub> producida por PA	124
Figura 47.- Efecto de los péptidos N-terminales (OH y OP) sobre la proteólisis de la PEPC-C <sub>4</sub> activada por PA	125
Figura 48.- Fosforilación <i>in vitro</i> del péptido N-terminal	130
Figura 49.- Efecto del péptido C19 sobre la fosforilación <i>in vitro</i> del péptido N-terminal por una fracción quinasa Ca <sup>2+</sup> independiente	131
Figura 50.- Fosforilación del péptido C19	133

Figura 51.- Regulación de la proteólisis de la PEPC a través de la accesibilidad de su extremo C-terminal	147
Figura 52.- Regulación de la fosforilación y de la proteólisis de la PEPC por su extremo C-terminal	147
Figura 53.- El ácido fosfatídico promueve la degradación de la PEPC C <sub>4</sub> en presencia de PA, posible mecanismo de acción	150

## ABREVIATURAS Y SIGLAS.

Las abreviaturas y siglas utilizadas en este trabajo se especifican a continuación. Para los nombres y símbolos utilizados, se ha elegido el sistema internacional de Unidades. Las sustancias químicas se han denominado según el sistema de nomenclatura de la IUPAC.

(p/v)	Relación peso/volumen
(v/v)	Relación volumen/volumen
$\mu\text{Ci}$	Microcurio
$\mu\text{E}$	Microeinstein
$\mu\text{g}$	Microgramos
$\mu\text{M}$	Micromolar
$^{32}\text{P}$	Isótopo fósforo 32
3PGA	Ácido 3-fosfoglicérico
ABA	Ácido Abscísico
ADP	Adenosina difosfato
AEBSF	(4-(2-aminoetil)benzeno sulfonil fluoride
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
AP <sub>5</sub> A	Diadenosina-5' pentafosfato pentaamonio
APS-IgG	Anticuerpos específicos dirigidos contra el sitio de fosforilación de la PEPC C <sub>4</sub> de sorgo
APS-IgGs	Anticuerpos dirigidos contra el sitio de fosforilación de la PEPC C <sub>4</sub> de sorgo
Arg	Arginina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Asn	Asparraguina
ATP	Adenosina trifosfato
C19-IgGs	Anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de la PEPC C <sub>4</sub> de sorgo
C <sub>3</sub>	Especie cuyo primer producto fotosintético estable posee 3 átomos de carbono
C <sub>4</sub>	Especie cuyo primer producto fotosintético estable posee 4 átomos de carbono
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Fosfato cálcico
CaCl	Cloruro cálcico
CAM	Especie que presenta metabolismo ácido de las crasuláceas
CDPK	Proteínas quinasas de plantas dependientes de calcio
Ci	Curio
cm	Centímetro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
C-terminal	Carboxilo terminal
Cys	Cisteína
DAG	Diacilglicerol
DGK	Diacilglicerol quinasa
DGPP	Diacilglicerol pirofosfato
DPDS	2,2'-Dipiridil disulfuro

DPP	Diacilglicerol pirofosfato fosfatasa
DTT	Ditiotreitol
E-64	L-trans-3-carboxoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine; N-(trans-epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide; tran-epoxy-succinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butano
EC	Extractos crudos
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético
FP1	Fracción proteasa 1
FP2	Fracción proteasa 2
g	Gramo
g	Aceleración gravitacional
G6P	Glucosa 6-fosfato
Gly	Glicina
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion bicarbonato
Hepes	Ácido N-(2.hicroxietil)piperacina-N´-(2-etanosulfónico)
IA	Yodoacetato
IC <sub>50</sub>	Concentración del inhibidor requerida para reducir al 50% la actividad enzimática
IgGs	Inmunoglobulinas G
IP3	Inosito-1,4,5-trifosfato
IP6	Inositol-hexakisfosfato
Ka	Constante del activador
KDa	Kilodalton
KF	Fluoruro de potasio
Ki	Constante del inhibidor
Km	Constante de Michaelis-Menten
KOH	Hidróxido de potasio
M	Molar
m	Metro
M & M	Materiales y Métodos
M & M	Materiales y métodos
mA	Miliamperios
MDa	Megadalton
MDH	Malato deshidrogenasa
MES	2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid
Met	Metionina
mg	Miligramo
Mg <sup>2+</sup>	Ión Magnesio
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de Magnesio
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MW	Marcadores de peso molecular
N <sub>2</sub>	Nitrógeno gaseoso
NaCl	Cloruro Sódico

NADH	Nicotina adenina dinucleótido reducido
NAD-ME	Subtipo fisiológico de plantas C <sub>4</sub> , cuya enzima descarboxiladora es la NAD-enzima málico
NADPH	Nicotina adenina dinucleótido (fosfato) reducido
NADP-ME	NADP-enzima málico
NADP-ME	Subtipo fisiológico de plantas C <sub>4</sub> , cuya enzima descarboxiladora es la NADP-enzima málico
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato sódico
NaOH	Hidróxido de sodio
Nm	Nanómetro
nmoles	Nanomoles
N-terminal	Amino terminal
N-t-OH	Péptido N-terminal defosforilado
N-t-OP	Péptido N-terminal fosforilado
OAA	Ácido Oxalacético
°C	Grados centígrados
p/v	Relación peso/volumen
PA	Ácido fosfatídico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAK	Ácido fosfatídico quinasa
PAP	Ácido fosfatídico fosfatasa
PBS	Tampón fosfato salino
PCK	Subtipo fisiológico de plantas C <sub>4</sub> , cuya enzima descarboxiladora es la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PDK <sub>1</sub>	Proteína quinasa dependiente de inositol 1
PEG	Polietilenglicol
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPC C <sub>4</sub> -IgGs	Anticuerpos dirigidos contra la PEPC C <sub>4</sub> de sorgo
PEPC-OH	Fosfoenolpiruvato carboxilasa defosforilada
PEPC-OP	Fosfoenolpiruvato carboxilasa fosforilada
PEPC-quinasa	Fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa
Péptido C15	Es el péptido C19 sin los cuatro últimos aminoácidos (QNTG)
Péptido C19	Péptido sintético que codifica los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC C <sub>4</sub> de sorgo
pHMB	p-hidroximercuribenzoato
Pi	Fosfato inorgánico
PIP	Fosfatidilinositol fosfato
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PI-PLC	Fosfolipasa C dependiente de inositol
PKA	Subunidad catalítica de la quinasa dependiente de AMPc de mamíferos
PLA	Fosfolipasa A
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PM	Peso molecular
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
PP2A	Proteína fosfatasa de tipo 2 <sup>a</sup>
PPDK	Piruvato ortofosfato diquinasa
ppm	Partes por millón

Pro	Prolina
PVP	Polivinilpirrolidona
Rpm	Revoluciones por minuto
Rubisco	Ribulosa 1,5-bifosfato
s	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS
Ser	Serina
TBS	Tampón Tris salino
TEMED	N,N,N',N'-tetanmetil-etilen-diamida
TGM	Tampón Tris-glicina-metanol
Thr	Treonina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U	Unidad de actividad enzimática
Uv	Ultravioleta
V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
Var.	Variedad
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima

#### AMINOACIDOS

Abreviación	Aminoácido
A	<i>Ala</i> Alanina
C	<i>Cys</i> Cisteina
D	<i>Asp</i> Ac. Aspartico
E	<i>Glu</i> Ac. Glutamico
F	<i>Phe</i> Fenilalanina
G	<i>Gly</i> Glicina
H	<i>His</i> Histidina
I	<i>Ile</i> Isoleucina
K	<i>Lys</i> Lisina
L	<i>Leu</i> Leucina
M	<i>Met</i> Metionina
N	<i>Asn</i> Asparragina
P	<i>Pro</i> Prolina
Q	<i>Gln</i> Glutamina
R	<i>Arg</i> Arginina
S	<i>Ser</i> Serina
T	<i>Thr</i> Treonina
V	<i>Val</i> Valina
W	<i>Trp</i> Triptofano
Y	<i>Tyr</i> Tirosina



## *INTRODUCCIÓN*



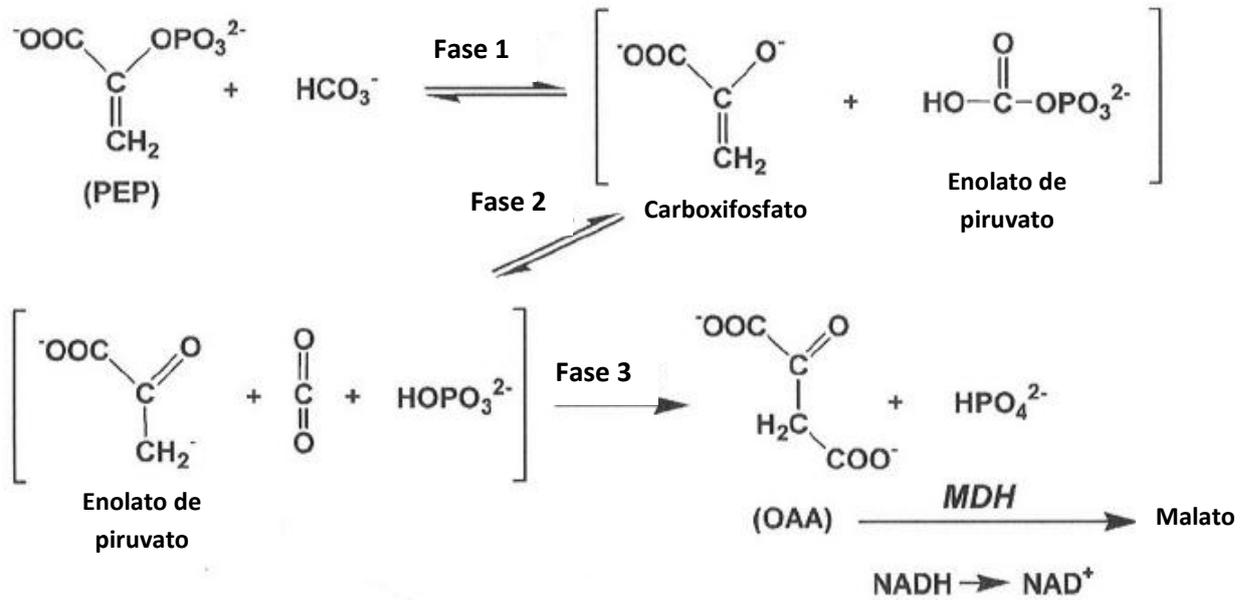
## **I.- INTRODUCCIÓN**

### **1.- FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA.**

La fosfoenolpiruvato carboxilasa es una enzima citosólica ampliamente distribuida en plantas, algas verdes y microorganismos, aunque está ausente en animales y levaduras (Chollet *et al.*, 1996; Izui *et al.*, 2004). En plantas superiores, la PEPC se localiza en hojas, raíces, nódulos y semillas, aunque existen diferentes isoenzimas de la proteína (O'Leary, 1982).

La PEPC fue caracterizada por primera vez en hojas de espinaca en 1953, considerándose durante mucho tiempo como una carboxilasa de plantas con función secundaria respecto a la Rubisco (Bandurski y Greiner, 1953). Sin embargo, el descubrimiento de la fotosíntesis C<sub>4</sub> y la implicación de una isoenzima específica de PEPC en esta ruta, aumentaron considerablemente el interés de esta enzima (Kluge, 1983; Hatch, 1992).

La fosfoenolpiruvato carboxilasa cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  y de un catión divalente, generalmente  $\text{Mg}^{2+}$ , para producir oxalacetato (OAA) y Pi (O'Leary, 1982). La reacción es altamente exergónica y estrictamente irreversible. El verdadero sustrato de la enzima es el bicarbonato y no el  $\text{CO}_2$  (Izui *et al.*, 2004). El mecanismo de reacción más aceptado actualmente disecciona la reacción en tres fases microreversibles (figura 1). En la primera fase se produce enolato de piruvato y carboxifosfato a partir de PEP y  $\text{HCO}_3^-$  en una reacción parcialmente reversible. En la segunda fase el enolato se isomeriza y el carboxifosfato se descompone en el sitio activo de la PEPC en  $\text{CO}_2$  y Pi. En la tercera y última fase el  $\text{CO}_2$  produce un ataque electrofílico al enolato para formar oxalacetato y liberar Pi, esta fase es irreversible. El oxalacetato es rápidamente reducido a malato por la malato deshidrogenasa en los subtipos fisiológicos NADP-ME y NAD-ME de plantas C<sub>4</sub> (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet., 1997; Izui *et al.*, 2004).



**Figura 1.- Representación química de las tres fases que componen el mecanismo de reacción de la PEPC.** Abreviaturas: OAA, Oxalacetato; MDH, malato deshidrogenasa (Adaptada de Izui *et al.*, 2004).

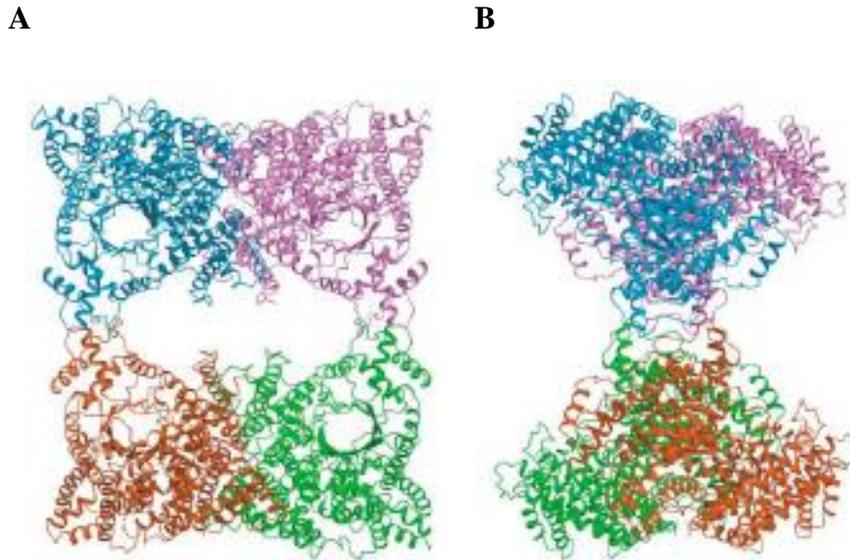
### 1.1.- Estructura.

La PEPC generalmente es un homotetrámero. La primera secuencia de aminoácidos de la PEPC se dedujo en 1984 a partir del gen *ppc* clonado de *E.coli* (Fujita *et al.*, 1984). En la actualidad se conocen más de 60 secuencias completas de PEPCs entre plantas y bacterias, incluyendo isoenzimas en el mismo organismo. El tamaño de las subunidades varía significativamente dependiendo del tipo de organismo: 870 aminoácidos (100 kDa) en bacterias, 970 aminoácidos (110 kDa) en plantas vasculares, 1010 aminoácidos (116 kDa) en cianobacterias y 1150 aminoácidos (134 kDa) en protozoos (Izui *et al.*, 2004). Actualmente se ha identificado y clonado un nuevo tipo de PEPC propia de arqueobacterias en *Sulfolobus solfataricus*, la cual presenta un tamaño muy pequeño (55-60 kDa) respecto a sus homólogas, distintas propiedades bioquímicas y está presente en la mayoría de los genomas secuenciados de arqueobacterias (Ettema *et al.*, 2004). Las PEPC de plantas se caracterizan por contener un dominio de fosforilación en una serina localizada en el extremo N-terminal de la proteína y un tetrapéptido (QNTG) crítico muy conservado en el extremo C-terminal (Izui *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2006). Sin embargo, en todas la plantas estudiadas hasta la fecha se ha localizado una enigmática PEPC de tipo bacteriano con un tamaño de 116-118 kDa, carente del dominio de fosforilación en el extremo N-terminal y con un tetrapéptido C-terminal de tipo procariota (R/K)NTG (Sánchez y Cejudo., 2003).

*In vitro*, la PEPC se presenta en forma de tetrámero, trímero, dímero ó monómero (Stiborova y Leblova, 1986). La forma tetramérica es la más abundante y catalíticamente la más activa, mientras que el monómero carece de actividad (Walker *et al.*, 1986; McNaughton *et al.*, 1989; Jawali, 1990; Willeford *et al.*, 1990). Recientemente, se ha descrito un nuevo tipo de PEPC en el endospermo de semillas de ricino de estructura heterooctamérica formada por la unión de isoformas de plantas e isoformas bacterianas en una relación estequiometría de 1:1 (O'Leary *et al.*, 2009).

Mediante análisis por cristalografía de Rayos X se han obtenido las estructuras tridimensionales de la PEPC de *E.coli* y la PEPC de tipo C<sub>4</sub> en maíz, mostrando que la estructura está muy bien conservada entre ambas isoenzimas. Ambas enzimas están compuestas por cuatro subunidades idénticas que se organizan como un dímero de dímeros y todos los determinantes estructurales importantes son semejantes entre las dos enzimas (figura 2). Sin embargo, existe una gran diferencia entre ambas isoformas y

es la ausencia del dominio de fosforilación en la PEPC bacteriana (Vidal y Chollet, 1997; Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002). Esta diferencia es muy importante, pues las PEPCs de plantas están fuertemente reguladas por fosforilación reversible en un residuo de serina localizado en el extremo N-terminal de la enzima del que carece la isoenzima bacteriana (Echevarría y Vidal., 2003.; Sánchez y Cejudo 2003).



**Figura 2.- Modelo tridimensional de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz.** Diferentes vistas de la estructura del homotetrámero. Cada subunidad presenta un color diferente. La figura B esta girada 90° en el eje vertical respecto a la figura A. (Adaptado de Matsumura *et al.*, 2002)

## 1.2.- Funciones.

### 1.2.1.- La PEPC en la fotosíntesis de tipo C<sub>4</sub> y CAM.

La PEPC es una enzima clave en el metabolismo del carbono en plantas C<sub>4</sub> y CAM.

Todos los eucariotas fotosintéticos reducen el CO<sub>2</sub> fotosintético a carbohidratos mediante el ciclo de Calvin o ciclo C<sub>3</sub>, cuya primera reacción es catalizada por la ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (Rubisco), generando como primer producto estable un compuesto de tres átomos de carbono denominado ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) (Hatch y Slack, 1970). Sin embargo, en plantas C<sub>4</sub> y CAM la primera fase en la asimilación fotosintética de CO<sub>2</sub> es catalizada por la isoenzima fotosintética de PEPC, que es muy abundante y exclusiva de las células del mesófilo. El producto de la

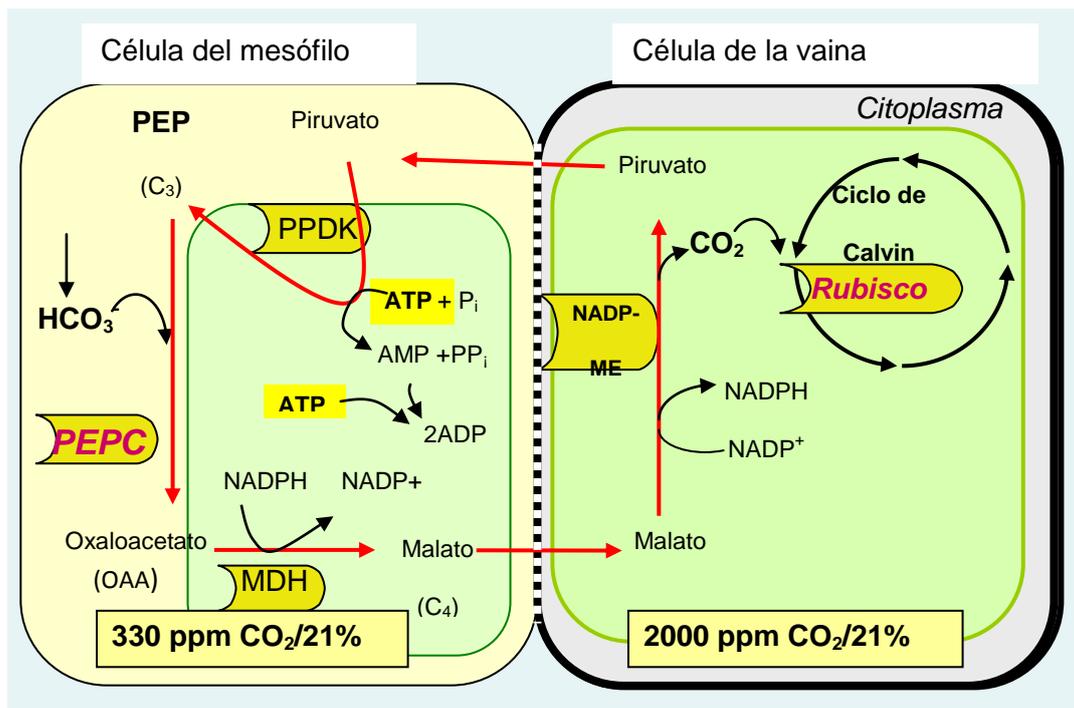
reacción catalizada por la PEPC (ácido de 4 carbonos) es posteriormente descarboxilado generando un compuesto de 3 átomos de carbono y CO<sub>2</sub> libre que sirve como sustrato para la fijación secundaria de CO<sub>2</sub> por la Rubisco (Gil, 1995). En las plantas CAM se produce una separación temporal entre ambas carboxilaciones, mientras que en plantas C<sub>4</sub> la separación es espacial, pues las carboxilaciones suceden en tipos celulares diferentes, el mesófilo y la vaina. Este ciclo adicional actúa como un mecanismo concentrador de CO<sub>2</sub>, lo que reduce la fotorrespiración y el gasto energético asociado, además de aumentar el rendimiento fotosintético y conseguir mayores eficiencias en el uso del agua y los nutrientes (Edwards *et al.*, 2001; Nimmo, 2000). Especialmente el metabolismo CAM es una adaptación a ambiente muy áridos (Nimmo, 2000). La adquisición de esta nueva estrategia fotosintética por una amplia variedad de especies filogenéticamente muy distintas, indica que se ha originado de forma independiente y en muchas ocasiones diferentes durante la evolución de las plantas con flor (Lepiniec *et al.*, 1994).

En plantas C<sub>4</sub> la separación espacial de los sucesos de carboxilación da lugar a una anatomía foliar característica denominada anatomía Kranz o en corona, donde las células del mesófilo se disponen formando una corona concéntrica alrededor de las células de la vaina (Haberlandt, 1884).

En la ruta C<sub>4</sub>, la fijación primaria de CO<sub>2</sub> es catalizada por la PEPC rindiendo ácido oxalacético (OAA), el cual es rápidamente reducido a malato por la enzima NADP-malato deshidrogenasa en los cloroplastos de la célula del mesófilo, o transaminado a aspartato en el citosol por la aspartato-transaminasa, dependiendo de la especie C<sub>4</sub>. Posteriormente, los ácidos C<sub>4</sub> (malato ó aspartato) son transportados a las células de la vaina, donde son descarboxilados, liberándose el CO<sub>2</sub> en el interior de estas células. La reacción de descarboxilación pueden llevarla a cabo tres enzimas distintas que definen los tres subtipos fisiológicos de plantas C<sub>4</sub>, la NADP<sup>+</sup>-enzima málico (tipo NADP-ME), la NAD<sup>+</sup>-enzima málico (tipo NAD-ME) ó la PEP-carboxiquinasa (tipo PCK) (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Nuestra planta modelo, el sorgo (*Sorghum bicolor*), pertenece al subtipo NADP-ME y por tanto el primer producto estable es el malato que en las células de la vaina es descarboxilado por la NADP<sup>+</sup>-enzima málico. El CO<sub>2</sub> liberado en la reacción es fijado por la Rubisco, y el piruvato regresa a los cloroplastos de las células del mesófilo para regenerar el aceptor primario, el PEP, por acción de la piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) (figura 3).

Estas modificaciones en el metabolismo fotosintético confieren a las plantas C<sub>4</sub> una serie de propiedades que en conjunto se denominan síndrome Kranz, entre las que destacan: bajos niveles de tasas mesurables de fotorrespiración, un punto de compensación fotosintética de CO<sub>2</sub> mínimo, insensibilidad de la fotosíntesis a las variaciones en las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> e insaturación de las tasas fotosintéticas por la intensidad lumínica. Además, sus enzimas tienen elevados óptimos térmicos y son plantas con una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno y del agua en comparación con las plantas C<sub>3</sub> (Gil, 1995).

Este conjunto de características determina que entre estos vegetales se encuentren las especies más productivas (Bjorkhan, 1976; Caballero *et al.*, 1978; Gil *et al.*, 1978; Caballero, 1981; Ehleringer y Pearcy, 1983).



**Figura 3.-** Esquema de la ruta C<sub>4</sub> en el subtipo fisiológico NADP<sup>+</sup>-enzima málico. Abreviaturas: PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; OAA, ácido oxalacético; MDH, NADPH-malato deshidrogenasa; NADP-ME, NADP<sup>+</sup>-enzima málico; Rubisco, ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa; PPDK, piruvato ortofosfato diquinasa; PEP, fosfoenolpiruvato.

*1.2.2.- La PEPC en otros contextos fisiológicos.*

Además de su implicación directa en la fotosíntesis C<sub>4</sub> y CAM, la PEPC tiene una multiplicidad de funciones en las células de diferentes tejidos, pues se puede localizar actividad PEPC en hojas, raíces, semillas e incluso en nódulos (O'Leary, 1982). Esta naturaleza ubicua de la enzima se justifica, probablemente, por la naturaleza de su producto final estable el L-malato, que puede ser usado como fuente de carbono y poder reductor en numerosas vías metabólicas.

Debido a la baja K<sub>m</sub> por el sustrato bicarbonato (en el rango de μmolar), esta enzima interviene, como función general, en la economía del carbono de la célula, recapturando el CO<sub>2</sub> respiratorio. La PEPC participa en multitud de contextos fisiológicos destacando el movimiento estomático (Outlaw, 1990), la homeostasis del pH celular, la absorción y transporte de cationes en las raíces (Ben-Zioni *et al.*, 1970). También interviene en la fijación del nitrógeno atmosférico por leguminosas, en la interacción del tubo polínico y el estilo, en la maduración y germinación de la semilla y en la maduración del fruto (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui, 2004). Además, la PEPC tiene una función anaplerótica consistente en la reposición de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos o ciclo de Krebs, cuando la demanda de esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos es alta (Huppe y Turpin, 1994). Esta función es especialmente importante en tejidos no fotosintéticos (Latzko y Kelly, 1983). Los ácidos orgánicos procedentes de ciclo de Krebs son transportados desde la mitocondria al estroma del cloroplasto o al citosol para la asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por la glutamina y glutamato sintetasa del ciclo GS/GOGAT, produciendo una reducción en la tasa de regeneración de OAA y/o malato en la mitocondria que es suplida por la PEPC a través de su función anaplerótica (Azcón-Bieto y Talón, 2008). Por otro lado, el OAA producido por la PEPC puede ser usado por la lanzadera OAA/malato mitocondrial o cloroplástica para transportar hasta el citosol el poder reductor requerido por la nitrato reductasa (Oaks, 1994). Varios estudios han puesto en evidencia una coordinación entre el metabolismo del carbono y el del nitrógeno finamente regulado para mantener una adecuada relación carbono/nitrógeno y se observa que en plantas tratadas con NO<sub>3</sub><sup>-</sup> se produce un aumento en la fosforilación de la enzima, la activación de la enzima y una disminución de la sensibilidad al L-malato (Van Quy y Champigny, 1992; Rajagopalan *et al.*, 1994).

También se observa una clara relación entre la actividad PEPC y la actividad glutamina sintetasa controlada a través de los niveles de glutamina (Dever *et al.*, 1995).

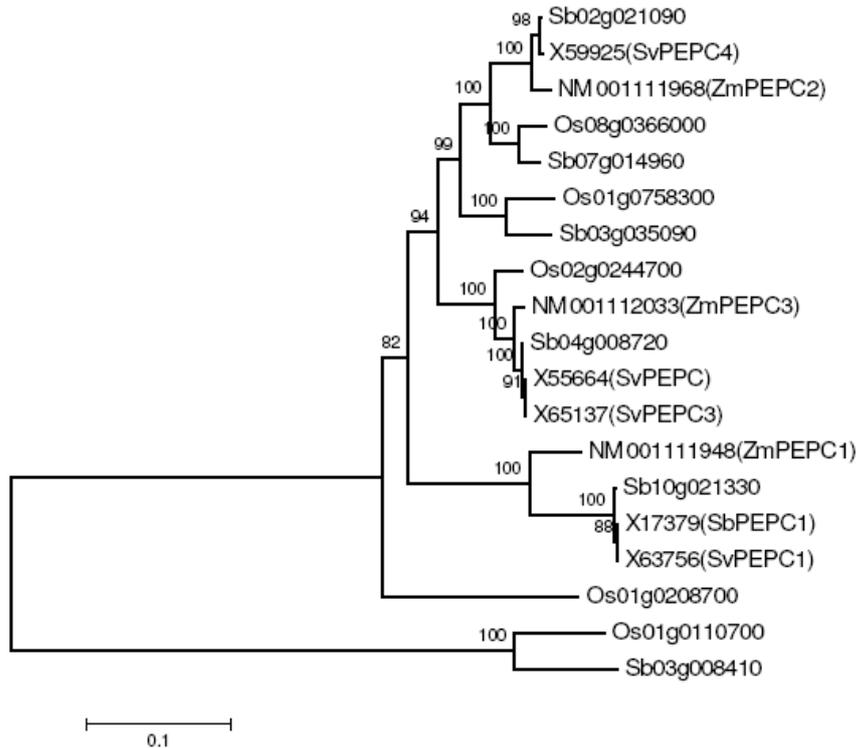
La función anaplerótica no es exclusiva de plantas C<sub>3</sub> sino que también puede ocurrir en plantas C<sub>4</sub> como es el caso descrito en el alga verde, *Dunaliella salina* (Giordano, 2001).

### 1.3.- Familia génica de la PEPC.

La PEPC constituye una pequeña familia multigénica reflejo de la diversidad funcional de la enzima. Se han caracterizado isoformas tanto fotosintéticas como no fotosintéticas en varios tipos de plantas (Lepiniec *et al.*, 1994; Toh *et al.*, 1994).

Recientemente se ha secuenciado el genoma completo del sorgo (*Sorghum bicolor*) y se han detectado 6 genes que codifican para diferentes isoformas de PEPC. (Paterson *et al.*, 2009). El gen *Sb10g021330* codifica para la isoenzima C<sub>4</sub> o fotosintética y el gen *Sb03g008410* codifica para la isoenzima bacteriana que es la que está evolutivamente más separada del resto. Los cuatro genes restantes codifican para isoenzimas de tipo C<sub>3</sub>, dos de los cuales están bien caracterizadas: el *Sb02g021090* que codifica para un isoenzima de tipo C<sub>3</sub> que se expresa constitutivamente y el *Sb04g008720* que codifica para una PEPC de tipo C<sub>3</sub> específica de raíz cuya expresión es inducible. Los otros dos genes *Sb03g035090* y *Sb07g014960* se han descubierto recientemente por homología con genes de PEPC de tipo C<sub>3</sub> de arroz por lo que no están bien descritos (figura 4) (Paterson *et al.*, 2009; Lepiniec *et al.*, 2003).

La isoforma de PEPC C<sub>4</sub> y las caracterizadas de tipo C<sub>3</sub> tienen estructuras primarias y propiedades funcionales y regulatorias similares por lo que la diferencia entre ellas se establece a nivel de expresión. La isoenzima bacteriana es la que presenta mayor divergencia respecto a sus homólogas ya que, carece del extremo N-terminal donde se localiza el dominio de fosforilación y por tanto, de regulación por fosforilación (Lepiniec *et al.*, 1994; Sánchez y Cejudo., 2003).



**Figura 4.- Filogenia de los genes de PEPC en sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oriza sativa*) y maíz (*Zea mays*).** “Sb” indica genes de *Sorghum bicolor*, “Sv” indica genes de *Sorghum vulgare*, “Os” indica genes de *Oriza sativa* y “Zm” indica genes de *Zea mays*. El árbol filogenético fue realizado por el método de Neighbor-Joining (Adaptado de Paterson *et al.*, 2009)

#### 1.4.- Regulación de la actividad PEPC.

En la regulación de la actividad PEPC se establecen principalmente dos niveles de control, uno a nivel transcripcional y otro a nivel postraduccional.

##### 1.4.1.- Regulación transcripcional.

La PEPC está regulada a nivel transcripcional por varios factores, destacando la luz como uno de los principales y mejor conocidos. La regulación transcripcional de la PEPC por luz está mediada por el fitocromo y se produce en la transición de planta etiolada a planta verde. Esta respuesta no se restringe a plantas  $C_4$  sino que también se observa en plantas  $C_3$  aunque de forma más moderada (Thomas *et al.*, 1990; revisado

por Lepiniec *et al.*, 2003; Matsuoka y Yamamoto, 1989). La luz también afecta a la fluctuación circadiana de los niveles de ARNm de PEPC, sin embargo estas fluctuaciones no se ven reflejadas en la cantidad de proteína que se mantiene constante (Thomas *et al.*, 1990).

Otros factores ambientales como temperatura, salinidad, estrés hídrico ó la aplicación exógena de ABA aumentan la expresión de la PEPC en la planta CAM facultativa *Mesembryanthemum crystallinum* (Herppich *et al.*, 1992). En esta planta CAM el fitocromo también participa en la expresión de la PEPC (Cushman y Bohnert, 1999).

En plantas de tipo C<sub>3</sub> *Hordeum vulgare* (cebada), el estrés salino y el ABA reducen la asimilación de CO<sub>2</sub>, el contenido en clorofilas, proteínas y la actividad Rubisco, por el contrario, la actividad PEPC se estimula (Popova *et al.*, 1995). En plántulas de trigo (*Triticum aestivum*) el tratamiento con NaCl y LiCl, además de otros estreses como hipoxia o frío, también provocan un aumento en la expresión de PEPC en la raíz, aunque se desconoce si el ABA interviene en este efecto (Gonzalez *et al.*, 2003).

Finalmente otras hormonas como citoquininas, en conjunción o no con la nutrición nitrogenada, pueden modificar la expresión de la PEPC (Peters *et al.*, 1997).

#### *1.4.2.- Regulación postraducciona.*

##### *Regulación por metabolitos, pH, estado oligomérico y estado rédox.*

La mayoría de las PEPCs están sujetas a regulación alostérica, por una amplia variedad de metabolitos fotosintéticos. Las PEPCs de plantas dicotiledóneas son activadas por glucosa 6-fosfato (G6P) e inhibidas por L-malato o aspartato. En plantas monocotiledóneas, además de los metabolitos citados anteriormente, la glicina y la alanina son activadores (Tovar-Méndez *et al.*, 2000; Izui *et al.*, 2004). Por el contrario, la PEPC de *E. coli* presenta una regulación más compleja, siendo activada por acetil-coenzima A, fructosa 1,6-bifosfato, ácidos grasos de cadena larga y guanosina 3'-difosfato 5'-difosfato, e inhibida por aspartato o L-malato. Además, la regulación por fosforilación reversible ausente en bacterias es inherente en plantas (Izui *et al.*, 2004).

El L-malato y el aspartato son efectores negativos de la actividad PEPC, especialmente a valores de pH subóptimos (del orden de 7,1 a 7,3), que se aproximan al valor de pH citosólico (Andreo *et al.*, 1987; Echevarría *et al.*, 1994). La G6P incrementa la  $V_{\max}$  de la PEPC, produciendo una bajada de la  $K_m$  para el PEP y reduciendo la sensibilidad de la enzima al L-malato. El L-malato interacciona con la enzima en diferentes puntos, produciendo una inhibición competitiva, no competitiva o mixta (Andreo *et al.*, 1987) dependiendo del pH, de la concentración y del estado de fosforilación de la PEPC (Echevarría *et al.*, 1994; Duff y Chollet, 1995).

A partir del estudio de la estructura tridimensional de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz se ha observado que en la zona de interacción entre las dos subunidades que conforman el dímero se localiza una región de alta densidad electrónica formada por cuatro residuos cargados positivamente (Arg183, Arg184, Arg231 y Arg372 de la subunidad vecina) y una molécula de sulfato. Este dominio parece tener especial relevancia en la regulación alostérica pues conforma un bolsillo que podría ser el sitio de unión para su activador alostérico la G6P ya que, la región comprendida entre los residuos 301 y 443 de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz se ha demostrado ser esenciales para la activación de la enzima por G6P. Además, se propone que la unión del sulfato en la interfaz del dímero parece producir cambios conformacionales globales en la estructura de la PEPC que afectan incluso al sitio activo de la enzima (Matsumura *et al.*, 2000)

La afinidad de la enzima por PEP y  $Mg^{2+}$  aumenta fuertemente entre pH 7 y 8, presentando un pH óptimo para la actividad de la enzima ensayada *in vitro* de pH 8. Los efectos de la G6P y el L-malato son mayores a pH subóptimos (cerca de 7), disminuyendo su efecto al aumentar el pH. Por lo tanto, *in vivo*, la actividad dependería del balance entre los efectores negativos y positivos de origen fotosintético y de la modulación de sus efectos por el pH citosólico (Gadal *et al.*, 1996). La mayoría de factores que interaccionan y actúan en la regulación de la PEPC (pH, G6P, fosforilación) son opuestos al efecto negativo ejercido por el L-malato (Jeanneau *et al.*, 2002).

La PEPC C<sub>4</sub> evolucionó a partir de formas ancestrales de tipo C<sub>3</sub> durante la evolución de las angiospermas, adquiriendo propiedades cinéticas y de regulación distintas a la de las isoformas C<sub>3</sub>. En maíz, existen dos isoformas de PEPC C<sub>3</sub>, una de las cuales es abundante en la raíz. La similitud entre la secuencia de aminoácidos de las

isoformas C<sub>4</sub> y la de raíz es del 77%. Sin embargo, los valores de K<sub>m</sub> de la forma C<sub>4</sub> para el PEP, Mg<sup>2+</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> a pH 7.3 es 30, 10 y 2 veces superior a los de la forma de raíz, respectivamente (Dong *et al.*, 1998).

La regulación de la actividad de la PEPC está influenciada por el estado oligomérico de la enzima, siendo el tetrámero la conformación óptima, seguida del dímero, y por último el monómero que carece de actividad. Los cambios en el estado de oligomerización se asocian a factores como la dilución de la enzima, cambios en la concentración de sales en el medio de ensayo, concentración de L-malato o baja temperatura (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, la contribución real de esta regulación a la actividad de la enzima *in vivo* no está clara en plantas C<sub>4</sub>. Por el contrario, en plantas CAM hay evidencias de que el tetrámero actuaría durante la fase nocturna asociado a la fase activa de fijación de CO<sub>2</sub> (Chollet *et al.*, 1996).

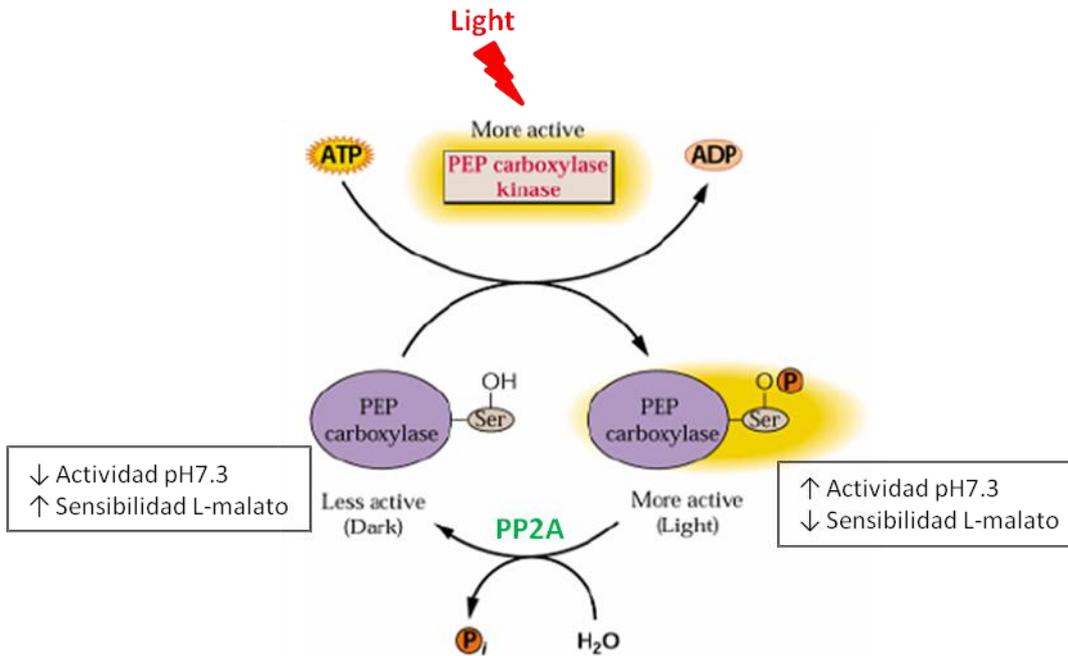
La abundancia de cisteínas (Cys) en la PEPC (7, en posiciones altamente conservadas) hace pensar que la actividad de la PEPC podría estar influenciada por el estado redox de la enzima (Chollet *et al.*, 1996). La Cys número 4 está conservada en todas las PEPCs, incluida las procariontas, sugiriendo una función especial para este residuo. Otras tres Cys están conservadas en la PEPC de plantas, y en la mitad amino terminal de la enzima hay otros tres residuos de Cys que parecen estar implicados en la asociación de las subunidades (Walker *et al.*, 1986; Jiao y Chollet., 1991; Weigend y Hinch, 1992). No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ninguna cascada de óxido-reducción tipo ferredoxina-tiorredoxina implicada en la regulación de la PEPC (Chollet *et al.*, 1996), a pesar de que actualmente se ha descrito varias tiorredoxina citosólicas como la mayoría de las tiorredoxinas h (Serrato *et al.*, 2002; Traverso *et al.*, 2008).

Recientemente, se ha descrito que productos como el DTT, mercaptoetanol o glutatión reducido, cambian débilmente la sensibilidad al malato *in situ*, sin embargo, ninguno de estos productos tiene efecto *in vitro*. Este efecto no se debe a ningún proceso mediado por tiorredoxina o dependiente de fosforilación. Debido a que el glutatión es un compuesto fisiológico que se encuentra en el citosol principalmente en estado reducido, diversos autores proponen que este compuesto tiólico podría contribuir a la protección de la enzima frente al málico (Pierre *et al.*, 2004).

Regulación de la PEPC por fosforilación reversible.

Todas las isoformas de PEPC de plantas, fotosintéticas y no fotosintéticas, a excepción de la PEPC de tipo bacteriano, están sometidas a regulación por fosforilación reversible en un residuo de serina (Ser 8 en PEPC C<sub>4</sub> de sorgo), localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La fosforilación la lleva a cabo una pequeña proteína con actividad quinasa conocida como PEPC-quinasa. La serina fosforilable reside en el motivo E/DR/KxxS\*IDAQL/MR, común a todas las enzimas de plantas secuenciadas hasta la fecha, pero ausente en las PEPC de bacterias (*E. coli*) y en la PEPC de tipo bacteriano de plantas (Chollet *et al.*, 1996; Kai *et al.*, 1999; Sánchez y Cejudo., 2003). Este hecho sugiere que la regulación de la enzima por fosforilación ocurre en los múltiples y diversos contextos fisiológicos donde la PEPC está involucrada.

El fenómeno de fosforilación reversible en la PEPC fue puesto en evidencia por primera vez en la PEPC de la planta CAM *Bryophyllum fedtschenkoi* (Nimmo *et al.*, 1984), y posteriormente en la PEPC de maíz (Budde y Chollet, 1986) y en la de sorgo (Guidici-Orticioni *et al.*, 1988). La fosforilación *in vivo* de la PEPC en plantas C<sub>4</sub> es dependiente de la intensidad lumínica (Echevarría *et al.*, 1990) mientras que en plantas CAM depende de un oscilador circadiano aun sin identificar (Nimmo, 2000). La fosforilación de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo produce un débil efecto sobre la K<sub>m</sub> de la PEPC, pero duplica la V<sub>max</sub>, aumenta 7 veces la K<sub>i</sub> para su inhibidor el L-malato y 4,5 veces la K<sub>a</sub> para la G6P, en condiciones de pH y concentración de PEP subóptimos (Echevarría *et al.*, 1994; Duff y Chollet, 1995). La PEPC es desfosforilada por una proteína fosfatasa de tipo 2A (PP2A) (Carter *et al.*, 1990). Las variaciones en el estado de fosforilación de la PEPC parecen ser consecuencia de fluctuaciones en la actividad PEPC-quinasa, ya que los niveles de actividad fosfatasa *in vitro* se mantienen relativamente constante en las transiciones luz-oscuridad (Echevarría *et al.*, 1990). Un factor muy importante a tener en cuenta cuando se estudia la relación entre la actividad PEPC-quinasa y el estado de fosforilación de la PEPC, es el control de la desfosforilación de la PEPC por las fosfatasas (Carter *et al.*, 1990; Mc Naughton *et al.*, 1991; Chollet *et al.*, 1996). Además, se ha demostrado que todos los metabolitos aniónicos que regulan la actividad PEPC (G6P, L-malato, PEP) inhiben a una fosfatasa de tipo 2A purificada a partir de hojas de maíz por interacción directa (Dong *et al.*, 2001).



**Figura 5.- Regulación de la PEPC por fosforilación reversible en plantas C<sub>4</sub>.** La luz produce un aumento de actividad PEPC-quinasa, la cual fosforila a la PEPC en una serina en el extremo N-terminal de la PEPC produciendo cambios en las propiedades cinéticas y de regulación de la enzima. La desfosforilación de la PEPC la realiza una fosfatasa de tipo 2A (PP2A) (Modificado de Fig. 12.49. Buchanan et al., 2001)

Los estudios de mutagénesis dirigida sobre una PEPC C<sub>4</sub> recombinante de sorgo, pusieron de manifiesto que el efecto de la fosforilación puede ser simulado por la introducción de una carga negativa, sustituyendo el residuo de serina por aspartato (S8D) en el extremo N-terminal de la proteína. La incorporación de una carga negativa en dicho dominio se traduce en un aumento de la velocidad catalítica y una disminución de la sensibilidad al L-Malato (Chollet *et al.*, 1996). La modificación de las propiedades funcionales de la PEPC también se consigue por la unión a la PEPC de anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo N-terminal que contiene la secuencia del sitio de fosforilación de la enzima C<sub>4</sub> de hojas de sorgo, denominados APS-IgG (Pacquit *et al.*, 1995). Estos anticuerpos provocan un cambio conformacional en la molécula que simula la fosforilación (Pacquit *et al.*, 1995). Otros tratamientos como la sustitución de un residuo básico situado 3 aminoácidos antes de la Ser por Asn, o la eliminación del péptido N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz con enteroquinasa mimetizan parcialmente el efecto de la fosforilación (Izui *et al.*, 2004).

Actualmente los resultados obtenidos sugieren que la isoenzima no fotosintética de la PEPC también está sometida a una regulación por fosforilación reversible similar a la de las isoenzimas C<sub>4</sub> y CAM (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). Diversos estudios *in vivo* con <sup>32</sup>P han demostrado la existencia de fosforilación reversible de la PEPC en una gran variedad de tejidos donde sólo se localiza la isoenzima no fotosintética, como por ejemplo en nódulos de raíces de soja (Zhang *et al.*, 1995), semillas de trigo y cebada (Osuna *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 1999., Feria *et al.*, 2008), frutos (Law y Plaxton, 1997) e incluso en la planta acuática *Egeria densa* (Casati *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2001). La inducción de la actividad quinasa en hojas iluminadas de plantas C<sub>3</sub> tiene características comunes a la de las enzimas C<sub>4</sub>, lo que sugiere la existencia de cadenas de transducción similares en ambos tipos de plantas (Duff y Chollet, 1995; Chollet *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996).

Por lo tanto, la fosforilación de la PEPC C<sub>4</sub> y CAM podría ejercer un efecto protector que contrarrestaría la inhibición metabólica de la PEPC, pudiéndose aplicar a cualquier contexto fisiológico donde la concentración del metabolito sea alta, en el caso de la PEPC C<sub>3</sub>, durante el flujo anaplerótico del carbono (Vidal *et al.*, 2002).

La PEPC C<sub>4</sub> se fosforila durante el día, mientras que en la PEPC de tipo CAM este fenómeno regulatorio ocurre de noche. Consecuentemente, en ambos casos, la fosforilación de la PEPC sucede durante la etapa activa de fijación primaria de CO<sub>2</sub> para la fotosíntesis. La fosforilación está regulada por la luz en la plantas C<sub>4</sub>, y por un oscilador circadiano en planta CAM (Nimmo, 2003). Sin embargo, hay evidencias que apoyan la existencia de múltiples factores que controlan la fosforilación reguladora de la PEPC como por ejemplo el estrés oxidativo o el estrés salino en plantas C<sub>4</sub> o la falta de CO<sub>2</sub> en plantas CAM (Echevarría *et al.*, 2001; Izui *et al.*, 2004).

Estudios recientes utilizando líneas transgénicas de la planta C<sub>4</sub> *Flaveria bidentis* carentes de actividad PEPC-quinasa demuestran que la fosforilación de la PEPC en la luz no es necesaria para alcanzar una eficiente fotosíntesis C<sub>4</sub> cuando las plantas son crecidas bajo condiciones controladas en invernadero (Furumoto *et al.*, 2007). Estos nuevos resultados ponen en duda la esencialidad de la fosforilación de la PEPC en el contexto fotosintético C<sub>4</sub>, adquiriendo especial relevancia los factores independientes de la luz que parecen regular la fosforilación de la PEPC lejos de las condiciones óptimas de cultivo.

### 1.5.- Papel regulador del extremo C-terminal de la PEPC.

En el extremo C-terminal de la PEPC existe un dominio muy conservado, incluso en la PEPC de procariotas, que abarca los últimos 20 aminoácidos de la proteína en dicho extremo (Lepiniec *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Gehrig *et al.*, 1998).

La estructura secundaria del extremo C-terminal es una larga  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -40) formada por 19 residuos (desde la Pro861 hasta la Met879 en la PEPC de *E. coli*) que se remata por un tetrapéptido final lineal (QNTG en la PEPC-C<sub>4</sub>). De los 19 residuos de la  $\alpha$ -hélice-40, 13 de ellos son hidrófobos en la PEPC de *E. coli* y 14 en la PEPC-C<sub>4</sub> de sorgo. Además, se ha descrito que esta  $\alpha$ -hélice se encuentra inmersa en un bolsillo hidrofóbico formado por varias  $\alpha$ -hélices de la parte C-terminal del barril- $\beta$  de la propia subunidad (Kai *et al.*, 1999).

En los últimos años, el grupo del Dr. Chollet ha desarrollado una línea de trabajo fundamentada en el estudio del papel regulador del extremo C-terminal de la PEPC, mostrando las primeras evidencias sobre la importancia de dicho dominio en el mantenimiento de la actividad y la estabilidad estructural de la enzima. Mediante la utilización de enzimas recombinantes de PEPC con el C-terminal truncado ellos han observado que la delección de los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal produce no sólo una pérdida total de la actividad sino que la cantidad de enzima acumulada en la línea transformante disminuye significativamente. Esto pone de manifiesto posibles problemas en el plegamiento o en la formación del tetrámero que altera la estabilidad de la proteína en las células transformadas. Sin embargo, la delección del tetrapéptido lineal conservado del extremo C-terminal (QNTG) no altera la acumulación de PEPC en los transformantes pero se pierde el 100% de la actividad de la enzima (Dong *et al.*, 1999). Además, recientemente han mostrado que el último aminoácido del extremo C-terminal que corresponde a una Glicina (Gly), muy conservada incluso en procariotas, es necesaria para alcanzar la máxima actividad catalítica (Xu *et al.*, 2006).

Resultados obtenidos en nuestro grupo han mostrado que un péptido sintético que contiene los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC (péptido C19), inhibe específicamente *in vitro* la fosforilación de la PEPC por la PEPC-quinasa,

siendo este efecto específico para la PEPC quinasa. Esto supone una nueva función del C-terminal que implicaría un control sobre la regulación de la PEPC por fosforilación reversible. Además, se pone en evidencia que en extractos crudos de hojas de sorgo la PEPC-C<sub>4</sub> puede presentar el C-terminal en dos estados conformacionales con distinto grado de accesibilidad, siendo la conformación más frecuente la menos accesible y que existe una interacción específica entre el extremo C-terminal hidrófobo de la PEPC y la PEPC-quinasa (Álvarez *et al.*, 2003).

## **2.- FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA QUINASA .**

La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPC-quinasa) es una proteína quinasa Ser/Thr que utiliza ATP como donador de fosfato. Fosforila a la PEPC en un residuo de serina (Ser 8 en la PEPC-C<sub>4</sub> de sorgo) en el extremo N-terminal de la proteína (Jiao *et al.*, 1991b).

La PEPC-quinasa es una proteína altamente específica, pertenece a la familia de las quinasas Ca<sup>2+</sup>/calmodulina dependientes (CDPK). Sin embargo, a diferencia de éstas, la PEPC-quinasa no posee ningún dominio de unión a Ca<sup>2+</sup> o secuencia autoinhibidora, así como motivos de fosforilación por otras proteínas quinasas (Echevarría y Vidal, 2003). Por lo tanto, su actividad es independiente de Ca<sup>2+</sup> y está constitutivamente activa. Es la proteína quinasa dependiente de ATP más pequeña conocida hasta la fecha (Hartwell *et al.*, 1999, revisado Hrabak *et al.*, 2003), con una masa molecular teórica de 31kDa.

A pesar que la especificidad de la PEPC-quinasa es alta, la PEPC C<sub>4</sub> purificada a partir de hojas de sorgo puede ser fosforilada *in vitro* por la subunidad catalítica de la quinasa de mamíferos dependiente de AMPc (PKA), la cual no está presente en plantas (Terada *et al.*, 1990).

### **2.1.- Familia génica de PEPC-quinasa.**

La PEPC-quinasa está formada por una familia multigénica con patrones de expresión específicos (Nimmo, 2003). Por comparación de secuencias de varias PEPC-quinasas se observa que los subdominios IV, V y VIA son muy variables mientras que

los subdominios X y XI están muy conservados y son propios de la PEPC-quinasa (Izui *et al.*, 2004).

En sorgo, se han descrito tres genes que codifican para la PEPC-quinasa llamados Sb04g036570 (*SbPPCK1*), Sb04g026490 (*SbPPCK2*), Sb06g022690 (*SbPPCK3*). Sólo los dos primeros están bien caracterizados pues el último se ha descrito recientemente a partir de la secuenciación del genoma del sorgo por comparación de secuencias con las PEPC-quinasas de maíz. El *SbPPCK1* induce su expresión drásticamente por luz y presenta un 92% de homología con el *ZmPPCK1* de maíz que se expresa en respuesta a luz en las células del mesófilo. El *SbPPCK2* muestra una menor respuesta a cambios luz-oscuridad y tiene un 90% de homología con el *ZmPPCK2* de maíz el cual se expresa en las células de la vaina. El *SbPPCK3*, recientemente descrito, está filogenéticamente más relacionado con el gen *ZmPPCK4* de maíz. Se piensa que los genes de sorgo se pueden expresar en el mismo sitio que sus homólogos en maíz pero actualmente se desconoce su localización celular (Shenton *et al.*, 2006; Paterson *et al.*, 2009).

## 2.2.- Regulación de la PEPC-quinasa.

La PEPC-quinasa está fundamentalmente regulada a nivel transcripcional (Hartwell *et al.*, 1999). En plantas C<sub>4</sub> la PEPC-quinasa se regula de forma circadiana por la intensidad lumínica. La cinética de aparición de la actividad PEPC-quinasa en la hoja de maíz (planta C<sub>4</sub>) es relativamente lenta, alcanzando su máxima actividad después de 90 minutos de iluminación (Echevarría *et al.*, 1990). La activación de la PEPC-quinasa por luz se produce a través de la síntesis *de novo* de la enzima, pues el proceso es inhibido por cicloheximida (Jiao *et al.*, 1991a; J., Bakrim *et al.*, 1992; Hartwell *et al.*, 1999).

Actualmente, la cadena de transducción de señales que desencadena la síntesis de PEPC-quinasa en hojas C<sub>4</sub>, implicaría los siguientes elementos:

- I). La luz, a una intensidad luminosa superior a  $200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .
- II). El 3-fosfoglicerato (3-PGA), producido en el ciclo de calvin (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996).
- III). La basificación del citosol (Pierre *et al.*, 1992).

- IV). Activación de una fosfolipasa C dependiente de inositol (PI-PLC) (Coursol et al., 2000).
- V). Apertura de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  del tonoplasto y activación de una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente (CDPK), con características de proteína quinasa C (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996; Coursol et al., 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Osuna et al., 2004).
- VI). Síntesis de la PEPC-quinasa.
- VII). Fosforilación de la PEPC, proceso regulado a su vez por metabolitos (G6P y L-malato) y por el pH (Giglioli-Guivarc'h et al., 1996).

Trabajos realizados en nuestro grupo han mostrado que en plantas de sorgo sometidas a estrés salino, la actividad quinasa está presente tanto en condiciones de luz como de oscuridad y que la PEPC-quinasa inducida en estas plantas es la PEPC-quinasa fisiológica (Echevarría et al., 2001). Además, se ha demostrado que es el componente iónico del estrés salino el que induce el aumento de actividad PEPC-quinasa y no el componente osmótico, y que las plantas de sorgo adaptadas a estrés salino presentarían un metabolismo fotosintético mixto entre  $\text{C}_4$  y CAM (García-Mauriño et al., 2003).

### **3.- PROTEASAS DE PLANTAS.**

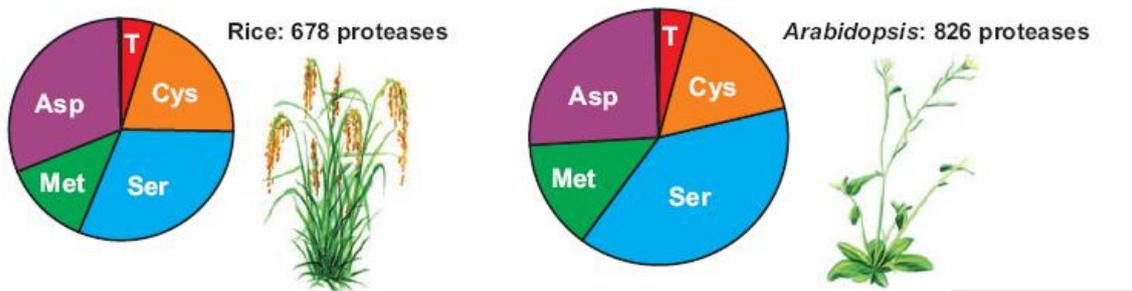
Las proteasas son responsables de la degradación de proteínas y están implicadas en una gran variedad de papeles reguladores dentro de un amplio rango de procesos fisiológicos esenciales para la vida de la planta entre los que destacan su desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis o la muerte celular programada (Coupe *et al.*, 2003; Van der Hoorn, 2008).

La proteólisis es un proceso indispensable para todos los organismos vivos. La mayoría de las proteínas celulares presentan una vida media menor que la del organismo y por tanto deben de ser degradadas y recicladas periódicamente, jugando las proteasas un papel esencial en este proceso. Las razones para esta costosa renovación de las proteínas es muy variada (Clarke, 2005).

La importancia de las proteasas ha sido puesta en evidencia recientemente con la concesión del premio nobel de medicina por trabajos relacionados con el sistema de degradación de proteínas mediado por ubiquitina en humanos. Sin embargo, el sistema ubiquitina/26S proteosoma está presente en todos los eucariotas, desempeñando también importantes funciones en plantas (Clarke, 2005).

Tradicionalmente, los estudios sobre proteólisis se centraban solamente en procesos fisiológicos relacionados con la agronomía, como la movilización de reservas durante la germinación o el reciclaje de proteínas durante la senescencia foliar. Actualmente, se ha comenzado a valorar la importancia de la degradación selectiva de proteínas en muchos procesos fisiológicos claves para la planta (Schaller, 2004).

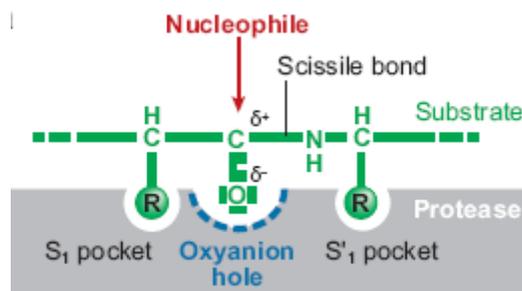
En la base de datos de proteasas MEROPS, las proteasas se subdividen en familias y clanes en base a sus relaciones filogenéticas (Rawlin *et al.*, 2010; Van der Hoorn, 2008). El genoma de *Arabidopsis* codifica para unas 800 proteasas distribuidas en unas 60 familias pertenecientes a unos 30 clanes diferentes. La distribución y el tamaño de la familias parece estar muy bien conservados dentro del reino vegetal porque analizando las proteasas del álamo o del arroz se observa que tiene un distribución similar a las proteasas de *Arabidopsis* (Van der Hoorn, 2008).



**Figura 6.- Distribución y número de genes de proteasas en arroz y Arabidopsis.** Además, se muestra la distribución dentro de cada especie de los diferentes tipos de proteasas. Abreviaturas: Asp, aspártico proteasas; Met, metaloproteasas; Ser, serin proteasas; Cys, cisteín proteasas; T, proteosoma (Modificado de Van der Hoorn, 2008).

### 3.1.- Mecanismo general de acción de las proteasas.

Las proteasas rompen los enlaces peptídicos tanto internamente (endoproteasas) como externamente (exoproteasas). El mecanismo de acción de todas las proteasas implica la unión de la proteína sustrato a unos bolsillos específicos en la proteasa por medio de uniones entre los residuos aminoacídicos, lo que implica una alta especificidad respecto a los sustratos. Posteriormente, una vez unida la proteína sustrato se produce una polarización del grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato por estabilización del oxígeno en un bolsillo oxianiónico de la proteasa, haciendo al átomo de carbono más vulnerable de ser atacado por un nucleófilo activado (figura 7A) (Van der Hoorn, 2008).



**Figura 7A.- Mecanismo catalítico general de las proteasas.** Abreviaturas: S pocket, dominios de reconocimiento del sustrato; R, residuos aminoacídicos; proteína sustrato (verde), proteasa (gris) (Modificado de Van der Hoorn, 2008).

### 3.2.- Clasificación y tipos de proteasas.

Según la base de datos sobre proteasas MEROPS, actualmente existen tres métodos para clasificar a las proteasas según distintos parámetros:

A) **En cuanto al tipo de reacción que catalizan.** Aunque todas las proteasas catalizan la misma reacción, ninguna es capaz de hidrolizar todas las uniones peptídicas mostrando una selectividad por las uniones que hidroliza. Una de las formas de especificidad es la rotura selectiva de las uniones peptídicas en función de su posición en la cadena polipeptídica. En base a esto se pueden diferenciar distintos grupos de proteasas (Rawlings *et al.*, 2010):

1.- Endoproteasas, rompen enlaces internos en la cadena polipeptídica.

2.- Exoproteasas, degradan la cadena polipeptídica desde los extremos. Las exoproteasas a su vez se clasifican en:

2.1.- Aminopeptidasas, hidrolizan residuos sencillos por el extremo amino terminal.

2.2.- Carboxipeptidasas, liberan residuos sencillos por el extremo carboxilo terminal.

3.- Dipeptidasa, hidroliza dipéptidos.

4.- Dipeptidil-peptidasa, hidroliza un dipéptido desde el extremo amino.

5.- Peptidil-dipeptidasa, hidroliza un dipéptido desde el extremo carboxilo.

6.- Tripeptidil-peptidasa, hidroliza un tripéptido desde el extremo amino.

B) **En cuanto al mecanismo catalítico y las características del sitio activo**, la clasificación sería (Rawlings *et al.*, 2010; Van der Hoorn., 2008; Schaller, 2004):

1.- Cisteín proteasas, se caracterizan por tener una cisteína en el sitio catalítico de la enzima, la cuál es responsable del ataque nucleofílico. Se inhiben en presencia de IA, quimostatina, pHMB, y se activan con agentes reductores (DTT, 2 $\beta$ -mercaptoetanol).

2.- Serín proteasas, posee residuos de serina en el sitio activo que actúan como nucleófilo. Constituyen el grupo de proteasas más numeroso de plantas con unos 200 miembros. El mecanismo catalítico es muy similar al de las cisteín proteasas con las que están evolutivamente muy relacionadas. Se inhiben en presencia de PMSF, quimostatina, aprotinina e inhibidores de tripsina.

3.- *Aspártico proteasas*, contienen en el centro activo dos residuos de aspartato los cuales actúan como soporte a la molécula de agua que actúa como nucleófilo durante la proteólisis. Son inhibidas a pH básico o en presencia de pepstatina A.

4.- *Metaloproteasas*, contienen en el sitio activo aminoácidos coordinados con cationes divalentes, normalmente zinc aunque también puede contener cobalto o manganeso. El ión metálico funciona en la catálisis activando a la molécula de agua responsable del ataque nucleofílico. Constituyen el grupo más diverso de proteasas tanto en estructura como en función. Se inhibe en presencia de agentes quelantes como el EDTA.

5.- *Glutámico proteasas*, constituyen un nuevo grupo descrito recientemente. Son proteasas ácidas con un residuo de glutámico en el sitio activo de la enzima.

### **C) Según su estructura molecular y el grado de homología.**

La clasificación de las proteasas en función de su estructura molecular y del grado de homología es el más novedoso de los tres métodos de clasificación utilizados actualmente ya que, éste depende de la disponibilidad de las secuencias de aminoácidos y de las estructuras tridimensionales de las proteasas. Este método fue diseñado por Rawlings y Barrett (1993), y se fundamenta en agrupar a las proteasas en familias y las familias en clanes. Las familias son grupos de proteasas que tienen cierto nivel de homología de secuencia. Los clanes son grupos de proteasas que presentan el mismo ancestro. La base de datos de proteasas MEROPS utiliza este sistema para clasificar a las enzimas (Rawlings et al., 2010).

A parte de estas proteasas las plantas poseen otro mecanismo de degradación de proteínas a través de la ruta ubiquitina/26S proteosoma. Esta ruta implica a la pequeña proteína ubiquitina y a un complejo proteolítico macromolecular (2 MDa) conocido como proteosoma 26S. Ésta es la principal ruta proteolítica en eucariotas estando implicada en la mayoría de los procesos fisiológicos de la plantas, localizándose su actividad en el citosol y en el núcleo. En Arabidopsis existen unos 1400 genes relacionados con esta ruta proteolítica y aproximadamente un 5 % del proteoma son componentes de la misma. El mecanismo de acción implica que la proteína ubiquitina ataca a proteínas destinadas a la degradación, marcándolas, posteriormente las proteínas

marcadas son reconocidas y catabolizadas por el proteosoma 26S (Viestra, 2009; Schaller, 2004; Smalle y Viestra, 2004).

### **3.3.- Funciones de las proteasas.**

El papel biológico de las proteasas en plantas es extraordinariamente diverso, estando íntimamente relacionado en muchos aspectos de la fisiología y desarrollo de la planta.

En plantas, las proteasas son necesarias para el recambio de proteínas, se estima que la mitad del contenido total de proteínas es renovado cada 4 a 7 días (Schaller, 2004).

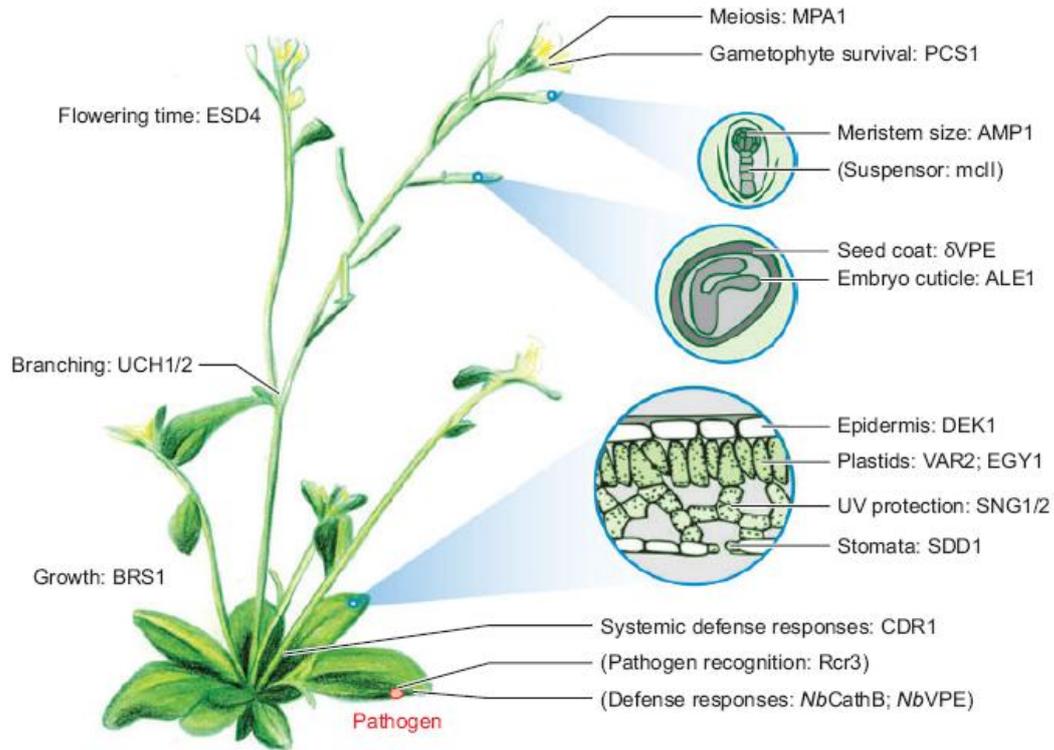
Las proteasas también son responsables de la degradación controlada de proteínas dañadas, mal plegadas o perjudiciales, además de proporcionar aminoácidos libres para la síntesis de nuevas proteínas (Van der Hoorn, 2008; Schaller, 2004).

Algunas proteasas están implicadas en modificaciones postraduccionales de proteínas mediante el sistema de proteólisis limitada. Este sistema se encarga de la activación de un amplio rango de proteínas desde sus formas inmaduras a través de la eliminación de péptidos de forma muy específica (Hubbard, 1998). La proteólisis limitada está íntimamente relacionada con el peptidosoma que es el sistema que permite el transporte de proteínas precursoras a la mitocondria y al cloroplasto mediante el uso de péptidos señal. Estos péptidos señal son posteriormente retirados por proteasas en los orgánulos diana con la consiguiente activación de la proteína (Caderholm *et al.*, 2009).

Otras proteasas regulan aspectos relacionados con el ciclo de vida de la planta desde la germinación, donde determinadas proteasas son responsables de la movilización de las reservas de proteínas de la semilla, hasta el inicio de la senescencia y muerte celular programada (Schaller, 2004).

También hay proteasas relacionadas en la meiosis (MPA1), en la supervivencia del gametofito (PSC 1), deposición de la cutícula del embrión (ALE), en la formación de la cubierta de la semilla ( $\delta$ VPE), en el desarrollo de los estomas (DEK 1), cloroplastos (VAR 2) y plastidios (EGY 1), en el crecimiento (BRS 1), en la protección

frente a luz UV (SNG 1), en la floración (ESD1) y en la respuesta defensiva frente patógenos (CDR 1, Rcr 3, NbVPE) (Van der Hoorn, 2008) (figura 7B ).



**Figura 7B.- Implicación de las proteasas en la fisiología y desarrollo de plantas.** Las proteasas no estudiadas en Arabidopsis aparecen entre paréntesis (Modificado de Van der Hoorn, 2008).

Por otro lado el sistema ubiquitina/proteosoma 26S está involucrado en numerosas fases del desarrollo de la plantas, incluyendo embriogénesis, fotomorfogénesis, ritmo circadiano, floración o formación de tricomas. También está relacionado con señalización hormonal, incluyendo respuesta a auxinas, citoquininas, giberelinas, ácido abscísico y jasmonato (Viestra, 2009; Smalle *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que las proteasas son piezas fundamentales para la supervivencia de la planta, pues mutaciones en genes que codifican para proteasas son frecuentemente letales. Sin embargo, debido a la redundancia de mucho de los genes de

proteasas se requieren mutar ambas copias para mostrar letalidad. Este hecho dificulta mucho el estudio de proteasas a nivel génico (Van der Hoorn, 2008).

Las proteasas además de ser muy abundantes son bastante ubicuas pues se pueden localizar en casi todos los dominios subcelulares (apoplasto, mitocondrias, cloroplastos, citosol, membranas...etc.). Respecto a su función en la plantas, como bien se ha mostrado anteriormente, las proteasas están presentes en casi todos los procesos fisiológicos, siendo esenciales para la vida de la planta y para el mantenimiento de su homeostasis.

### **3.4.- Proteólisis de la fosfoenolpiruvato carboxilasa.**

En los últimos 40 años, la PEPC ha sido profundamente estudiada sobre múltiples aspectos de la proteína, como su enzimología, estructura, expresión o evolución molecular, y se ha dilucidado su importante función dentro del metabolismo CAM y C<sub>4</sub> como en otros procesos fisiológicos. Sin embargo, hasta la actualidad no se ha descrito ninguna ruta sobre la proteólisis controlada de la PEPC, no obstante se ha observado proteólisis de la PEPC en numerosas ocasiones y en diferentes contextos.

Diversos estudios han mostrado que el N-terminal de la PEPC es muy susceptible a ser proteolizado *in vitro* durante la purificación de la enzima en ausencia de inhibidores de proteasas, produciendo alteraciones en las propiedades cinéticas de la enzima (Plaxton, 1996).

Se ha descrito en el endospermo de semillas de ricino (*Ricinus comunis*) una asparragil endoproteasa que cataliza *in vitro* la eliminación de 120 aminoácidos del extremo N-terminal de la isoenzima de PEPC p107. La proteólisis solo sucede en presencia de DTT y sales, especialmente sulfato y fosfato, y es inhibida en presencia de un inusual inhibidor de tiol-proteasas denominado DPDS (2,2'-dipiridil disulfuro) (Crowley *et al.*, 2005).

Durante el cierre estomático se observa en las células guardas de los estomas una degradación selectiva de tres isoenzimas de PEPC de 110, 112 y 116 KDa, que son específicas de este tipo de células. Esta proteólisis parece depender del sistema ubiquitina/proteosoma. El inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) actúa como mensajero

secundario en la cascada de transducción de señales promovida por ABA que conduce al cierre estomático. El IP3, inducido por ABA, estimula la proteólisis de la PEPC durante el cierre estomático. Además, se sugiere que la fosforilación de las isoformas de PEPC propias de las células guardas está implicada en su regulación por degradación (Klockenring *et al.*, 1997). Recientemente, se ha demostrado que una PEPC procedente de semillas de ricino es monoubiquitinada en el extremo N-terminal, sin embargo es necesario la poliubiquitinización de la proteína para inducir su degradación por el proteosoma (Uhrig *et al.*, 2008).

Trabajos recientes realizados en nuestro grupo han mostrado que la PEPC asociada a membrana es parcialmente degradada durante el proceso de separación de las distintas fracciones por centrifugación diferencial a partir de un extracto crudo de hojas de sorgo (Monreal *et al.*, 2010).

#### 4.- REGULACIÓN FOSFOLIPÍDICA EN PLANTAS.

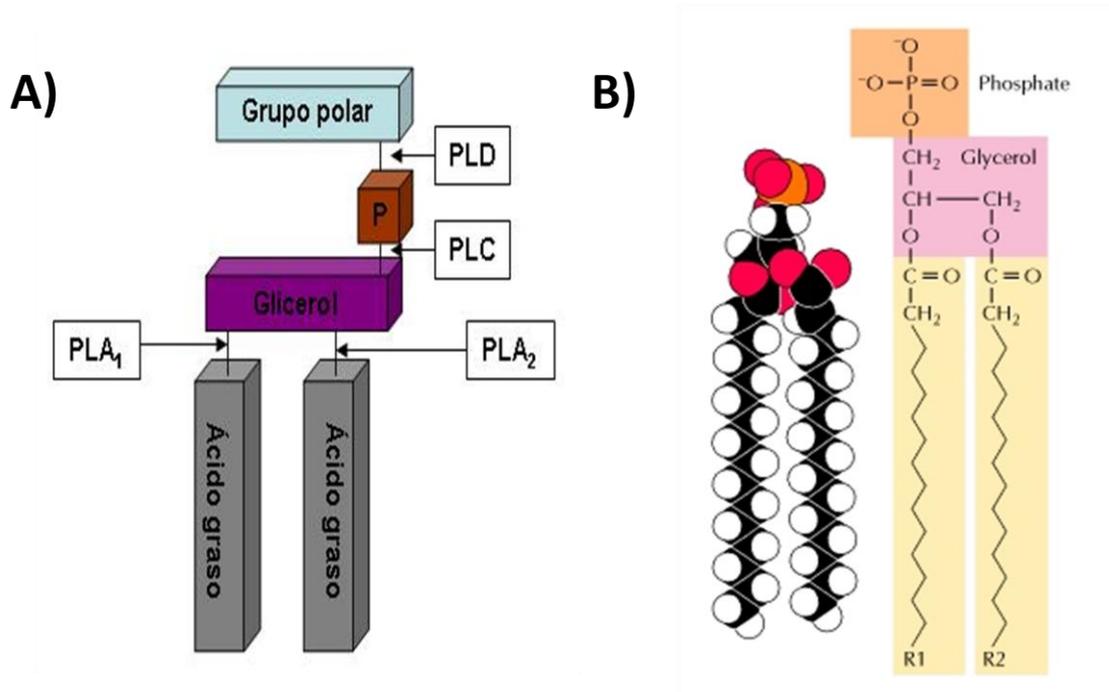
##### 4.1.- Señalización fosfolipídica.

Las células están continuamente recibiendo señales de su entorno tanto físicas como químicas (cambios de luz, hormonas, temperatura, elicitores...etc). Los mecanismos a través de los cuales la célula recibe y procesa la información de su entorno son de vital importancia para su propia integridad y por tanto para la del organismo completo ya que, le permite adoptar una respuesta adecuada en función de la señal recibida. Todo esto implica mecanismos de transducción de señales finamente regulados. La recepción inicial de las señales la realizan receptores proteicos específicos localizados en las membranas, los cuáles perciben la señal y la transmiten al interior de las células. Debido a que las enzimas efectoras se localizan en la superficie de la célula, frecuentemente los mensajeros son derivados de componentes de la membrana. Los fosfolípidos pueden actuar como dianas que reclutan proteínas que contengan dominios de unión a lípidos (Munnik *et al.*, 1998). Esto significa que, durante la señalización lipídica, proteínas citosólicas pueden localizarse en sitios de la membrana ricos en la señal. De esta forma, agregando proteínas señal en microdominios, se promueven interacciones que conducen después a la transmisión de las señales. Algunos lípidos pueden jugar un papel más activo induciendo cambios conformacionales que alteren la actividad de las enzimas (Meijer y Munnik, 2003). Incluso hay lípidos capaces de alterar las propiedades físicas de las membranas promoviendo el tráfico vesicular, el reciclaje de membrana o la secreción (Burger, 2000).

En los años 80, se comenzó a pensar que los fosfolípidos no eran simples elementos estructurales de las membranas, sino que podían funcionar como moléculas señal entre el ambiente y la célula. Actualmente, entre las diversas funciones de los fosfolípidos destaca su papel como importantes mensajeros secundarios (Munnik *et al.*, 1998).

Aunque se pueden diferenciar varias clases de fosfolípidos, todos presentan una estructura común. En general, los fosfolípidos constan de dos cadenas de ácidos grasos esterificadas a una molécula de glicerol y una región fosfatídica constituida por un grupo fosfato unido por un lado al glicerol por un enlace fosfodiéster y por otro lado a

un grupo polar variable que da nombre al fosfolípido (figura 8) (Meijer y Munnik, 2003).



**Figura 8.- A) Estructura general de los fosfolípidos y posiciones sujetas a acción de fosfolipasas.** En general los lípidos constan de dos cadenas de ácidos grasos esterificadas a una molécula de glicerol en las posiciones sn-1 y sn-2, un grupo fosfato en la posición sn-3 (que da lugar a la mitad fosfatídica), al que se une un grupo polar variable, el cuál da el nombre al fosfolípido (Abreviaturas: Fosfolipasas A (PLA) subtipo 1 y 2, C (PLC) y D (PLD) (Modificado de Meijer y Munnik, 2003). **B) Estructura y composición del ácido fosfatídico (PA)** (Modificado de Fig 2.4. Cooper, 2000).

Las fosfolipasas son las enzimas que hidrolizan a los fosfolípidos, columna vertebral de las membranas biológicas. Las actividades de estas enzimas no sólo tienen un profundo impacto en la estructura y estabilidad de las membranas celulares sino que también juegan un papel fundamental regulando importantes funciones celulares (Wang, 1999).

Señalización fosfolipídica en plantas.

La mayoría de los estudios sobre señalización fosfolipídica se han iniciado y desarrollado en animales. Considerando que muchos mecanismos de señalización son universales, no es sorprendente descubrir que numerosos mecanismos de señalización fosfolipídica de animales también existen en plantas (Munnik, 1998).

Actualmente, se ha observado que las plantas presentan la mayoría de los componentes implicados en la señalización por fosfolípidos en animales, incluso se ha puesto en evidencia su papel en la señalización en las células vegetales, aunque existen diferencias notables entre animales y plantas (Munnik y Testerink, 2009).

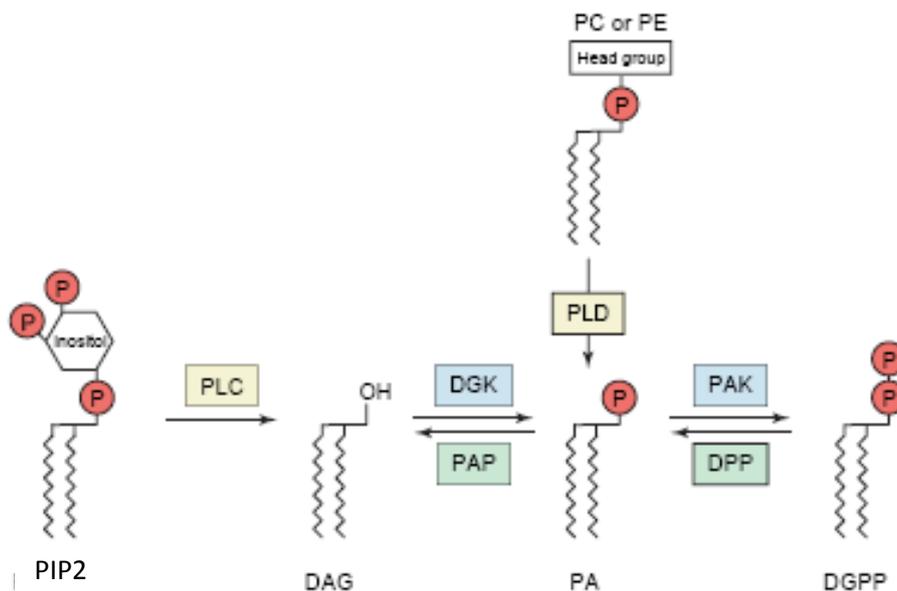
Las investigaciones sobre señalización lipídica en células vegetales han avanzado muy rápidamente en esta última década, no obstante aún se requieren muchos estudios para alcanzar en plantas el grado de conocimiento que existe en animales y para establecer las diferencias entre ambos sistemas ya que, existen gran cantidad de puntos que no están claros sobre la señalización fosfolipídica en plantas (Meijer y Munnik, 2003).

**4.2.- Acido fosfatídico.**

El ácido fosfatídico (PA) es un intermediario bien conocido de la biosíntesis de lípidos (Athenstaedt y Daum, 1999). Sin embargo, actualmente también es considerado un importante lípido señal actuando como segundo mensajero en varias cadenas de transducción de señales tanto en plantas como en animales (Testerink y Munnik, 2005). El PA desempeña un amplio abanico de funciones según el tipo de organismo o el proceso donde intervenga. Hasta el momento se conoce que en animales participa en la señalización mitogénica, en el tráfico vesicular y en el estallido oxidativo (Rizzo y Romero, 2002; Ktistakis *et al.*, 2003). En plantas, se induce la síntesis de PA en respuesta a un amplio rango de estreses entre ellos por frío, estrés hídrico, salinidad, por heridas o por ataques de patógenos (Testerink y Munnik, 2005), y también en la interacción entre una bacteria simbiótica del género *Rhizobium* y una leguminosa (Den Hartog *et al.*, 2001, 2003). En general, la producción de PA es muy rápida, cuestión de minutos, puntual y pasajera (Testerink *et al.*, 2004).

4.2.1.- Síntesis de PA.

El PA involucrado en la señalización celular se puede generar a través de dos rutas fosfolipasas distintas (figura 9) y su síntesis es muy rápida y precisa como puntualizamos anteriormente. Se puede formar directamente por la fosfolipasa D (PLD), la cual hidroliza fosfolípidos estructurales rindiendo PA y el grupo polar libre (Testerink y Munnik., 2005). También se puede generar por la acción secuencial de la fosfolipasa C (PLC) y de la diacilglicerol quinasa (DGK). El fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) es hidrolizado por la PLC rindiendo inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 formado por la PLC difunde al citosol donde, posiblemente via inositolhexakisfosfato (IP6), dispara la salida de las reservas de  $Ca^{2+}$  intracelular (Meijer y Munnik, 2003; Testerink y Munnik., 2005). El otro producto de la PLC, el DAG, permanece en la membrana donde es rápidamente fosforilado a PA por la diacilglicerol quinasa (DGK) (Munnik, 2001). El PA actúa como mensajero secundario de forma puntual y rápida por lo que presenta una atenuación controlada de la señal, la cual es realizada por la PA fosfatasa (PAP) o por la conversión de PA en diacilglicerol pirofosfato (DGPP) por acción de la PA-quinasa (PAK) (Munnik *et al.*, 1996).



**Figura 9.- Síntesis y atenuación del ácido fosfatídico.** Abreviatura no indicada anteriormente: DPP, DGPP fosfatasa; (Modificado de Testerink y Munnik, 2005).

#### 4.2.2.- Funciones del PA.

En células de mamíferos, se han identificado varias proteínas de señalización que interactúan con PA. Entre esas dianas de PA se incluyen proteínas quinasas como Raf-1 (Rizzo *et al.*, 2000) y PKC $\epsilon$  (Corbalan-García *et al.*, 2003), la quinasa de lípidos esfingosina quinasa (Delon *et al.*, 2004), y la quinasa PIP de tipo I (Jenkins *et al.*, 1994), y también fosfatasas (Frank *et al.*, 1999; Jones y Hannun, 2002), fosfodiesterasas de AMPc (Grange *et al.*, 2000; Baillie *et al.*, 2002), NADPH oxidasa (Palicz *et al.*, 2001) y pequeñas proteínas de unión a GTP (Manifava *et al.*, 2001).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado dos proteínas que se unen al PA, una proteína SNARE (Nakanishi *et al.*, 2004) y Opi 1p que tiene también afinidad por DGPP (Loewen *et al.*, 2004).

En general las dianas de PA están involucradas en diversos procesos celulares como señalización mitogénica, tráfico vesicular o estallido oxidativo (Ktistakis *et al.*, 2003; Daum, 2004).

En plantas, existen numerosos trabajos sobre la formación de PA en respuesta a distintos estímulos, aunque aún no se ha profundizado sobre sus consecuencias. Las primeras dianas de PA funcionalmente caracterizadas en plantas fueron ABI1 (Zhang *et al.*, 2004) y PDK1 (proteína quinasa dependiente de fosfoinositol 1) (Anthony *et al.*, 2004). El PA se une y activa a la proteína PDK1 de *Arabidopsis* y a AGC2-1 en un proceso dependiente de PDK1. AGC2-1 es idéntica a OXI1, proteína quinasa que interviene en la respuesta al estrés oxidativo.

En *Arabidopsis* se han identificado otras posibles dianas de PA, entre ellas Hsp90, proteínas 14-3-3, la proteína Serina/threonina quinasa SnRK2, la subunidad regulatoria de la PP2A RCN1 y además la PEPC (Testerink *et al.*, 2004). Algunas de estas proteínas están involucradas en señalización por ABA, como las proteínas 14-3-3 y SnRKs (Himmelbach *et al.*, 2003).

El efecto del PA al unirse a sus proteínas dianas puede ser muy diverso. Puede activar enzimas directamente o hacerlo de forma indirecta, reclutándolas hacia sitios de la membrana, aumentando así la concentración local de enzima de forma que se promuevan interacciones regulatorias (Munnik, 2001; Laxalt y Munnik, 2002). Un buen

ejemplo es Raf-1, que requiere PA para reclutarse a membrana, donde es posteriormente activada por otras proteínas (Rizzo *et al.*, 2000; Ghosh *et al.*, 2003).

En algunos casos, el PA parece actuar junto con otros mensajeros secundarios lipídicos. Por ejemplo, el dominio C2 de la PKC $\epsilon$  une PA promoviendo el transporte de la proteína a la membrana. De forma sinérgica a la unión de PA a C2, una molécula de DAG se une al dominio C1 de la misma proteína. La unión de ambos lípidos es necesaria para la activación total de la enzima (López-Andreo *et al.*, 2003).

El PA puede inducir modificaciones post-traduccionales en sus proteínas dianas como sucesos de fosforilación (Testerink y Munnik, 2005). También puede intervenir en la inactivación de proteínas de forma indirecta, al retirarlas del lugar donde se activan (Zhang *et al.*, 2004). Alternativamente, podría activar o inactivar una proteína de membrana e incluso canales iónicos. En plantas se ha observado que la adición de PA afecta a la actividad de canales iónicos *in vivo*, aunque se desconoce si el mecanismo de acción implica la unión directa del PA (Jacob *et al.*, 1999).

Debido a su naturaleza, fundamentalmente su conformación y su carga negativa, el PA podría promover cambios en la curvatura de las membranas e inducir la formación de vesículas (Kooijman *et al.*, 2003).

Actualmente, está bastante claro que el PA participa en la señalización por estrés, ya que se sintetiza rápidamente y de forma transitoria en respuesta a varios estímulos ambientales. Además, la identificación de las primeras dianas de PA refuerza su papel como mensajero secundario lipídico. Estudios recientes sobre las distintas isoenzimas de PLD han revelado que estas isoenzimas presentan funciones diferentes e incluso a veces opuestas en la señalización del estrés (Testerink y Munnik, 2005).

Teniendo en cuenta que en *Arabidopsis* se han descubierto más de diez isoenzimas de PLD, nueve de PLC y siete de DGK que aún no están caracterizadas, queda mucho por descubrir sobre el modo de acción de todos estos fosfolípidos y cómo se regula la activación específica de cada una de estas enzimas.

Considerando que el PA se puede sintetizar por diferentes rutas, en múltiples especies, que se puede localizar en distintos tipos de membranas, que tiene muchas dianas proteicas y que presenta un amplio abanico de modos de acción, se sugieren que el PA es un importante elemento en la regulación celular (Zhang *et al.*, 2005).

Regulación de la PEPC por PA.

Testerink *et al.*, (2004) pusieron por primera vez en evidencia, utilizando extractos proteicos procedentes de cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis thaliana* (col-0) y tomate (Msk8), la interacción entre el PA y distintas isoenzimas de la PEPC de tipo C<sub>3</sub>. Además, mostraron que la PEPC se une preferentemente a PA que a otros lípidos (Testerink *et al.*, 2004; Testerink y Munnik, 2005). En tomate, son las isoenzimas PEPC1 y 2 las que se unen a PA mientras que en *Arabidopsis* son las isoenzimas PEPC1 y 3, sugiriendo una cierta dependencia de la isoenzima en la interacción (Testerink *et al.*, 2004).

Posteriormente, se observó que el tratamiento de células con estrés hipoosmótico o el elicitor fúngico xilanasas, también aumenta el grado de unión del PA a la PEPC. Por lo tanto, la interacción del PA y la PEPC podría jugar un papel en la adaptación a estreses ambientales (Zhang *et al.*, 2005).

Recientemente, trabajos realizados en nuestro grupo han caracterizado la interacción PEPC-PA, y analizado sus efectos sobre la enzima. El PA no sólo se une a las PEPCs de tipo C<sub>3</sub> sino que también tiene afinidad por la isoenzima de tipo C<sub>4</sub> procedente de hojas de sorgo (Monreal *et al.*, 2010).

La adición de PA, tanto en su forma fisiológica (18:1) como en su forma soluble pero no fisiológica (8:0), a una muestra de PEPC C<sub>4</sub> semipurificada a partir de hojas de sorgo provocaba una inhibición catalítica de la enzima. Dicha inhibición es independiente del estado de fosforilación de la PEPC, del pH o de la presencia de metabolitos reguladores (G6P ó L-malato) o de su sustrato (PEP) (Monreal *et al.*, 2010).

Además, existen evidencias de que la PEPC se encuentra asociada a membrana cuando se analiza las proteínas unidas a membrana procedentes de un extracto de hojas de sorgo. No sólo se observa la presencia de PEPC en la fracción de membrana sino que también se detectan múltiples bandas de PEPC indicando que la PEPC se encuentra parcialmente proteolizada o modificada específicamente en la fracción de membrana (Monreal *et al.*, 2010).

Todos estos resultados proponen que el ácido fosfatídico puede ser un importante elemento regulador de la PEPC en determinadas condiciones, aunque se requiere un estudio más profundo sobre las implicaciones fisiológicas de la interacción PEPC-PA.





*OBJETIVOS*



## **II.- OBJETIVOS.**

El objetivo principal de este trabajo se planteó como una ampliación de los estudios sobre la implicación del extremo C-terminal de la PEPC en su regulación. Para ello se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- 1) Estudiar la implicación del C-terminal en la actividad catalítica de la enzima.
- 2) Estudiar las condiciones *in vitro*, moléculas o estados de la PEPC que influyeran en la accesibilidad del extremo C-terminal.
- 3) Profundizar en el mecanismo por el cual el extremo C-terminal regula la fosforilación de la PEPC por la PEPC-quinasa.





***MATERIALES Y MÉTODOS***



### **III.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **1.- MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO.**

##### **1.1.- Material vegetal.**

La especie vegetal utilizada en este trabajo ha sido el cereal de tipo C<sub>4</sub> sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, var. PR87G57, Pioneer Hi-Bred España).

##### **1.2.- Condiciones de cultivo.**

La germinación de las semillas de sorgo se llevó a cabo durante tres días en condiciones de oscuridad, utilizando como sustrato vermiculita suplementada con agua y a 28°C. Una vez germinadas, las plántulas se montaron en cultivos hidropónicos o se cultivaron en macetas, se suplementaron con una solución nutritiva tipo nitrato (Hewitt, 1966) y se mantuvieron en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones controladas: 28°C y 60% de humedad relativa durante el fotoperiodo (12 h, 350  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) y a 20°C y 70% de humedad relativa durante el periodo de oscuridad.

##### **1.3.- Péptidos sintéticos**

Los péptidos sintéticos utilizados en esta tesis han sido los siguientes:

- ❖ Péptido C19 (Y-20-G). Corresponde a los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo (*Sorghum vulgare*, Pers cv Tamaran) [942(Y)EDTLILTMKGIAAGMQNTG960].
- ❖ Péptido terminal C15 (Y-16-M). Es el péptido C19 sin los cuatro últimos aminoácidos (QNTG) [942(Y)EDTLILTMKGIAAGM956].
- ❖ Péptido C19 mutado (E-19-G). Es el péptido C19 en el que las tres treoninas han sido sustituidas por tres tirosinas. [942(Y)EDYLILYMKGIAAGMQNYG960].
- ❖ Péptido N-terminal desfosforilado (M-18-P) (N-t-OH). Contiene 18 aminoácidos del extremo N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo (*Sorghum bicolor*, Locus

CAA35251) [1MASERHHSIDAQLRALAP18]. Esta secuencia contiene el dominio de fosforilación de la proteína.

- ❖ Péptido N-terminal fosforilado (M-18-P Phosphorilated) (N-t-OP). Contiene 18 aminoácidos de la secuencia N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo (*Sorghum bicolor*, Locus CAA35251) fosforilado en la serina 8 [1MASERHHS(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)IDAQLRALAP18].
- ❖ Péptido L1 (L-20-S) (108LAHRRRNSKLGDFSEDEGS127), Péptido L2 (A-28-E) (333AEEVQSTPASKKVKYIEFWKQIPPNE360) y el Péptido L3 (S-27-N) (907SFKVTPQPPLSKEFADENKPAGLVKLN933) corresponden a secuencias específicas de la PEPC que están muy conservadas dentro de las PEPCs de plantas pero ausente en la PEPC de bacterias y que se encuentran muy expuestas en la estructura tridimensional de la proteína (Matsumura et al., 2002).

## **2.- OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS Y FRACCIONES PROTEICAS.**

### **2.1 Obtención de extractos crudos.**

Los extractos de proteínas se obtuvieron triturando en un mortero, a 4 °C, 0,2 g de peso fresco de tejido de hoja en 1 ml de tampón de extracción que contenía 0,1 M Tris-ClH pH 7.5, 20% glicerol, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 14 mM β-mercaptoetanol suplementado con PMSF 1 mM, KF 10 mM, quimostatina 10 µg/ml y leupeptina 2.2 µM. El homogenado se centrifugó a 15.000 g durante 5 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada modelo Microfriger-BL (Selecta). El sobrenadante obtenido se utilizó para los distintos ensayos enzimáticos.

### **2.2. Obtención de la fracción PEPC semipurificada (PEPC + Proteasa C19).**

Plantas de sorgo iluminadas durante 2-3 horas con luz solar o mantenidas en oscuridad durante toda la noche se utilizaron para purificar la PEPC C<sub>4</sub> de hojas mediante cromatografía en hidroxapatito y Mono Q (Econo-Pac, Bio-Rad). Todo el proceso de purificación se realizó en frío a unos 4°C.

*Obtención del extracto crudo de hojas de sorgo.*

40 g de hojas frescas, previamente mantenidas en oscuridad o iluminadas se trituraron con un homogenizador “Waring blender” en 200 ml de un tampón de extracción compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 7.5, glicerol 5% (v/v), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, 2 β-mercaptoetanol 14 mM, PVP 2% (p/v), PMSF 1 mM, KF 10 mM, quimostatina 10 µg/ml y leupeptina 2.2 µM. El homogenado se filtró en una gasa de nylon (80 µm) y posteriormente se centrifugó a 45000g (10 min, 4°C). El sobrenadante se precipitó con polietilenglicol (PEG, PM 8.000) del 8,5-15% y se centrifugó a 48000g (10 min, 4°C). El precipitado resultante se resuspendió en tampón A que contenía Hepes-KOH 50 mM pH 7.1, ditioneitol (DTT) 5 mM, EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM. En determinados pasos de purificación se tomaron alícuotas para medir la actividad PEPC, cantidad de proteína y sensibilidad al L-malato, lo que nos permite evaluar el estado de la PEPC durante el proceso de purificación (Nimmo *et al.*, 1987).

*Cromatografía en columna de hidroxapatito.*

El método de purificación que se detalla a continuación ha sido descrito por McNaughton *et al.*, 1989 con algunas modificaciones.

La solución proteica anterior conteniendo aproximadamente unas 500 U de PEPC en unos 2,5 ml se depositó en una columna de hidroxapatito de 5 ml (Bio Scale™ Mini CHT Type II de Bio-Rad, Cod.732-4332) conectada a un equipo Econo-System (Bio-Rad). La muestra se hizo pasar por la columna, previamente equilibrada con tampón A, con una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las proteínas no retenidas se eliminaron lavando la columna con tampón A, hasta que la absorbancia registrada a 280 nm se estabilizó en cero. Para la elución de las proteínas retenidas se usó tampón B compuesto por tampón fosfato potásico 0.2 M al 80% y tampón A al 20%. La PEPC se eluyó a una concentración entre 80 y 120 mM de fosfato potásico. El pico de proteína detectado correspondiente a la PEPC, se recogió a través de un colector de fracciones conectado al equipo y se llevó al 60% de saturación con sulfato de amonio. A continuación se centrifugó a 48000g (10 min, 4°C) y el precipitado obtenido se resuspendió en tampón A. El volumen resultante se filtró a través de una columna de Sephadex G-25, previamente equilibrada con tampón A, con el fin de eliminar las sales para llevar a cabo el segundo paso de purificación.

*Cromatografía de intercambio iónico (Mono-Q)*

Para la segunda purificación se utilizó una columna Mono-Q (Bio Scale™ Mini Macro-Prep® High Q, Cod.732-4122) previamente equilibrada con tampón A Mono-Q que contenía Tris-HCl 20 mM pH 8, glicerol 5% (v/v), DTT 1 mM y L-malato 5 mM. Esta segunda purificación se realizó en las mismas condiciones descritas para la primera, aunque para la elución se utilizó tampón B Mono-Q formado por tampón A Mono-Q con NaCl 0.5 M. La PEPC eluyó a una concentración de entre 0.12 y 0.15 M de NaCl. El pico de proteína detectado se recogió y se llevó al 60% de saturación con sulfato de amonio. A continuación, se centrifugó a 48000g (10 min, 4°C) y el precipitado obtenido se resuspendió en tampón A. La eliminación de las sales se llevó a cabo dializando la muestra en membranas de celulosa (Sigma, Cod. O-9277), la cual retiene proteína de peso molecular superior a 12 kDa. La diálisis se realizó durante 12 horas a 4°C en agitación suave. Finalmente, la muestra resultante se llevó a un 40-50% de glicerol y se conservó a -20°C hasta su uso. En esta fracción proteica (PEPC semipurificada), junto con la PEPC, se copurifica la proteasa C19 que se evidencia y se caracteriza en este trabajo.

**2.3.- Purificación de la PEPC por electroelución.**

La fracción proteica anterior denominada fracción PEPC semipurificada, obtenida a partir de hojas de sorgo de oscuridad y que contiene la PEPC y la proteasa C19 se sometió a una electroforesis nativa al 7% (ver apartado 5.1 de M & M). Finalizada la electroforesis, el gel se incubó durante 5 min en un medio de reacción para medir la actividad PEPC (ver apartado 3.1 de M & M), transcurrido este tiempo se añadió CaCl<sub>2</sub> 0.16 mM al medio de reacción. El fosfato inorgánico (Pi) liberado en la reacción catalizada por la PEPC precipita como fosfato cálcico (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) generándose una banda blanca correspondiente a la PEPC. La banda se separó del resto del gel y se fragmentó para su posterior electroelución en un aparato electro-eluter (modelo 42 Bio-Rad). El resto del gel también se cortó en bandas y se electroeluyó. La electroelución se desarrolló a 50 V durante 12 horas en un tampón que contenía Tris 25 mM-glicina 192 mM pH 8.3. Las fracciones electroeluidas se concentraron en filtros millipore de 10 kDa (Millipore Ultrafree-CL Cod. UFC4BGC). La cantidad de PEPC electroeluida se determinó en un ensayo de actividad PEPC a pH óptimo de 8. Por este

método es posible separar a la PEPC (que llamaremos PEPC purificada por electroelución o PEPC electroeluída) y la proteasa que contiene la fracción semipurificada de PEPC.

#### **2.4.- Purificación de la proteasa C19 por cromatografía de afinidad en una columna Hi-Trap<sup>TM</sup> activada con NHS y con el péptido C-terminal acoplado.**

##### *Preparación de la columna.*

La columna HiTrap<sup>TM</sup> activada con NHS (Pharmacia, Cod. 17-0716-01), se lavó con 6 ml de HCl 1 mM frío a una velocidad de flujo de 1 ml/min aproximadamente. A continuación 5 mg de péptido C-terminal, el cuál contiene 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo, se disolvió en 1 ml de tampón Hepes-NaOH 0.1 M pH 8 y se acopló a la columna a temperatura ambiente dejando interaccionar durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se lavó la columna con 3 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 8.8, para bloquear los brazos activos libres.

##### *Preparación del extracto crudo de hojas*

Los extractos de proteínas se obtuvieron triturando en un mortero, a 4°C, 1 g de peso fresco de tejido foliar (hojas jóvenes de sorgo de 3-4 semanas mantenidas en oscuridad) en 5 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, 5% glicerol (v/v), EDTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, β-mercaptoetanol 14 mM, PMSF 1 mM, KF 10 mM, quimostatina 10 µg/ml y leupeptina 2.2 µM. El homogenado se filtró en una gasa de Nylon (80 µm) y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. Posteriormente, el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio al 60% de saturación y se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 min. El precipitado resultante se resuspendió en tampón de extracción y se utilizó como extracto crudo para la cromatografía de afinidad.

Cromatografía de afinidad en la columna con péptido C-terminal acoplado.

La columna preparada según se describe en el apartado anterior se equilibró con 4 ml de tampón A (Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, 5% glicerol (v/v), 1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). A continuación, se hizo pasar por la columna una alícuota de extracto crudo (1,2 ml) de hojas de sorgo de oscuridad, que contenía 30 U de PEPC y se dejó interaccionar 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la columna se lavó con 2 ml de tampón A y se recogió el filtrado. Por último, las proteínas retenidas se eluyeron con 3 ml tampón A suplementado con NaCl 0.5 M. La muestra obtenida se concentró y se dializó en filtros Millipore de 10 kDa (Millipore Ultrafree-CL Cod. UFC4BGC). En esta primera fracción se obtuvieron preferentemente proteínas unidas al péptido en condiciones hidrófilas y constituye la fracción 1 utilizada en este trabajo.

La fracción no retenida en la columna (el filtrado) se precipitó con sulfato de amonio del 0-60% y se centrifugó a 48000g (10 min, 4°C). El precipitado obtenido se resuspendió en 1 ml de tampón A con NaCl 0.4 M, se depositó en la columna a flujo lento y se dejó interaccionar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la columna con 2 ml de tampón A con NaCl 0.3 M y las proteínas retenidas se eluyeron con 3 ml de agua MiliQ, se concentraron en filtros millipore de 10 kDa y se conservaron a -20°C hasta su uso. En esta segunda fracción se obtuvieron preferentemente proteínas unidas al péptido en condiciones hidrófobas y constituye la fracción 2 utilizada en este trabajo.

### **3.- ENSAYOS ENZIMÁTICOS.**

#### **3.1.- Determinación de la actividad PEPC.**

La determinación de la actividad PEPC se realizó tanto en condiciones óptimas de pH (8) como subóptimas (7.3) y a 30°C, utilizando malato deshidrogenasa (MDH), que reduce el oxalacetato producido por la PEPC a L-malato, en presencia de NADH. La oxidación del NADH se registró en un espectrofotómetro (Mod. Helios  $\alpha$ , Thermo Electron Corporation), a 340 nm, en 1 ml de medio de reacción que contenía tampón Hepes-NaOH 100 mM pH 8 ó 7.3, PEP 2.5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 0.2 mM y MDH 5 U (Echevarría *et al.*, 1994). El coeficiente de extinción del NADH a 340 nm es 6.23  $\mu\text{moles}^{-1} \text{ ml cm}^{-1}$ . El ensayo se inicia con la adición de la enzima.

Una unidad enzimática se define como la cantidad de PEPC que cataliza la carboxilación de 1  $\mu\text{mol}$  de PEP por min a pH 8 y 30°C. En el caso del sorgo, 1 U de PEPC se corresponden con aproximadamente 30  $\mu\text{g}$  de PEPC purificada (Vidal *et al.*, 1980).

### **3.2.- Determinación del grado de fosforilación de la PEPC mediante el test malato.**

Mediante este test se estima la sensibilidad de la PEPC a su inhibidor alostérico L-malato ( $\text{IC}_{50}$ ). Para el cálculo de la  $\text{IC}_{50}$  se determinó la actividad PEPC en el medio de reacción descrito en el apartado anterior en condiciones subóptimas de pH (7.3) y PEP 2.5 mM, en presencia de diferentes concentraciones de L-malato. La concentración de L-malato requerida para inhibir al 50% la actividad de la enzima ( $\text{IC}_{50}$ ) se calculó a partir de una gráfica de la velocidad frente a la concentración de L-malato (Nimmo *et al.*, 1984). En estas condiciones de ensayo, la enzima fosforilada presenta una  $\text{IC}_{50}$  para el L-malato de 2 a 3 veces mayor que la enzima desfosforilada (Jiao & Chollet, 1991; Bakrim *et al.*, 1992).

### **3.3.- Incubación de la PEPC con el péptido C19 y determinación de la actividad proteasa C19.**

Para determinar el efecto del péptido C-terminal sobre la actividad de la PEPC se incubó una alícuota de la preparación proteica de PEPC semipurificada conteniendo 0,3 U de PEPC a 30°C con 60 nmoles de péptido en 50  $\mu\text{l}$  de un medio que contenía Tris-HCl 0.1 M pH 8, 20% glicerol (v/v),  $\text{MgCl}_2$  5 mM, PMSF 1mM y leupeptina 2.2  $\mu\text{M}$ . Durante la incubación se tomaron alícuotas a distintos tiempos para determinar la actividad de la enzima. Por este mismo procedimiento se obtuvieron las muestras que fueron analizadas en geles de acrilamida. La actividad proteasa se determinó como pérdida de actividad PEPC por unidad de tiempo, como porcentaje respecto a la actividad inicial o bien mediante la visualización de la desaparición de la cantidad de PEPC en los geles de acrilamida. La ausencia o presencia de los inhibidores de proteasas utilizados durante la incubación con el péptido C19 no modificó la actividad proteasa C19 pues se obtienen los mismos resultados. En determinados casos alícuotas de PEPC-OH semipurificada (0.3 U) se incubaron a 30°C en presencia de 60 nmoles de

péptido C19 y/o péptido N-terminal (OH y OP) o en las mismas condiciones de ensayo descritas anteriormente.

En otros ensayos se preincubó una alícuota de PEPC-OH semipurificada (0.3U) con 40 µg de diferentes anticuerpos policlonales durante 1 h a 30°C en el medio de incubación descrito en el párrafo anterior. Posteriormente se añadió 60 nmoles de péptido C19 durante tres horas más y se analizaron las muestras en SDS-PAGE (10% acrilamida).

### **3.4.- Determinación de la actividad proteasa en zimogramas.**

La actividad proteolítica total de la fracción semipurificada se determinó en geles de acrilamida copolimerizados con caseína (zimograma) (Bio-Rad, Cod. 161-1168). Las muestras se mezclaron con un tampón de carga nativo (25% del volumen total de la muestra) compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, glicerol al 20% (v/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v). La electroforesis se desarrolló en condiciones desnaturalizantes, a temperatura ambiente y a voltaje constante (100 V) durante 2 horas. Una vez transcurrida la electroforesis, el gel se incubó a temperatura ambiente durante 30 min con tampón de renaturalización (Bio-Rad, Cod. 161-0765), y posteriormente en tampón fosfato 50 mM suplementado con 1.2 mM de péptido C-19. pH 6.5 durante 24 horas a 40 °C . Por último, los geles se tiñeron con amido black (Sigma, Cod. A8181) para la detección de actividad proteasa, que se reveló como una banda clara en el gel (Monreal *et al.*, 2007).

### **3.5.- Fosforilación *in vitro* de la PEPC-OH semipurificada con PKA.**

Una alícuota conteniendo 0.6 U de PEPC semipurificada de hojas de sorgo de oscuridad (PEPC-OH) obtenida según se describe en el apartado 2.2 de M & M, se incubó en presencia de 5 U PKA [subunidad catalítica de la quinasa de mamíferos dependiente de AMPc que fosforila a la PEPC en el sitio fisiológico de fosforilación (Terada *et al.*, 1990; Sigma, Cod. P-2645)], durante 2 horas a 30°C en 100 µl de un medio que contenía Tris-HCl 0.1 M pH 8, glicerol 20% (v/v), ATP 5 mM, PMSF 1 mM, quimostatina 0.01 µg/µl, leupeptina 2.2 µM. La fosforilación se controló a través del test malato (apartado 3.2 de M & M). Una vez verificada la fosforilación, se añadieron a las muestras 70 nmoles de péptido C19. A lo largo de tres horas de incubación se

fueron tomando alícuotas de PEPC para medir actividad catalítica (expresada como % de inhibición por el péptido). Finalmente, terminado el periodo de incubación las muestras fueron analizadas en PAGE (7%). La fracción de PEPC fosforilada *in vitro* con PKA (PEPC-OP) se utilizó en distintos ensayos enzimáticos y en las inmunoprecipitaciones con anticuerpos anti C-terminal (C19-IgGs).

### **3.6.- Fosforilación *in vitro* de los péptidos sintéticos.**

Para la fosforilación de los péptidos sintéticos se utilizó como fuente de quinasa un extracto crudo de hojas de sorgo iluminadas durante 3 horas con luz solar. Para la extracción se usó 1 gr de hojas en 5 mL de tampón de extracción que contenía 0,1 M Tris-HCl pH 7.5, 5% glicerol, 1 mM EDTA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM β-mercaptoetanol, PMSF 1 mM, KF 10 mM, quimostatina 10 μg/ml y leupeptina 2.2 μM. El homogenado resultante se centrifugó 5 minutos a 15.000 g. El sobrenadante se llevó al 60% (p/v) de saturación con sulfato de amonio y se centrifugó a 15.000 g (5 min, a 4°C). El precipitado obtenido se resuspendió en 0.7 mL de tampón de extracción y se filtró en Sephadex G-25 para eliminar las sales y moléculas de bajo peso molecular. Las columnas de Sephadex G-25 se equilibraron previamente con tampón de extracción. Una alícuota del extracto crudo desalado que contenía 0,5 U de PEPC se incubó durante 5 min con 60 nmoles de péptido C19 ó péptido N-t-OH ó en presencia de ambos a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* a 30°C durante 45 min en presencia de un medio de reacción que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EGTA 1 mM, un inhibidor de la adenilato quinasa (AP<sub>5</sub>A 0,25 mM) y [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP 2,7 μM (1 μCi; 10 Ci/mmol) en un volumen final de 60 μl (Echevarría *et al.*, 1990). La reacción se inició con la adición de [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. Finalizado el tiempo de incubación, se añadió a las muestras 15 μl de tampón de disociación compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 8,8, glicerol al 25% (v/v), SDS al 1% (p/v), 2-mercaptoetanol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,02% (p/v), se calentaron a 90°C durante 2 min y se analizaron en SDS-PAGE (15% acrilamida) o en geles peptídicos (15% acrilamida). Tras la tinción y secado del gel, este se puso en contacto en una pantalla Fuji Imaging Plate, para ser revelados en un densitómetro (PCBas 2.0) después de 24 o 48 h en contacto.

### **3.7.- Incubación de la PEPC con ácido fosfatídico (PA).**

En esta tesis se ha utilizado dos tipos de PA, el PA fisiológico (18:1) y el PA (8:0). El PA (18:1) Avanti Polar Lipids (USA) (1-2 Dioleoil-sn-glicerol-3 fosfato sal monosodio (DOPA), Ref. 840875C), se conserva en cloroformo a una concentración de 10 mM y para su preparación es necesario evaporar el cloroformo con N<sub>2</sub> para evitar su oxidación y resuspenderlo en Tris 0,1 M pH 8 mediante sonicación. Se ensaya a una concentración final de 0,5-2 mM. El PA (8:0) (1-2 Dioctanoil-sn-glicerol 3 -fosfato sal de sodio (Sigma, P3591)) se prepara en Tris 0,1 M pH 8 a una concentración de 10 mM y se ensaya a 0,5-1 mM.

Una alícuota de 0,3 U de PEPC semipurificada (PEPC-OH) se incubó en ausencia o en presencia de distintas concentraciones de PA (18: 1) o de PA (8:0) en 50 µl de un medio de reacción conteniendo Tris 0.1 M pH 8, a 30°C durante 5, 10 ó 20 h. A la media hora de incubación se tomó una alícuota de cada muestra para medir actividad PEPC a pH 8 para controlar el estado y la eficacia del PA a través, del grado de inhibición de la actividad. Finalmente se añadió 20 µl de tampón de disociación a cada muestra, se calentaron 3 min a 90°C y se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida).

En otros ensayos una alícuota correspondiente a 0,2 U de PEPC semipurificada (PEPC-OH) o 0,1 U procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo se incubó con 1mM de PA (8:0) a 30°C durante 30 min en 50 µl de un medio que contenía Tris-HCl 0.1 M pH 8, PMSF 1mM, quimostatina 0.01 µg/µl y leupeptina 2 µM. En el caso de la alícuota de PEPC obtenida del extracto crudo de hojas de sorgo, la incubación de la enzima con el PA se realizó en el medio de extracción descrito en el apartado 2.1 de M & M en ausencia de MgCl<sub>2</sub> y EDTA. Una vez comprobado la eficacia del PA se inmunoprecipitaron las muestras con anticuerpos C19-IgGs (45 µg/25µl) según se describe en el apartado 4.2. de M & M.

En un ensayo se preincubó 0,3 U de PEPC semipurificada (PEPC-OH) con 35 µg de anticuerpo anti-C-terminal (C19-IgGs) durante 30 min antes de añadir PA (18:1) a una concentración de 0,25-0,5 mM. Después de la adición del PA, las muestras se incubaron durante 5 horas y finalmente se desnaturalizaron calentándolas durante 3 min ó 10 min en presencia de tampón de disociación. Finalmente, las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida).

Para estudiar el efecto de los péptidos N-terminales (N-t-OH y N-t-OP) sobre la proteólisis de la PEPC inducida por PA, 0,3 U de PEPC semipurificada (PEPC-OH) se incubó en ausencia o en presencia de 60 nmoles del péptido N-t-OH ó N-t-OP con 1 mM de PA (8:0) en 50 µl de un medio conteniendo Tris 0,1 M pH 8, durante 5 h a 30°C. Durante los primeros 120 min de incubación se midió actividad PEPC cada 30 min a pH 8 y 2.5 mM de PEP. Al final las muestras se desnaturalizaron calentándolas durante 3 min a 90°C con tampón de disociación al 25% y se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida).

#### **4.- MÉTODOS INMUNOLÓGICOS.**

En este trabajo se han utilizado los siguientes tipos de anticuerpos policlonales:

- Anticuerpos totales (PEPC C<sub>4</sub>-IgGs), dirigidos contra la totalidad de la PEPC. La purificación de la PEPC para la obtención de estas inmunoglobulinas se realizó a partir de una PEPC purificada en hidroxapatito, Mono Q y electroelución según se describe en los apartados 2.2 y 2.3 de M & M. La obtención de los anticuerpos se realizó en el centro de Producción y Experimentación Animal de la Universidad de Sevilla. La producción de estas inmunoglobulinas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología desarrollada por el Dr. J. Vidal (Vidal *et al.* 1980).
- Anticuerpos anti N-terminal (APS-IgGs), dirigidos contra un péptido sintético de 23 aminoácidos que representa los últimos 21 aminoácidos del extremo N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo [ERHHSIDAQLRALAPGKVSEE(YG)] y que contiene el dominio de fosforilación de la PEPC. Estos anticuerpos fueron cedidos por el Dr. J. Vidal (Orsay, France)
- Anticuerpos anti C-terminal (C19-IgGs), dirigidos contra un péptido sintético de 20 aminoácidos que representa los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo (*Sorghum bicolor*, Locus CAA35251) [(Y)EDTLILTMKGIAAGMQNTG] (Crétin *et al.*, 1990). El péptido sintético y los anticuerpos fueron producidos por Neosystem laboratoire (Strasbourg, Francia).

#### **4.1.- Purificación de anticuerpos en cromatografía de afinidad en gel de proteína A Sepharosa.**

Este tipo de cromatografía se basa en la capacidad de la proteína A Sepharosa CL-4B de retener específicamente a las inmunoglobulinas G. La capacidad de retención de la columna oscila entre 2 y 15 mg de inmunoglobulinas por cada ml de gel. El procedimiento seguido se describe a continuación.

Para la preparación de la columna se resuspendió 1 g de proteína A Sepharosa CL-4B (Pharmacia, Cod. 17-0780-01) en 4 ml de tampón A compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8, y se empaquetó en una columna (Bio-Rad, 20 ml) equilibrada previamente con tampón PBS (fosfato sódico 25 mM pH 7,5, NaCl 0,9% (p/v)). A continuación, se hizo pasar por la columna 1 ml de suero sanguíneo y se lavó la columna con 25 ml de tampón PBS hasta que la absorbancia registrada espectrofotométricamente a 280 nm se estabilizó en cero. Las inmunoglobulinas retenidas en la columna se eluyeron con tampón citrato 200 mM, pH 2,8. Se recogieron 7 fracciones de 4 ml, a las que se les añadió rápidamente 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8, para neutralizar la acidez. Las fracciones que contenían las inmunoglobulinas se reagruparon, se concentraron con sulfato de amonio al 50% de saturación, se centrifugaron a 20.000 x g (15 min, 4°C) y el precipitado se resuspendió en tampón B que contenía Tris 100 mM pH 7,5 y glicerol 20% (v/v). Las muestras se filtraron en una columna de Sephadex G-25 (1 ml de Sephadex/100 µl de muestra) equilibrada con tampón B o se dializaron toda la noche utilizando membranas de celulosa (Sigma, Ref. D-9277). Los anticuerpos se conservaron a -20°C.

#### **4.2.- Inmunoprecipitación de la PEPC.**

Una vez finalizado el ensayo de fosforilación *in vitro* con ATP o con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (ver apartados 3.5 ó 3.6) o después de la incubación de la PEPC con distintos agentes (DTT, ferricianuro potásico, G6P, L-malato ó PA) y en diferentes condiciones, se le añadió a las muestras 25 µl de anticuerpos (45 µg de proteína) y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió proteína A Sepharosa al 4% (p/v) y se dejó actuar 15 min a 4°C. A continuación, el inmunoprecipitado se recuperó por centrifugación a 13.000 g (5 min). El precipitado se lavó en primer lugar con 1 ml de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, conteniendo NaCl

1,5 M y Tritón X al 1% (v/v), posteriormente se centrifugó 10 min y se realizaron dos lavados sucesivos con 1 ml de tampón Tris-HCl 100 mM pH 8,0, centrifugando 10 min después de cada lavado. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 60 µl de tampón de disociación compuesto por Tris-HCl 100 mM pH 8,8, glicerol al 25% (v/v), SDS al 1%, 2β-mercaptoetanol (v/v) al 10% y azul de bromofenol al 0,01 %, las muestras se calentaron 10 min a 90°C, y se centrifugaron a 13.000 x g (5 min). Los inmunoprecipitados y los sobrenadantes de muestras de fosforilaciones radiactivas de péptidos se analizaron en SDS-PAGE (15% acrilamida) y mediante un programa de densitometría (Fuji BASS1000).

En los experimentos para la determinación de la exposición del C-terminal, los inmunoprecipitados y los sobrenadantes fueron analizados en SDS-PAGE (10% acrilamida), posteriormente los geles fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa y se revelaron mediante western blot (apartado 5.3 de M & M).

## **5.- TÉCNICAS ANALÍTICAS.**

### **5.1.- Electroforesis analítica en geles de poliacrilamida.**

Para la separación de proteínas se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y nativas según el método descrito por Laemmli (1970).

#### *En condiciones nativas (PAGE)*

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas se realizó utilizando geles discontinuos formados por un gel de empaquetamiento al 4% (p/v) y un gel de separación al 7% de acrilamida (p/v). El gel de separación se preparó con la mezcla de acrilamida/bisacrilamida en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8, persulfato amónico al 0,5% (p/v) y TEMED 6 mM. El gel de empaquetamiento contenía los mismos componentes, excepto que el tampón utilizado fue Tris-HCl 125 mM pH 6,8. Las muestras fueron suplementadas con tampón de carga nativo (25% del volumen total de la muestra) compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, glicerol al 20% (v/v) y azul de bromofenol al 0,05% (p/v). La electroforesis se desarrolló en una cámara refrigerada a

6°C, a 100 voltios durante 3 horas, en una cubeta Mini-Protean® III-2D Cell (Bio-Rad), siendo el tampón de electroforesis Tris 25 mM, Glicina 192 mM, pH 8.3.

*En condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).*

Para la electroforesis en condiciones desnaturalizantes se utilizaron geles discontinuos, constituidos por un gel de separación al 10% de acrilamida (p/v), y un gel de empaquetamiento al 4% de acrilamida (p/v). El gel de separación se preparó con la mezcla de acrilamida/bisacrilamida en tampón Tris-HCl 375 mM pH 8.8, SDS al 0.1% (p/v), persulfato amónico al 0.5% (p/v) y TEMED 6 mM. El gel de empaquetamiento contenía los mismos componentes, excepto que el tampón utilizado fue Tris-HCl 125 mM pH 6.8. Las muestras fueron suplementadas con tampón de disociación (25% del volumen total de la muestra) compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 8,8, glicerol al 25% (v/v), SDS al 1% (p/v), 2β-mercaptoetanol al 10% (v/v) y azul de bromofenol al 0,01% (p/v). Finalmente, las muestras se calentaron 3 min a 90°C y se resolvieron en una cubeta Mini-Protean® III-2D Cell (Bio-Rad), que contenía tampón de electroforesis Tris 25 mM-Glicina 192 mM pH 8.3, SDS al 0.1% (p/v), a voltaje constante de 110 V durante 2 h.

*Geles Peptídicos.*

Las electroforesis de péptidos se realizaron en condiciones desnaturalizantes en geles discontinuos formados por un gel de compactación al 5,76 % de acrilamida (p/v) y un gel de separación al 15% de acrilamida (p/v). El gel de separación contenía un 15% de una mezcla de acrilamida/bisacrilamida (19:1), tampón Tris-HCl 1M pH 8,45, 0,1% SDS, glicerol al 10%, APS 0,05% y TEMED 6 mM. El gel de compactación contenía Tris-HCl 0,75 M pH 8.45, SDS al 0.075% (p/v), persulfato amónico al 0.1% (p/v) y TEMED 6 mM. La electroforesis se desarrollo en una cubeta Mini-Protean® III-2D Cell (Bio-Rad), conteniendo un tampón ánodo (0,5 M Tris-HCl pH 8.9, 0,5 M Tricina) y un tampón cátodo (0,5 M Tris-HCl pH 8.45, 0,5 M Tricina, 0,5% SDS), a voltaje constante de 110 V durante 2 h.

La dimensión de los geles fueron 8x6 cm, 1,5 mm de grosor y 9 pocillos (minigeles).

En algunos casos se utilizaron como marcadores de peso molecular proteínas preteñidas de pesos moleculares conocidos (Sigma, Cod. C-1992; Bio-Rad, Cod. 161-0324).

## **5.2.- Tinción y secado de geles.**

Los geles se sumergieron durante 2 horas, en agitación suave, en una solución que contenía agua/etanol/ácido acético en relación (4:5:1) y azul de Coomassie R-250 al 0.2% (p/v), para su tinción. Para decolorarlos, se utilizó una mezcla de agua/etanol/ácido acético en relación (4:5:1) durante 15 horas. Posteriormente los geles se sumergieron durante 25 min en una solución que contenía agua/metanol/ácido acético/glicerol en relación (4,7:4:1:0,3). Por último los geles se secaron al vacío durante unas 2 horas en un equipo de secado de la marca Bio-Rad (modelo 543) conectado a una bomba de vacío.

## **5.3.- Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa (Western blot).**

La transferencia de las proteínas desde los geles de acrilamida a membranas de nitrocelulosa se llevó a cabo según la técnica de Western blot (Towbin *et al.*, 1979), descrita a continuación.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se sumergió durante 1 h en agitación, en tampón TGM (Tris 48 mM-Glicina 39 mM pH 9.2, metanol al 5% (v/v) y SDS al 0.037% (p/v). La transferencia de los polipéptidos a la membrana de nitrocelulosa (Sigma, poro 0.2  $\mu\text{m}$ ) se realizó utilizando tampón TGM, en un aparato Semidry Transfer blot (Bio-Rad), con voltaje constante (10 V) durante 30 min y una corriente límite de 5.5 mA/cm<sup>2</sup>. Una vez finalizada la transferencia, se realizó el siguiente tratamiento de la membrana, a temperatura ambiente.

1. Para verificar la eficacia de la transferencia, la membrana se tiñó con rojo Ponceau S al 0.2% (p/v) en ácido tricloroacético al 3% (p/v) durante unos minutos para revelar las proteínas transferidas. Posteriormente, la membrana se lavó unos minutos en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5 con NaCl 150 mM) para eliminar el colorante.
2. Saturación de la membrana. Ésta se incubó 2 veces durante 1 h con 200 ml de tampón TBS conteniendo leche desnatada en polvo al 5% (p/v). Con este tratamiento, se saturan los sitios de unión inespecíficos.

3. Incubación con anticuerpos primarios. La membrana se incubó durante 12 h en agitación continua con anticuerpos policlonales PEPC C<sub>4</sub>-IgGs ó APS-IgGs (30-50 µg anticuerpos totales)
4. Primer lavado. Para eliminar las uniones inespecíficas de los anticuerpos a la membrana, ésta se lavó 2 veces durante 30 min con 200 ml de tampón TBS, conteniendo Nonidet (NP 40) al 0.05% (v/v) en agitación continua.
5. Incubación con anticuerpos secundarios anti-inmunoglobulinas de conejo marcadas con peroxidasa (Bio-Rad, cod. 170-6515). La incubación se realizó durante 2 h en agitación con 5 µl de anti-inmnglobulinas de conejo en 15 ml de tampón TBS.
6. Segundo lavado. Seguidamente, la membrana se lavó 2 veces durante 30 min con 200 ml de tampón TBS conteniendo Nonidet al 0.05% (v/v).
7. Tercer lavado. Antes de proceder a su revelado, los restos del detergente Nonidet se eliminaron lavando la membrana durante 10 min con 200 ml de tampón TBS.
8. Revelado de la actividad peroxidasa. Se utilizó como sustrato 4-cloro-1-naftol (Sigma, C 8890). Una vez solubilizados 15 mg de 4-cloro-1-naftol en 5 ml de etanol previamente enfriado, se mezcló con 25 ml de TBS conteniendo 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% (p/v). La membrana se sumergió en esta mezcla a temperatura ambiente, durante 5 a 10 min, teniendo lugar en este tiempo la reacción colorimétrica que permite la detección de la proteína en la membrana. La reacción se paró al introducir la membrana en agua destilada.

## **6.- OTROS MÉTODOS.**

### **6.1.- Eliminación de sales y moléculas pequeñas.**

Los extractos crudos de hojas se filtraron en una columna de Sephadex G-25, cuyas dimensiones fueron variables en función del volumen de la muestra a filtrar, teniendo en cuenta la siguiente proporción: 1 ml Sephadex G-25 por cada 100 µl de muestra. La filtración se realizó a 4°C.

La eliminación de sales de las preparaciones enzimáticas purificadas, se llevó a cabo dializando las muestras en membranas de celulosa (Sigma, Ref. D-9277) que retiene proteínas de peso molecular superior a 12.000 Da, frente al mismo tampón de la muestra. El tratamiento se realizó a 4°C en agitación suave durante 12 horas. Las membranas se sometieron a un tratamiento previo que consistía en calentarlas 1 min a 80°C en agua destilada y lavarlas a continuación con abundante agua destilada durante 3-4 horas. Posteriormente, las membranas se almacenaron en agua destilada con azida sódica al 0,01% a 4°C hasta su uso.

### **6.2.-Concentración de muestras.**

Se realizó por ultrafiltración a través de una membrana Millipore Ultrafre-CL (Cod. UFCBGC) que impide el paso de moléculas de peso superior a 10 kDa. El proceso se llevó a cabo mediante centrifugación a 15.000 g durante 10 min a 4°C.

### **6.3.- Determinación de proteínas solubles.**

La determinación de proteínas en los extractos crudos se realizó según el método colorimétrico descrito por Bradford (1976). La muestra proteica se completó hasta un volumen de 500 µl de agua destilada, se mezcló con 500 µl de reactivo (Bio-Rad) y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se midió la absorbancia de dicha mezcla a 595 nm. Para determinar la concentración de proteínas presente en la muestra, se utilizó una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de albúmina serina bovina (Merck) (0 a 10 µg de proteína).

### **6.4.- Determinación del pH.**

Las medidas de pH se realizaron en un medidor de pH Crison, modelo GLP21 provisto de un electrodo Crison (Crison Instruments S.A. Alella, España).

## **7.-. APARATOS Y REACTIVOS.**

Para la elaboración de los medios de cultivo, se utilizaron productos Panreac (España), grado para análisis. Para los tampones de las electroforesis se utilizaron productos suministrados por Bio-Rad (USA). El [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP 2,7  $\mu\text{M}$  (1  $\mu\text{Ci}$ ; 10 Ci/mmol) de Hartmann Analytic GmbH (Germany) fue suministrado en España por el Grupo Taper, Madrid.

El resto de los reactivos fueron productos de Sigma (USA).

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en el espectrofotómetro modelo Helios  $\alpha$  (Thermo Spectronic, UV visible) usando cubetas de 1 cm de paso de luz.

Las centrifugaciones a temperatura ambiente se llevaron a cabo en una centrifuga Heraeus Pico 15 (Thermo Scientific). Para las centrifugaciones en frío se utilizaron la centrifugas refrigeradas P Selecta Microfreger-BL (rotor cod. 70001380) para eppendorf y Sigma 3K30 (rotores cod. 12111 y 12150) para volúmenes de hasta 50 ml.

Los ensayos a temperatura constante se llevaron a cabo en baños termostatizados P Selecta Tectrón 3000543 y P Selecta Frigiterm S-382.

Para la purificación de la PEPC se utilizo un LPLC Econo-System (Bio-Rad).



*RESULTADOS*



## IV.- RESULTADOS.

### 1.- IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEASA ACTIVADA POR EL PÉPTIDO C19.

#### 1.1.- Efecto del péptido sintético C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC.

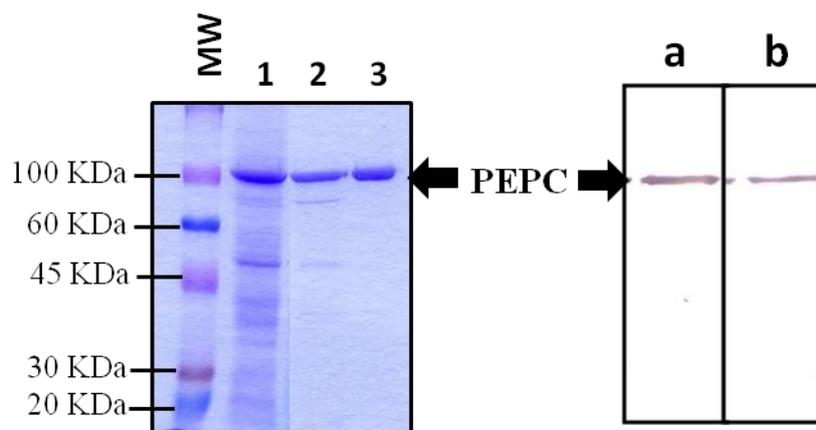
Resultados previos obtenidos en nuestro grupo han mostrado que un péptido sintético que contiene los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC (péptido C19; [(Y)942EDTLILTMKGIAAGMQNTG960]) es capaz de inhibir la fosforilación *in vitro* de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003), poniendo en evidencia una nueva función de esta secuencia altamente conservada, cuyas propiedades reguladoras aún no han sido muy estudiadas. En esta tesis hemos continuado con esta línea experimental e inicialmente quisimos ver si el péptido C19 tenía algún efecto sobre la actividad catalítica de la PEPC. Para ello utilizamos una preparación de PEPC semipurificada desfosforilada (PEPC-OH), obtenida a partir de hojas de sorgo mantenidas en oscuridad. Esta PEPC se purifica mediante una precipitación previa con polietilenglicol y posterior cromatografía a través de columnas de hidroxiapatito y Mono Q según se describe en el apartado 2.2 de M & M. La fracción proteica así obtenida está altamente enriquecida en PEPC y no se observa ninguna otra banda a nivel electroforético cuando se analiza tanto con azul de Coomassie como mediante western blot revelado con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs o C19-IgGs (ver figura 10). Esta preparación de PEPC es la que se utiliza rutinariamente en los experimentos realizados por nuestro grupo. Una alícuota de esta PEPC-OH semipurificada correspondiente a 0.3 U de la enzima, se incubó en presencia ó en ausencia del péptido C19 (60 moles), a 30°C, y se tomaron alícuotas para la determinación de la actividad PEPC a los tiempos señalados en la figura 11. Observamos que el péptido C19 inhibió la actividad de la PEPC a lo largo del tiempo de incubación (figura 11, gráfica, + C19). Los valores de actividad de la PEPC representados en la gráfica están recogidos en la figura 11A.

Según los resultados, después de 240 min de incubación en presencia del péptido C19 se produce una inhibición de la actividad PEPC superior al 80%, mientras que en el control la actividad permanece estable.

A)

	Actividad PEPC (U)	Proteína (mg)	Actividad específica (U/mg)	Purificación (veces)	Rendimiento (%)
Extracto crudo	1029	159	6.5	1	100
PEG (8,5-15%)	1106	34	32.5	5	107
Hidroxiapatito	686	3.2	214	34	67
Mono Q	344	1.3	264	45	33

B)

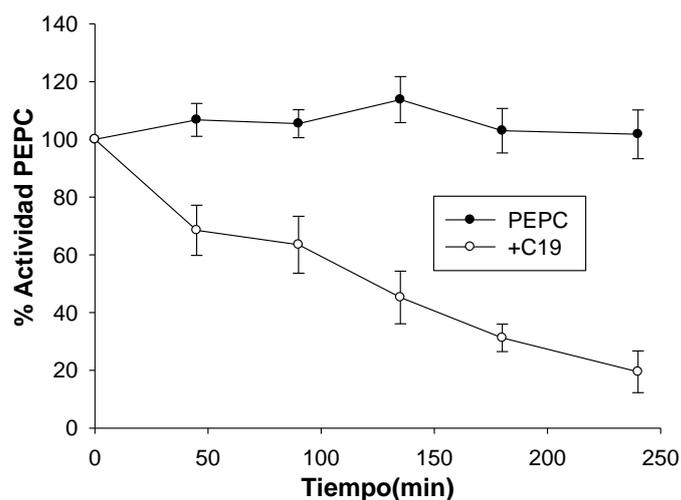


**Figura 10.- Purificación de la PEPC de hojas de sorgo de oscuridad por cromatografía de intercambio iónico.** A) Tabla de purificación. B) Grado de purificación de la PEPC obtenida por cromatografía de intercambio iónico, alícuotas correspondientes a 0,2 U de PEPC procedente del extracto crudo (pista1), después del primer paso de purificación en Hidroxiapatito (pista 2) o tras la segunda cromatografía en MonoQ (PEPC semipurificada) (pista 3) se analizaron en SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Por otro lado se analizó la PEPC semipurificada por western blot. En cada pista se cargo 0,05 U de PEPC. La membrana se reveló con anticuerpos anti-PEPC-C4 (pista a) y con anticuerpos anti C-terminal (pista b), ambos se describen en el apartado 4 de M & M.

A)

% ACTIVIDAD PEPC		
Tiempo(min)	PEPC	+ C19
0	100±0	100±0
45	106,7±5,6	68,5±8,7
90	105,4±4,8	63,5±9,8
135	113,7±7,9	45,2±9,1
180	103±7,7	31,5±4,7
240	101,7±8,4	19,5±7,2

B)



**Figura 11. Inhibición de la actividad PEPC en presencia del péptido C19.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó en presencia de 60 nmoles del péptido C19 (+C19) o en ausencia del péptido (PEPC), en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) a 30°C durante 4 horas. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial. **A)** La tabla muestra los valores medios de actividad y el error estándar, calculados a partir de 4 réplicas. **B)** Representación gráfica de los valores de la tabla.

*1.1.1.- Protección de la inhibición por metabolitos.*

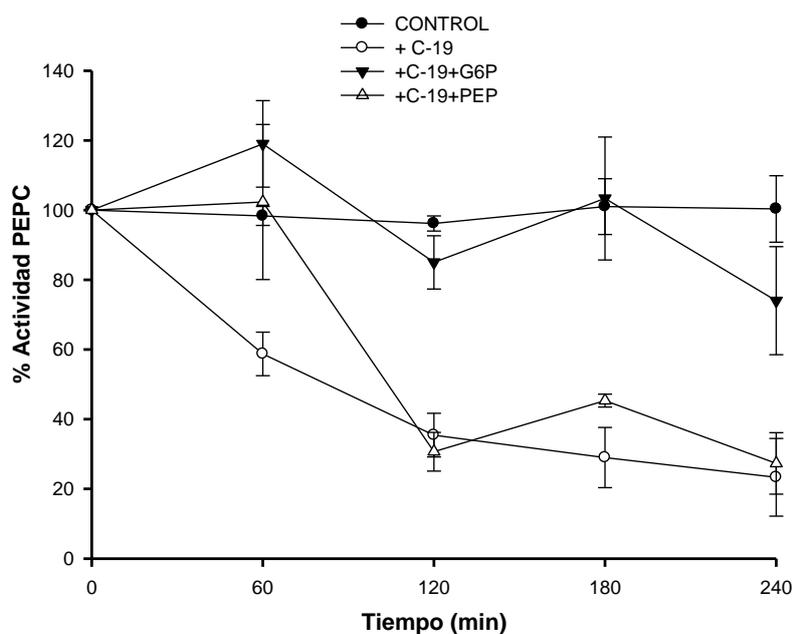
En plantas monocotiledóneas la PEPC está sometida a regulación alostérica. Azúcares fosfato como la glucosa 6-fosfato (G6P) actúan como efectores positivos de la enzima, mientras que otros metabolitos como el L-malato o el aspartato actúan como inhibidores. Además, el fosfoenolpiruvato (PEP) junto con el bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ), son sustratos de la enzima (Chollet *et al.*, 1996).

Los resultados presentados en la Figura 12 muestran que cuando la PEPC-OH semipurificada se incubaba en presencia del péptido C19 en un medio de incubación que contiene 5 mM de G6P la inhibición de la actividad PEPC provocada por el péptido no se produce (figura 12, + C19 + G6P). Sin embargo este efecto protector fue mucho más moderado a tiempos cortos, y casi nulo a largo tiempo, cuando la incubación con el péptido C19 se hacía en presencia de 2 mM de PEP (figura 12, +C19 + PEP). Estos resultados indican que la G6P protege a la enzima de la inhibición y que ésta es más efectiva que el PEP protegiendo a la enzima de la inhibición provocada por el péptido C19. Además, estos resultados sugieren que los cambios conformacionales de la PEPC producidos por la unión de su efector alostérico positivo G6P están íntimamente relacionados con el efecto del péptido C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC.

A)

% ACTIVIDAD PEPC				
Tiempo (min)	PEPC	+ C19	+C19 +G6P	+C19 +PEP
0	100±0	100±0	100±0	100±0
60	98,3±2,7	58,7±6,4	119±12,4	102,3±22,2
120	96,1±2,1	35,4±6,3	85±7,6	30,7±5,5
180	101±8	29±8,6	103,3±17,6	45,3±1,8
240	100,3±9,5	23,3±11,1	74±15,5	27,3±8,8

B)

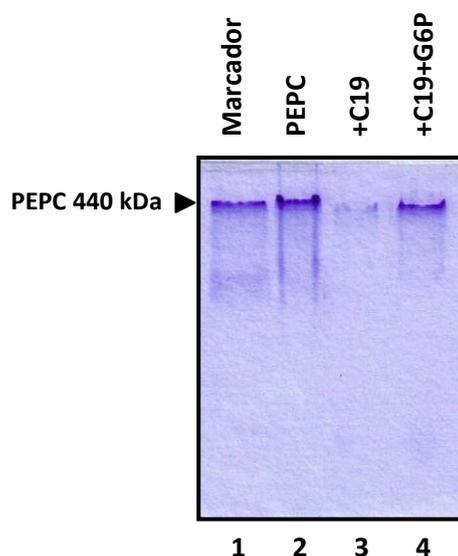


**Figura 12. Efecto del péptido C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC en presencia de G6P ó PEP.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó sola (PEPC) ó con 60 nmoles del péptido C19 (+C19) en presencia de 5 mM de G6P (+C19+G6P) ó con 2 mM de PEP (+C19+PEP), en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 M & M) a 30°C durante 4 horas. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial. **A)** La tabla muestra los valores medios de actividad y el error estándar, calculados a partir de 3 repeticiones. **B)** Representación gráfica de los valores de la tabla.

*1.1.2.- La pérdida de actividad PEPC en presencia del péptido C19 conlleva una pérdida en la cantidad de proteína.*

Dado que la inactivación de la enzima podía deberse a un proceso de inhibición catalítica o bien a una pérdida de la propia proteína, las muestras de PEPC-OH semipurificada incubadas durante 4 horas en ausencia o presencia del péptido C19 se analizaron mediante electroforesis nativa (PAGE) al 7% de acrilamida. Los resultados obtenidos muestran que en presencia del péptido C19 la PEPC-OH desaparece (figura 13, pista 3), por el contrario en las muestras incubadas en ausencia del péptido (figura 13, pista 2), o en presencia del péptido C19 y G6P (figura 13, pista 4) la cantidad de PEPC permanece estable.

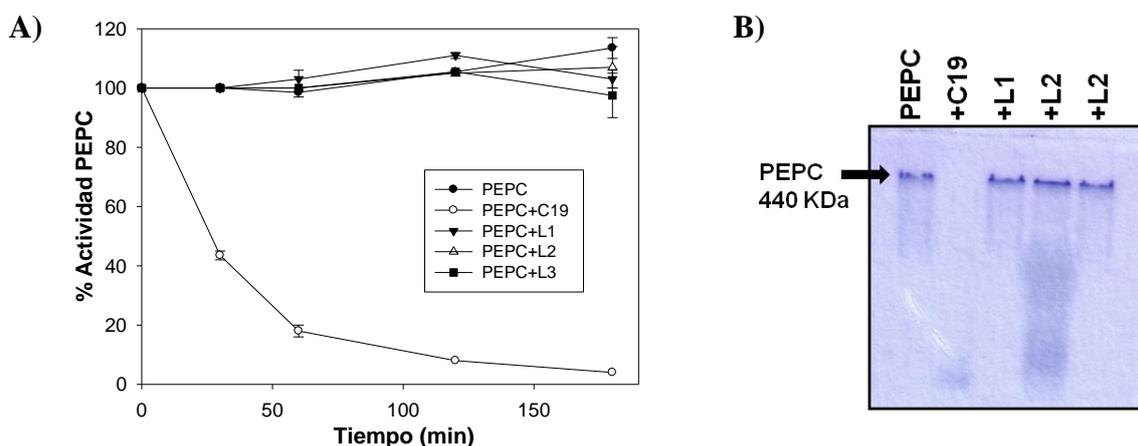
Estos resultados indican que la pérdida de la actividad PEPC en presencia del péptido C19 es debido a una desaparición de la proteína y que los cambios conformacionales producidos por la glucosa anulan el efecto del péptido C19 sobre la PEPC.



**Figura 13. Desaparición de la PEPC por incubación con el péptido C19 y efecto de la G6P.** 0.3U de PEPC-OH semipurificada (Control, pista 2) se incubaron a 30°C con 60 nmoles de péptido C19 (+C19, pista 3) ó con 60 nmoles de péptido C19 y 5 mM de G6P (+C19+G6P, pista 4) en 50 µl del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M). A los 180 min las muestras se analizaron en PAGE (7% de acrilamida). Una alícuota de 0.2 U de PEPC-OH a tiempo 0 se usó como marcador (pista 1).

### 1.1.3.- El efecto del péptido C19 es muy específico.

A partir del análisis cristalográfico de la estructura tridimensional de la PEPC en maíz y *E. coli* se ha observado que el dominio C-terminal de la PEPC es una extensa  $\alpha$ -hélice altamente hidrofóbica y muy conservada (Kait *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002). Para estudiar si el fenómeno de inhibición de la actividad de la PEPC por el péptido C19 era específico se diseñaron otros péptidos sintéticos, péptidos L1, L2 y L3, a partir de la estructura de la PEPC. Para ello se eligieron secuencias específicas de la PEPC de plantas, ausentes en la PEPC de *E. coli* y que están muy expuestas en la estructura de la proteína, además, los péptidos L2 y L3 poseen un grado de hidrofobicidad semejante al del péptido C19. En la gráfica de la figura 14 se observa que la actividad PEPC de las muestras de PEPC-OH semipurificada incubadas durante 150 min con los péptidos L1, L2 ó L3 permanece estable durante el tiempo de incubación mientras que la incubada con péptido C19 muestra una fuerte inhibición. Igualmente, el análisis en gel nativo de dichas muestras, al final del periodo de incubación, revela la integridad de la PEPC tanto en el control (figura 14B, PEPC) como en las muestras incubadas en presencia de los péptidos L1, L2 y L3 (figura 14B, L1, L2 y L3 respectivamente). Sin embargo, en la muestra de PEPC-OH incubada con el péptido C19 la PEPC ha desaparecido completamente (figura 14B, +C19).



**Figura 14.- Efecto de los péptidos L1, L2 y L3 sobre la PEPC.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó sola (PEPC) ó en presencia de los péptidos C19, L1, L2 ó L3 en 50  $\mu$ l del medio descrito en el apartado 3.3 de M & M durante 3 horas. **A)** A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir la actividad PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial y se representó gráficamente. Los datos son medias y errores estándar calculados a partir de tres repeticiones. **B)** Al final del tiempo de incubación 25 $\mu$ l (0,15U de PEPC) de las distintas muestras se analizaron en PAGE (7% de acrilamida). El gel tiñó con azul de Coomassie.

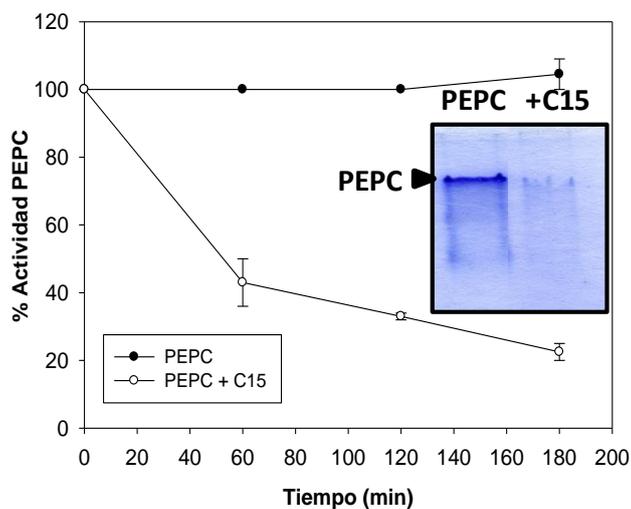
Los resultados anteriores muestran que el efecto del péptido C19 no es reproducido por otros péptidos que representa distintas secuencias de PEPC como son los péptidos L1, L2 y L3, lo que le confiere una alta especificidad a dicho efecto.

También se estudió el efecto de dos péptidos sintéticos denominados C15 y C19 mutado (Apartado 1.3 de M & M) sobre la actividad catalítica y la desaparición de la PEPC-OH semipurificada. El péptido C15 es similar al péptido C19 pero carece del tetrapéptido terminal lineal QNTG. Este tetrapéptido, en la PEPC, carece de estructura secundaria y es indispensable para la actividad catalítica de la enzima pues su delección produce una pérdida total de la actividad (Dong *et al.*, 1999). Como se observa en la figura 15A el péptido C15 tiene el mismo efecto sobre la PEPC-OH semipurificada que el C19 tanto sobre la actividad como a nivel de gel (figura 15A, pista C15).

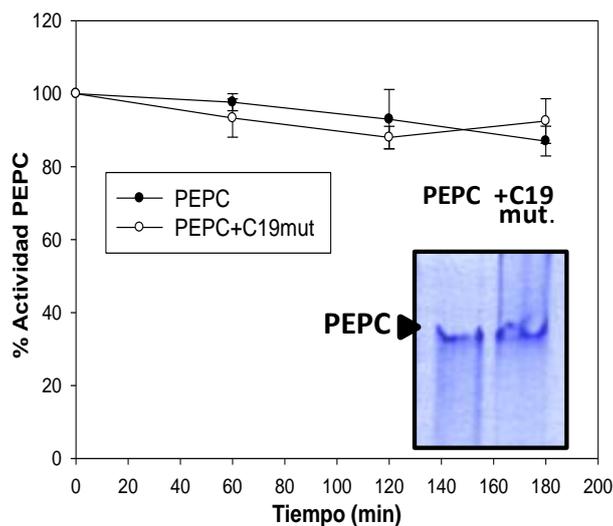
El otro péptido analizado (C19 mutado) es similar al C19 pero con la excepción de que las tres treoninas que contiene el péptido y que corresponden a las posiciones 944, 948 y 959 en la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo se han sustituido por tirosinas [942(Y)EDYLILYMKGIAAGMQNYG960]. Cuando dicho péptido se incubaba con la PEPC-OH semipurificada, en las mismas condiciones utilizadas para los ensayos con el péptido C19, observamos que el péptido C19 mutado no tiene ningún efecto ni sobre la actividad, la cual permanece estable durante el tiempo de incubación, ni sobre la desaparición cuando se analiza en gel (figura 15B).

Todos estos resultados muestran que el efecto del péptido C19 sobre la actividad catalítica de la PEPC o sobre la desaparición de la misma es específico de esta secuencia, que el tetrapéptido terminal lineal no es necesario, que la hidrofobicidad del péptido no es el factor primordial en la interacción y que dos treoninas (944 y 948) son residuos claves en la inhibición y desaparición de la PEPC desencadenada por el péptido C19, bien porque se establezca una interacción directa con estos residuos, bien porque las sustituciones alteren la estructura secundaria del péptido.

A)



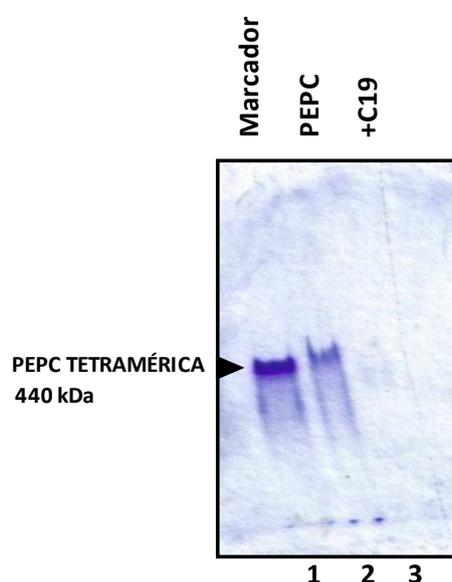
B)



**Figura 15.- Efecto de los péptidos C15 y C19 mutado sobre la PEPC-OH semipurificada.** Alícuotas de 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó en ausencia (PEPC) o en presencia de péptido en 50  $\mu$ l del medio descrito en el apartado 3.3 de M y M durante 3 horas a 30°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir la actividad PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial y se representó gráficamente. Los datos son medias y errores estándar calculados a partir de tres repeticiones. Al final del tiempo de incubación unos 30  $\mu$ l (0,2U de PEPC) de las muestras se analizaron en PAGE (7% de acrilamida) y se tiñeron con azul de Coomassie. **A)** Efecto del péptido C15. **B)** Efecto del péptido C19 mutado.

1.1.4.- La pérdida de la proteína en presencia del péptido C19 no es debida a la formación de macroagregados ni a precipitación.

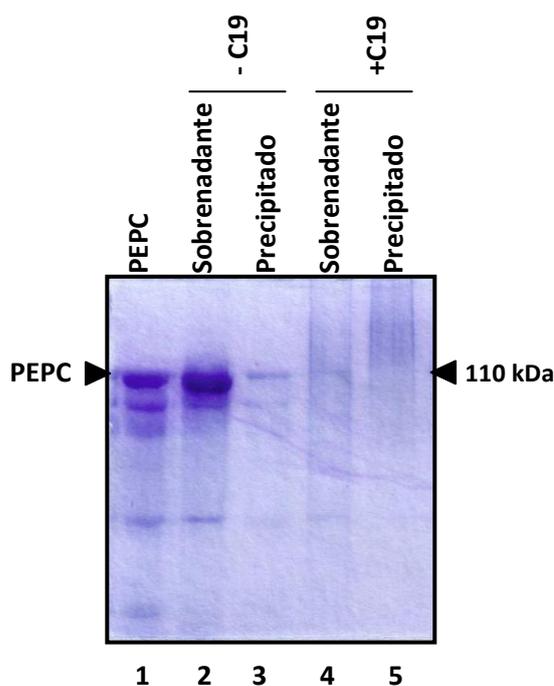
La PEPC es una proteína multimérica constituida por un homotetrámero que se organiza como un dímero de dímeros (Matsumura *et al.*, 2002). Además, debido a la multiplicidad de funciones que presenta, existen diferentes isoenzimas de PEPC en la planta. En *Sorghum bicolor*, por ejemplo, se han descrito 4 isoenzimas de PEPC: una PEPC de tipo C<sub>3</sub> constitutiva; una PEPC fotosintética de tipo C<sub>4</sub>; una PEPC de raíz, inducible de tipo C<sub>3</sub> y una PEPC de tipo bacteriano que es la más separada evolutivamente del resto (Paterson *et al.*, 2009). Todas ellas son tetraméricas, sin embargo, se ha descrito en ricino la existencia de una PEPC heterooctamérica de aproximadamente 910 kDa, formada por la asociación de subunidades de tipo bacteriano (118 kDa) y de tipo C<sub>3</sub> (107 kDa) (Gennidakis *et al.*, 2007). Una de las hipótesis planteadas era que el péptido C19 pudiera inducir la formación de un macroagregado inactivo de alto peso molecular. Sin embargo, este tipo de macroagregados no se han visualizado ni en geles nativos del 7% de acrilamida (figura 13, pista 3) ni en geles nativos del 4 % de acrilamida (figura 16, pista 3).



**Figura 16. La desaparición de la PEPC no media a través de la formación de un macroagregado.** 0.3 U de PEPC semipurificada se incubaron a 30°C en ausencia (PEPC, pista 2) o en presencia (+C19, pista 3) de 60 nmoles de péptido C19 en 50 µl del medio descrito en el apartado 3.3 de M y M. A los 180 min las muestras se analizaron en PAGE al 4% de acrilamida. Una alícuota de 0.2 U de PEPC-OH a tiempo 0 se usó como marcador (pista 1).

También se tuvo en cuenta la posible existencia de un artefacto experimental, más concretamente que el péptido C19, debido a su naturaleza hidrofóbica, pudiera inducir la precipitación de la enzima. Para descartar esta posibilidad se realizó un ensayo de incubación de la PEPC en presencia del péptido C19 y después de tres horas de incubación se centrifugó la muestra para separar el hipotético precipitado de la fracción soluble. El precipitado se resuspendió en el mismo tampón de incubación y ambas fracciones se analizaron en SDS-PAGE al 10% de acrilamida. La PEPC se localizó en el sobrenadante de las muestra control incubada en ausencia del péptido C19 (figura 17, pista 2), sin embargo, en las muestras incubadas con péptido C19 la PEPC no se localizó ni en el sobrenadante ni el precipitado poniendo en evidencia la degradación o proteolisis de la enzima (figura 17, pistas 4-5).

Estos resultados indican que por cromatografía en Hidroxiapatito y Mono Q se obtiene, a partir de hojas de sorgo en oscuridad, una fracción proteica con un gran contenido en PEPC pero en la que se copurifica una proteasa. Esta proteasa es específicamente activada por los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal, (péptido C19) de su propio sustrato, la PEPC. Este proceso está además regulado por efectores alostéricos de la PEPC como la G6P.



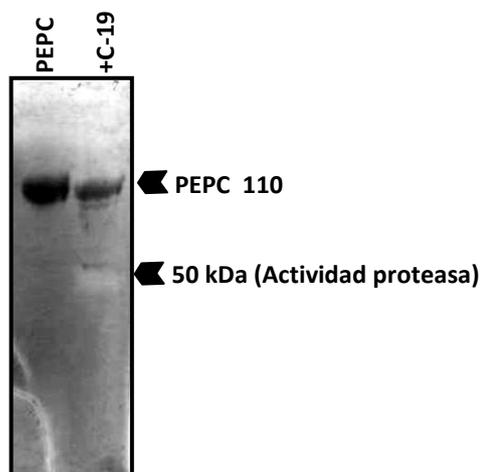
**Figura 17. El péptido C19 no provoca la precipitación de la PEPC.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó en ausencia (- C19) o en presencia (+C19) de 60 nmoles de péptido C19, en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) a 30°C. Después de 180 min de incubación las muestras se centrifugaron a 12000g durante 10 min a 4°C. Se separaron sobrenadante y precipitado, se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y el gel se tiñó con azul de Coomassie. Una alícuota de 0.2 U de PEPC-OH a tiempo 0 de incubación se usó como marcador (PEPC, pista 1)

## **1.2.- Pruebas experimentales de la presencia de una proteasas en la fracción de PEPC semipurificada.**

*1.2.1.- El análisis de la fracción PEPC-OH semipurificada en zimogramas revela la presencia de actividad proteasa dependiente de péptido C19.*

Mediante el uso de geles de zimogramas (geles de acrilamida copolimerizados con un sustrato proteico como caseína o gelatina) se constató la existencia de una actividad proteasa en la fracción de PEPC-OH semipurificada. Para ello, una muestra de PEPC-OH semipurificada se incubó durante 3 horas en presencia del péptido C19 y después se cargó en un gel de acrilamida copolimerizado con caseína. Una vez desarrollada la electroforesis el gel se incubó durante 24 horas en un medio de reacción para detectar actividad proteasa (ver apartado 3.4 de M & M). La actividad proteolítica se visualizó como una banda clara sobre el fondo negro, fruto de la degradación de la caseína (figura 18, +C19). La mayor actividad proteasa se localizó como una única banda de alrededor de 50 kDa, en un medio de incubación a pH 6.5 y suplementado con péptido C19 a una concentración de 1.2 mM. En cualquier caso, la presencia del péptido C19 tanto en la preincubación de la muestra como durante la incubación del gel se reveló como fundamental para la detección de la actividad proteolítica de forma que, la muestra control (PEPC) preincubada antes de la electroforesis en ausencia del péptido no reveló actividad proteolítica aún cuando el gel fue incubado en presencia del péptido. Este dato corrobora que esta banda corresponde a la actividad proteasa detectada en los experimentos que es inducida por el péptido C19. Por el contrario, no se observó actividad proteolítica incubando el gel a pH ácido de 4 en presencia del péptido ni utilizando gelatina como sustrato de proteolisis.

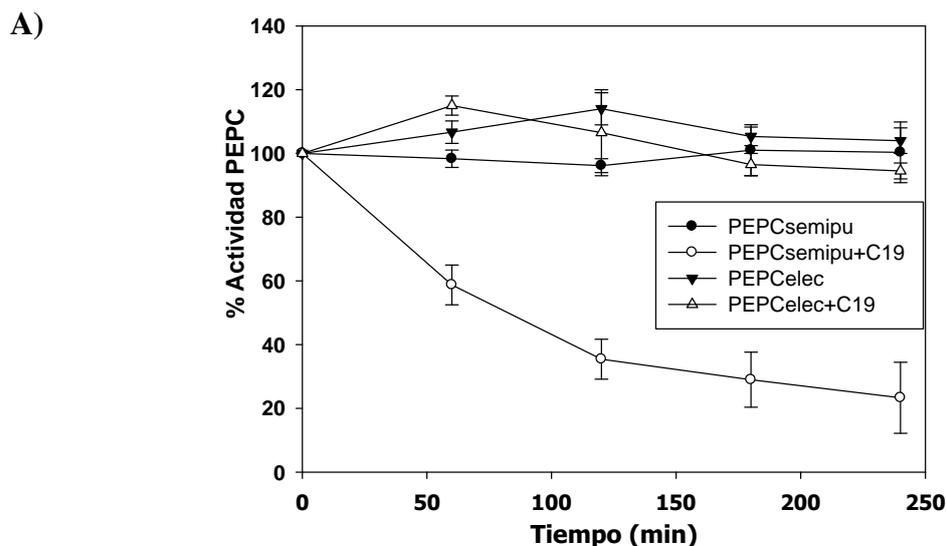
Estos experimentos revelan la presencia en la fracción PEPC-OH semipurificada de una proteasa con un peso molecular aproximado de 50 kDa, activa a pH 6.5 y que es estrictamente dependiente de la presencia del péptido C19 para su activación a la que hemos denominado proteasa C19. Además, los resultados muestran que la actividad proteasa es estrictamente dependiente del péptido C19 incluso para proteolizar otros sustratos distintos a la PEPC como la caseína, confirmando que la acción del péptido es sobre la proteasa y no sobre la PEPC. Esta es la primera vez que se describe una actividad proteolítica de estas características.



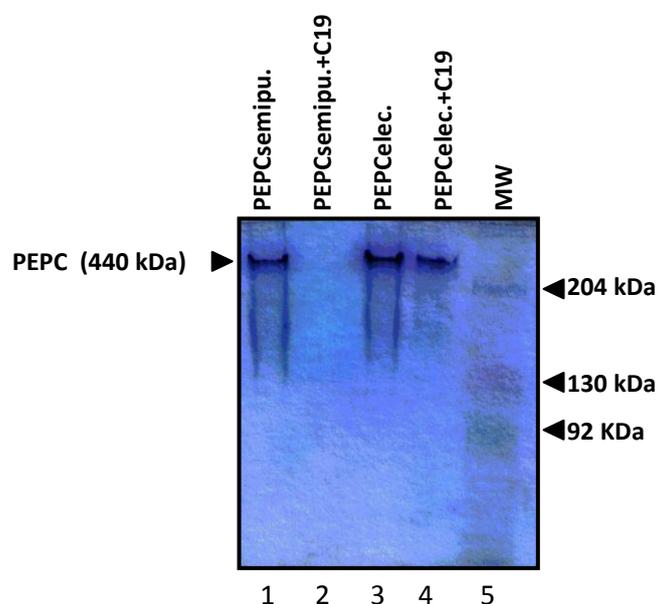
**Figura 18. Análisis de la actividad proteasa contenida en la fracción de PEPC-OH semipurificada.** Una alícuota de 0.6 U de PEPC-OH semipurificada se incubó en presencia (+C19) o en ausencia (PEPC) de 80 nmoles de péptido C19. Después de 3 horas de incubación a 30°C, las muestras se cargaron en un gel al 12% de acrilamida copolimerizado con caseína (Ver apartado 3.4 de M & M). La actividad proteasa se ensayó a pH 6.5 en presencia de 1.2 mM de péptido C19. El gel se reveló con amido black.

#### 1.2.2.- Separación de la PEPC y de la proteasa por electroelución.

Finalmente, se realizó un paso más de purificación mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida de forma que, si las dos proteínas (PEPC y la posible proteasa) tenían diferente movilidad electroforética bastaría recuperarlas por electroelución para obtener así una fracción PEPC libre de actividad proteolítica y prácticamente pura. Para ello se cargaron unas 50 unidades de PEPC-OH semipurificada en un gel nativo al 7 % de acrilamida sin gel de compactación y se desarrolló la electroforesis durante 3 horas, a 100 V y a 4°C. Una vez terminada la electroforesis se reveló la PEPC según el método descrito en el apartado 2.3 de M & M. La banda que se revela por este método corresponde a la PEPC activa. Posteriormente, la banda se electroeluyó obteniendo así una fracción proteica denominada “PEPC electroeluida” (PEPCelec) (Ver apartado 2.3 de M & M). La PEPC-OH electroeluida se utilizó como fuente de PEPC en un ensayo de inhibición por el péptido C19. A lo largo de la incubación se tomaron alícuotas de las muestras para cuantificar la actividad PEPC a distintos tiempos y finalmente se analizó la muestra en geles nativos. Los resultados muestran que la actividad de la PEPC electroeluida no se ve afectada por la presencia del péptido C19 (figura 19A, pista PEPCelec + C19) y que la cantidad de PEPC detectada en PAGE es similar a la de la PEPC incubada en ausencia del péptido (figura 19B, pista PEPCelec), indicando la ausencia de actividad proteasa C19 en esta fracción de PEPC.



B)

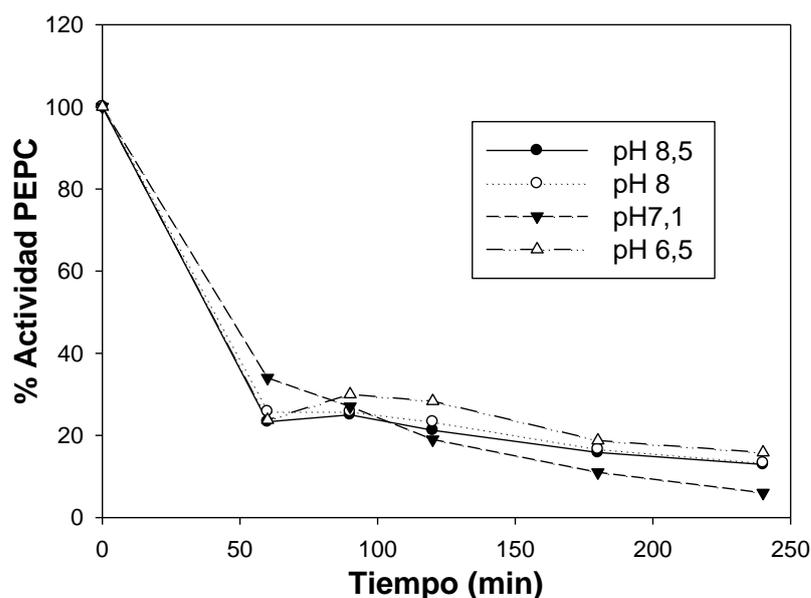


**Figura 19. La PEPC electroeluída no se proteoliza *in vitro* en presencia del péptido C19.** Una alícuota de 0.6 U de PEPC semipurificada (líneas 1 y 2) o de PEPC electroeluída (líneas 3 y 4) se incubó en ausencia (PEPC) o en presencia (PEPC+C19) de 120 nmoles de péptido C19, en 100  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) a 30°C durante 4 horas. **A)** Medidas de la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP a los tiempos indicados utilizando 5  $\mu$ l de muestra. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial y se representó gráficamente. Los datos son medias y errores estándar calculados a partir de tres repeticiones **B)** Análisis mediante PAGE (7%) de una alícuota correspondiente a 50  $\mu$ l de cada tratamiento y revelado con azul de Coomassie. MW, marcadores de peso molecular (pista 5); PEPCsemipu, fracción de PEPC-OH semipurificada; PEPCelec, fracción de PEPC electroeluída.

### 1.3. Caracterización de la proteasa C19.

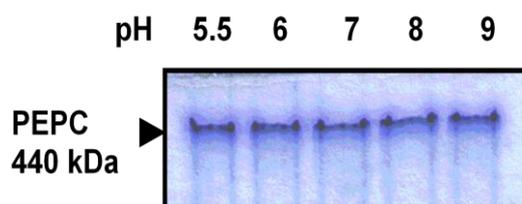
#### 1.3.1.- Efecto del pH sobre la actividad de la proteasa C19.

El zimograma analizado anteriormente revela actividad proteolítica a un pH de 6,5. Para estudiar el pH óptimo de la enzima hemos realizado el ensayo de actividad proteasa a diferentes pHs. Los resultados de la figura 20 muestran que la proteasa C19 es igualmente activa en los rangos de pH estudiados, desde 6,5 hasta 8,5. Estos resultados y los obtenidos en el zimograma anterior en los que no se reveló actividad a pH ácido de 4 confirman que se trata de una proteasa neutra.



**Figura 20. Efecto del pH sobre la actividad proteasa C19 en presencia del péptido C19.** Se incubaron 0,3U de PEPC-OH semipurificada en presencia del péptido C19 a diferentes pH en 50  $\mu$ l del medio descrito en el apartado 3.3 de M & M durante 4 horas a 30°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial y se representó gráficamente. Para el pH 6,5 se utilizó tampón MES 0.1 M, 20% de glicerol.

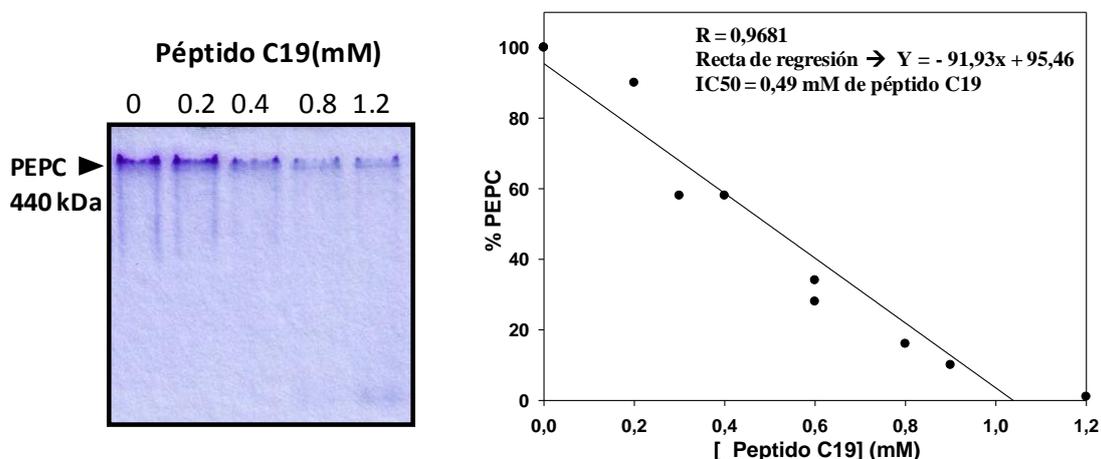
Dado que el pH es un importante elemento regulador de la actividad catalítica de las proteasas (Domínguez del Toro, 1997) analizamos si en ausencia del péptido C19 la proteasa pudiera activarse en algún valor de pH. Se incubaron alícuotas de PEPC-OH semipurificada en ausencia del péptido C19 en un rango de pH 5.5-9 durante 270 min y después se analizaron las muestras en PAGE (7% de acrilamida). A ninguno de los pH de incubación se observó estimulación apreciable de la actividad proteasa a través de la desaparición de la PEPC a nivel electroforético (figura 21). Este experimento confirmó que la activación de la PEPC proteasa no es dependiente del pH y si estrictamente dependiente de la presencia del péptido C19 a cualquiera de los pH ensayados.



**Figura 21. Efecto del pH sobre la actividad proteasa en ausencia del péptido C19.** Alícuotas correspondientes a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubaron durante 270 min a 30°C en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) a distintos pH. Para los medios ácidos (pH 5.5-6) se utilizó tampón MES 0.1 M, 20% de glicerol. Las muestras se analizaron en PAGE (7% de acrilamida) y el gel se tiñó con azul de Coomassie.

### 1.3.2.- Constante de afinidad para el péptido C19 y efecto del EGTA.

Otro parámetro estudiado fue la constante de activación de la proteasa C19 ( $K_a$ ) por el péptido C19. Se prepararon muestras con PEPC-OH semipurificada, correspondiente a 0.3 U, y cantidades crecientes de péptido. Después de tres horas de incubación se analizaron en PAGE al 7 % (figura 22, gráfico) y se cuantificaron las bandas del gel mediante un programa de análisis por densitometría (PCBas 2.0). Se observó que a medida que aumentábamos la cantidad de péptido C19 disminuía la cantidad de PEPC tras 3 horas de incubación, presentado un valor de  $K_a$  para el péptido de 0,49 mM.



**Figura 22. Constante de activación ( $K_a$ ) de la proteasa C19 por el péptido C19.** Muestras conteniendo 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubaron con distintas concentraciones de péptido C19 en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) durante 180 min a 30°C. **A)** Análisis mediante PAGE (7 %) y tinción mediante azul de Coomassie. **B)** Representación gráfica de la cantidad de PEPC, como porcentaje respecto a la muestra carente de péptido, respecto a la cantidad de péptido C19. La cuantificación se realizó mediante el programa de análisis por densitometría PCBAS2.0.

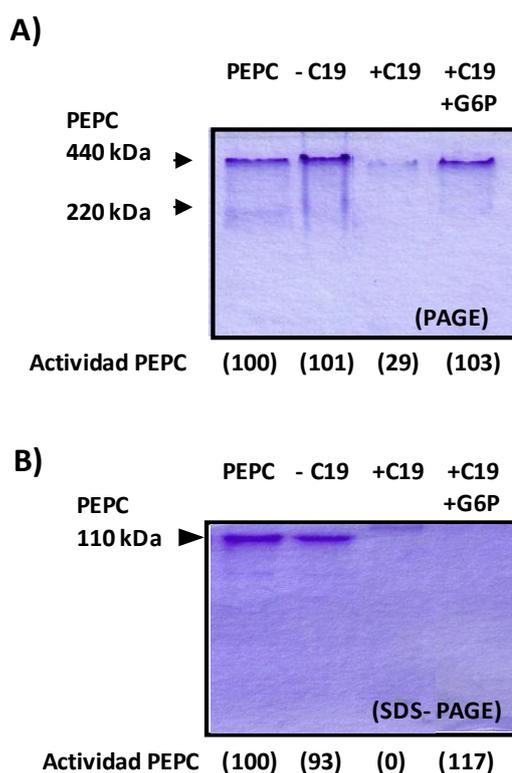
Para ver si la degradación de la PEPC era dependiente de calcio se realizó la reacción de proteólisis en presencia de EGTA. La figura 23 muestra que el EGTA no tiene efecto sobre la actividad PEPC proteasa, por lo que no pertenece al grupo de las fitocalpains tratándose por tanto de una proteasa calcio independiente (Margis y Margis-Pinheiro, 2003).

<i>Tiempo(min)</i>	% ACTIVIDAD PEPC	
	<i>PEPC</i>	<i>+ C19+EGTA</i>
0	100	100
180	105	9

**Figura 23.- Efecto del EGTA sobre la actividad proteasa C19.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se incubó a 30°C en ausencia (PEPC) o en presencia de 60 nmoles de péptido C19 y 1 mM de EGTA (+C19+EGTA), en 50  $\mu$ l del medio descrito en el apartado 3.3 de M & M. A los 180 min las muestras se utilizaron para medir la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial.

### 1.3.3.- Efecto de la desnaturalización sobre la actividad proteasa C19.

Hemos observamos que durante la desnaturalización de la PEPC en presencia del péptido C19, para su posterior análisis en SDS-PAGE, se producía una estimulación de la proteólisis. Este fenómeno ocasionó la desaparición de la PEPC incluso en presencia de G6P (figura 24B, pista +C19+G6P), la cual permanecía integra en condiciones nativas (figura 24A, +C19+G6P) y conservaba su actividad (figura 24B, +C19+G6P, actividad entre paréntesis) antes de la desnaturalización. Esta estimulación de la degradación de proteínas en presencia de SDS (condiciones desnaturalizantes) ha sido descrita varias veces en la literatura ya que, la desnaturalización expone los puntos de corte y facilita el acceso de las proteasas (Dalling et al., 1983; Yamada et al., 1998, 2000). Este resultado es uno más que se añade a la evidencia de la existencia de una proteasa en la fracción PEPC semipurificada.



**Figura 24.- Estimulación de la actividad proteasa C19 por SDS.** 0.3U de PEPC-OH semipurificada (- C19) se incubaron a 30°C con 60 nmoles de péptido C19 (+ C19) ó con 60 nmoles de péptido C19 y 5 mM de G6P (+C19+G6P) en 50 µl del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M). Se cuantifico la actividad PEPC a pH 8 a los 180 min y se represento respecto a la actividad inicial (datos entre paréntesis en la figura). A tiempo final unos 35 µl de cada tratamiento se analizaron: **A)** Mediante PAGE (7 % acrilamida). **B)** Mediante SDS-PAGE. (10% acrilamida).

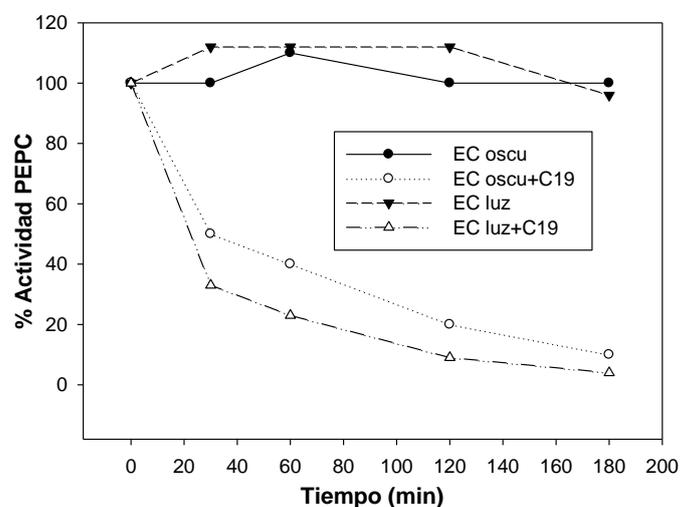
*1.3.4.- La presencia de actividad proteasa C19 no está regulada por cambios luz-oscuridad.*

La iluminación es un componente regulador esencial en las células de plantas C<sub>4</sub>. Gran variedad de enzimas y sus ARNm correspondientes son regulados por luz observándose un incremento varias veces mayor en sus niveles en el paso de condiciones de oscuridad a condiciones de luz (Nelson y Langdale, 1992). Un claro ejemplo de ello es la PEPC quinasa cuyos niveles de transcripción y traducción están íntimamente ligados a la intensidad de luz (Echevarría y Vidal, 2003).

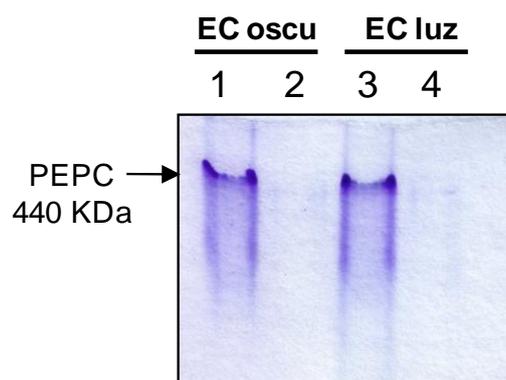
En todos los ensayos mostrados anteriormente se ha utilizado una fracción de PEPC-OH semipurificada a partir de hojas de sorgo de oscuridad como fuente de proteasa C19. Partiendo de que la luz es un importante elemento regulador de la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo C<sub>4</sub>, nos planteamos analizar si la proteasa C19 estaría presente en condiciones de luz, y por tanto, si se regularía por este factor.

Se obtuvo una fracción de PEPC semipurificada (Ver apartado 2.2 de M & M) a partir de hojas de sorgo previamente iluminadas y se determinó la presencia de la proteasa C19 en dicha fracción mediante un ensayo de su actividad. Como puede observarse en la figura 25 se detecta actividad proteasa C19 tanto en la PEPC semipurificada obtenida a partir de hojas de luz (EC luz) como en la PEPC semipurificada obtenida de hojas de oscuridad (EC oscu). Estos resultados muestran que la presencia de la proteasa C19 no responde a cambios luz-oscuridad, sin embargo experimentos futuros serán necesarios para determinar si su expresión es constitutiva en hojas de sorgo.

A)



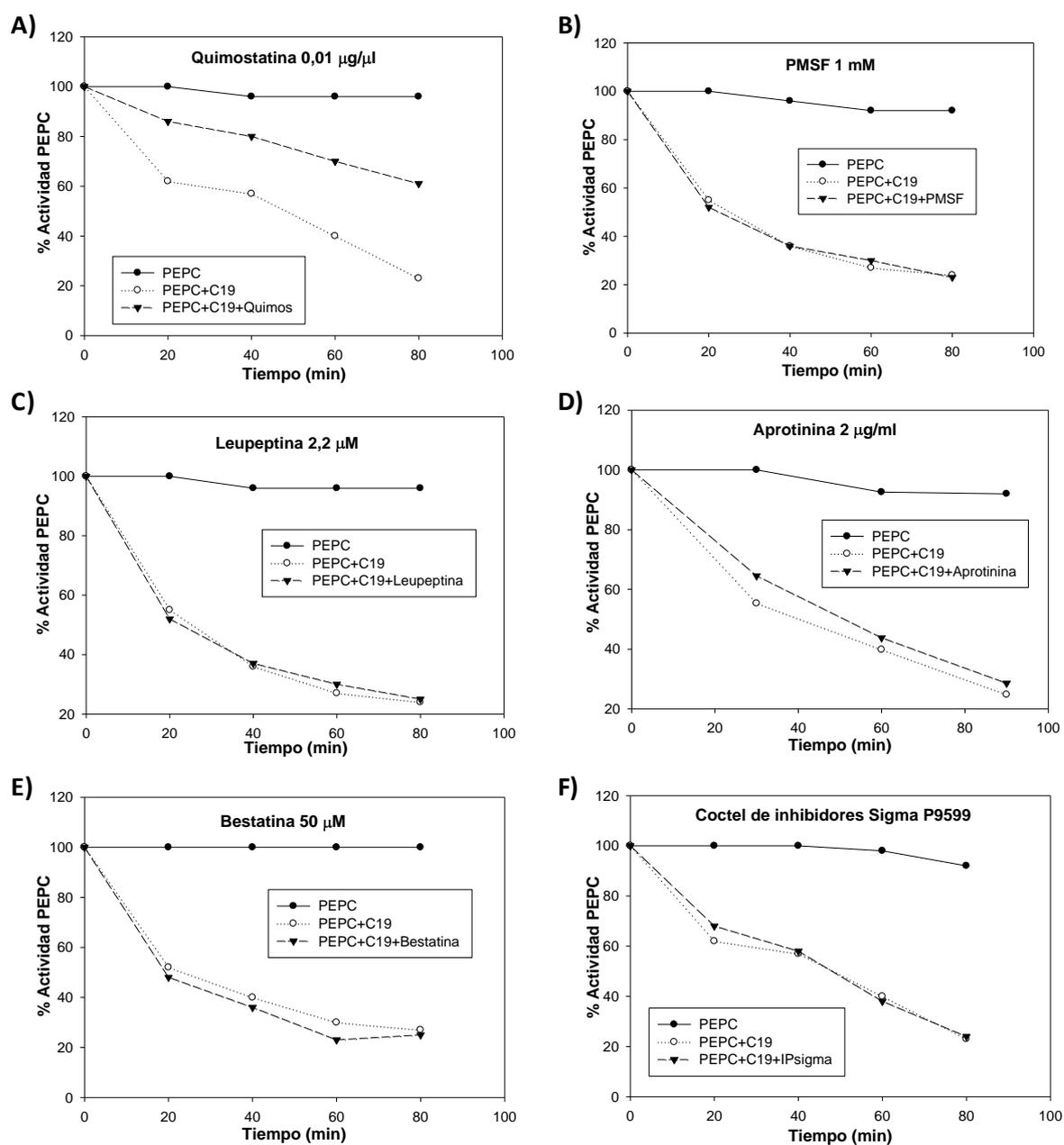
B)



**Figura 25.- Análisis de la presencia de actividad proteasa C19 en fracciones de PEPC semipurificada de luz y oscuridad.** Una alícuota correspondiente a 0.3 U de PEPC semipurificada a partir de hojas de sorgo de oscuridad (EC oscu) o de luz (EC luz) se incubó en presencia de 60 nmoles del péptido C19 (+C19, pistas 2 y 4) o en ausencia del péptido (pistas 1 y 3), en 50  $\mu$ l del medio de incubación (ver apartado 3.3 de M & M) a 30°C durante 3 horas. **A)** A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu$ l para medir la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial. **B)** Al final del periodo de incubación las muestras se analizaron en PAGE (7% de acrilamida) y el gel se reveló con azul de Coomassie.

### *1.3.5.- Efecto de inhibidores de proteasas.*

La utilización de inhibidores proteolíticos se revela como la manera más eficaz de caracterizar el tipo de proteasa en función del mecanismo de catálisis o de las características del sitio activo, pudiendo diferenciarse principalmente entre cisteín proteasas, serín proteasas, aspártico proteasas o metaloproteasas (Van der Hoorn, 2008; Schaller, 2004). Con el objetivo de caracterizar la proteasa contenida en la fracción de PEPC semipurificada y determinar su pertenencia a alguno de estos grupos de proteasas, se realizaron ensayos de incubación de la PEPC semipurificada con el péptido C19 en presencia de diferentes inhibidores de proteasas conocidos y que son representativos de los principales tipos de proteasas conocidas. Se ha testado una amplia gama de inhibidores como PMSF (inhibe serín-proteasas), leupeptina (inhibe tiol-proteasas), quimostatina (inhibe serín y cisteín-proteasas), aprotinina (inhibe algunas serín proteasas), bestatina (inhibe metaloproteasas) y un cóctel comercial de inhibidores específicos para proteasas de plantas (sigma P9599) que contenía AEBSF (inhibe serín-proteasas), fenantrolina (inhibe metaloproteasas), pepstatina A (inhibe proteasas ácidas), leupeptina, bestatina (inhibe aminopeptidasas) y E-64 (inhibe cisteín-proteasas) (Beynon, 1990; Zollner, 1990). De todos los inhibidores ensayados sólo la quimostatina, inhibidor de serín y cisteín proteasas, es capaz de inhibir la actividad proteasa C19 en un 40 % a concentraciones de 0,01 µg/µl (figura 26A), sin embargo, concentraciones superiores de quimostatina no mejoraban la inhibición. El resto de los inhibidores ensayados no inhiben de forma apreciable la actividad proteolítica de la fracción PEPC-OH semipurificada ni a las concentraciones mostradas ni superiores (figura 26, B-F). Por último, se ensayó el DPDS que es un inhibidor muy eficaz de una asparragil-proteasa capaz de proteolizar el extremo N-terminal de la PEPC de ricino (Crowley *et al.*, 2005). Este inhibidor tampoco fue eficaz en la inhibición de nuestra proteasa (dato no mostrado). Estos resultados sugieren que la proteasa C19 podría incluirse dentro del grupo de serín proteasa o de cisteín proteasas. El mecanismo catalítico de ambos grupos es muy similar y algunas serín proteasas están evolutivamente muy relacionadas con las cisteín proteasas (Van der Hoorn, 2008; Beynon, 1990; Zollner, 1990). De acuerdo con estos resultados, en los ensayo de proteólisis se utilizó rutinariamente inhibidores de proteasas que pudieran proteger a la PEPC de otras actividades proteolíticas diferentes a la proteasa C19 pues nunca se utilizó quimostatina.



**Figura 26.- Determinación de la sensibilidad de la proteasa C19 a distintos inhibidores.**

Una alícuota correspondiente a 0,3 U de PEPC se incubó, durante 80 min a 30°C, en ausencia (PEPC) o en presencia de 60 nmoles de péptido (PEPC+C19) o en presencia del péptido C19 y diferentes inhibidores de proteasas: **A)** Quimostatina 0,01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ; **B)** PMSF 1 mM; **C)** Leupeptina 2,2  $\mu\text{M}$ ; **D)** Aprotinina 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; **E)** Bestatina 50  $\mu\text{M}$ . **F)** Coctel de inhibidores (Sigma P9599) al 1%. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  para medir actividad PEPC a pH8 y 2,5 mM de PEP. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial y se representó gráficamente. Los datos representados son valores medios de dos repeticiones.

En su conjunto, los resultados expuestos en este capítulo muestran que la fracción proteica PEPC semipurificada obtenida según el apartado 2.2 de M & M, contiene una proteasa que se copurifica con la PEPC. Esta proteasa se activa específicamente en presencia de un péptido C19 que simula el extremo C-terminal de su propio sustrato. Se trata de una proteasa neutra, calcio independiente, con un peso molecular aproximado de 50 kDa y con una  $K_a$  para el péptido C19 de 0,49 mM. La proteólisis de la PEPC se ve ralentizada en presencia del su efector positivo G6P y acelerada cuando la PEPC se encuentra en condiciones desnaturalizantes. Su presencia no responde a cambios luz-oscuridad sugiriendo una posible expresión constitutiva. Finalmente, los experimentos con inhibidores de proteasas, nos permiten proponer que podría pertenecer a la familia de las serín o cisteín proteasas. Sin embargo, trabajos posteriores serán necesarios para dilucidar este último punto.

#### **1.4.- Purificación de la proteasa por cromatografía de afinidad al C-terminal.**

Una prueba contundente de que dos moléculas interaccionan es la retención específica de una de ellas en una cromatografía de afinidad. A tal efecto, se preparó una columna de afinidad (Hi-trap<sup>TM</sup>, Pharmacia) con el péptido C19 inmovilizado sobre la agarosa (ver preparación de la columna en apartado 2.4 de M & M), en la que se depositó un extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad (1.2 ml de extracto crudo correspondiente a 30 U de PEPC). La cromatografía se realizó tanto a bajo como a alto potencial iónico. Primero se cargó la fracción proteica contenida en un tampón con baja concentración salina (Tampón A descrito en apartado 2.4 de M & M). La elución se realizó con tampón A conteniendo NaCl 0,5 M. La fracción así obtenida contiene proteínas unidas a la matriz con una baja fuerza iónica y constituye la fracción 1 obtenida en este experimento. El filtrado de esta cromatografía que contiene gran cantidad de sales (alta fuerza iónica) se concentró y se volvió a pasar por la columna. Esta segunda vez la elución se realizó con agua MiliQ, y la fracción eluída contiene proteínas que interaccionan con la matriz preferentemente por interacciones hidrófobas. La fracción proteica así obtenida constituye la fracción 2 utilizada en este experimento. Para analizar la existencia de proteasa(s) en las fracciones eluídas se incubó una alícuota de éstas con PEPC purificada por electroelución, la cual carece de actividad proteasa C19, en presencia del péptido C19. Como se observa en la figura 27 ambas fracciones purificadas contiene actividad proteasa, pues se produce una pérdida tanto de actividad catalítica de la PEPC como de la proteína cuando se analiza en PAGE.

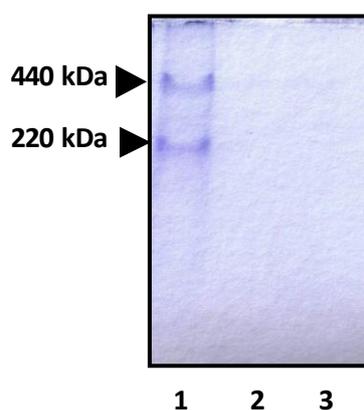
Estos resultados muestran la retención de actividad proteasa por afinidad con el C-terminal de la PEPC (péptido C19) tanto en condiciones hidrófilas como hidrófobas y confirma la interacción entre ambas moléculas apoyando los resultados mostrados en los apartados anteriores que sugerían que la proteasa C19 interacciona con el péptido C19 promoviendo su activación.

A)

Tiempo	% Actividad PEPC		
	PEPC+FP2	PEPC+FP1 +C19	PEPC+FP2 +C19
0	100	100	100
60	80	65	75
120	84	56	70
180	80	60	53
240	84	43	35

B)

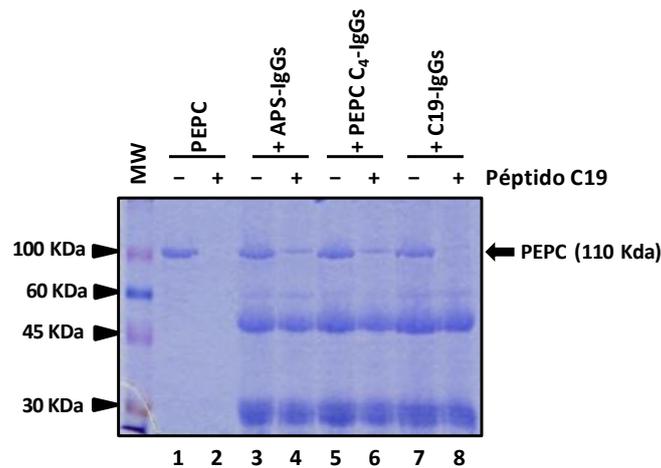
PEPCelectroeluída	+	+	+
Fración Proteasa1	-	-	+
Fración Proteasa2	+	+	-
Péptido C19	-	+	+



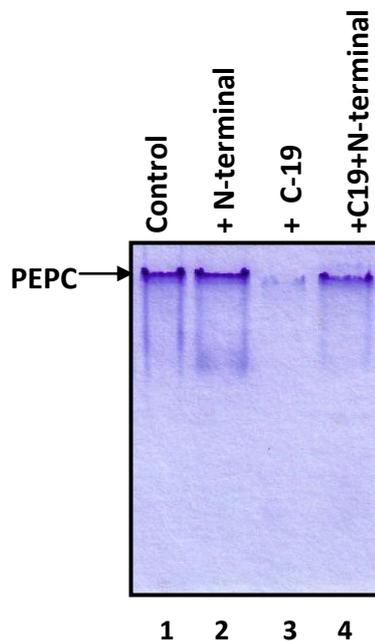
**Figura 27.- Purificación de la proteasa C19 por cromatografía de afinidad en una matriz con péptido C19 inmovilizado.** Se realizó un ensayo de actividad proteasa con las fracciones obtenidas mediante cromatografía de afinidad (ver apartado 2.4 en M & M). Una alícuota de PEPC electroeluída, sustrato de proteólisis, se incubó con la fracción proteasa 2, en ausencia (pista 1) o en presencia de 60 nmoles de péptido C19 (pista 2), o con la fracción proteasa 1 en presencia del péptido C19 (pista 3) en 67  $\mu$ l del medio de incubación descrito en el apartado 3.3 de M & M. La reacción se desarrolló a 30°C durante 4 horas. **A)** Medidas de la actividad de la PEPC a pH 8 y 2.5 mM de PEP. La actividad se expresa como porcentaje respecto a la actividad inicial. **B)** Análisis mediante PAGE (7% acrilamida) y tinción con azul de Coomassie.

### **1.5.- La proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 comienza en el extremo N-terminal.**

El extremo N-terminal de la PEPC, el cual contiene el dominio de fosforilación (Ser8 en la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo), juega un importante papel en la regulación de la actividad y la estabilidad de la enzima (Chollet *et al.*, 1996). Además, diversos estudios han puesto de manifiesto que el extremo N-terminal de la PEPC es muy susceptible de ser proteolizado *in vitro* (Crowley *et al.*, 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes se diseñaron una serie de experimentos para dilucidar si el extremo N-terminal de la PEPC contenía algún punto de corte o dominio de reconocimiento para la proteasa C19. En una primera aproximación se preincubó la PEPC durante 30 min con anticuerpos APS-IgGs dirigidos contra un péptido sintético que contiene 21 aminoácidos del extremo N-terminal de la PEPC-C<sub>4</sub> de sorgo donde se incluye la serina fosforilable [4ERHHSIDAQLRALAPGKVSEE24(YG)]. Los resultados presentados en la figura 28 muestran que dichos anticuerpos, protegen parcialmente a la enzima de la degradación por la proteasa C19 (figura 28, pista 4). Igualmente, la adición de anticuerpos policlonales anti PEPC C<sub>4</sub> (PEPC C<sub>4</sub>-IgGs) también protegen parcialmente a la enzima de su degradación pues contienen IgGs contra el dominio N-terminal además de bloquear otros dominios expuestos de la proteína (figura 28, pista 6). Sin embargo, el bloqueo del extremo C-terminal de la PEPC con anticuerpos específicos (C19-IgGs) previo al ensayo de proteólisis no tiene ningún efecto sobre la degradación de la PEPC (figura 28, pista 8). Estos resultados sugieren que en el extremo N-terminal podría encontrarse un punto de corte de la proteasa, más concretamente en los 21 aminoácidos que conforman el péptido contra el que van dirigidos los anticuerpos (ver apartado 4 de M & M). También podría suceder que los cambios conformacionales asociados a la unión del anticuerpo, los cuales también alteran las propiedades cinéticas de la PEPC (Paquit *et al.*, 1995), ocultaran sitios de corte fundamentales para la proteólisis de la PEPC. Para discriminar entre estas dos posibilidades se realizó un experimento en el que la PEPC-OH semipurificada se incubó en presencia de péptido C19 y del péptido sintético N-terminal (ver apartado 1.3 de M & M). Los resultados obtenidos muestran que la adición del péptido N-terminal produce un bloqueo de la proteólisis de la enzima en muestras incubadas en presencia del péptido C19 (figura 29, pista 4, +C19+N-terminal).



**Figura 28. Efecto de los anticuerpos APS-IgGs, PEPC C<sub>4</sub>-IgGs y C19-IgGs sobre la degradación de la PEPC en presencia del péptido C19.** Una alícuota correspondiente a 0,3 U de PEPC semipurificada se preincubó durante 1 hora en presencia de 40µg de los distintos anticuerpos en 35 µl de medio del medio de reacción (ver apartado 3.3 de M & M). Posteriormente se añadió el péptido C19 (60 nmoles) (pistas 2, 4, 6 y 8) y se incubó durante 3 horas más. Finalmente las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10%). MW, marcadores de peso molecular.



**Figura 29. Efecto del péptido N-terminal sobre la proteólisis de la PEPC en presencia del péptido C19.** 0.3 U de PEPC-OH semipurificada (Control) se incubaron a 30 °C con 60 nmoles de péptido N-terminal (+N-terminal) ó con 60 nmoles de péptido C19 (+C19) ó con 60 nmoles de ambos péptidos (+C19+N-terminal) en 50 µl del medio de reacción (ver apartado 3.3 de M & M). A los 180 min las muestras se analizaron en PAGE (7%).

Estos resultados revelan que el péptido N-terminal actúa como un inhibidor de la proteasa y permiten concluir que la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 comienza en su extremo N-terminal y más concretamente en alguno de los aminoácidos contenidos en la secuencia de 18 aminoácidos reproducida en el péptido N-terminal. El efecto del péptido N-terminal media a través de una inhibición competitiva por la proteasa entre el péptido N-terminal y la PEPC. Además, se deduce que el ataque en este dominio de la enzima es imprescindible para su posterior degradación por la proteasa C19, ya que, en condiciones en que la proteasa no puede acceder a este segmento, bien porque esté bloqueado con anticuerpos o bien porque se establezca una competición con el péptido sintético N-terminal, la proteólisis se bloquea aún en presencia del péptido activador C19.

#### **1.6.- La fosforilación de la PEPC regula la proteólisis de la PEPC, por la proteasa C19.**

##### *1.6.1.- La proteasa C19 tiene baja afinidad por el péptido N-terminal fosforilado.*

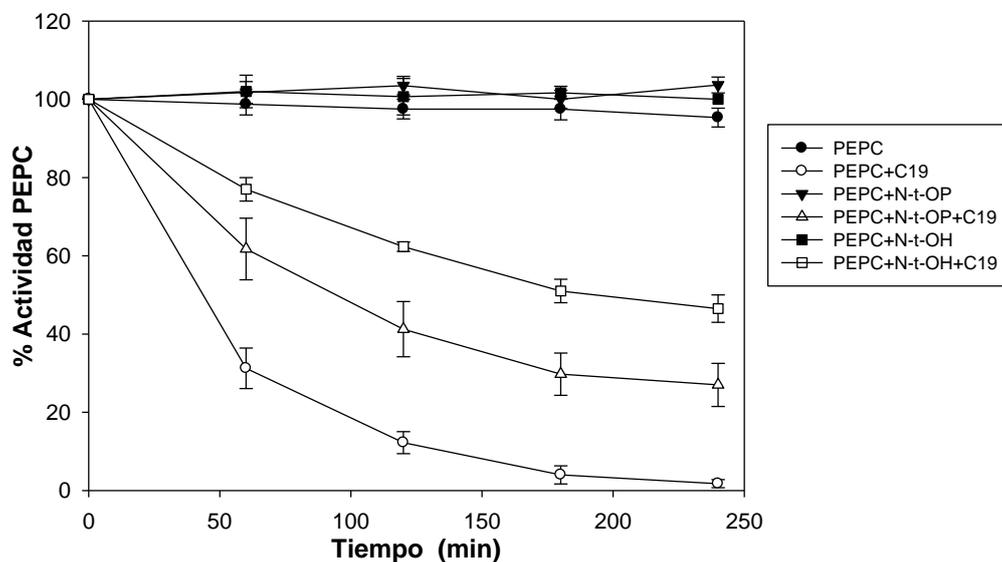
La fosforilación de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo produce un aumento de su V<sub>max</sub>, una bajada en la sensibilidad al L-malato y una mayor sensibilidad a su activación por G6P en condiciones de pH subóptimo de 7.3 (Echevarría *et al.*, 1994). Durante más de dos décadas este ha sido el único papel asignado a la fosforilación de la PEPC, es decir, modular sus propiedades cinéticas a pH subóptimo de 7,3 y proteger a la enzima contra su efector negativo el L-malato, aumentando así la eficacia de la catálisis en condiciones en que el L-malato se acumula en la célula del mesófilo. En plantas C<sub>4</sub>, las altas concentraciones de malato en las células del mesófilo son necesarias para crear un gradiente entre 10 y 40 mM de malato, según la especie, que permita el flujo de carbono entre el mesófilo y la vaina en condiciones de máxima fotosíntesis (Leegood, 2000). El pH es un importante factor regulador de la actividad PEPC, pues los efectos de la fosforilación sobre la regulación de la enzima sólo son efectivos a pH subóptimo pero fisiológicos (Echevarría *et al.*, 1994). Los resultados expuestos en el capítulo anterior muestran que la proteólisis de la PEPC comienza en el extremo N-terminal de la PEPC,

y más concretamente en una secuencia de aminoácidos que contiene el motivo de fosforilación de la enzima. Para ver si la fosforilación de la PEPC estaría implicada en la regulación de su proteólisis por la proteasa C19, realizamos una serie de ensayos de proteólisis con PEPC-OH semipurificada y péptido C19, en presencia de dos péptidos N-terminales que difieren en el residuo de serina de la posición 8 (Ser8) en sorgo, el cual está desfosforilado en el péptido N-t-OH [1MASERHHSIDAQLRALAP18] y fosforilado en el péptido N-t-OP [1MASERHHS(PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>)IDAQLRALAP18] (ver apartado 1.3 de M & M).

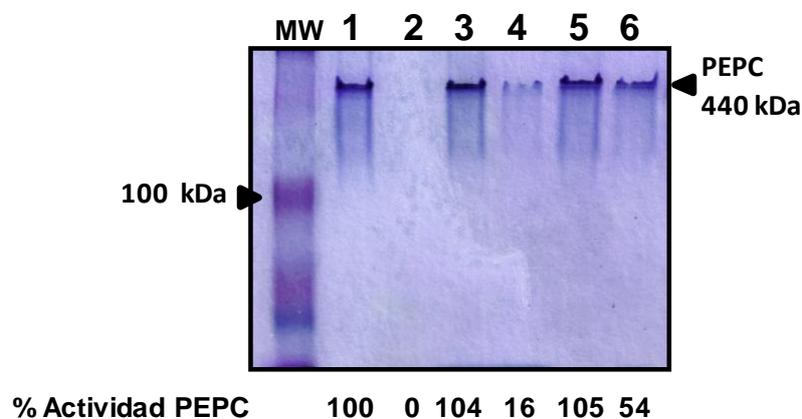
La figura 30 muestra que en presencia del péptido N-terminal fosforilado se produce un menor bloqueo de la proteólisis de la PEPC (figura 30, PEPC+C19+N-t-OP, pista 4), cuantificada a través de la pérdida de actividad (figura 30A) y de su desaparición en gel (figura 30B), cuando se compara con los resultados obtenidos con el péptido N-terminal desfosforilado (figura 30, PEPC+C19+N-t-OH, pista 6).

Estos resultados muestran que la introducción de un fosfato en la serina 8 del péptido N-terminal disminuye la afinidad de la proteasa por el péptido N-terminal y se reduce la capacidad de este para competir con la PEPC por el sitio activo de la proteasa C19. Esto dotaría al mecanismo de regulación de la PEPC por proteólisis que en este trabajo se describe, de un sentido más integrado y fisiológico dentro de la regulación de la PEPC por fosforilación.

A)



B)



**Figura 30.-** Ensayo de actividad proteasa C19 en presencia de los péptidos N-terminales desfosforilado (N-t-OH) y fosforilado (N-t-OP). Una alícuota de 0.3 U de PEPC-OH semipurificada (PEPC, pista 1) se incubó durante 4 horas a 30°C con 60 nmoles de los péptidos C19, N-t-OH y N-t-OP en distintas combinaciones en 50 µl del medio de reacción (ver apartado 3.3 de M & M). **A)** Representación gráfica de la actividad PEPC medida a los tiempos indicados a pH 8, 2,5 mM de PEP y con 5µl de muestra. La actividad se expresa como porcentaje respecto a la actividad inicial. Los valores representados son medias y errores estándar calculados a partir de tres ensayos. **B)** Análisis en PAGE (7% de acrilamida) de 40 µl de cada muestra al final del periodo de incubación y valores de actividad a tiempo final respecto al tiempo 0. Tinción del gel con azul de Coomassie. Pista 1, PEPC; Pista 2 PEPC+C19; Pista 3, PEPC+N-t-OP; Pista 4, PEPC+C19+N-t-OP; Pista 5, PEPC+N-t-OH; Pista 6, PEPC+C19+N-t-OH.

1.6.2.- La PEPC fosforilada es menos susceptible a ser proteolizada por la proteasa C19.

Continuando con el estudio del posible papel regulador de la fosforilación sobre la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19, aumentamos el nivel de complejidad pasando del uso de péptidos sintéticos como herramientas, a la proteína completa, ya que, los efectos de la fosforilación no se limitan al extremo N-terminal de la enzima (Pacquit *et al.*, 1995). Para ello, se realizó un ensayo de proteólisis utilizando la PEPC semipurificada tanto en estado desfosforilado (PEPC-OH) como fosforilado (PEPC-OP). La fosforilación se desarrolló previamente al ensayo de proteólisis utilizando PKA como fuente de quinasa (ver apartado 3.5 de M & M). El estado de fosforilación se comprobó a través de la cuantificación de la IC<sub>50</sub> de la PEPC obteniendo unos valores de 0,6 mM para la PEPC-OH y 1 mM para la PEPC-OP (ver apartado 3.2 M & M).

Como se puede observar en la figura 31 la PEPC fosforilada (PEPC-OP+C19) es más resistente a ser inhibida y por tanto proteolizada *in vitro* por la proteasa C19 que la PEPC en estado desfosforilado (PEPC-OH+C19).

Estos resultados confirman los ya obtenidos utilizando los péptidos y demuestran que el estado de fosforilación de la PEPC modifica la sensibilidad de la enzima a su degradación por la proteasa C19. Además, muestran que los péptidos sintéticos son herramientas de estudio idóneas, ya que, reflejan el mismo resultado que se obtiene con la proteína completa.

Similares resultados se obtienen cuando se utiliza como fuente de PEPC y de proteasas C19 un extracto crudo procedente de hojas de sorgo. Para ello se prepararon extractos crudos tal y como se describe en el apartado 2.1 de M & M a partir de hojas de sorgo previamente iluminadas durante dos horas con luz solar (ECluz) o a partir de hojas mantenidas en oscuridad toda la noche (ECoscu). La fosforilación en la PEPC C<sub>4</sub> es inducida por luz (Bakrim *et al.*, 1992), por lo que la mayor parte de la PEPC contenida en la fracción ECluz esta fosforilada mientras que en la fracción ECoscu la PEPC se encuentra fundamentalmente en estado desfosforilado, hecho que fue corroborado mediante el test de malato, con una IC<sub>50</sub> para el EC oscuridad de 0,35 mM y para el de luz de 1 mM (ver apartado 3.2 M & M).

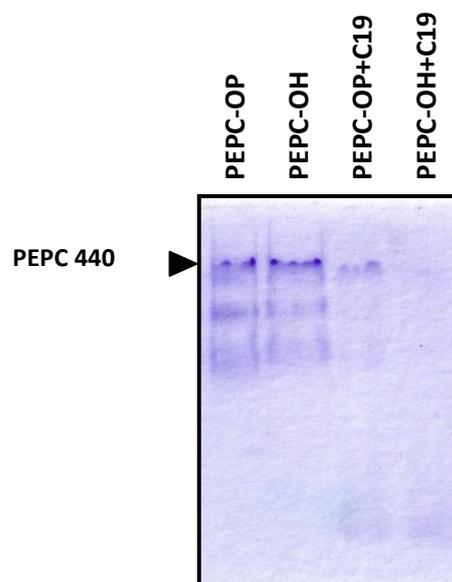
Cuando ambas fracciones se incuban en presencia del péptido C19 se observa que la PEPC del extracto de oscuridad (figura 32A, ECoscu+C19) muestra una inhibición más acusada a lo largo del tiempo de incubación que la PEPC procedente del extracto de luz (figura 32A, ECluz+C19). Esta pérdida de actividad en presencia del péptido C19 se correlaciona con una reducción en la cantidad de proteína debido a su proteólisis cuando se analiza en PAGE (figura 32B), fundamentalmente en el extracto de oscuridad (figura 32B, ECoscu+C19). Sin embargo, la diferencia de proteólisis entre los estados de fosforilación es menor cuando se utiliza un extracto crudo (figura 32B) que cuando se utiliza la fracción de PEPC semipurificada (figura 31B), probablemente debido al hecho de que en el extracto crudo la preparación de PEPC y proteasa C19 puede diferir de la contenida en la fracción de PEPC semipurificada.

El conjunto de los resultados obtenidos nos permite afirmar que la fosforilación de la PEPC está íntimamente relacionada con su regulación por proteólisis, lo que supone una mejor integración de la actividad proteasas C19 dentro del metabolismo fotosintético C<sub>4</sub> y más concretamente dentro de la regulación de la PEPC. Además, se demuestra que la PEPC cuando esta fosforilada es más resistente a ser proteolizada *in vitro* por la proteasa C19, obteniéndose resultados muy similares cuando utilizamos péptidos, PEPC semipurificada o extractos crudos de hojas.

A)

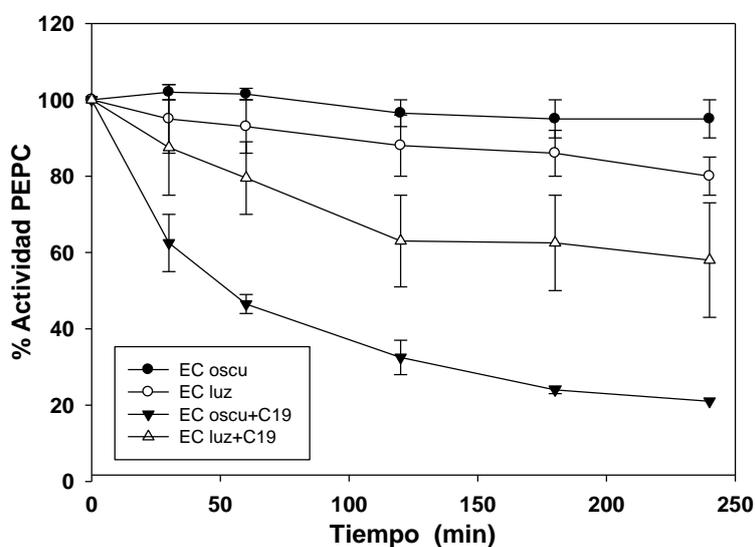
Tiempo	% ACTIVIDAD PEPC			
	PEPC-OP	PEPC-OH	PEPC-OP +C19	PEPC-OH +C19
180	100	100	100	100
	<i>Péptido C19 (70 nmoles)</i>			
240	104	100	100	70
300	104	140	89	50
360	110	130	58	37

B)

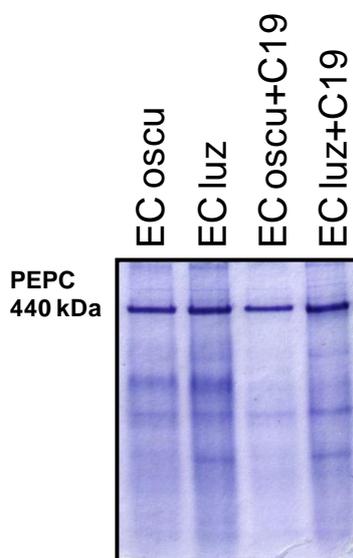


**Figura 31.- La PEPC fosforilada (PEPC-OP) con PKA es más resistente a la proteólisis.** Inicialmente se incubaron 0.6 U de PEPC-OH semipurificada con PKA (PEPC-OP) ó sin PKA (PEPC-OH) en 100  $\mu$ l del medio de incubación descrito en el apartado 3.5 de M & M, suplementado con ATP 5 mM. La fosforilación se desarrolló durante 3 horas a 30°C. Finalizada la fosforilación, se añadieron 70 nmoles de péptido C19 o el medio de preparación del péptido en su defecto, incubando a las muestras durante otras tres horas a 30°C. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir actividad PEPC a pH 7,3 y 2.5 mM de PEP. Al final de la incubación las muestras restantes se analizaron en PAGE. **A)** Medidas de la actividad de la PEPC después de la adición del péptido. La actividad se expresa como porcentaje respecto a la actividad inicial. **B)** Análisis mediante PAGE (7% de acrilamida), tinción con azul de Coomassie.

A)



B)



**Figura 32.- Efecto de la fosforilación de la PEPC procedente de extractos crudos de hojas de sorgo sobre la actividad proteasa C19.** Se incubaron 0,3U de PEPC procedentes de extractos crudos de hojas de sorgo de luz (ECluz) y de oscuridad (ECoscu) (ver apartado 2.1 M & M) en presencia (+C19) o no de 60 nmoles de péptido C19 durante 4 horas a 30°. A los tiempos indicados se tomaron alícuotas para medir actividad PEPC a pH 7,3 y 2.5 mM. Al final de la incubación las muestras se analizaron en PAGE. **A)** Medidas de la actividad de la PEPC después de la adición del péptido. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial. Los valores representados son medias y errores estándar calculados a partir de tres ensayos. **B)** Análisis mediante PAGE (7% de acrilamida), tinción con azul de Coomasie.

## 2.- ESTUDIO DE LA ACCESIBILIDAD DEL EXTREMO C-TERMINAL DE LA PEPC.

Análisis de comparación de secuencias de aminoácidos deducidas a partir de varios ADN complementarios de PEPC y varios genes *Ppc*, han puesto en evidencia la existencia de un dominio muy bien conservado que engloba aproximadamente los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC. Esta secuencia de 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC, a diferencia del dominio N-terminal, está bien conservada incluso en la PEPC de organismos procariotas (Ej. *E. coli*) (Dong *et al.*, 1999; Chollet *et al.*, 1996).

Mediante difracción por Rayos-X se ha estudiado la estructura tridimensional de la PEPC de *E.coli* y se ha observado que el extremo C-terminal de la proteína forma una extensa  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -hélice-40) desde la Pro-861 hasta la Met-879 rematada por un tetrapéptido terminal lineal (QNTG). La  $\alpha$ -hélice-40 está inmersa en una región hidrófoba dentro de la misma subunidad la cual está constituida por varias  $\alpha$ -hélices (Kai *et al.*, 1999). Posteriormente se ha publicado la estructura tridimensional de la PEPC de tipo C<sub>4</sub> en maíz (*Zea mays*) y se ha observado que la estructura del C-terminal es similar a la descrita para *E. coli* (Matsumura *et al.*, 2002).

De los 19 aminoácidos conservados en el extremo C-terminal de la PEPC, 14 residuos son hidrofóbicos en la PEPC de *E. coli* y en la PEPC de tipo C<sub>4</sub> de sorgo (*Sorghum vulgare*) y 13 residuos en la PEPC de tipo C<sub>4</sub> de maíz (*Zea mays*), es decir, el C-terminal de la PEPC es muy hidrófobo (Kai *et al.*, 1999).

Trabajos realizados en nuestro grupo han demostrado que la mayoría de las subunidades de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo, procedente de un extracto crudo de hojas de oscuridad presentan el extremo C-terminal no accesible coincidiendo con la configuración del C-terminal mostrada en los estudios cristalográficos para la PEPC de *E. coli* y la PEPC C<sub>4</sub> de maíz (Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002; Álvarez *et al.*, 2003). Sin embargo, una pequeña población de aproximadamente entre un 20% y un 30% de la PEPC puede ser inmunoprecipitada con anticuerpos específicos contra los 19 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC (C19-IgGs) (ver apartado 4 de M & M) indicando que al menos *in vitro*, la PEPC puede encontrarse en dos estados conformacionales que difieren en el grado de exposición del C-terminal (Álvarez *et al.*,

2003). Se ha propuesto que el movimiento del C-terminal de la PEPC y por tanto los cambios de accesibilidad pudiera ser un mecanismo de señalización que regulase distintos procesos, como la fosforilación reversible de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003).

Los resultados previamente publicados y los presentados en este trabajo muestran que el C-terminal está implicado tanto en la fosforilación como en la degradación de la enzima (Álvarez *et al.*, 2003; Apartado 1 de resultados del presente trabajo). Por tanto, uno de los puntos importantes a desarrollar en el estudio del papel regulador del extremo C-terminal de la PEPC es conocer qué condiciones promueven cambios en la accesibilidad de dicho dominio. En esta línea se planteó analizar el grado de exposición del C-terminal en distintas condiciones que simulen diferentes ambientes celulares o estados de la PEPC como por ejemplo, diferencias de pH, presencia de metabolitos, grado de fosforilación o estado redox.

## **2.1.- Accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de fracciones de PEPC semipurificadas.**

Utilizando como fuente de PEPC una fracción de PEPC semipurificada obtenida según se explica en el apartado 2.2 de M & M, se incubó dicha PEPC durante 1 hora bajo distintas condiciones. Tras los diferentes tratamientos, la PEPC se inmunoprecipitó con anticuerpos anti C-terminales (C19-IgGs) o anticuerpos anti PEPC C<sub>4</sub> (PEPC C<sub>4</sub>-IgGs) según se describe en el apartado 4.2 de M & M. Posteriormente precipitados y sobrenadantes se analizaron mediante western blot. Los inmunoprecipitados con C19-IgGs permiten separar específicamente aquella población de PEPC con el C-terminal expuesto, mientras que los anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs precipitan la totalidad de la enzima.

### *2.1.1.- Efecto del pH de incubación y del estado de fosforilación.*

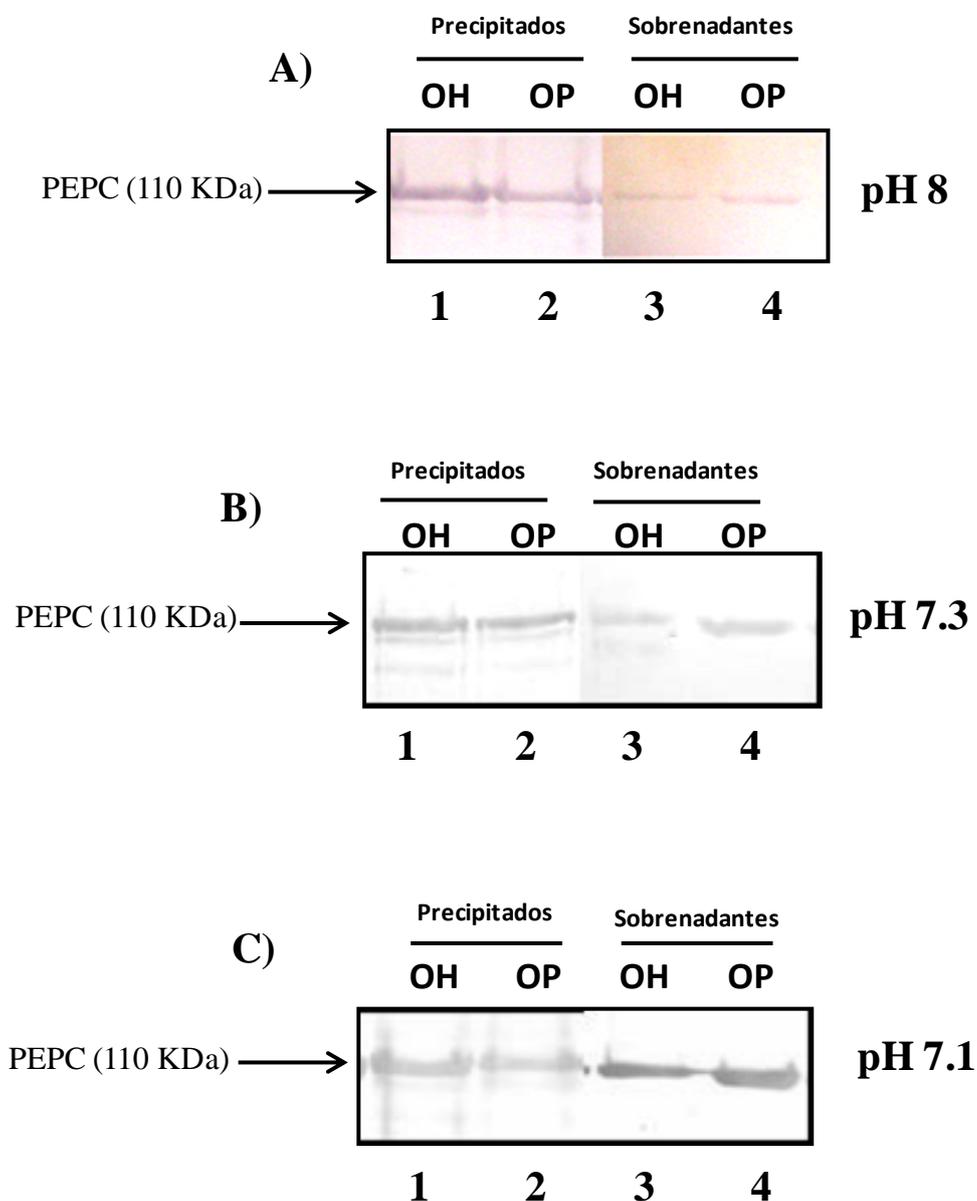
El pH y el estado de fosforilación son dos factores muy importantes en el control de la regulación y de las propiedades cinéticas de la PEPC. La actividad PEPC disminuye a valores de pH subóptimos pero fisiológicos (7,1-7,3), mientras que a pH 8 no fisiológico tiene su óptimo de actividad. Los efectos de la fosforilación sobre la actividad PEPC, aumento de la  $V_{\max}$  y de la  $IC_{50}$  para el L-malato, sólo son visibles a pH

subóptimo pero fisiológico de 7,3, siendo esta zona de pH extremadamente sensible, de forma que a pHs por encima o por debajo de 7,3 las diferencias en las propiedades cinéticas y de regulación que imprime la fosforilación no son detectadas (Echevarría *et al.*, 1994, Lepiniec *et al.*, 2003). Como se puede observar, ambos factores inducen importantes cambios en las propiedades de la PEPC, por lo que resultaban ser buenos candidatos para alterar el grado de exposición del C-terminal de la PEPC.

En orden a establecer la influencia de estos dos parámetros, pH y estado de fosforilación, en la exposición del C-terminal se realizaron una serie de ensayos utilizando como fuente de PEPC una PEPC semipurificada obtenida a partir de hojas de sorgo de oscuridad. La fosforilación de la PEPC se realizó *in vitro* por la subunidad catalítica de la quinasa de mamíferos dependiente de AMPc (PKA) durante 2 horas. Se ha descrito que la PKA es capaz de fosforilar a la PEPC exclusivamente en la serina altamente conservada en el extremo N-terminal de la enzima (Ser15 en maíz y Ser8 en sorgo) alterando las propiedades cinéticas y de regulación de la enzima (Terada *et al.*, 1990). Después del ensayo de fosforilación *in vitro*, se controló su eficacia mediante la determinación de la IC<sub>50</sub> de la enzima para el L-malato a pH 7.3, constatándose que valores de IC<sub>50</sub> de aproximadamente 1 mM son característicos de una enzima fosforilada y valores de IC<sub>50</sub> de 0,2-0,4 mM son propios de una PEPC desfosforilada, es decir, la fosforilación de la enzima incrementa la IC<sub>50</sub> de 2 a 3 veces (Echevarría *et al.*, 1994). Tras el ensayo de fosforilación, muestras conteniendo PEPC fosforilada (PEPC-OP) o desfosforilada (PEPC-OH) se incubaron toda la noche en agitación y en presencia de anticuerpos específicos contra el C-terminal de la PEPC (C19-IgGs). Tanto la fosforilación como la posterior incubación con los anticuerpos se realizó a tres pHs distintos, (7,1-7,3-8). La PEPC con el C-terminal expuesto se inmunoprecipitó y tanto sobrenadante como precipitados se analizaron mediante western blot.

Como se observa en la figura 33 una gran parte de la PEPC contenida en la fracción PEPC semipurificada tiene el C-terminal expuesto. Sin embargo, se observa que a pH 8 (figura 33A, pista 1) y a pH 7,1 (figura 33C, pista 1) se inmunoprecipita un poco más de PEPC cuando se encuentra desfosforilada respecto de las muestras donde la PEPC está fosforilada (figura 33A, pista 2; figura 33B, pista2). Sin embargo a pH 7,3 (figura 33B, pistas 1 y 2) no se observan diferencias en el grado de exposición del C-terminal entre el estado fosforilado y desfosforilado. Estos resultados sugieren que a pH

8 y 7,1 la presencia del fosfato en la ser del N-terminal de la PEPC podría producir cambios conformacionales que redujeran la accesibilidad el extremo C-terminal mientras que a pH 7,3 esas diferencias son mínimas.



**Figura 33.- Efecto del pH de incubación y del estado de fosforilación sobre la accesibilidad de extremo C-terminal de la PEPC.** 0,15 U de PEPC semipurificada desfosforilada (OH, pistas 1 y 3) o fosforilada (OP, pistas 2 y 4) se inmunoprecipitaron a distintos pHs con C19-IgGs. La fosforilación se realizó con PKA tal y como se describe en el apartado 3.5 de M & M. Finalmente sobrenadantes y precipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot (apartado 5.3 de M & M). Las membranas se revelaron con PEPC C<sub>4</sub>-IgGs. **A)** Muestras inmunoprecipitadas a pH 8. **B)** Muestras inmunoprecipitadas a pH 7.3. **C)** Muestras inmunoprecipitadas a pH 7.1.

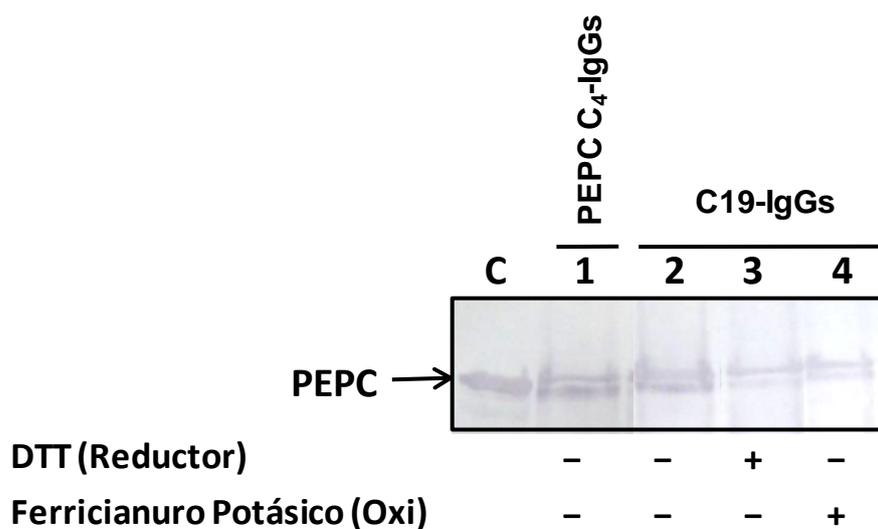
### 2.1.2.- Regulación redox.

Existen evidencias de que la PEPC podría estar sometida a una regulación redox (Chardot and Wedding, 1992). Se ha observado *in vivo* que compuestos reducidos como el DTT, el mercaptoetanol o el glutatión reducido disminuyen la sensibilidad de la PEPC C<sub>4</sub> al málico, sin embargo este efecto no se observa *in vitro* (Pierre *et al.*, 2004).

Por otro lado, algunos autores proponen que cambios en el estado redox de tres cisteínas situadas próximas al extremo N-terminal de la PEPC podrían estar implicados en alteraciones del estado de oligomerización de la PEPC (Jiao y Chollet, 1991; Weigend y Hinch, 1992).

Dado que el estado redox de la PEPC podría implicar cambios conformacionales de la enzima, analizamos si la accesibilidad del C-terminal se vería afectada *in vitro* por alteraciones en las condiciones redox. Para ello se incubó una fracción de PEPC-OH semipurificada tanto con un agente reductor (DTT) como con un oxidante (ferricianuro potásico).

Los resultados obtenidos indican que *in vitro* tanto el DTT (figura 34, pistas 3) como el ferricianuro potásico (figura 34, pistas 4) producen una reducción en la cantidad de PEPC que expone el C-terminal cuando se compara con un control carente de ambos compuestos (figura 34, pistas 3). Estos resultados sugieren que el equilibrio en el estado redox de la PEPC es importante para mantener una cierta exposición del C-terminal y que tanto una excesiva reducción u oxidación disminuyen la exposición del C-terminal.



**Figura 34.- Efecto del estado rédox de la PEPC sobre la exposición del C-terminal.** 0,05U de PEPC-OH semipurificada se incubaron en un medio conteniendo MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Tris 0,1 M pH 7.3, DTT 2 mM (pistas 3) ó ferricianuro potásico 0,6 mM (pistas 4) durante 30 min a 30°C. Posteriormente las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs (pistas 1) ó C19-IgGs (pistas 2-4). Los inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs.

### 2.1.3.- Efecto de metabolitos reguladores.

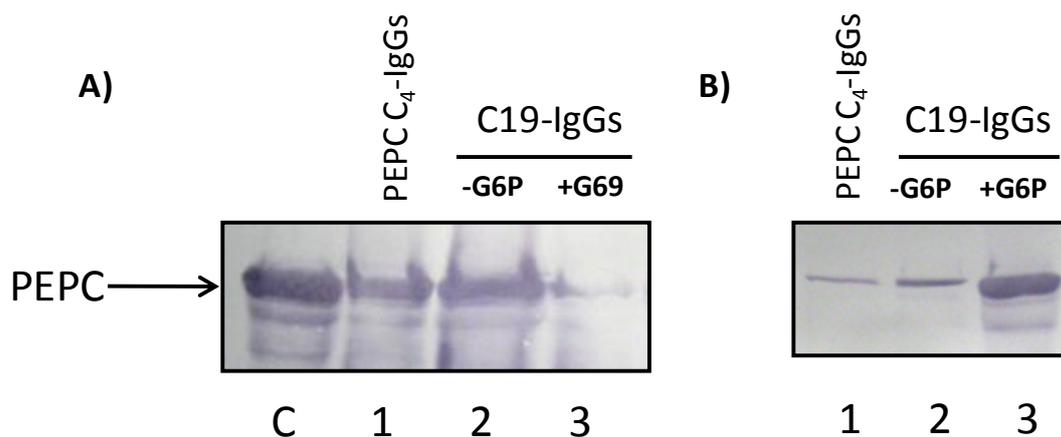
Estudios realizados en maíz muestran *in vitro* que la G6P protege de la inhibición producida por L-malato y estabiliza la forma tetramérica de la enzima, aunque este último punto no está claro que suceda *in vivo* (Willeford *et al.*, 1990; Rajagopalan *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996).

A partir de la publicación de la estructura tridimensional de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz se propuso que la G6P podría interaccionar en la zona de unión de las subunidades que conforman el dímero y que una molécula de sulfato participa en la unión de la interfaz del dímero. Además, se propone que modificaciones en la interfaz del dímero parece producir cambios conformacionales globales en la estructura de la PEPC (Matsumura *et al.*, 2002).

Otro importante regulador alostérico de la PEPC es el L-malato, efector negativo de la enzima, el cuál puede interaccionar con la PEPC en diferentes puntos (Andreo *et al.*, 1987). El L-malato *in vitro* altera el estado oligomérico de la PEPC (Willeford *et al.*, 1990).

Utilizando como fuente de PEPC una fracción de PEPC semipurificada obtenida a partir de hojas de sorgo de oscuridad, se analizó el efecto de la G6P a una concentración de 5 mM sobre la accesibilidad del extremo C-terminal de la enzima. Observamos que en presencia de G6P se inmunoprecipita menos cantidad de PEPC (figura 35, pista 3) con anticuerpos C19-IgGs, que en la muestra carente de G6P (figura 35, pista 2). La unión de la G6P a la PEPC parece producir ciertos cambios en la estructura de la PEPC afectando a la configuración de su extremo C-terminal haciéndolo menos accesible. Estos cambios podrían estar en relación con la estabilización del tetrámero lo que sugiere que el C-terminal estaría menos expuesto en el tetrámero que en el dímero.

También se analizó el efecto del L-malato sobre el grado de exposición del C-terminal pero no se observó ningún resultado destacable comportándose de forma similar al control sin L-malato (resultados no mostrados).



**Figura 35.- Grado de accesibilidad del C-terminal de la PEPC semipurificada en presencia de G6P.** La PEPC-OH semipurificada (0,1 U) se incubó en un medio conteniendo  $MgCl_2$  5 mM, Tris 0,1 M pH 7.3 en ausencia (pistas 1-2) o en presencia (pista 3) de G6P 5 mM durante 30 min a 30°C. Posteriormente las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs (pistas 1) ó C19-IgGs (pistas 2 y 3). Los sobrenadantes e inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs. **A)** Inmunoprecipitados. 0,1 U de PEPC sin incubar con anticuerpos se utilizó como marcador (pista C). **B)** Sobrenadantes.

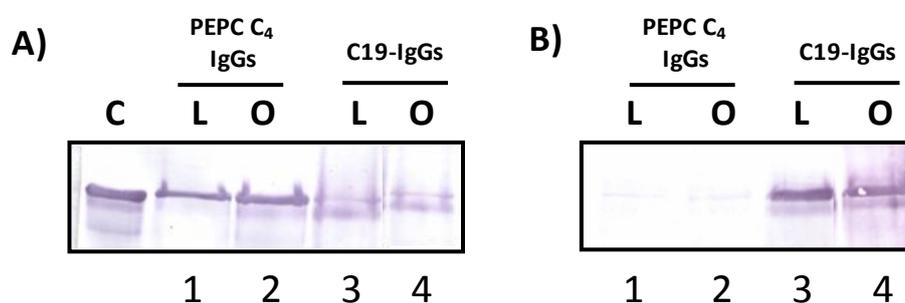
## 2.2.- Grado de accesibilidad del C-terminal de la PEPC en extractos crudos de hojas de sorgo.

Los resultados publicados por Álvarez et al., (2003) mostraron que sólo una pequeña parte de la PEPC contenida en extractos crudos, aproximadamente entre el 20% y el 30% de la PEPC total, tiene el C-terminal expuesto mientras que el resto de la PEPC tiene el C-terminal inmerso en un bolsillo hidrofóbico de la propia subunidad de acuerdo con lo que se deduce de la estructura cristalina de la PEPC de *E.coli* y maíz (Kai et al., 1999; Matsumura et al., 2002).

Sin embargo, los resultados obtenidos con las fracciones semipurificadas muestran mayor porcentaje de PEPC con el C-terminal expuesto (figuras 33, 34 y 35). Para comparar ambas condiciones se repitieron algunos de los experimentos con una fracción de PEPC procedente de extractos crudos. Para ello, se prepararon extractos crudos de hojas iluminadas o mantenidas en oscuridad que contienen mayoritariamente PEPC fosforilada y desfosforilada respectivamente, para ver también la repercusión de dicha variable.

Alícuotas conteniendo 0,05 U de PEPC procedente de los extractos crudos se inmunoprecipitaron con anticuerpos C19-IgGs. En la figura 36 se observa que tanto en extractos crudos procedentes de hojas de oscuridad o previamente iluminadas, sólo una pequeña subpoblación de la PEPC tiene el C-terminal accesible (figura 36A, pistas 3 y 4) cuando se compara con la PEPC inmunoprecipitada con anticuerpos anti-PEPC C<sub>4</sub> (figura 36A, pistas 1 y 2). Estos resultados corroboran los obtenidos por Álvarez et al., (2003).

En cualquier caso, en la figura 36 se muestra que en extractos crudos de hojas de sorgo el C-terminal está muy poco accesible cuando se compara con la fracción de PEPC semipurificada, la cual tiene una mayor cantidad de PEPC con el C-terminal expuesto (figuras 33, 34 y 35). Este resultado sugiere que durante la cromatografía de hidroxiapatito y Mono Q, mediante la que se obtiene esta fracción, o en su posterior conservación durante largo tiempo en glicerol a -20°C, la PEPC sufre cambios conformacionales que aumentan la accesibilidad de su extremo C-terminal.



**Figura 36.- Accesibilidad del C-terminal de la PEPC en extractos crudos de luz y de oscuridad.** Una cantidad correspondiente a 0,05 U de PEPC procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo iluminadas (L) o mantenidas en oscuridad (O), obtenido según se describe en el apartado 2.1 de M & M, se inmunoprecipitaron con 35 µg de anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs (pistas 1 y 2) ó C19-IgGs (pistas 3 y 4). Seguidamente, sobrenadantes e inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. Finalmente, la PEPC de las membranas se reveló con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs. **A)** Inmunoprecipitados. 0,1 U de PEPC-OH semipurificada se utilizó como marcador (pista C). **B)** Sobrenadantes. Abreviaturas: L, luz; O, oscuridad.

2.2.1.- *Accesibilidad del C-terminal de la PEPC de extractos crudos en presencia de glucosa-6-fosfato.*

Experimentos anteriores realizados con PEPC semipurificada, muestran que en presencia de la G6P se produce cambios conformacionales en la PEPC que reducen significativamente la accesibilidad de su extremo C-terminal.

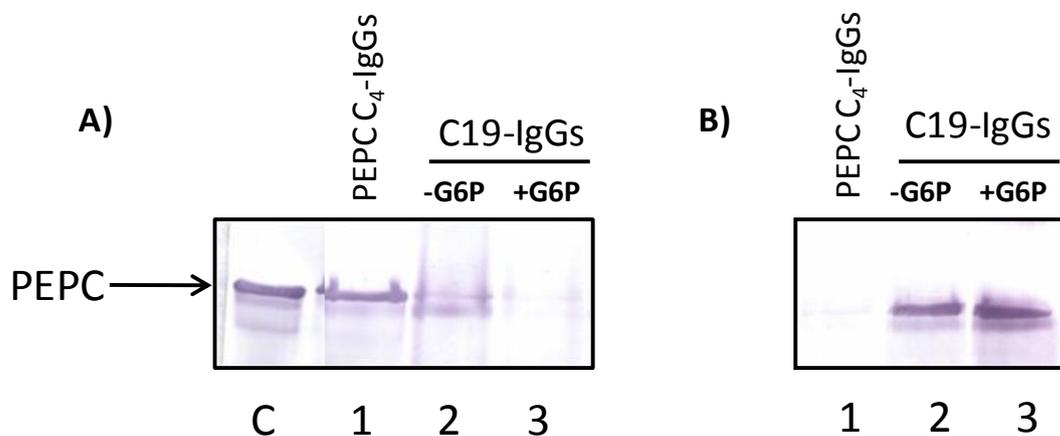
Este mismo experimento se repitió partiendo de un extracto crudo de hojas de sorgo. Para ello se inmunoprecipitaron con anticuerpos C19-IgGs 0,1U de PEPC de un extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad previamente incubadas con 5 mM de G6P durante 30 min a 30°C.

Los resultados de la figura 37 muestran que en presencia de G6P (pista 3, +G6P) la cantidad de PEPC inmunoprecipitada con C19-IgGs es menor que en ausencia del metabolito (pista 2, -G6P). Por lo tanto, la G6P produce en la PEPC de extractos crudos cambios conformacionales similares a los que produce en la PEPC procedente de la fracción PEPC semipurificada, reduciendo la accesibilidad de su extremo C-terminal. Estos resultados sugieren la implicación de este metabolito en la regulación de los procesos en los que el C-terminal está involucrado tales como, la proteólisis de la enzima (resultados de esta tesis) y en la fosforilación de la PEPC (Alvarez *et al.*, 2003 y resultados de esta tesis).

Todos estos resultados indican que un importante factor a tener en cuenta a la hora de estudiar la accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC es el origen de la enzima, pues el grado de exposición del C-terminal varía dependiendo de la fuente de PEPC utilizada, estando expuesto en mayor proporción en la fracción de PEPC semipurificada y en menor proporción en la PEPC procedente de extractos crudos de hojas de sorgo, tanto de luz como de oscuridad. Otro punto a destacar en la regulación de la exposición del C-terminal de la PEPC es que solamente la G6P tiene un efecto destacado, produciendo una reducción de la accesibilidad de dicho dominio independientemente de la fuente de PEPC utilizada.

Se prueba así mismo, que la mayor parte de la PEPC no tiene expuesto el C-terminal *in vivo* lo que se relaciona con el estado activo de la enzima (Kai *et al.*, 1999). Además, los resultados obtenidos con G6P avalan dicha hipótesis, pues sabemos que la G6P estabiliza el tetrámero, pudiendo relacionarse el estado oligomérico de la PEPC

con el grado de exposición del C-terminal (Chollet et al., 1996). El tetramero, que es el estado más activo de la PEPC, no expondría el C-terminal mientras que el dímero y el monómero lo tendrían más expuesto.



**Figura 37.- Efecto de la G6P sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de extractos crudos.** Alícuotas correspondientes a 0,05 U de PEPC procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo mantenidas en oscuridad (ver apartado 2.1 M & M) se incubaron en ausencia (pista 1 y 2) o en presencia de 5mM G6P (pista 3, +G6P), durante 30 min a 30°. Posteriormente las muestras se inmunoprecipitaron con 25  $\mu$ g de anticuerpos PEPC-C<sub>4</sub>-IgGs (pistas 1) ó C19-IgGs (pistas 2 y 3). Los sobrenadantes e inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos PEPC-C<sub>4</sub>-IgGs. **A)** Inmunoprecipitados. 0,1 U de PEPC semipurificada se utilizo como marcador y control de la PEPC sin incubarla con anticuerpos (pista C). **B)** Sobrenadantes.

### **3.- EL ÁCIDO FOSFATÍDICO (PA): ELEMENTO REGULADOR DE LA PEPC.**

El ácido fosfatídico (PA) es un fosfolípido aniónico cuya principal función es actuar como molécula señal. Se acumula de forma rápida y transitoria en plantas en respuesta a un amplio rango de condiciones de estrés, como estrés por frío, estrés hídrico, salinidad, heridas o ataques de patógenos (Testerink y Munnik, 2005).

Actualmente se han descrito varias proteínas diana para el PA tanto en animales como en plantas. Utilizando extractos de *Arabidopsis* y tomate, como fuente de proteínas de plantas, se han identificado varias proteínas dianas del PA, entre las que destaca la PEPC de tipo C<sub>3</sub>. Dicha PEPC se une preferentemente a PA incluso en presencia de otros lípidos (Testerink *et al.*, 2004).

Estudios recientes realizados en nuestro grupo han puesto de manifiesto que la PEPC de tipo C<sub>4</sub>, procedente de hojas de sorgo, también se une preferentemente a PA y que dicha interacción produce una inhibición de la actividad catalítica de la PEPC. Además, se ha observado que cierta cantidad de PEPC se encuentra asociada a membrana lo que puede implicar un reclutamiento a membrana de la PEPC por parte del PA (Monreal *et al.*, 2010).

#### **3.1.- El PA promueve la exposición del extremo C-terminal de la PEPC.**

Diversos estudios han demostrado que los fosfolípidos pueden afectar a la localización y actividad de un amplio rango de proteínas e incluso pueden regular enzimas implicadas en el metabolismo (Monreal *et al.*, 2010).

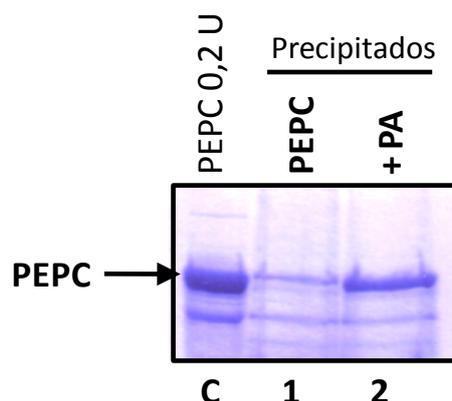
Continuando con la línea de trabajo centrada en el estudio de la regulación de la exposición del extremo C-terminal de la PEPC, como pieza clave en la caracterización de la actividad PEPC proteasa, y habiendo demostrado recientemente la interacción inhibitoria del PA con la PEPC, analizamos si el PA tendría algún efecto sobre el grado de accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC.

Para ello, se preincubaron 0,2 U de PEPC procedentes de una fracción de PEPC semipurificada (ver M & M apartado 2.2) (figura 38) ó 0,1 U de PEPC proveniente de un extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad (figura 39) en presencia de 1mM de PA, a 30°C, durante 30 min. Después de la incubación se comprobó la eficacia del PA midiendo el porcentaje de inhibición de la actividad PEPC respecto del control que fue de entre un 90% a un 100 %. Posteriormente se añadieron anticuerpos C19-IgGs y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Por último, se inmunoprecipitaron las muestras (ver apartado 4.2 de M & M) y se analizaron precipitados y sobrenadantes por separado en SDS-PAGE.

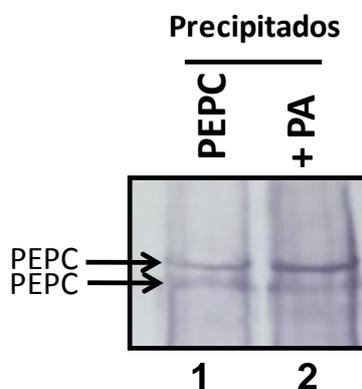
Como se observa en la figura 38, en presencia de PA se inmunoprecipita más PEPC con anticuerpos C19-IgGs (pista 2) que en ausencia del fosfolípido (pista 1). Además, los resultados indican que dicho efecto no se ve significativamente afectado por la fuente de PEPC utilizada, produciéndose tanto con la PEPC semipurificada (figura 38) como con el extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad (figura 39, pista 2).

En el capítulo anterior hemos estudiado el efecto de distintos factores sobre la accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC, sin embargo, ninguna de las condiciones estudiadas provocaban un aumento tan destacado de la accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC, como el inducido por el PA. Estos resultados ponen por primera vez en evidencia una molécula capaz de inducir la exposición del C-terminal *in vitro*.

Queda por establecer si el efecto inhibitor del PA sobre la actividad catalítica de la PEPC C<sub>4</sub> (Monreal *et al.*, 2010) está íntimamente relacionado con la exposición del C-terminal de la PEPC o son dos fenómenos independientes.



**Figura 38.- Efecto del PA sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de una fracción de PEPC semipurificada.** Una alícuota correspondiente a 0,2 U de PEPC-OH semipurificada se incubó sola (pista 1, PEPC) ó con 1mM PA (8:0) (pista 2, +PA) en 50  $\mu$ l del medio de incubación descrito en el apartado 3.3 de M & M a 30°C durante 30 min. A los 30 min se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Posteriormente, las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos C19-IgGs. Los inmunoprecipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). 0,2 U de PEPC semipurificada sin incubar con anticuerpos se utilizó como marcador (pista C).



**Figura 39.- Efecto del PA sobre la accesibilidad del C-terminal de la PEPC procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo de oscuridad.** Una cantidad correspondiente a 0,1 U de PEPC procedente de un extracto crudo de hojas de sorgo mantenidas en oscuridad (ver apartado 2.1 de M & M) se incubó en 50  $\mu$ l del medio descrito en el apartado 2.1 de M & M (tampón de extracción) durante 30 min a 30°C en ausencia (pista 1, PEPC) o en presencia (pista 2, +PA) de 1 mM PA (8:0). A los 30 min se midió la actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Posteriormente, las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos C19-IgGs. Los precipitados se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. Las membranas se incubaron con anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs.

### 3.2.- El PA activa la proteólisis de la PEPC.

En este trabajo de tesis hemos demostrado la existencia de una actividad proteasa (proteasa C19) que se copurifica con la PEPC por cromatografía en hidroxapatito y Mono Q y que es activada específicamente en presencia de un péptido sintético que representa los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de su propio sustrato (péptido C19).

Se han realizado numerosos experimentos intentando encontrar algún factor que estimule la actividad PEPC proteasa *in vitro* (pHs, metabolitos...etc) sin necesidad de utilizar el péptido C19 como activador. Sin embargo, ninguna de las variables ensayadas fueron efectivas para dicho propósito.

Los resultados anteriores muestran que el PA induce la exposición el extremo C-terminal de la PEPC que normalmente no se encuentra accesible. Nuestra hipótesis sobre el mecanismo de acción de la proteasa C19 implica que en determinados ambientes celulares, la PEPC cambiaría su conformación y expondría el extremo C-terminal. Una vez accesible el dominio C-terminal podría interaccionar con la proteasa C19 activándola y fruto de la activación, la proteasa C19 degradaría a la PEPC.

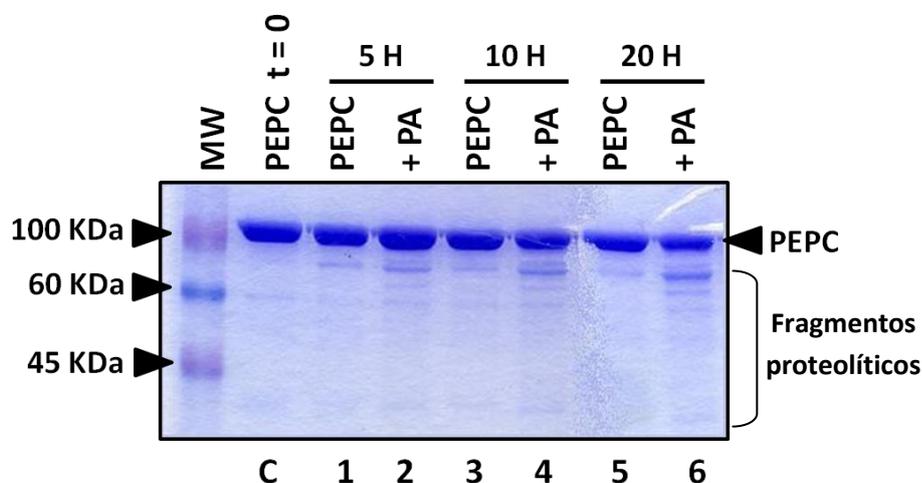
Por lo tanto, en presencia de PA la PEPC debería de proteolizarse ya que, el PA promueve la exposición del C-terminal de la PEPC que activaría a la proteasa C19 que acabaría degradando a la enzima. Para demostrar esta hipótesis se incubaron alícuotas conteniendo 0,3 U de PEPC semipurificada en presencia o en ausencia de 1 mM PA (8:0). Resultados previos habían mostrado que la proteólisis no era efectiva a tiempos cortos (1-2 horas) por lo que pensamos que la activación por el extremo C-terminal endógeno de la PEPC sería mucho más lenta que cuando es inducida por el péptido C19. Para demostrar está hipótesis incubamos las muestras a tiempos largos durante 5, 10 y 20 horas a 30°C y se analizó el estado de la PEPC en SDS-PAGE.

La figura 40A muestra que en presencia de PA (8:0) (pistas 2, 4 y 6) hay una mayor actividad proteolítica en comparación con los controles carente del fosfolípido (pistas 1, 3 y 5), apareciendo más bandas proteolíticas y de mayor intensidad a medida que aumentamos el tiempo de incubación desde 5 h hasta 20 h (figuras 40A, pistas 1, 3 y 5).

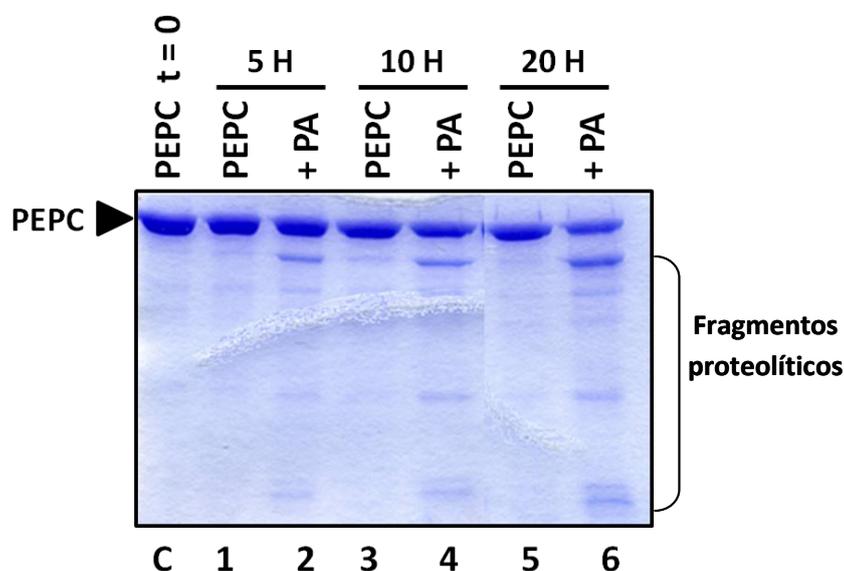
En todos los experimentos realizados se ha utilizado como fuente de PA el tipo (8:0), el cuál a pesar de ser soluble en agua y por tanto fácil de controlar su concentración real, no es el fisiológico. Debido a esto se repitió el experimento anterior utilizando el PA fisiológico (18:1) que presenta el problema de que es difícil de solubilizar y por tanto de controlar su concentración efectiva. Como se ve en la figura 40B el PA (18:1) (pistas 2, 4 y 6) tiene el mismo efecto que el PA (8:0) sobre la integridad de la PEPC, es decir, a tiempos largos se observa una clara activación de la proteólisis de la PEPC que no se producen en las muestras sin PA (Pistas 1, 3 y 5).

Con ambos tipos de PA se observa que en el patrón de proteólisis destaca una banda de aproximadamente unos 85 KDa que representa el producto de proteólisis mayoritario a los tiempos de incubación empleados.

## A) PA (8:0)



## B) PA (18:1)



**Figura 40.- Efecto del PA (8:0) ó (18:1) sobre la proteólisis de la PEPC semipurificada.** Una alícuota correspondiente a 0,3 U de PEPC semipurificada se incubó en ausencia (PEPC) o en presencia (+PA) de 1mM PA en 50 µl de un medio conteniendo Tris 0,1 M pH 8 a 30°C durante 5, 10 ó 20 h. A los 30 min se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Finalmente, las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). El gel se tiñó con azul de Coomassie. 0,3 U de PEPC se utilizaron como marcador a tiempo 0 (pista C). **A)** Efecto del PA (8:0). **B)** Efecto del PA (18:1).

### 3.3.- Principales factores que afectan a la cinética de proteólisis de la PEPC en presencia de PA.

A partir de los numerosos experimentos realizados para detectar actividad proteasa en presencia de PA, se observa que hay diferencias en la velocidad de proteólisis cuando se comparan distintos ensayos. En la figura 41 se observa que tras 5 horas de incubación en presencia de 1mM de PA la PEPC está proteolizada prácticamente en su totalidad lo que difiere bastante de lo observado en la figura 40B (pista 2) pese a que el ensayo se realizó en las mismas condiciones. De estos resultados se deduce que existen dos factores muy importantes que influyen en la velocidad de proteólisis de la PEPC en presencia de PA, por un lado el estado de la fracción de PEPC semipurificada y por otro, la concentración efectiva de PA cuando se trabaja con el PA (18:1).

#### 3.3.1.- Influencia del estado de la PEPC semipurificada.

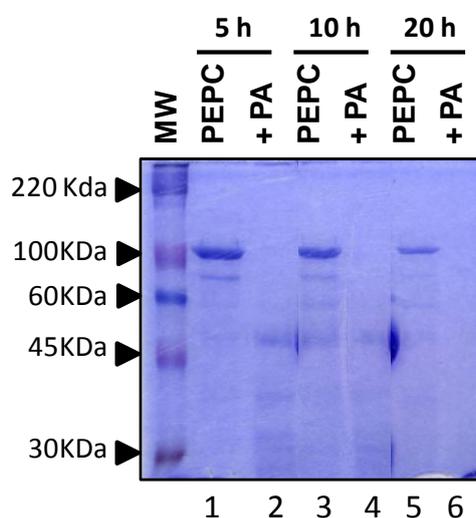
En este trabajo de tesis hemos mostrado que la PEPC semipurificada puede presentar un estado conformacional diferente respecto a la PEPC *in vivo*, y dichos cambios conformacionales podrían producirse durante el proceso de purificación y en su posterior conservación a -20°C durante largo tiempo. También se ha puesto en evidencia que la alteración de la estructura de la PEPC semipurificada tiene importantes repercusiones en la accesibilidad de su extremo C-terminal, el cual se encuentra más expuesto en la PEPC semipurificada que en la PEPC *in vivo*. Si a todo lo anterior añadimos que el PA induce la exposición del C-terminal y que esta configuración podría ser la responsable de la estimulación de la actividad proteasa que degrada a la PEPC, en la muestra de PEPC semipurificada conservada a -20°C durante largo tiempo debería de producirse una proteólisis de la PEPC a tiempos largos sin necesidad de añadir PA a la reacción.

Para controlar este efecto, se incubó una muestra de PEPC semipurificada que estuvo almacenada a -20°C durante 3 meses, a 30°C, en ausencia o en presencia de PA a tiempos largos. Después de 20 horas de incubación se observa que la mayoría de la PEPC está proteolizada desde las 5 h de incubación en presencia de PA (figura 41, pista

2), sin embargo, a 10 h y 20 h de incubación se observa un importante actividad proteolítica aun en ausencia de PA (del orden del 80% de desaparición de la PEPC después de 20 h de incubación) (figura 41, pista 5).

Además, se observa que existe una gran variabilidad en la velocidad de degradación cuando se utilizan fuentes de PEPC semipurificada con diferente antigüedad. Cuando la fracción de PEPC semipurificada es más fresca la velocidad de proteólisis es más lenta (figura 40A-B, pistas 2, 4 y 6) que cuando se utiliza una PEPC semipurificada conservada a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante más tiempo en la cual, la PEPC se encuentra ya proteolizada totalmente a las 5 h de incubación (figura 41, pista 2).

Estos resultados confirman que en preparaciones de PEPC semipurificadas antiguas el C-terminal de la enzima está muy expuesto por lo que la proteasa C19 no necesita ni PA ni péptido C19 para su activación, ya que, puede activarse por interacción directa con el C-terminal de la PEPC. Dado que en estas preparaciones la PEPC se encuentra muy dimerizada (dato no mostrado) se sugiere que la forma dimérica podría presentar un mayor grado de exposición del C-terminal que el tetrámero.



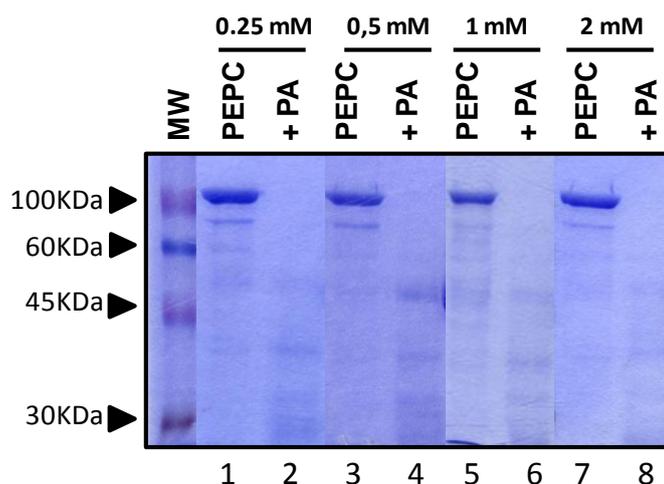
**Figura 41.- La PEPC se proteoliza en ausencia de PA.** Una alícuota correspondiente a 0,3 U de PEPC semipurificada se incubó en ausencia (PEPC) o en presencia (+PA) de 1mM PA (18:1) en 50  $\mu\text{l}$  de un medio que contenía Tris 0,1 M pH 8 a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 5, 10 ó 20 h. A los 30 min se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Finalmente las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). El gel se tiñó con azul de Coomassie. MW, marcadores de peso molecular.

### *3.3.2.- Concentración efectiva de PA.*

El PA (18:1) se conserva en cloroformo y para su utilización se requiere la evaporación del cloroformo con N<sub>2</sub> gas, para evitar la oxidación, y posteriormente resuspenderlo en un tampón biológico mediante sonicación. Su preparación implica que resulte muy complejo saber su concentración efectiva, pues no se puede conocer la cantidad de PA completamente disuelto.

Para obtener una aproximación de las concentraciones efectivas de PA se incubó 0,3 U de PEPC semipurificada en presencia de distintas cantidades de PA durante 5 horas a 30°C, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE. Los resultados indican que con esta preparación de PEPC semipurificada a una concentración teórica de PA de 0,25 mM (figura 42, pista 2) se produce el mismo efecto que a concentraciones superiores de hasta 2 mM de PA (figura 42, pista 8), es decir, concentraciones teóricas de 0,25 mM de PA (18:1) son suficientes para producir la proteólisis total de la PEPC a 5 h de incubación.

Estos resultados ponen en evidencia que es muy importante tener en cuenta la variabilidad que se puede producir en los ensayos de proteólisis en presencia de PA en función de la fracción de PEPC semipurificada utilizada y de la eficiencia en la solubilización del fosfolípido que determina su concentración real.



**Figura 42.- Efecto de la concentración de PA sobre la proteólisis de la PEPC.** Una alícuota correspondiente a 0,3 U de PEPC semipurificada se incubó en ausencia (PEPC) o en presencia (+PA) de PA (18:1) a distintas concentraciones desde 0,25 hasta 2 mM en 50  $\mu$ l de un medio que contenía Tris 0,1 M pH 8 a 30°C durante 5 h. A los 30 min, se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Finalmente, las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). El gel se tiñó con azul de Coomassie. MW, marcadores de peso molecular.

### 3.4.- El bloqueo del extremo C-terminal de la PEPC con anticuerpos específicos inhibe la proteólisis de la proteína incluso en presencia de PA.

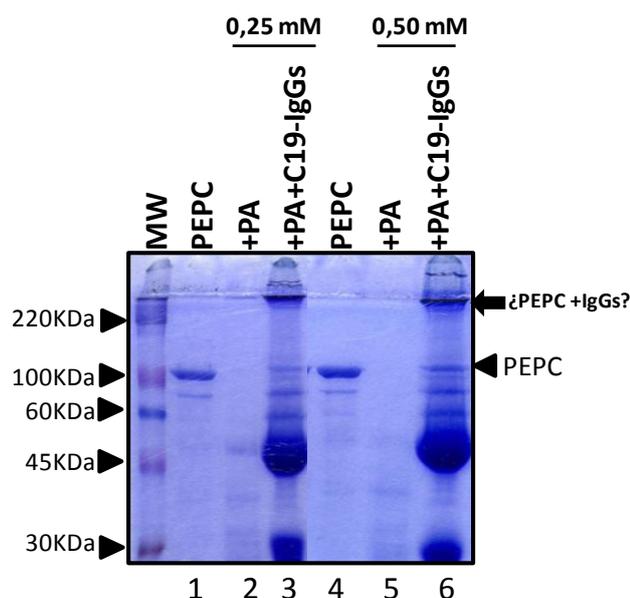
Los resultados obtenidos sugieren que el extremo C-terminal de la PEPC es un elemento clave en la regulación de la proteólisis de la PEPC activada por PA, y que el PA promueve la proteólisis a través de un cambio conformacional de la proteína que aumenta la accesibilidad de su extremo C-terminal. Por lo tanto, si se bloquea dicho dominio con anticuerpos específicos (C19-IgGs) se debería observar una inhibición de la proteólisis en presencia de PA.

Para la realización de este experimento se utilizó una fracción de PEPC semipurificada y se preincubó con los anticuerpos durante 30 minutos a 30°C, posteriormente se añadió el PA y se incubó la mezcla durante 5 horas a 30°C. Se realizaron controles sólo con PEPC o con PEPC más PA y se ensayaron dos concentraciones distintas de PA (0,25 mM y 0,5 mM). Finalmente, las muestras se desnaturalizaron a 90°C durante 3 minutos y se analizaron en SDS-PAGE.

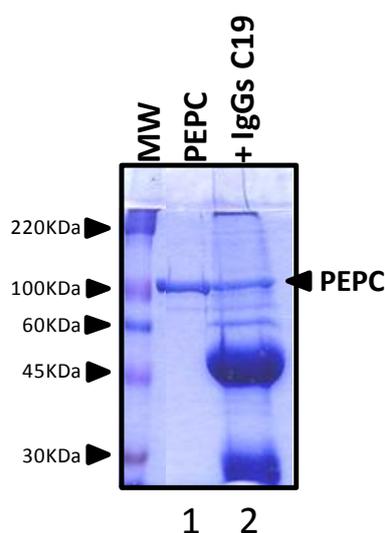
En la figura 43 se muestra que el PA produce la proteólisis total de la PEPC después de 5 horas de incubación (pistas 2 y 5), sin embargo, en presencia de los anticuerpos se observa un bloqueo parcial de la proteólisis inducida por PA (pistas 3 y 6). También se observa en la interfaz entre el gel de compactación y el de separación una banda de alto peso molecular (figura 43, pistas 3 y 6), la cual pensamos que está formada por complejos de PEPC y anticuerpos, solubles o precipitados que no entran en el gel, lo que indicaría que la cantidad de PEPC sin proteolizar es realmente mayor de la que se observa a la altura de la banda de PEPC. El mismo experimento se repitió en ausencia de PA para eliminar el efecto de la proteólisis y analizar sólo el efecto del anticuerpo. Además, se aumentó el tiempo de calentamiento durante la desnaturalización hasta 10 minutos.

La figura 44 muestra que incluso en ausencia de PA y por tanto de proteólisis, sigue habiendo menos cantidad de PEPC en las muestras incubadas con los anticuerpos y que la PEPC que falta parece encontrarse en la interfaz del gel, sugiriendo que en efecto se trata de macroagregados formados en presencia del anticuerpo o de precipitados estables, incluso después de tratar las muestras durante 10 min a 90°C (figura 44, pista 2).

Por lo tanto, estos resultados muestran una reducción de la proteólisis de la PEPC inducida por PA cuando se bloquea el C-terminal de la enzima con anticuerpos específicos (C19-IgGs), indicando que en efecto el PA promueve la proteólisis de la PEPC a través de un aumento en la accesibilidad de su extremo C-terminal.



**Figura 43.- Inhibición de la proteólisis por los anticuerpos C19-IgGs.** 0,3 U de PEPC se incubaron solas (PEPC), con PA (18:1) o con PA (18:1) y 50  $\mu$ g de C19-IgGs en 50  $\mu$ l de un medio que contenía Tris 0,1 M pH 8 a 30°C durante 5 h. El PA se utilizó a dos concentraciones 0,25 y 0,5 mM. Las muestras con anticuerpos se preincubaron con la PEPC durante 30 min antes de la adición del PA. A los 30 min después de añadir el PA se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Finalmente las muestras se calentaron 3 min a 90°C y se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). El gel se tiñó con azul de Coomassie. MW, marcadores de peso molecular.



**Figura 44.- Efecto del tiempo de calentamiento en la disociación de la banda de alto peso molecular.** 0,3 U de PEPC se incubaron en ausencia (PEPC) o en presencia de 50  $\mu$ g de C19-IgGs en 50  $\mu$ l de un medio que contenía Tris 0,1 M pH 8 a 30°C durante 5 h. Finalmente las muestras se desnaturalizaron calentándolas durante 10 minutos a 90°C y se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida). El gel se tiñó con azul de Coomassie. MW, marcadores de peso molecular.

### **3.5.- La proteólisis inducida por PA comienza por el extremo N-terminal de la PEPC.**

Resultados previos muestran que la proteasa C19 comienza a degradar a la PEPC por su extremo N-terminal, pues la adición del péptido N-terminal inhibe la proteólisis aún en presencia de su activador el péptido C19 (figura 29). Si la misma proteasa fuese la inducida por PA la proteólisis en presencia del fosfolípido debería de comenzar por el extremo N-terminal.

#### *3.5.1.- El primer producto proteolítico carece del extremo N-terminal.*

En aquellos ensayos de actividad proteolítica en presencia de PA donde la velocidad de reacción es lenta (Ej: figuras 40A-B), entre los fragmentos proteolíticos destaca una banda de unos 85 KDa que podría ser uno de los primeros productos de degradación. A partir del análisis de esta banda mediante western blot con anticuerpos específicos se podría conocer el extremo de la PEPC por el cual comienza la proteólisis.

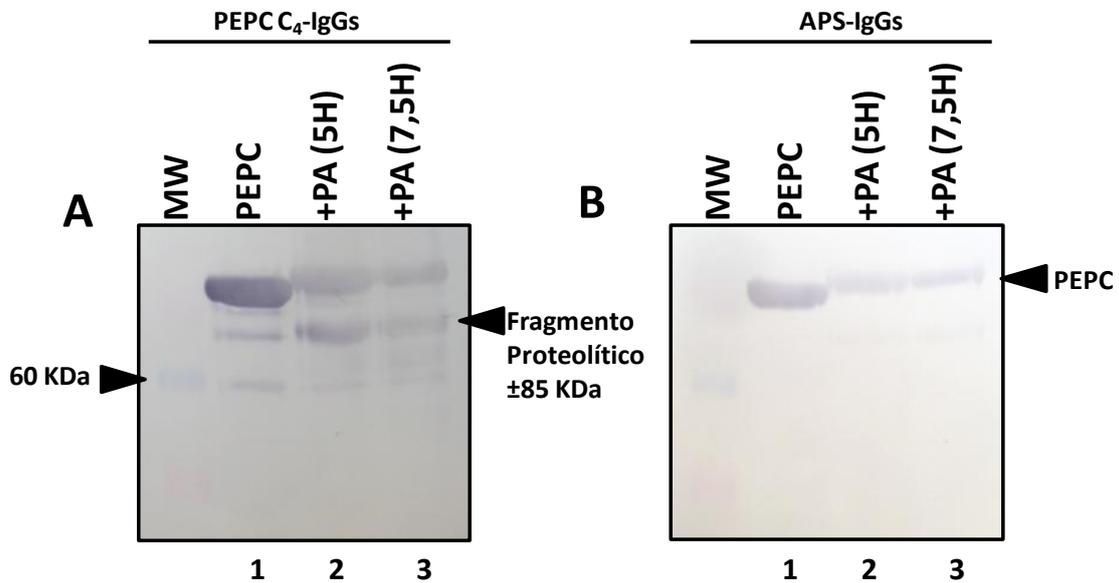
En primer lugar se realizó un ensayo de actividad proteasa en presencia de PA a tiempos no muy largos (5 y 7,5 horas) con la intención de parar la reacción en un estado de degradación no muy avanzado. Posteriormente, las muestras se analizaron en SDS-PAGE y western blot. El ensayo se realizó por duplicado, uno se reveló con anticuerpo PEPC C<sub>4</sub>-IgGs y otro con anticuerpos APS-IgGs, que van dirigidos contra el N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> (ver apartado 4 de M & M).

En la figura 45A se muestra que los anticuerpos PEPC C<sub>4</sub>-IgGs revelan la PEPC y todos los fragmentos proteolíticos que han quedado retenidos en la membrana. Además, se observa que a medida que aumenta el tiempo de incubación en presencia de PA se reduce la cantidad de PEPC y aumentan los fragmentos proteolíticos.

Sin embargo, cuando utilizamos anticuerpos APS-IgGs no aparece ninguna banda proteolítica, y sólo se revela la PEPC íntegra cuya cantidad también disminuye con el tiempo de incubación en presencia de PA.

Estos resultados muestran que el fragmento proteolítico de aproximadamente 85 kDa, posiblemente el primer producto de la reacción proteolítica, y el resto de

fragmentos proteolíticos revelados carecen del extremo N-terminal de la PEPC, lo que implica que la degradación comienza por este extremo.



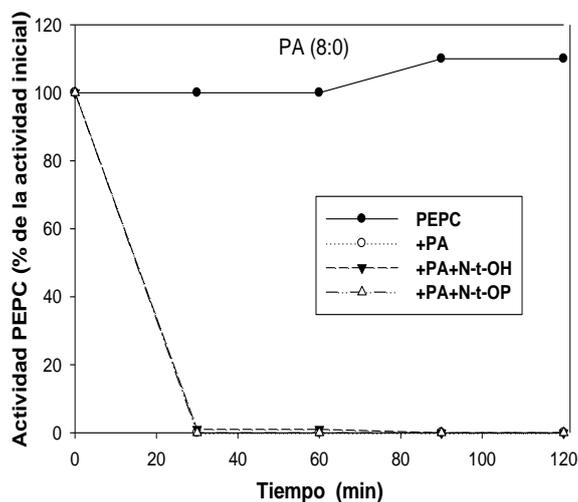
**Figura 45. Análisis de los fragmentos proteolíticos mediante western blot.** 0,3 U de PEPC se incubaron en ausencia (PEPC) ó en presencia de 1 mM de PA (18:1) en 50 µl de un medio que contenía Tris 0,1 M pH 8 a 30°C durante 5 ó 7,5 h. A los 30 min se midió actividad PEPC a pH 8 y 2,5 mM de PEP para controlar la eficacia del PA. Finalmente las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% acrilamida) y western blot. **A)** La membrana se reveló con PEPC C<sub>4</sub>-IgGs. **B)** La membrana se reveló con APS-IgGs. MW, marcadores de peso molecular.

### 3.5.2.- Efecto de los péptidos N-terminales sobre la proteólisis de la PEPC activada por PA.

Resultados previos presentados en esta tesis han demostrado que la actividad proteasa C19 es inhibida por el péptido N-terminal desfosforilado (N-t-OH) y en menor medida por el péptido N-terminal fosforilado (N-t-OP) (ver apartado 1.5 de resultados, figura 30).

En el punto anterior mostramos que la proteólisis inducida por PA comienza por el extremo N-terminal de la PEPC, dicho resultado se confirmó mediante experimentos de competición utilizando los péptidos N-terminales. Se realizaron distintos ensayos conteniendo PEPC semipurificada y PA (8:0), en presencia de los péptidos N-terminales (OH y OP) y se analizó su efecto sobre la proteólisis de la PEPC. Rutinariamente siempre se mide actividad PEPC en los ensayos con PA para asegurarnos del estado del fosfolípido.

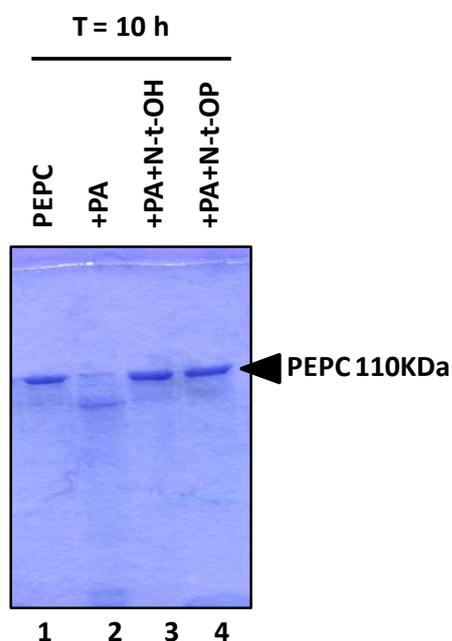
En la figura 46 se muestra que el PA (8:0) aún en presencia de los péptidos N-terminales (OH y OP) inhibe la actividad de la PEPC indicando el buen funcionamiento del PA.



**Figura 46.- Efecto de los péptidos N-terminales (OH y OP) sobre la inhibición de la actividad catalítica de la PEPC-C<sub>4</sub> producida por PA.** Una alícuota de 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se preincubó a 30°C durante 10 min con 60 nmoles de los péptidos N-t-OH ó N-t-OP en 50 µl de un medio conteniendo Tris 0,1 M pH 8. Seguidamente se añadió 1 mM de PA (8:0) y se dejó incubando hasta 2h. Se midió actividad PEPC a los tiempos indicados a pH 8, 2,5 mM de PEP y con 5µl de muestra. La actividad se expresó como porcentaje respecto a la actividad inicial.

Finalmente, se ensayó la actividad proteolítica con PA en presencia de los péptidos N-terminales durante 10 horas de incubación.

Como se observa en la figura 47, en presencia de los péptidos N-terminales desfosforilado (OH) ó fosforilado (OP) (pistas 3 y 4) se produce una clara inhibición de la proteólisis cuando se compara con la muestra carente de los péptidos (pista 2) donde la proteólisis está muy avanzada. Este resultado corrobora que la proteólisis de la PEPC activada por PA comienza por el extremo N-terminal. El bloqueo producido en presencia del péptido se debería a que el péptido y la PEPC competirían por la proteasa. Además, apoya la hipótesis de que la proteasa C19 es la responsable de la proteólisis inducida por PA, pues el mecanismo de acción es muy similar. Sin embargo, no se observa una clara influencia del estado de fosforilación sobre la proteólisis activada por PA aunque parece haber una ligera disminución en la cantidad de PEPC en las muestras incubadas con el péptido fosforilado (figura 47, pista 4).



**Figura 47.- Efecto de los péptidos N-terminales (OH y OP) sobre la proteólisis de la PEPC C<sub>4</sub> activada por PA.** Una alícuota de 0.3 U de PEPC-OH semipurificada se preincubó a 30°C durante 10 min con 60 nmoles de los péptidos N-t-OH ó N-t-OP en 50 µl de un medio conteniendo Tris 0,1 M pH 8. Seguidamente se añadió 1 mM de PA (8:0) y se dejó incubando durante 10 h. Finalizada la incubación las muestras se analizaron en SDS-PAGE (10% de acrilamida) y el gel se reveló con azul de Coomassie.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la proteasa C19 la cual es activada por el péptido C19 y que se ha descrito aquí por primera vez, es la responsable de la proteólisis de la PEPC en presencia de PA ya que, existen muchas similitudes en la caracterización de ambas actividades proteasas. En este caso, el PA activaría a la proteasa C19 de forma indirecta a través de un aumento en la accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC.

#### 4.- EFECTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO C19 EN LA FOSFORILACIÓN DE LA PEPC: POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN.

La PEPC ha sido descrita como un homotetrámero formado por subunidades de aproximadamente 110 kDa que se organizan en un dímero de dímeros (Echevarría y Vidal 2003). La PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible llevado a cabo por la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPC-quinasa). La fosforilación de la PEPC sucede a nivel de una serina (Ser8) en el extremo N-terminal de la proteína. La PEPC-quinasa pertenece a la familia de las quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, aunque no posee ningún dominio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ , su actividad es independiente de calmodulina y carece de región autoinhibidora (Dong *et al.*, 1999).

Mediante la utilización de diferentes péptidos sintéticos homólogos al dominio conservado en el extremo N-terminal de la PEPC, donde se localiza la diana de fosforilación de la proteína, se ha observado que el mejor de los péptidos sintéticos que contienen esta secuencia tiene una  $K_m$  como sustrato de fosforilación dos veces mayor que la  $K_m$  de la proteína completa (Li *et al.*, 1997). Estos datos junto con otros estudios, sugirieron que en la fosforilación de la PEPC fotosintética por la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, la interacción entre ambas proteínas no se limita al dominio de fosforilación (Wang *et al.*, 1992; Li *et al.* 1997).

En este sentido investigamos en nuestro laboratorio posibles sitios de interacción de la PEPC-quinasa con la PEPC, diferentes del dominio de fosforilación. En el extremo C-terminal de la PEPC existe una zona altamente conservada que desempeña un importante papel funcional y estructural en la proteína (Dong *et al.*, 1999). Resultados obtenidos por nuestro grupo mostraron que un péptido sintético que contiene los 19 últimos aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC (péptido C19) [(Y)942EDTLILTMKGIAAGMQNTG960]), inhibía la fosforilación *in vitro* de la proteína por la PEPC-quinasa, poniendo en evidencia un posible papel regulador de este dominio C-terminal en la fosforilación de la proteína (Álvarez *et al.*, 2003).

Parte de los estudios realizados en esta tesis han tenido también como objetivo esclarecer cual es el mecanismo por el cual el péptido C-terminal inhibe la fosforilación *in vitro* de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003) y si la proteasa C19 estaba implicada. Se plantearon varias hipótesis:

1. Que el extremo C-terminal de la PEPC pudiera interactuar con la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente en otro dominio distinto al sitio activo, actuando como un punto de anclaje que facilitaría la accesibilidad de la quinasa al dominio de fosforilación en el extremo N-terminal de la PEPC. Esto supondría la existencia de dos dominios de interacción entre las proteínas. Cuando añadiéramos el péptido sintético C19 se bloquearía el dominio de anclaje en la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente lo que reduciría la eficiencia en la fosforilación de la PEPC. Esto implicaría que el dominio C-terminal no fuera una secuencia inhibitoria sino que la inhibición de la fosforilación fuera un efecto indirecto debido a la presencia del péptido durante el ensayo de fosforilación.
2. Que el extremo C-terminal funcione como un inhibidor alostérico. El péptido C19 interactuaría con la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, dicha interacción produciría determinados cambios conformacionales en la quinasa inhibiéndola. Por lo tanto, esta hipótesis propone la existencia de dos dominios de interacción entre las proteínas, uno catalítico y otro regulador, y que la interacción entre el C-terminal y la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente fuera inhibitoria.
3. Que el péptido C19 se uniera al sitio catalítico de la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente bloqueándolo y por tanto, impidiendo la interacción con el dominio N-terminal de la PEPC e inhibiendo la fosforilación de la proteína.
4. Que el péptido C19 inhibiera la fosforilación de la PEPC porque activa a la proteasa C19 que degrada el extremo N-terminal de la PEPC.

#### 4.1.- La fosforilación del péptido N-terminal es inhibida por el péptido C19.

Para dilucidar alguna de las hipótesis propuestas se realizaron una serie de ensayos de fosforilación *in vitro* con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP en presencia de los péptidos sintéticos N-terminal y C19. El péptido N-terminal es un péptido sintético de 18 aminoácidos [1MASERHHSIDAQLRALAP18] y peso molecular de aproximadamente 2 kDa que representa el extremo N-terminal de la PEPC de sorgo y que contiene el motivo de fosforilación SIDAQLR cuya serina (Ser8 en sorgo) es la serina implicada en la fosforilación reversible de la PEPC. La utilización del péptido N-terminal como sustrato de fosforilación permite ensayar la actividad PEPC-quinasa pero eliminando otros posibles puntos de interacción de la quinasa con la PEPC. Como fuente de quinasa se utilizó un extracto crudo obtenido a partir de hojas de sorgo previamente iluminadas, los ensayos de fosforilación se realizaron en presencia de EGTA para evitar posibles fosforilaciones por quinasas calcio dependiente. Al final del ensayo de fosforilación, los péptidos se separaron por inmunoprecipitación con anticuerpos específicos contra el péptido N-terminal (APS- IgGs) o contra el péptido C19 (C19-IgGs) y se analizaron en geles de forma independiente.

Primero analizamos la fosforilación del péptido N-terminal por la fracción quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente contenida en un extracto crudo de hojas de sorgo iluminadas según se describe en el apartado 3.6 de M & M. Como se observa en la figura 48, el péptido N-terminal es fosforilable por las quinasas- $\text{Ca}^{2+}$  independientes contenidas en el extracto crudo de luz.

Posteriormente, se realizó un ensayo de fosforilación *in vitro* del péptido N-terminal en presencia del péptido C19. Los péptidos se separaron mediante inmunoprecipitación con anticuerpos anti-C-terminal (C19-IgGs) según se describe en el apartado 4.2 de M & M. Los precipitados y los sobrenadantes obtenidos se analizaron en geles peptídicos al 15% de acrilamida. Tras teñir el gel con azul de Coomassie y secarlo, se puso en contacto con una placa autoradiográfica para detectar el marcaje radiactivo por fosforilación de las muestras peptídicas.

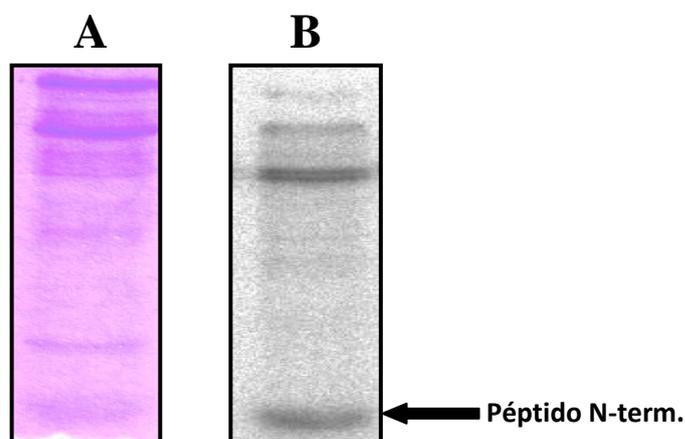
En la figura 49A se observa que los anticuerpos específicos contra el extremo C-terminal de la PEPC separan eficazmente los péptidos N-terminal y C19 una vez terminado el ensayo de fosforilación. Por un lado el sobrenadante contiene el péptido N-

terminal (figura 49A; pista 8) mientras que el péptido C19 se localiza en el inmunoprecipitado (figura 49A; pistas 4 y 5).

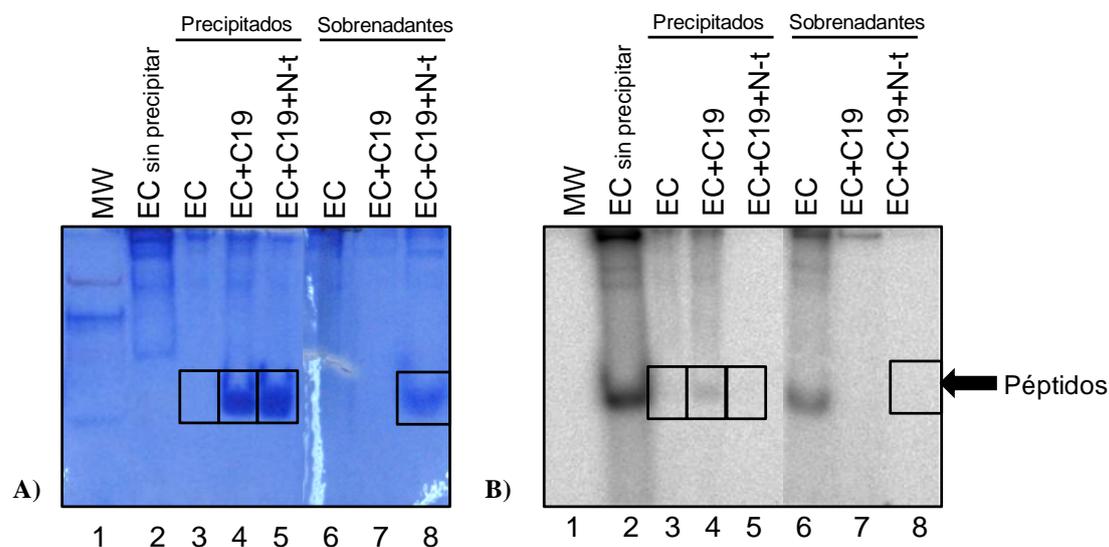
Además, la autoradiografía muestra que cuando la fosforilación del péptido N-terminal se realiza en presencia del péptido C19, el péptido N-terminal no se fosforila (figura 49B; pista 8), es decir, el péptido C19 inhibe la fosforilación del péptido N-terminal.

La banda de fosforilación que se recupera en el sobrenadante del extracto crudo (figura 49, pista 6) seguramente se trate de fragmentos N-terminales presentes en el extracto crudo cuya fosforilación también se inhibe en presencia del péptido C19 (figura 49, pistas 7 y 8).

Este resultado indica que el C-terminal de la PEPC actúa en la fosforilación de la PEPC como una secuencia inhibidora de la actividad PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, ya que, si el C-terminal actuara como un punto de anclaje que facilitara la fosforilación de la PEPC, el péptido N-terminal debería de fosforilarse.



**Figura 48.- Fosforilación *in vitro* del péptido N-terminal.** 40 nmoles del péptido N-terminal y una alícuota de extracto crudo de proteínas desalado de hojas de sorgo iluminadas conteniendo 0,15 U de PEPC se incubaron en el medio óptimo para realizar una fosforilación *in vitro* con  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  según se describe en el apartado 3.6 de M & M durante 45 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . Después de la fosforilación la muestras se analizaron en SDS-PAGE (15% acrilamida). A) Gel teñido en azul de Coomassie. B) Autoradiografía.



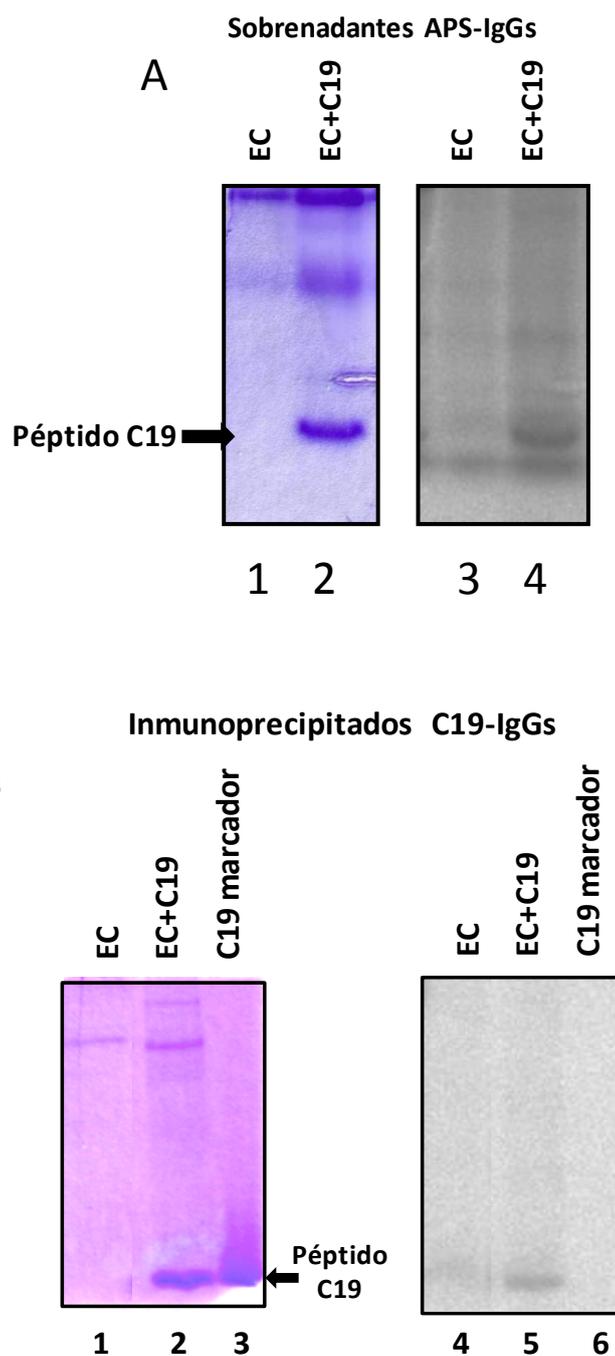
**Figura 49.- Efecto del péptido C19 sobre la fosforilación *in vitro* del péptido N-terminal por actividad quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente.** Una alícuota de extracto crudo desalado de hojas de sorgo iluminadas conteniendo 0.2 U de PEPC endógena (EC) se incubó en ausencia de péptidos (EC), con 40 nmoles de péptido C19 (EC+C19) ó 40 nmoles de péptido C19 y N-terminal (EC+C19+N-t) en un medio de fosforilación descrito en el apartado 3.6 de M & M, durante 45 min a 30°C. Finalizada la fosforilación *in vitro*, las muestras se inmunoprecipitaron con anticuerpos C19-IgGs de la PEPC (ver apartado 4.2 de M & M). Finalmente, sobrenadantes y precipitados se analizaron en geles peptídicos al 15% acrilamida. **A)** Gel teñido en azul de Coomassie. **B)** Autoradiografía.

**4.2.- El péptido C-terminal es fosforilado por una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente que podría ser la PEPC-quinasa.**

Sorprendentemente, en la figura 49 pista 4 se observa que en dicho precipitado aparece una banda de fosforilación de bajo peso molecular, indicando que esta fosforilación correspondería al péptido C-terminal. Por tanto, nuestros resultados indican que no sólo el péptido N-terminal se fosforila, sino que el péptido C19 también puede ser fosforilado por quinastas independientes de calcio presentes en el extracto crudo. Esto supone un novedoso resultado pues implicaría la existencia de dos dominios de fosforilación en la PEPC, uno conocido en el extremo N-terminal de la PEPC y otro desconocido hasta el momento en el extremo C-terminal de la proteína.

La fosforilación del péptido C19 podría ser realizada por la misma quinasa o por otra quinasa diferente de la que fosforila al N-terminal. Para confirmar la fosforilación del C-terminal se repitió el experimento de fosforilación utilizando extractos crudos de hojas de sorgo iluminadas como fuente de quinasa. Los resultados de la figura 50 proceden de dos experimentos independientes de fosforilación de péptido C19 y posteriormente inmunoprecipitados con diferentes anticuerpos. En el primero (figura 50A) la inmunoprecipitación se realizó con anticuerpos APS-IgGs así que el péptido C19 se localizaría en el sobrenadante mientras que en el segundo (figura 50B) se utilizaron anticuerpos C19-IgGs para la inmunoprecipitación por lo que el péptido C19 se localizaría en el precipitado. Esto se realizó con el fin de obtener los resultados por duplicado y controlar la especificidad de los anticuerpos.

Los resultados muestran que ambos tipos de anticuerpos separan eficazmente el péptido C19. Cuando se utilizaron anticuerpos APS-IgGs el péptido C19 aparece en el sobrenadante (figura 50A, pista 2) y cuando se utilizaron C19-IgGs el péptido C19 aparece en el precipitado (figura 50B, pista 2). En ambos ensayos el péptido C19 aparece fosforilado (figura 50A, pista 3; Figura 50B, pista 5).



**Figura 50.- Fosforilación del péptido C19.** Una alícuota de 20  $\mu$ l de extracto crudo de proteínas desalado de hojas de sorgo iluminadas conteniendo 0.15 U de PEPC se incubó en ausencia (EC) o en presencia de 40 nmoles de péptido C19 (EC+C19) en el medio de fosforilación descrito en el apartado 3.6 de M & M durante 45 min a 30°C. Finalizada la fosforilación *in vitro*, las muestras se inmunoprecipitaron. **A)** Sobrenadantes de inmunoprecipitados con APS-IgGs, pistas 1-2 azul de Coomasie, pistas 3-4 autoradiografía. **B)** Inmunoprecipitados con C19-IgGs, pistas 1-3 azul de Coomasie, pistas 4-5 autoradiografías. C19 marcador: 40 nmoles de péptido C19 utilizado como marcador.

En conjunto, estos resultados aportan una gran cantidad de información respecto al sistema en estudio:

- 1) La secuencia C-terminal de la PEPC actuaría como una secuencia inhibidora de la fosforilación y no como un segundo sitio de interacción que aumente la eficiencia catalítica de la quinasa (Li *et al.*, 1997).
- 2) La inhibición de la fosforilación no es debida a la proteólisis del péptido N-terminal ya que este se visualiza en azul de Coomassie (figura 49, pista 3).
- 3) El C19 es fosforilado por extractos crudos de hojas de sorgo iluminadas lo que podría representar un segundo sitio de fosforilación de la PEPC hasta ahora no descrito. Además, es fosforilado por una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente.

#### **4.3.- El sitio de fosforilación en el C19 está por dilucidar.**

Las bandas de péptido C19 fosforilado fueron procesadas desde los geles de acrilamida y enviadas al servicio de proteómica de la Universidad Complutense de Madrid para la identificación del aminoácido fosforilado. Sin embargo, las cantidades de muestra aportadas no fueron suficientes para resolver el análisis. Con idea de obtener mayor cantidad de péptido fosforilado utilizamos PKA (subunidad catalítica de la PKA y que fosforila con éxito la Ser8 del motivo de fosforilación del extremo N-terminal de la PEPC (Terada *et al.*, 1990)), sin embargo, el C-terminal no es fosforilado por la PKA. Estos resultados están muy relacionados con los publicados por Álvarez *et al.*, (2003) en los que se muestra que la fosforilación de la PEPC por la PKA no es inhibida en presencia del péptido C19. Finalmente y suponiendo que la fosforilación del C-terminal podría realizarse por la PEPC-quinasa u otra quinasa similar del tipo Ser/Thr quinasa (Hartwell *et al.*, 1999), se observa, tras analizar la secuencia del péptido C19, *[(Y)942EDTLILTMKGIAAGMQNTG960]* que no existe ninguna Ser aunque si se localizan tres Thr en las posiciones 944, 948 y 959 desde el extremo amino que podrían constituir el sitio de fosforilación. Experimentos futuros serán necesarios para dilucidar el residuo objeto de fosforilación y determinar si dicha fosforilación sucede *in vivo*.



*DISCUSIÓN*





*DISCUSIÓN*



## V. DISCUSIÓN.

### 1.- CARACTERIZACIÓN DE UNA PROTEASA QUE DEGRADA A LA PEPC Y QUE ES ACTIVADA POR EL C-TERMINAL DE SU SUSTRATO (PROTEASA C19).

La PEPC presenta en su extremo C-terminal una zona altamente conservada, incluso en procariotas, que engloba los últimos 20 residuos de dicho extremo (Lepiniec *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Gehrig *et al.*, 1998). Respecto a su estructura secundaria, el C-terminal forma una  $\alpha$ -hélice ( $\alpha$ -40) rematada por un tetrapéptido terminal lineal (QNTG en la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo). La  $\alpha$ -hélice es altamente hidrofóbica, presentando en la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo 14 aminoácidos hidrófobos de los 19 aminoácidos finales.

En la actualidad son pocos los estudios que se han realizado para conocer las posibles funciones de esta secuencia de 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC. Mediante la utilización de enzimas recombinantes de PEPC con el C-terminal alterado se ha observado que los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal son necesarios no sólo para conservar la actividad catalítica sino también para que la proteína sea estable en la línea transformante, poniendo de manifiesto problemas de plegamiento o en la formación del tetrámero (Dong *et al.*, 1999). Además, se ha visto que la delección del tetrapéptido terminal lineal QNTG produce una pérdida total de la actividad aunque no de la proteína. También se ha mostrado que la glicina (G) terminal es imprescindible para alcanzar la máxima actividad catalítica de la enzima y que la asparragina (N) está implicada en el sitio de unión a aspartato, efector negativo de la PEPC (Dong *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2006).

Los estudios realizados en nuestro grupo sobre el papel regulador del extremo C-terminal de la PEPC han aportado también resultados interesantes. Estos estudios se centraron en la implicación del C-terminal en la regulación de la fosforilación de la enzima, y se observó que el péptido C19, el cual representa los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo, interacciona con la PEPC-quinasa inhibiéndola y por tanto inhibiendo la fosforilación de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003).

Utilizando como herramienta base el péptido C19 nos propusimos estudiar en este trabajo si el dominio conservado en el C-terminal de la PEPC tenía alguna influencia sobre la actividad catalítica de la PEPC C<sub>4</sub>, o en cualquiera de las propiedades de regulación de la enzima.

Utilizando como fuente de PEPC la fracción de PEPC semipurificada, obtenida por cromatografías en hidroxapatito e intercambio iónico en Mono Q a partir de hojas de sorgo mantenidas en oscuridad, observamos que en presencia del péptido C19 se produce una inhibición de la actividad catalítica de la enzima durante el tiempo de incubación. Esta inhibición de la actividad se ve acompañada de una desaparición de la enzima cuando las muestras se analizaron en gel, tanto en condiciones nativas (7 % de acrilamida) como en condiciones desnaturalizantes (10 % de acrilamida), después de 3 horas de incubación en presencia del péptido. Estos resultados pusieron de manifiesto la posible existencia de una proteasa en la fracción PEPC semipurificada que se activara en presencia del péptido C19 y a la que denominamos proteasa C19.

Se estudió la especificidad del fenómeno mediante el uso de diferentes péptidos sintéticos. Se utilizaron tres péptidos sintéticos denominados L1, L2 y L3 que representan secuencias específicas de la PEPC de plantas y que están muy expuestas en la estructura terciaria de la enzima. Además, los péptidos L2 y L3 tienen un grado de hidrofobicidad similar al péptido C19 (Álvarez *et al.*, 2003). Ninguno de los péptidos ensayados produjo ningún efecto ni sobre la actividad catalítica de la PEPC ni sobre su desaparición a nivel de gel (figura 14). Esto demuestra que el efecto del péptido C19 sobre la PEPC es específico y no es debido ni a la hidrofobicidad del péptido ni a compuestos inespecíficos presentes en las preparaciones de los péptidos. Dentro de la secuencia del péptido C19 hemos visto que las treoninas localizadas en las posiciones 944 y 948 de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo son residuos clave para la interacción con la proteasa C19, ya que, la sustitución de estas treoninas (T) por tirosinas (Y) hace que el péptido pierda por completo su capacidad de activar a la proteasa C19 (figura 15B). Sin embargo, un péptido similar al péptido C19 pero que carece del tetrapéptido terminal lineal QNTG y al que denominamos péptido C15, sigue siendo igualmente efectivo para la activación de la proteasa de lo que se deduce que el sitio de interacción está aguas abajo de dicho tetrapéptido (figura 15A). En este sentido, estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que el tetrapéptido terminal no es esencial para inhibir la fosforilación de la PEPC por la PEPC-quinasa (Álvarez *et al.*, 2003).

Todo esto sin detrimento de que el tetrapéptido terminal lineal sea un dominio clave de la PEPC pues la glicina terminal (G) es necesaria para alcanzar la máxima actividad catalítica y el residuo de asparragina (N) está implicado en la unión de su regulador negativo aspartato (Dong *et al.*, 1999; Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002).

Se había observado que alteraciones en el extremo C-terminal de la PEPC provocaban una disminución de la cantidad de tetrámero sugiriendo que el C-terminal podría estar implicado en el mantenimiento del estado oligomérico de la PEPC (Dong *et al.*, 1999). Además, recientemente se había descrito en ricino la presencia de complejos heterooctaméricos de PEPC (Gennidckis *et al.*, 2007). Para confirmar que la inhibición y desaparición de la PEPC por incubación con el péptido C19 no se debiera a cambios en el estado de oligomerización de la enzima, se realizaron varios experimentos. Sin embargo, esta hipótesis se descartó ya que, la incubación con el péptido C19 de una PEPC purificada y separada de la proteasa por electroelución, no provocó la dimerización, monomerización o formación de macroagregados cuando la muestra de analizó en electroforesis nativa (figura 19).

También se descartó la precipitación artefactual de la enzima en presencia del péptido C19 como responsable de la inhibición y desaparición de la PEPC ya que, la PEPC no se localizó ni en el sobrenadante ni en el precipitado después de la incubación de la proteína en presencia del péptido C19, mientras que en un control carente del péptido C19 la PEPC se localizó en el sobrenadante (figura 17).

La proteasa C19 se puede separar de la PEPC añadiendo un paso más de purificación a la fracción de PEPC semipurificada por PAGE y posteriormente recuperando la enzima por electroelución. La fracción de PEPC así obtenida (PEPC electroeluída) no se ve afectada por la presencia del péptido ni en su actividad ni en su integridad (figura 19).

Mediante la detección de actividad proteasa por zimografía se corroboró la hipótesis de la presencia de una proteasa en la fracción de PEPC semipurificada como responsable del efecto del péptido C19 sobre la PEPC. Esta actividad proteasa se detectó en geles de acrilamida copolimerizados con caseína, a pH de 6,5 y 1,2 mM de péptido C19 como una banda de aproximadamente unos 50 kDa (figura 18). Este experimento mostró además que la proteasa C19 puede utilizar otros sustratos como la

caseína y que aún así sigue siendo estrictamente dependiente de la presencia del péptido C19 para su activación.

Existen pocos estudios sobre la degradación controlada de la PEPC sin embargo, se ha detectado y caracterizado proteólisis de la PEPC en algunas ocasiones y en diferentes contextos. Algunos estudios han puesto de manifiesto la susceptibilidad de la PEPC a ser proteolizada *in vitro* durante su purificación (Plaxton, 1996). Recientemente se ha descrito en ricino una asparragil endoproteasa que degrada específicamente la PEPC p107 procedente del endospermo de semillas de ricino (Crowley *et al.*, 2005) cuya actividad es independiente de la presencia de péptidos. También se ha detectado degradación selectiva de PEPC en tres isoenzimas propias de las células guarda de los estomas durante el cierre estomático, sin embargo, esta proteólisis parece depender del sistema ubiquitina/proteosoma (Klockenring *et al.*, 1997). Otras observaciones muestran alteraciones de la estabilidad de la PEPC de hojas en plantas viejas controles y aclimatadas a salinidad, mostrándose que la PEPC es más estable en plantas crecidas en presencia de altas concentraciones de NaCl (García-Mauriño *et al.*, 2003).

El mecanismo de acción de la actividad proteasa activada por el péptido C19 no coincide con ninguna de las proteasas descritas actualmente que tienen como sustrato a la PEPC. Los resultados aquí presentados implican la descripción de una nueva proteasa de la PEPC C<sub>4</sub> que se activa específicamente en presencia de un péptido que representa la secuencia de 19 aminoácidos del extremo C-terminal de su propio sustrato, a la que hemos denominado **proteasa C19**.

La PEPC está sujeta a regulación por una gran variedad de metabolitos. La glucosa 6-fosfato (G6P) es un efector positivo de la PEPC que produce un aumento de su  $V_{max}$ , una bajada de la  $K_m$  para su sustrato (PEP) y una menor sensibilidad a su inhibidor L-malato (Echevarría *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996). Se ha analizado la influencia del control metabólico, principalmente G6P y L-malato, sobre la actividad proteasa C19 de la fracción de PEPC semipurificada.

El L-malato, efector negativo de la PEPC, no produce cambios significativos en la cinética de proteólisis de la proteasa C19 cuando está presente en los ensayos de actividad proteolítica. Por el contrario, en presencia de G6P se observa una inhibición de la actividad proteasa C19 que es cuantificable tanto a través de la actividad PEPC remanente como por PAGE. La G6P provocaría un efecto indirecto a través de cambios

conformacionales encubriendo puntos de cortes esenciales para que la proteólisis prospere.

En plantas CAM se ha observado que, *in vitro*, en presencia de varios metabolitos, entre ellos G6P, la PEPC se encuentra fundamentalmente en forma tetramérica mostrando una alta  $K_i$  para el L-malato, sin embargo, no hay evidencias *in vivo* de que estos cambios de agregación de la PEPC puedan regular a la enzima (Chollet *et al.*, 1996). Wedding *et al.*, (1997) demostraron *in vitro* que existía una relación entre el grado de agregación de la PEPC CAM y la sensibilidad a proteasas comerciales, siendo el tetrámero la conformación más resistente a la degradación. Además, a partir de la publicación de la estructura tridimensional de la PEPC C<sub>4</sub> de maíz se ha propuesto que la zona de unión de la G6P se localiza en un bolsillo de alta densidad electrónica en la interfaz del dímero y que modificaciones en este dominio tienen repercusiones globales en la estructura de la PEPC (Matsumura *et al.*, 2000).

Todos estos datos sugieren que el bloqueo de la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 en presencia de G6P pudiera mediar por determinados cambios conformacionales que estabilizaran la estructura de la PEPC, posiblemente a través del mantenimiento del estado de agregación de la enzima. Ambas opciones no son mutuamente excluyentes pudiendo suceder ambas, es decir, en presencia de G6P se estabiliza la estructura de la PEPC favoreciéndose el estado tetramérico y se reduce la accesibilidad a los puntos de corte o reconocimiento en la PEPC por la proteasa C19 fruto de los cambios conformacionales generado por la G6P. En este sentido nuestros resultados muestran que en fracciones viejas o muy diluidas de PEPC semipurificada (2 meses a -20°C), que contienen abundancia de dímero y monómero, la proteólisis es 3 veces más rápida que en fracciones frescas indicando una mayor preferencia de la proteasa por el dímero o monómero que por el tetrámero (datos no mostrados). Estos resultados están de acuerdo con la propuesta de Wedding *et al.*, (1997).

El extremo C-terminal de la PEPC es una  $\alpha$ -hélice muy conservada y altamente hidrofóbica como hemos descrito anteriormente. Este extremo se encuentra inmerso en una región hidrofóbica constituida por varias  $\alpha$ -hélices de la misma subunidad y está muy poco expuesto (Kai *et al.*, 1999). Trabajos realizados en nuestro grupo han mostrado que la PEPC *in vitro* se encuentra en dos estados de conformación. El mayoritario en las condiciones ensayadas, es aquel en el cual la PEPC no precipita en

presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra la secuencia C-terminal (un 70 % de la PEPC) y en el que por tanto la secuencia estaría enterrada en la subunidad según lo propuesto por Kai et al., (1999). Sin embargo, aproximadamente el 30% de la PEPC se precipita con dichos anticuerpos mostrando que una parte de la PEPC tendría dicha secuencia expuesta (Álvarez et al., 2003). El estudio sobre los cambios de accesibilidad del extremo C-terminal de la PEPC es fundamental para explicar el mecanismo de acción de la proteasa C19. Mediante la realización de inmunoprecipitados con anticuerpos específicos dirigidos contra el extremo C-terminal de la PEPC (C19-IgGs) hemos obtenidos una serie de resultados que muestran que, en presencia de G6P la PEPC contenida tanto en la fracción PEPC semipurificada (figura 35) como en un extracto crudo de hojas se sorgo de oscuridad (figura 37) presenta el C-terminal menos expuesto que el control carente del metabolito, por lo tanto, la G6P reduce la exposición del C-terminal propiciando una conformación en el que el C-terminal estaría enterrado en la subunidad. La G6P se perfila, por tanto, como un elemento de gran importancia en la regulación de la proteólisis, ya que, protegería a la enzima de la proteólisis por la proteasa C19 en cualquiera de los múltiples contextos metabólicos en los que se produzca un incremento de este metabolito, contextos metabólicos que están asociado con una alta eficacia de la PEPC como sería el de la fotosíntesis C<sub>4</sub>.

Hemos realizado diferentes ensayos con el objetivo de caracterizar a la proteasa C19 descrita aquí por primera vez. Los resultados obtenidos hasta el momento muestran que la proteasa C19 es una proteasa neutra, puesto que sólo se revela actividad proteasa C19 en zimogramas a pH 6.5 y no a pH 4. *In vitro*, y en presencia del péptido C19, la proteasa es igualmente activa entre pH 6,5 y pH 8, y es estrictamente dependiente del péptido C19 ya que, en ausencia del péptido no mostró actividad a ninguno de los pHs ensayados (figuras 20 y 21). Mediante el uso de EGTA hemos visto que la proteasa C19 no es dependiente de calcio por tanto no pertenece al grupo de proteasas calcio dependientes o fitocalpains (Paterson *et al.*, 2010; Margis & Margis-Pinheiro, 2003). Se ha analizado el efecto de una amplia gama de inhibidores de proteasas intentando abarcar todos los grupos de proteasas existentes. De todos los inhibidores utilizados sólo la quimostatina tiene algún efecto sobre la proteasa C19 bloqueando su actividad parcialmente (40-50%) a tiempos cortos de incubación de 90 min. La quimostatina es un inhibidor peptídico de origen microbiano capaz de inhibir a serin proteasas como quimotripsina o papaína y algunas cisteín proteasas como la catepsina por lo tanto,

nuestros resultados sugieren que la proteasa C19 podría pertenecer al grupo de las serín o cisteín proteasa, ambos tipos de proteasas están evolutivamente muy relacionados y su mecanismo de catálisis es muy parecido (Van der Hoorn, 2008; Beynon, 1990; Zollner, 1990). Su actividad se estimula con SDS ya que, al desnaturalizarse la proteína se exponen mayor cantidad de sitios de corte. La activación de la proteólisis en presencia de SDS ha sido puesta de manifiesto en otras proteasas (Dailing *et al.*, 1983; Yamada *et al.*, 1998, 2000). También hemos visto que la proteasa C19 está presente tanto en fracciones de PEPC semipurificadas obtenidas a partir de hojas iluminadas como mantenidas en oscuridad, es decir, su presencia no está regulada por cambios luz-oscuridad que es factor regulador esencial en muchas enzimas en las planta C<sub>4</sub> (Nelson y Langdale, 1992). Sin embargo, serán necesario estudios futuros, principalmente obtener la secuencia para profundizar en un estudio sobre la transcripción y regulación de esta proteasa por tejidos y en los diferentes contextos fisiológicos en los que pudiera estar implicada.

La fosforilación reversible de la PEPC es un mecanismo de regulación postraduccional que produce determinados cambios notables en las propiedades cinéticas y de regulación de la enzima, destacando un aumento de la  $V_{max}$  y una menor sensibilidad a su inhibidor el L-malato (Chollet *et al.*, 1996). Todas las isoenzimas de la PEPC de plantas a excepción de la PEPC de tipo bacteriano están sometidas a regulación por fosforilación (Chollet *et al.*, 1996; Sánchez y Cejudo, 2003). El dominio de fosforilación se localiza en el extremo N-terminal de la enzima y el residuo fosforilable es una serina muy conservada (Ser 8 en la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo) (Lepiniec *et al.*, 1994; Toh *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996). Nos propusimos estudiar posibles puntos de corte de la proteasa y comenzamos por esta secuencia ya que, poseíamos anticuerpos específicos contra ella (APS-IgGs). Además, el extremo N-terminal de la PEPC es un dominio muy expuesto en la estructura de la proteína y podía ser un buen candidato como punto de corte pues varios estudios han demostrado que este extremo es muy susceptible de ser proteolizado *in vitro* (Plaxton, 1996; Matsumura *et al.*, 2000). Los resultados mostraron que en efecto la adición de anticuerpos APS-IgGs durante el ensayo de proteólisis preservaban la integridad de la PEPC. Sin embargo, Pacquit *et al.*, (1995) habían demostrado que el bloqueo del dominio de fosforilación de la PEPC-OH con estos anticuerpos específicos (APS-IgGs) produce cambios en la conformación de la PEPC con un efecto similar al de la fosforilación. Para descartar que la unión del

anticuerpo preserve la integridad de la PEPC por un cambio en la conformación que esconda un sitio de corte diferente al N-terminal y no porque bloquee el mismo N-terminal, utilizamos directamente un péptido sintético de 18 aminoácidos que representa el extremo N-terminal de la PEPC y que contiene el motivo de fosforilación.

La adición del péptido N-terminal al ensayo de actividad proteolítica produce una clara inhibición de la proteólisis, sugiriendo que en el extremo N-terminal de la PEPC se localiza el punto inicial de corte de la proteasa ya que, en presencia del péptido se mantiene la integridad de la proteína.

Hemos estudiado si el mecanismo de regulación por fosforilación afectaba a la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 y observamos que la PEPC fosforilada es menos susceptible a ser proteolizada *in vitro* por la proteasa C19 que la forma desfosforilada de la enzima (figura 30B). Se diseñó un péptido sintético denominado N-terminal fosforilado, similar al N-terminal pero con la única diferencia respecto de este de que la serina fosforilable presenta un grupo fosfato unido. En efecto, el péptido N-terminal fosforilado inhibe pobremente la proteólisis de la PEPC indicando que es peor sustrato de la proteasa (figura 30A).

La preferencia de la proteasa por un sustrato desfosforilado se pone también de manifiesto tanto si utilizamos como fuente de PEPC la fracción de PEPC semipurificada fosforilada o no, *in vitro*, con PKA (Terada *et al.*, 1990), como usando extractos crudos de hojas de oscuridad, donde la mayoría de la PEPC está desfosforilada, o de luz, donde un alto porcentaje de la PEPC está fosforilada (figuras 31 y 32).

Todos estos resultados ponen de manifiesto que el dominio localizado en el extremo N-terminal de la PEPC es un punto muy importante en la regulación de la degradación de la PEPC por la proteasa C19 y que representa el punto inicial de corte a partir del cual se desencadena la proteólisis general de la enzima. Además, demostramos tanto con los ensayos con PEPC fosforilada (PEPC-OP) como con el péptido N-terminal fosforilado que la introducción de un fosfato en el N-terminal reduce la sensibilidad de la PEPC a ser proteolizada *in vitro* por la proteasa C19.

Actualmente la fosforilación sólo se relacionaba con cambios en las propiedades catalíticas y de regulación de la enzima (Echevarría y Vidal, 2003), sin embargo, su

implicación en la regulación de la proteólisis de la PEPC supone un nuevo significado fisiológico al mecanismo de regulación por fosforilación.

Referente a los factores que pueden alterar la accesibilidad del C-terminal hemos estudiado el efecto de la fosforilación y hemos observado que de forma general la fosforilación también parece reducir la accesibilidad del C-terminal aunque en menor grado que la G6P. Por lo tanto la fosforilación tendría una repercusión doble por un lado afecta de forma directa al N-terminal reduciendo la afinidad de la proteasa C19 por este dominio y alterando la accesibilidad del C-terminal haciéndolo menos accesible y por tanto pudiendo regular la activación de proteasa C19.

En los estados donde la PEPC es más resistente a ser proteolizada *in vitro* por la proteasa C19, cuando tiene unida G6P o cuando está fosforilada, observamos que el estado conformacional de la PEPC C<sub>4</sub> presenta el C-terminal menos accesible y por tanto esas subunidades sería menos susceptibles de activar a la proteasa C19 a través de su propio C-terminal.

El modelo propuesto para explicar la proteólisis de la PEPC a través de la accesibilidad de su extremo C-terminal implica que en aquellas condiciones donde el C-terminal estaría expuesto, el C-terminal podría interactuar con la proteasa C19 y activarla. La activación podría suceder por la interacción con el C-terminal expuesto de la PEPC o por interacción con fragmentos C-terminales consecuencia de su propia actividad proteolítica. Los fragmentos proteolíticos C-terminales podrían producir un “feedback” positivo que estimularía la actividad proteasa de forma rápida. La proteasa C19 una vez activada podría degradar a la PEPC independientemente del grado de exposición del C-terminal, lo que conllevaría la caída de la actividad PEPC o la degradación selectiva de moléculas de PEPC marcadas. El marcaje en cuestión podría ser un mal plegamiento, algún daño o la pérdida de la estructura cuaternaria. En cualquier caso nuestro modelo propone que la actividad proteasa comenzaría por el N-terminal y afectaría principalmente a las subunidades de PEPC más susceptibles de ser proteolizadas como las deterioradas y/o desfosforiladas o no unidas a G6P.

Los resultados obtenidos en esta tesis también ponen en evidencia la relación entre dos vías de regulación de la PEPC, la vía proteolítica, a través de la proteasa C19 y la ruta de fosforilación, presentando ambas un elemento en común, el dominio C-terminal de la PEPC. El modelo propuesto indica que cuando el C-terminal está

expuesto (figura 51, estadio A) se induce la proteólisis de la enzima por la proteasa C19 por interacción directa con el C-terminal de la PEPC. Al mismo tiempo se bloquea la fosforilación de esa subunidad (Álvarez *et al.*, 2003) aumentando su sensibilidad a ser degradada (figura 52). Además, en el modelo se refleja que conforme aumenta la proteólisis los péptido C-terminales que se generan estimularían la activación de la proteasa, siendo esta activación independiente de la interacción directa con el extremo C-terminal de la proteína sustrato (figura 51, C y B). Según nuestros resultados el ataque comenzaría por el N-terminal de la PEPC, donde se encuentra el sitio de fosforilación. Por el momento desconocemos en qué condiciones se activa la proteólisis y como se marcan las subunidades para ser degradadas. En cualquier caso nuestros resultados indican que un importante elemento regulador que podría actuar en diferentes contextos metabólicos podrían ser los niveles de metabolitos, en concreto de glucosa-6P a través de la regulación de la exposición del C-terminal de la enzima.

Los resultados aquí mostrados y los descritos por Álvarez *et al.*, (2003) ponen en evidencia una interconexión de tres rutas de regulación de la PEPC, la regulación metabólica, la regulación por fosforilación y la regulación por degradación, a través de un elemento común, el extremo C-terminal de la PEPC.

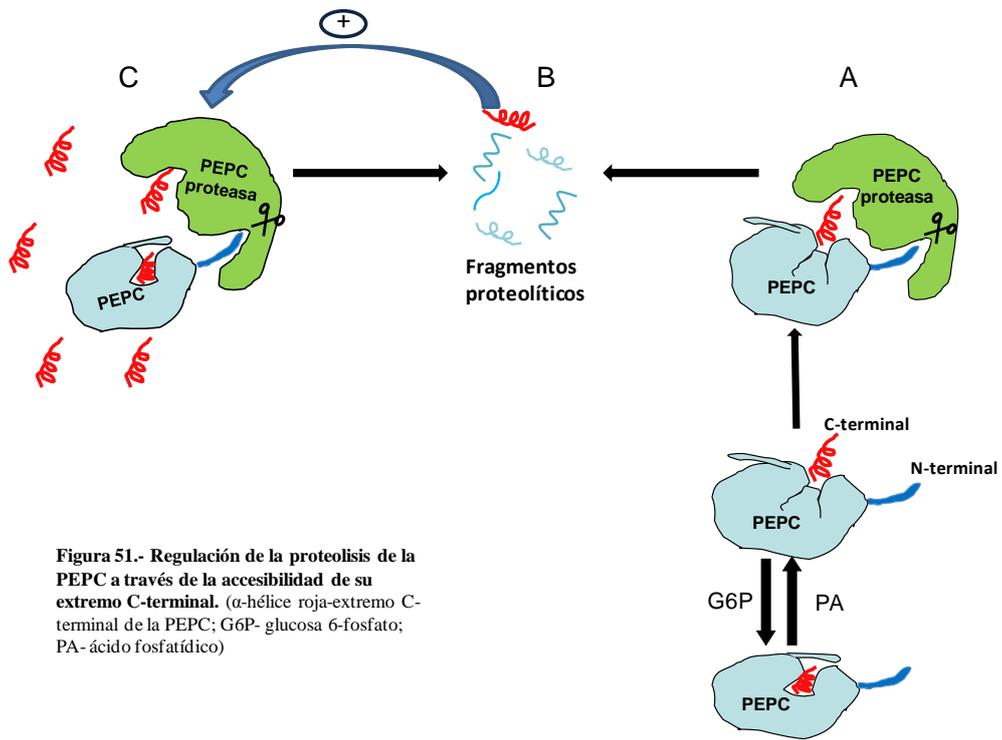


Figura 51.- Regulación de la proteólisis de la PEPC a través de la accesibilidad de su extremo C-terminal. (α-hélice roja-extremo C-terminal de la PEPC; G6P- glucosa 6-fosfato; PA- ácido fosfatídico)

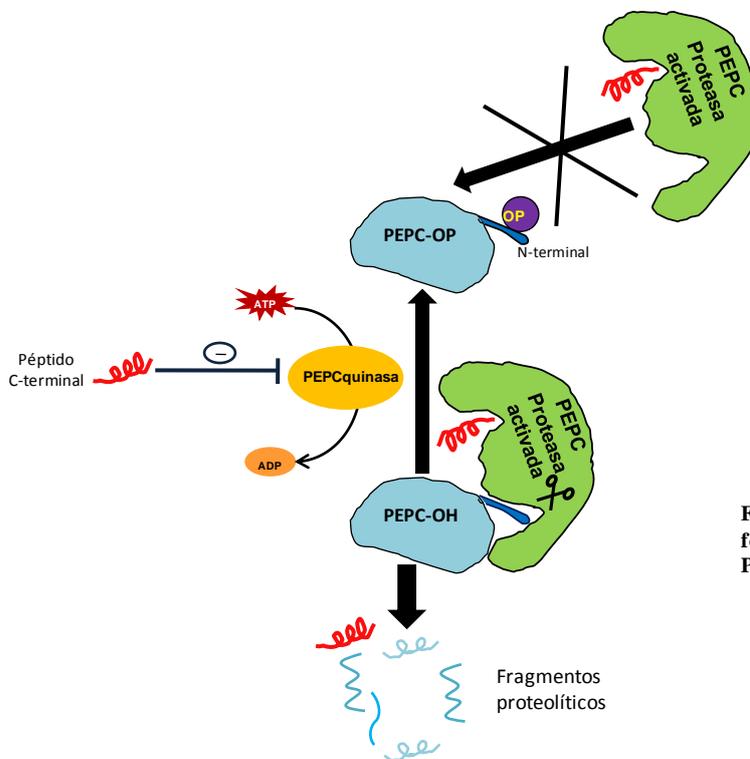


Figura 52.- Regulación de la fosforilación y de la proteólisis de la PEPC por su extremo C-terminal.

## 2.- EL ÁCIDO FOSFATÍDICO INDUCE LA EXPOSICIÓN DEL C-TERMINAL DE LA PEPC Y SU DEGRADACIÓN POR LA PROTEASA C19.

El ácido fosfatídico es un fosfolípido de membrana que funciona como segundo mensajero en diferentes rutas de señalización en plantas (Testerink y Munnik, 2005). Estudios recientes realizados por nuestro grupo en colaboración con la Dra. Testerink han mostrado *in vitro* la interacción directa entre la PEPC C<sub>4</sub> y el PA, fruto de dicha interacción se produce la inhibición de la actividad catalítica de la PEPC C<sub>4</sub> (Monreal *et al.*, 2010).

Conociendo la interacción PEPC-PA y en la búsqueda de señales que regularan la exposición del C-terminal, proceso esencial en el mecanismo de activación de proteasa C19 aquí propuesto, se estudió si el PA producía algún cambio en la accesibilidad del C-terminal. Sorprendentemente observamos que en presencia de PA la PEPC expone el C-terminal. Este resultado se obtuvo utilizando como fuente de PEPC tanto un extracto crudo de hojas de sorgo como la fracción de PEPC semipurificada (figura 38 y 39). Este resultado era de gran importancia porque nos permitía demostrar la posible activación de la proteasa C19 en ausencia del péptido C19 por interacción directa con la PEPC.

Nuestros resultados muestran que en presencia de PA se induce la proteólisis de la PEPC a tiempos largos independientemente del tipo de PA utilizado. Además la adición de anticuerpos dirigidos contra el C-terminal al ensayo de proteólisis en presencia de PA produce una inhibición de la degradación de la PEPC, lo que pone de manifiesto que la exposición del C-terminal está íntimamente relacionada con la activación de la proteólisis.

Para asegurarnos de este hecho se realizaron una serie de ensayos para caracterizar la actividad proteasa que se induce en presencia de PA. Al igual que en experimentos presentados en esta tesis donde se muestra que la proteasa C19 comienza a degradar a la PEPC por el extremo N-terminal, mostrando mayor afinidad por el N-terminal desfosforilado, la proteasa activada por PA comienza a degradar a la PEPC por su extremo N-terminal con una menor afinidad por el péptido fosforilado, ratificando lo que hemos descrito anteriormente para la proteasa C19 y sugiriendo que se trata de la misma actividad proteolítica.

La utilización de PA para activar a la proteasa C19 permite ralentizar la cinética de proteólisis y observar bandas de proteólisis que no se aprecian cuando se utiliza el péptido C19 como activador. Cuando se analiza el patrón proteolítico destaca una banda de aproximadamente 85 KDa que pensamos corresponde al primer producto de la proteólisis. Hemos visto, mediante el uso de western blot y anticuerpos específicos dirigidos contra el extremo N-terminal de la PEPC, que la banda de 85 KDa y el resto de bandas carece del extremo N-terminal de la PEPC corroborando los resultados obtenidos con el péptido N-terminal que sugieren que la proteasa C19 comienza la degradación por el extremo N-terminal y confirmando que es la responsable de la degradación de la PEPC en presencia de PA.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que el PA induce la degradación de la PEPC C<sub>4</sub> por una proteasa de características similares a la proteasa C19 que actúa en ausencia del péptido C19 por lo que se activaría por interacción directa con el extremo C-terminal de la PEPC ajustándose de manera precisa al mecanismo de acción propuesto para la proteólisis de la PEPC por dicha proteasa.

La síntesis de PA es un proceso rápido, puntual y transitorio y está asociado a respuestas de la planta a un amplio rango de condiciones de estrés (Testerink *et al.*, 2004; Testerink y Munnik, 2005). La producción de PA en respuesta a estrés podría ser una de las señales que regulasen *in vivo* la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19. El mecanismo podría operar a través de un reclutamiento a membrana de la PEPC ya que se ha detectado PEPC unida a membrana y ligeramente proteolizada (Monreal *et al.*, 2010). El marcaje o señal que determina las subunidades de PEPC con mayor afinidad por el PA, se desconoce en la actualidad pero podrían ser subunidades de PEPC mal plegadas, con algún daño debido a las condiciones de estrés o que en un momento determinado se requiera una menor actividad PEPC.

Una vez unida al PA se produciría un cambio conformacional en la PEPC que además de inhibirla (Monreal *et al.*, 2010) provoca un aumento en la accesibilidad del C-terminal aumentando la probabilidad de la enzima de ser proteolizada. No obstante, nuestros resultados no implican que la exposición del C-terminal se asocie indisolublemente a la inactivación de la PEPC descrita por Monreal *et al.*, (2010). Sin embargo, los resultados obtenidos con el PA podrían sugerir este hecho. La relación entre la exposición del C-terminal y la inactivación de la PEPC es un punto interesante a

investigar en el futuro porque la inactivación puede ser una de las señales que desencadenen la degradación de la enzima. Además, la exposición del C-terminal también inhibiría a la PEPC-quinasa evitando la fosforilación innecesaria de las subunidades destinadas a su proteólisis. Fruto de la proteólisis controlada en la membrana se generaría péptidos C-terminales que podrían producir un “feedback” de activación de la proteasa C19 generando un aumento rápido y puntual de la actividad proteolítica (Modelo, figura 53).

En este trabajo de tesis hemos descrito un nuevo mecanismo de regulación de la PEPC a través de su degradación que implica la interconexión de diferentes rutas de regulación de la PEPC a través de un elemento en común, su extremo C-terminal. Lo aquí mostrado es la punta de lo que parece ser un complejo mecanismo de regulación extremadamente específico sin embargo, un amplio abanico de posibilidades se abre ante nosotros en el futuro con el objetivo de ir dilucidando las innumerables lagunas de nuestro modelo, comenzando por la secuenciación y clonaje de la principal protagonista de esta tesis, la proteasa C19.

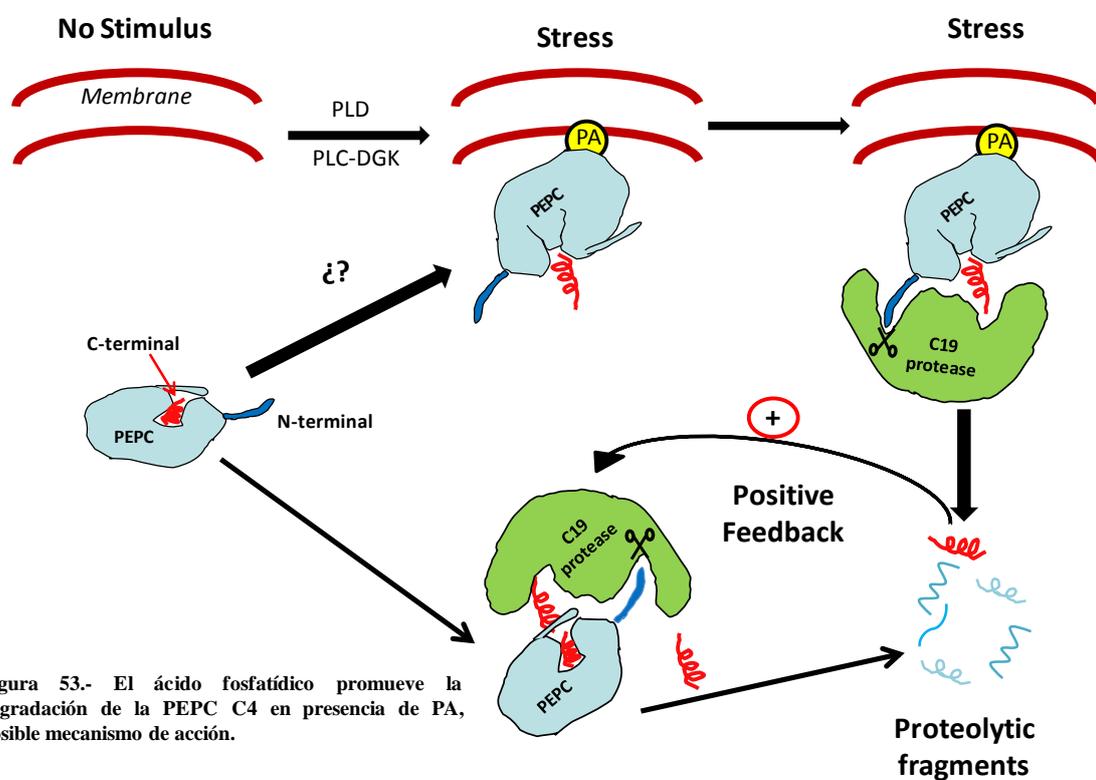


Figura 53.- El ácido fosfatídico promueve la degradación de la PEPC C4 en presencia de PA, posible mecanismo de acción.

### 3.- EFECTO DEL PÉPTIDO SINTÉTICO C19 EN LA FOSFORILACIÓN DE LA PEPC: POSIBLE MECANISMO DE ACCIÓN.

Finalmente, y teniendo en cuenta que resultados recientes obtenidos en nuestro grupo han puesto de manifiesto que el péptido C19 es capaz de inhibir específicamente la fosforilación *in vitro* de la PEPC por la PEPC-quinasa, sugiriendo un posible y novedoso papel regulador del dominio C-terminal en la fosforilación de la proteína (Álvarez *et al.*, 2003), hemos querido, en este trabajo profundizar en el mecanismo de acción por el cual el C-terminal regularía la fosforilación de la PEPC. Los trabajos realizados en este sentido se han basado en la realización de fosforilaciones *in vitro* con [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP utilizando como herramienta clave dos péptidos: el péptido C19, que inhibe la fosforilación de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003) y un péptido sintético que representa los últimos 18 aminoácidos del extremo N-terminal de la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo denominado péptido N-t-OH y que contiene el dominio de fosforilación conocido de la PEPC (SIDAQ), el cual hemos utilizado como sustrato de fosforilación en vez de utilizar la PEPC completa. Este planteamiento responde a que utilizando como sustrato el péptido N-terminal se eliminan todas las posibles de interacciones reguladoras de otras secuencias de la PEPC con la PEPC quinasa reduciendo el efecto del péptido a la interacción directa con la quinasa.

Una vez demostrado que el péptido N-t-OH era fosforilable, ya que se había descrito que péptidos homólogos al dominio de fosforilación de la PEPC tenían baja eficiencia como sustratos de fosforilación (Li *et al.*, 1997), se estudió el efecto del péptido C19 sobre la fosforilación del N-t-OH por las quinasas Ca<sup>2+</sup>-independientes contenidas en un extracto crudo de hojas de sorgo previamente iluminadas. Para analizar los péptidos de forma independiente, después de la fosforilación, las muestras se inmunoprecipitaron con inmunoglobulinas específicas contra el péptido C19 (C19-IgGs), debido a que la movilidad electroforética de ambos péptidos es muy parecida.

El péptido C19 no sólo inhibe la fosforilación de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003) sino que también inhibe la fosforilación del péptido N-t-OH por las quinasas Ca<sup>2+</sup> independientes procedente de un extracto crudo de luz (figura 49).

Este resultado implica que el C-terminal de la PEPC no es un punto de anclaje que facilitaría la accesibilidad de la PEPC-quinasa al dominio de fosforilación. En ese supuesto la presencia del péptido C19 reduciría la eficiencia en la fosforilación de la PEPC al tener la quinasa dicho dominio de interacción bloqueado por el péptido. Si esto hubiera sido así, el péptido N-t-OH debería de fosforilarse en presencia del péptido C19 hecho que no sucede.

Tampoco la inhibición de la fosforilación de la PEPC es debida a una proteólisis del N-terminal de la PEPC por la proteasa C19, hecho que nos planteamos tras el descubrimiento de esta nueva actividad proteolítica, ya que, al menos una cantidad apreciable de péptido, se conserva después del ensayo de fosforilación (figura 49, pista 3). Por lo tanto el C-terminal de la PEPC actúa en el mecanismo de regulación de la enzima por fosforilación reversible como una secuencia inhibidora de la actividad PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente. Este punto concreto es un avance respecto de los resultados publicados en Alvarez et al., (2003) donde no se perfila el papel concreto del péptido C19 como inhibidor. Sin embargo, aún queda por demostrar si el efecto del C-terminal es a través de un bloqueo del sitio activo de la PEPC-quinasa o por interacción en un dominio regulador de la enzima que produzca un cambio conformacional que la inhiba.

En los ensayos de fosforilación en presencia de los péptidos sorprendentemente se observa que cuando se realiza la fosforilación sólo con el péptido C19 se detecta cierta cantidad de marcaje radioactivo en la banda correspondiente al péptido C19. Este novedoso resultado sugiere que el péptido C19 puede ser fosforilado por las quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independientes presentes en un extracto crudo de hojas de sorgo previamente iluminadas, lo que supondría el descubrimiento de un nuevo dominio de fosforilación en la PEPC. Por lo tanto en la PEPC habría dos dominios de fosforilación, uno en el extremo N-terminal de la enzima, bien caracterizado y responsable de la regulación catalítica de la enzima, y otro en el extremo C-terminal descrito por primera vez en este trabajo.

Respecto a la enzima responsable de la fosforilación del C-terminal solo conocemos que es una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente presente en extractos crudo de hojas de sorgo iluminadas. Podría ser la PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente la responsable de la fosforilación del C-terminal, sin embargo, dado que la PEPC quinasa es una serina-

treonina quinasa, que no hay serinas en la secuencia C19 aunque hay tres Thr y que hemos demostrado en este trabajo que las Thr944 y 948 son imprescindibles para la activación de la proteasa C19, se sugiere que las Thr944 o 948 podrían ser los aminoácidos fosforilables. Sin embargo, trabajos posteriores serán necesarios para esclarecer este punto.





*CONCLUSIONES-CONCLUSIONS*



## VI.- CONCLUSIONES-CONCLUSIONS.

### 1.- CONCLUSIONES.

- 1) Hemos identificado y caracterizado parcialmente una nueva proteasa que degrada a la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC). Esta enzima es  $\text{Ca}^{2+}$ -independiente, no requiere metales para su actividad y es parcialmente sensible a quimostatina, considerado como un inhibidor de serín-cisteín proteasas.
- 2) La proteasa posee la peculiaridad de ser activa sólo en presencia de un péptido de características hidrófobas que representa los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC de sorgo de tipo C<sub>4</sub> (péptido C19) por lo que la hemos llamado proteasa C19.
- 3) Hemos identificado el sitio de interacción mostrando que el tetrapéptido final QNTG no es necesario para la activación de la proteasa, mientras que las Thr944 y Thr948 son aminoácidos esenciales para la activación.
- 4) En presencia de glucosa-6P, la degradación de la PEPC por la proteasa C19 es inhibida. El efecto de la glucosa-6P sería indirecto a través de cambios conformacionales en la PEPC. En este sentido se sugiere que el dímero es más sensible a la proteólisis que el tetramero. La proteasa C19 posee un amplio rango de pH óptimo desde 6,5 hasta 8,5, y presenta un peso molecular aproximado de 50 kDa.
- 5) El punto inicial de corte se localiza en el extremo N-terminal de la PEPC, en los primeros 18 aminoácidos donde se encuentra el dominio de fosforilación. La fosforilación de dicho dominio reduce considerablemente la proteólisis implicándose por primera vez a la fosforilación de la PEPC en la regulación de su degradación por la proteasa C19.
- 6) El PA (ácido fosfatídico) induce la actividad proteasa C19 en ausencia del péptido C19 mediante un cambio en la accesibilidad del extremo C-terminal

de la PEPC, representado el primer indicio de que la proteasa puede activarse no sólo por el péptido C19 sino también por interacción directa con el C-terminal de la PEPC.

- 7) Sobre la movilidad del extremo C-terminal de la PEPC mostramos que la glucosa-6P lo esconde y el ácido fosfatídico (PA) lo expone. Esto supone la existencia *in vivo* de elementos reguladores de la proteólisis de la PEPC por la proteasa C19 que la regularían a través del control del grado de exposición del C-terminal.
  
- 8) El extremo C-terminal de la PEPC es una secuencia inhibidora de la actividad PEPC-quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  independiente pudiendo bloquear el sitio activo de la enzima o interactuar con algún dominio regulador. En este trabajo se sugiere un nuevo dominio de fosforilación de la PEPC, diferente del ya descrito en el extremo N-terminal de la PEPC, y que se localizaría en el extremo C-terminal de la enzima, en las Thr944 o Thr948.
  
- 9) Todos estos resultados dibujan por primera vez un mapa totalmente nuevo donde la PEPC regularía su fosforilación y su proteólisis a través de un control de la exposición del extremo C-terminal cuya movilidad estaría a su vez regulada por glucosa-6P, esencial en la fotosíntesis  $\text{C}_4$ , o por el PA, mensajero secundario frecuentemente relacionado con situaciones de estrés.

## 2.- CONCLUSIONS.

- 1) We have identified, and partially characterized, a new protease cleaving the PEPC from darkened or illuminated sorghum leaf extracts. This enzyme does not require  $\text{Ca}^{2+}$  or metals for its activity and is partially sensitive only to Serine-Cysteine protease inhibitors.
- 2) This protease is active only in the presence of a hydrophobic peptide composed of 19 amino acids (peptide C19) identical to the C-terminal end of the C4-PEPC from Sorghum. Therefore, we have named this enzyme as protease C19.
- 3) The activator motive is downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr944 and Thr948 are essential amino acid for interaction.
- 4) The allosteric activator of PEPC, glucose-6P, blocks the protease activity on this PEPC form suggesting that glucose-6P-related conformation impairs the protease to attack its target. Along this line it suggested that the dimeric form is more sensitive to proteolysis than the tetrameric form. This protease has an optimal range of pH between 6,5 and 8,5 and an approximate relative mobility in SDS PAGE of about 50 kDa.
- 5) We also show that the first cleavage site is located at the N-terminal end (the last 18 amino acids) of PEPC. This sequence contains the phosphorylation motive and the phosphorylation of Ser8 (physiological Ser phosphorylated *in vivo*) decreased the affinity of protease C19 by its substrate. This is the first time that it is shown that the reversible phosphorylation of PEPC regulates the proteolysis of the enzyme by a mechanism that includes the C-terminal end of its substrate.
- 6) Another important point of this work is that the protease C19 can be activated by phosphatidic acid (PA) in absence of the peptide C19. We have

found that PA promotes the exposition of the C-terminal end of the PEPC leading to the interaction/activation of the protease C19 with its substrate.

- 7) The fact that the C-terminal end of the PEPC is buried in presence of G6P and exposed by PA shows two physiological *in vivo* regulators of the C-terminal mobility that regulate PEPC phosphorylation and proteolysis by changes in the conformational state of PEPC that implicate the C-terminal end of the protein.
  
- 8) It has been shown that the C19 peptide inhibit *in vivo* the phosphorylation of PEPC. Here we show that the peptide C19 is in fact an inhibitor of PEPC-kinase. Where this interaction occurs, in the active site or in a regulatory domain, remain unclear. In addition we show that peptide C19 can be phosphorylated *in vitro* suggesting by the first time another phosphorylation motive on PEPC. Thr944 or 948 are the proposed phosphorylated amino acid.
  
- 9) These results open a myriad of studies and draw a new picture were PEPC can regulate its phosphorylation and proteolysis through the exposition of its C-terminal end, that is regulated by the level of metabolites as G6P, essential on C<sub>4</sub> photosynthesis, or second messengers as PA, often related with stress conditions.



*RESUMEN - SUMMARY*



## **VII.- RESUMEN.**

### **1.-RESUMEN.**

En este trabajo hemos identificado y caracterizado parcialmente una nueva proteasa que degrada a la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), proteína objeto de nuestro estudio. Esta enzima no requiere  $\text{Ca}^{2+}$  ni metales para su actividad y es parcialmente sensible a quimostatina, considerado como un inhibidor de serín-cisteín proteasas. Sin embargo, posee la peculiaridad de ser activa sólo en presencia de un péptido de características hidrófobas y que representa los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC de sorgo de tipo  $\text{C}_4$  (péptido C19). Hemos identificado el sitio de interacción mostrando que el tetrapéptido final QNTG no es necesario para la activación de la proteasa, mientras que las Thr944 y Thr948 son aminoácidos esenciales para la activación. También hemos mostrado la especificidad de este péptido ya que, otras secuencias de PEPC (péptidos L1, L2 y L3) no tienen ningún efecto como activadores de esta proteasa. Adicionalmente, la proteasa C19 (nombre que hace alusión al péptido que la activa) puede degradar otros sustratos como la caseína pero aún así su actividad sigue siendo absolutamente dependiente del péptido C19. Además, hemos observado que en presencia de glucosa-6P, activador alostérico de la PEPC, se produce una inhibición de la degradación de la PEPC por la proteasa C19. Este resultado es muy interesante ya que indica que la degradación de la PEPC por la proteasa C19 puede ser regulada por metabolitos. El efecto de la glucosa-6P sería indirecto a través de cambios conformacionales en la PEPC. Otras características de esta proteasa son su amplio rango de pH óptimo desde 6,5 hasta 8,5, y un peso molecular aproximado de 50 kDa.

En cuanto a los sitios de corte de la proteasa C19 sobre la PEPC hemos puesto en evidencia otro importante resultado. La proteasa C19 empieza su proteólisis por el extremo N-terminal de la PEPC pues en presencia de un péptido sintético que simula dicho extremo y que contiene además el motivo de fosforilación (Chollet et al. 1996) la proteólisis es inhibida, cosa que no ocurre cuando se utiliza el mismo péptido pero fosforilado en la Ser8. Este resultado aporta una nueva perspectiva del mecanismo de regulación de la PEPC por fosforilación reversible, el cuál hasta el momento sólo se pensaba que regulaba las propiedades cinéticas y de regulación de la PEPC. Nosotros aportamos en este trabajo, por primera vez, que la fosforilación de la PEPC regula

también la degradación de la proteína por la proteasa C19.

Otros datos de interés sobre la movilidad del extremo C-terminal de la PEPC, del cual se ha descrito *in vitro* que puede estar en dos conformaciones distintas, accesible o inaccesible según se describe en Álvarez et al., (2003), muestran que hay dos posible reguladores fisiológicos de la exposición del C-terminal, la glucosa-6P que lo esconde y el ácido fosfatídico (PA) que lo expone. De esto se deduce que la conformación de la PEPC en presencia de glucosa-6P es una conformación protegida de la proteólisis (como se ha descrito anteriormente), mientras que en presencia de PA adoptaría una conformación en la que la proteólisis estaría favorecida. Los trabajos con el PA nos han permitido demostrar que la proteasa puede ser activada por el propio extremo C-terminal de la PEPC. En efecto, el PA induce la exposición del C-terminal de la PEPC y promueve su proteólisis por la proteasa C19 sin necesidad de la presencia del péptido C19, y al igual que en el mecanismo descrito anteriormente el punto inicial de corte se localiza en el dominio N-terminal de la PEPC.

Finalmente, aportamos evidencias de que el péptido C19 es un inhibidor de la PEPC-quinasa, describiendo el mecanismo antes sólo sugerido en Álvarez et al., (2003).

En su conjunto estos resultados indican que la regulación de la movilidad del C-terminal podría depender *in vivo* de la presencia de metabolitos como la glucosa-6P o de mensajeros secundarios como el PA. En presencia de glucosa-6P, la PEPC escondería el C-terminal promoviendo la actividad y la fosforilación y desfavoreciendo la proteólisis de la PEPC, preparándose esta para ser eficaz en el contexto metabólico donde sea requerida, como por ejemplo, la fotosíntesis C<sub>4</sub>. Dado que el incremento de PA en la célula está con frecuencia asociado a condiciones de estrés nos encontraríamos con un modelo eficaz de reajuste de los niveles de PEPC promoviendo la proteólisis. Además, en presencia de PA se favorece la exposición del C-terminal con lo que se inhibiría la fosforilación. Todos estos resultados dibujan por primera vez un mapa totalmente nuevo de regulación de la PEPC a través de la movilidad del extremo C-terminal de la proteína que a su vez regularía la fosforilación y la degradación de la proteína por la proteasa C19.

## 2.- SUMMARY.

In this work we have identified and partially characterized a new protease cleaving the PEPC protein from darkened or illuminated sorghum leaf extracts. This enzyme does not require  $\text{Ca}^{2+}$  or metals for its activity and is only partially sensitive to Serine-Cysteine proteases inhibitors, but displays the original property to be active only in the presence of a hydrophobic 19 amino acid peptide (C19 peptide) identical to the C-terminal end of the C<sub>4</sub>-PEPC. The activator motive is downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr944 and Thr948 are essential amino acids for interaction. Other C<sub>4</sub>-PEPC related peptides, L1, L2 or L3 have no effect on this process. The protease can use casein as substrate and even with this substrate the protease activity depends on the presence of the C19 peptide. The allosteric activator of PEPC, glucose-6P, blocks the protease activity on this PEPC form suggesting that glucose-6P-related conformation impairs the protease to attack its target. These results strongly suggest that the protease is controlling PEPC amount in the physiological context of C<sub>4</sub>-photosynthesis by the presence of metabolites and changes in the conformational state that implicate the C-terminal end of its substrate. Whether the C19 peptide exists *in vivo*, via degradation of the C<sub>4</sub>-PEPC, or if the C-terminus of C<sub>4</sub>-PEPC is exposed following conformational changes like tetramer/dimer interconversion increasing the sensitivity of PEPC to proteolysis as proposed by Wedding and Black, 1987, for a CAM PEPC remain to be elucidated.

We also show that the first cleavage sited is located at the N-terminal end (the last 18 amino acids) of PEPC. This sequence contains the phosphorylation motive and the phosphorylation of Ser8 (physiological Ser phosphorylated *in vivo*) decreased the affinity of the protease C19 by its substrate. This is the first time that the reversible phosphorylation of PEPC is implicated in the regulation of PEPC proteolysis by a mechanism where the C-terminal end of the protein is a key element.

Another important point of this work is that the protease activity in semipurified protein fractions can be activated by phosphatidic acid (PA) in the absence of the C19 peptide. In addition, we have found that PA promote the exposition of the C-terminal end of PEPC leading to the activation of the protease C19 by direct interaction with its substrate and showing that the protease activity promoted by PA was in fact the protease C19. The cleavage also starts inside the sequence of 18 amino acids at the N-terminal end of the protein that contains the phosphorylation motive and has preference

by the non-phosphorylated N-terminal end of the PEPC. All these results suggest a new perspective about the regulatory phosphorylation of PEPC that could be implicated in the control of the degradation of PEPC by a mechanism including non-phosphorylated PEPC, the C-terminal end exposition and PA. Degradation of PEPC in relation of PA production has recently been showed in Monreal et al., (2010).

This new protease open a myriad of studies and it will be of future interest to explore: i) the cellular elements in addition to glucose-6P or PA that control the exposition of the C-terminal end of PEPC, allowing the peptide-dependent protease to be activated via direct interaction with the C<sub>4</sub>-PEPC C-terminus, ii) the presence of this protease in other non-photosynthetic tissues or C<sub>3</sub> type plants or its relation with stress condition. In addition, the purification of the enzyme is needed.



*BIBLIOGRAFÍA*



**VIII.- BIBLIOGRAFÍA.**

- Álvarez, R., García-Mauriño, S., Ferial AB, Vidal, J., Echevarría, C. (2003). A conserved 19 amino acid synthetic peptide from the carboxy terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the *in vitro* phosphorylation of the enzyme by the calcium-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol.*, 132: 1097-1106.
- Andreo, C.S., González, D.H., Iglesias, A.A. (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase, structure and regulation. *FEBS Lett.*, 213: 1-8.
- Anthony, R.G., Henriques, R., Helfer, A., Meszaros, T., Rios, G., Testerink, C., Munnik, T., Deak, M., Koncz, C., Bogre, L. (2004). A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *Embo J.*, 23: 572-581.
- Athenstaedt, K., Daum, G. (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. *Eur. J. Biochem.*, 266: 1-16.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. Mc Graw Hill. Madrid. España.
- Baillie, G.S., Huston, E., Scotland, G., Hodgkin, M., Gall, I., Peden, A.H., MacKenzie, C., Houslay, E.S., Currie, R., Pettitt, T.R., Walmsley, A.R., Wakelam, M.J., Warwicker, J., Houslay, M.D. (2002). TAPAS-1, a novel microdomain within the unique N-terminal region of the PDE4A1 cAMP-specific phosphodiesterase that allows rapid, Ca<sup>2+</sup>-triggered membrane association with selectivity for interaction with phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 277: 28298-28309.
- Bakrim, N., Echevarría, C., Créatin, C., Arrio-Dupont, M., Pierre, J.N., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P. (1992). Regulatory phosphorylation of *Sorghum* leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. Identification of the protein-serine kinase and some elements of the signal-transduction cascade. *Eur. J. Biochem.*, 204: 821-830.
- Bandurski, R.S., Greiner, C.M. (1953). The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.*, 204: 781-

786.

- Ben-Zioni, A., Vaadia, Y., Lips, S.H. (1970). Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. *Physiol. Plant.*, 23: 1039-1047.
- Beynon, R. J., Bond, J. E. (1990). *Proteolytic enzymes: A practical approach*. Ed. IRL Press. Oxford. England.
- Bjorkhan, O. (1976). Adaptative and genetic aspects of C<sub>4</sub> photosynthesis. En: *CO<sub>2</sub> Metabolism and plant productivity*. Ed. University Park Press, Baltimore, Inglaterra, pp 287-309.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72: 248-254.
- Buchanan, B. B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plants Physiology. Mariland. USA.
- Budde, R.J.A., Chollet, R. (1986). *In vitro* phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 82: 1107-1114.
- Burger, K.N., Demel, R.A., Schmid, S.L., de Kruijff, B. (2000). Dynamin is membrane-active: lipid insertion is induced by phosphoinositides and phosphatidic acid. *Biochemistry*, 39: 12485-12493.
- Caballero, A. (1981). Eficiencia fotosintética y producción. En: "Productividad vegetal". Ed. Universidad Complutense, Madrid.
- Caballero, A., Gil, F., Berbel, M. (1978). La productividad en prados mediterráneos. *Investigación y Ciencia*, 6: 83-97.
- Caderholm, S. N., Bäckman, H. G., Pesaresi, P., Liester, D., Glaser, E. (2009). Deletión of an organellar peptidasome PreP affects early development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 71: 497-508.
- Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. (1990). *Bryophillum fedschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.*, 263: 233-236.
- Casati, P., Lara, M.V., Andreo, C.S. (2000). Induction of a C<sub>4</sub>-like mechanism of CO<sub>2</sub> fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. *Plant Physiol.*, 123: 1611-1622.

- Chardot, T. P., Wedding, R. T. (1992). Role of cysteine in activation and allosteric regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 129: 469-485.
- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H. (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 273-298.
- Clarke, A. K. (2005). Plant proteases – an appetite for destruction. *Physiol. Plant.*, 123: 350-361.
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell a molecular approach*. Ed. Sinauer Associates. Sunderland (MA).
- Corbalán-García, S., Sánchez-Carrillo, S., García-García, J., Gómez-Fernández, J.C. (2003). Characterization of the membrane binding mode of the C2 domain of PKC  $\epsilon$ . *Biochemistry*, 42: 11661-11668.
- Coupe, S. A., Sinclair, B. K., Watson, L. M., Heyes, J. A., Eason, J. R. (2003). Identification of dehydration-responsive cysteine proteases during post-harvest senescence of broccoli florets. *J. Exp. Bot.*, 54(384): 1045-1056.
- Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, N., Vidal, J., Pierre, J.N. (2000). An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH<sub>4</sub>Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant J.*, 23: 497-506.
- Créatin C., Keryer E., Tagu D., Lepieniec L., Vidal J., Gadal P. (1990). Complete cADN sequence of *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C<sub>4</sub> photosynthesis. *Nucl. Acids Res.*, 18: 658.
- Crowley, V., Gennidakis, S., Plaxton, W. (2005). In vitro proteolysis of phosphoenolpyruvate carboxylase from developing castor oil seeds by an endogenous thiol endopeptidase. *Plant. Cell. Physiol.*, 46(1): 1855-1862.
- Cushman, J.C., Bohnert, H.J. (1999). CRASSULACEAN ACID METABOLISM: Molecular Genetics. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, 50, 305-332.
- Dailling, M. J., Tang, A. B., Huffaker, R. C. (1983). Evidence for the existence of peptide hydrolase activity associated with chloroplast isolated from barley mesophyll protoplasts. *Z. Pflanzenphysiol.*, 111: 311-318.

- Daum, G. (2004). Membrane targeting: glued by a lipid to the ER. *Curr. Biol.*, 14: R711-713.
- Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S., and Ktistakis, N. T. (2004). Sphingosine kinase 1 is an intracellular effector of phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 279: 44763-44774.
- Den Hartog, M., Musgrave, A., and Munnik, T. (2001). Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair deformation. *Plant J.*, 25: 55-65.
- Den Hartog, M., Verhoef, N., Munnik, T. (2003). Nod factor and elicitors activate different phospholipid signaling pathways in suspension-cultured alfalfa cells. *Plant Physiol.*, 132: 311-317.
- Díaz, A., Maza, H., González, B., Lacuesta, M., González, C., Muñoz, A. (1995). Phosphinothricin reverts the ammonia-dependent enhancement of phosphoenolpyruvate carboxylase activity. *J. Plant Physiol.*, 145(1-2): 11-16.
- Domínguez del Toro, F. (1997). Proteolisis durante el desarrollo y la germinación de trigo (*Triticum aestivum*). Universidad de Sevilla, Sevilla.
- Dong, L., Ermolova, N.V., Chollet, R. (2001). Partial purification and biochemical characterization of a heteromeric protein phosphatase 2A holoenzyme from maize (*Zea mays* L.) leaves that dephosphorylates C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase. *Planta*, 213: 379-389.
- Dong L, Patil S, Condon S, Hass E, Chollet R (1999) The conserved C-terminal tetrapeptide of sorghum C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase is indispensable for maximal catalytic activity, but not for homotetramer formation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 371: 124-128.
- Dong, L.Y., 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 C<sub>4</sub>-form enzyme. *Plant. Cell. Physiol.*, 39: 865-873.
- Duff S., Chollet R. (1995). *In vivo* regulation of wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *Plant Physiol.*, 107: 775-782.
- Echevarría, C., Vidal, J. (2003). The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol. Biochem.*, 4: 541-547.

- Echevarría, C., García-Mauriño, S., Álvarez, R., Soler, A., Vidal, J. (2001). Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in *Sorghum* leaves. *Planta*, 214: 283-287.
- Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J. (1994). The effect of pH on the covalent and metabolic control of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. *Arch. Biochem. Biophys.*, 315: 425-430.
- Echevarría, C., Vidal, J., Jiao, J.A., Chollet, R. (1990). Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves. *FEBS Lett.*, 275: 25-28.
- Edwards, G. E., Furbank, R. T., Hatch, M. D., Osmond, C. B. (2001). What does it take to be C<sub>4</sub>? Lessons from the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Plant Physiol.*, 125: 46-49.
- Ehleringer, J.R., Pearcy, R.W. (1983). Variatum in quatum yield for CO<sub>2</sub> uptake among C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> plants. *Plant Physiol.*, 73: 555-559.
- Ettema, J. G., MaKarova, K. S., Jellema, G. L., Gierman, H. J., Koonin, E. V., Huynen, M. A., de Vos, W. M., van der Oost, J. (2004). Identificación and functional verification of Archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in Archaeal central carbohydrate metabolism. *J. Bacteriol.*, 186 (22): 7754-7762.
- Feria, A. B., Álvarez, R., Cochereau, L., Vidal, J., García-Mauriño, S., Echevarría, C. (2008). Regulación of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and abscísico acid during the development and germination of barley seeds. *Plant Physiol.*, 148: 761-774.
- 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.
- Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschornig, O., Bohmer, F.D. (1999). Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation. *Biochemistry*, 38: 11993-12002.
- Furumoto, T., Izui, K., Quinn, V., Furbank, R. T., von Caemmerer, S. (2007). Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase is not essential for high

- photosynthetic rates in the C<sub>4</sub> species *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.*, 144: 1936-1945.
- Gadal, P., Pacquit, V., Giglioli, N., Bui, V.L., Pierre, J.N., Echevarría, C., Vidal, J. (1996). The role of PEPC phosphorylation in the regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis. En *Protein phosphorylation in plants*. Ed. The Phytochemical Society of Europe, Clarendon Press, Oxford, Inglaterra pp 53-64.
  - García-Mauriño, S., Monreal, J. A., Álvarez, R., Vidal, J., Echevarría, C. (2003). Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Shorgum vulgare*: independence from osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. *Planta*, 216: 648-655.
  - Gehrig, H., Heute, V., Kluge, M. (1998). Toward a better knowledge of the molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxilasa by comparison of partial cDNA sequence. *J. Mol. Evol.*, 162: 233-238.
  - Gennidakis, S., Rao, S., Greenham, K., Glen Uhrig, R., O'Leary, B., Snedden, W. A., Lu, C., Plaxton, W. C. (2007). Bacterial and plant type phosphoenolpyruvate carboxylase polipeptides interact in the hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds. *Plant J.*, 52: 839-849.
  - Ghosh, S., Moore, S., Bell, R.M., Dush, M. (2003). Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase: mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *J. Biol. Chem.*, 278: 45690-45696.
  - Giglioli-Guivarc'h, N., Pierre, J.N., Brown, S., Chollet, R., Vidal, J., Gadal, P. (1996). The Light-Dependent Transduction Pathway Controlling the Regulatory Phosphorylation of C<sub>4</sub> Phosphoenolpyruvate Carboxylase in Protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. *Plant Cell*, 8: 573-586.
  - Gil, F. (1995). Fotosíntesis C<sub>4</sub>. En: *Elementos de Fisiología Vegetal*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, pp 627-666.
  - Gil, F., Caballero, A., Guadilla, D. (1978). Efectos del nitrato y del amonio en la producción estacional de *Lolium perenne*. 2ª parte. III Reu. S.E.F.V. Granada.
  - Giordano, M. (2001). Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO<sub>2</sub> and high N concentrations. *Plant Physiol.*, 158: 577-581.

- González, M.C., Sánchez, R., Cejudo, F.J. (2003). Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. *Planta*, 216: 985-992.
- Grange, M., Sette, C., Cuomo, M., Conti, M., Lagarde, M., Prignet, A. F., Nemoz, G. (2000). The cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 is regulated by phosphatidic acid binding. Consequences for cAMP signaling pathway and characterization of a phosphatidic acid binding site. *J. Biol. Chem.*, 275: 33379-33387.
- Guidici-Orticioni, M.T., Vidal, J., Le Maréchal, P., Thomas, M., Gadal, P., Rémy, R. (1988). *In vivo* phosphorylation of *Sorghum* leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochimie*, 70: 769-772.
- Haberlandt, G. (1884). *Physiological plant anatomy*. Traducción de la 4ª edición. Ed. MacMillan 1914. Londres, Inglaterra.
- Hartwell, J., Gill, A., Nimmo, G.A., Wilkins, M.B., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G. (1999). Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. *Plant J.*, 20: 333-342.
- Hatch M. D. (1992). C<sub>4</sub> photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant Cell Physiol.*, 33: 333-342.
- Hatch, M.D., Slack, C.R. (1970). Photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation pathway. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21: 141-162.
- Herppich, W., Herppich, M., von Willert, D.J. (1992). The irreversible C<sub>3</sub> to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control. *Bot. Acta*, 105: 34-40.
- Hewitt, E.J. (1966). The composition of the micronutrient solution. En: "Sand y water culture methods in the study of plants nutrition". Ed. Commonwealth Agricultural Bureaux of Hort., Tech. Commum. N° 22. Farnham Royal.
- Himmelbach, A., Yang, Y., Grill, E. (2003). Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6: 470-479.
- Hrabak, E.M., Chan, C.W., Gribskov, M., Harper, J.F., Choi, J.H., Halford, N., Kudla, J., Luan, S., Nimmo, H.G., Sussman, M.R., Thomas, M., Walker-Simmons, K., Zhu, J.K., Harmon, A.C. (2003). The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant Physiol.*, 132: 666-680.
- Hubbard, S. J. (1998). The structural aspects of limited proteolysis of native

- protein. *Biochim. Biophys. Acta*, 1382: 191-206.
- Huppe, H.C., Turpin, D.H. (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45: 577-607.
  - Izui, K., Matsumura, H., Furumoto, T., Kai, Y. (2004). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Ann. Rev. Plant Bio.*, 55: 69-84.
  - Jacob, T., Ritchie, S., Assmann, S.M., Gilroy, S. (1999). Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 96: 12192-12197.
  - Jawali, N. (1990). The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: physical and kinetic properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277: 61-68.
  - Jeanneau, M., Vidal, J., Gousset-Dupont, A., Lebouteiller, B., Hodges, M., Gerentes, D., Perez, P. (2002). Manipulating PEPC levels in plants. *J. Exp. Bot.*, 53: 1837-1845.
  - Jenkins, G.H., Fiset, P.L., Anderson, R.A. (1994). Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J. Biol. Chem.*, 269: 11547-11554.
  - Jiao, J.A., Chollet, R. (1991). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in  $C_4$  and crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.*, 95: 981-985.
  - Jiao, J., Echevarría, C., Vidal, J., Chollet, R. (1991a). Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in  $C_4$  plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2712-2715.
  - Jiao, J.A., Vidal, J., Echevarría, C., Chollet, R. (1991b). *In vivo* regulatory phosphorylation site in  $C_4$ -leaf phosphoenolpyruvate carboxylase from maize and *Sorghum*. *Plant Physiol.*, 96: 297-301.
  - Jones, J. A., Hannen, Y. A. (2002). Tight binding inhibition of protein phosphatase-1 by phosphatidic acid. Specific of inhibition by the phospholipid. *J. Biol. Chem.*, 277:15530-15538.
  - Kai Y., Matsumura H., Inoue T., Terada K., Nagara Y., Yoshinaga T., Kihara A., Tsumura K., Izui K. (1999). Three-dimensional structure of

- phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96: 823-828.
- Klockinbring, T., Meinhard, M., Schnabl, H. (1997). The stomatal phosphoenolpyruvate carboxylase a potential target for selective proteolysis during stomatal closure?. J. Plant Physiol., 152: 222-229.
  - Kluge, M., (1983). The role of PEPC in C<sub>4</sub> photosynthesis and crassulacean acid metabolism. Physiol. Veg., 21:817-852.
  - Kooijman, E.E., Chupin, V., de Kruijff, B., Burger, K.N. (2003). Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid. Traffic, 4: 162-174.
  - Ktistakis, N.T., Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Ganley, I., Sugars, J.M. (2003). Phospholipase D1 and potential targets of its hydrolysis product, phosphatidic acid. Biochem. Soc. Trans., 31: 94-97.
  - Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680-685.
  - Lara, M.V., Casati, P., Andreo, C.S. (2001). In vivo phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. Plant Cell Physiol., 42: 441-445.
  - Latzko, E., Kelly, G.J. (1983). The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. Physiol. Veg., 21: 805-815.
  - Law, R.D., Plaxton, W.C. (1997). Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by a copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. Eur. J. Biochem., 247: 642-651.
  - Laxalt, A.M., Munnik, T. (2002). Phospholipid signalling in plant defence. Curr. Opin. Plant Biol., 5: 332-338.
  - Leegood, R. C. (1994): "CO<sub>2</sub>-concentrating mechanisms and C<sub>4</sub> metabolism in relation to transport" en Shehy, J. E., Mitchell, P. L., Hardy, B. (eds) Redesigning rice photosynthesis to increase yield. Elsevier, Amsterdam, pp. 113-126.

- Lepiniec, L., Thomas, M., Vidal, J. (2003). From enzyme activity to plant biotechnology: 30 years of research on phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol Biochem* 4, 533-539.
- Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P., Crépin, C. (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase : structure, regulation and evolution. *Plant sci.*, 99: 111-124.
- Li, B., Pacquit, V., Jiao, J.A., Duff, S.M., Maralihalli, G., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Chollet, R. (1997). Structural requirements for phosphorylation of C<sub>4</sub>-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by its highly regulated protein-serine kinase. A comparative study with synthetic peptide substrates and native, mutant target proteins. *Aust. J. Plant Physiol.*, 24, 443-449.
- Li, B., Zhang, X.Q., Chollet, R. (1996). Phosphoenolpyruvate Carboxylase Kinase in Tobacco Leaves Is Activated by Light in a Similar but Not Identical Way as in Maize. *Plant Physiol.*, 111, 497-505.
- Loewen, C.J., Gaspar, M.L., Jesch, S.A., Delon, C., Ktistakis, N.T., Henry, S.A., Levine, T.P. (2004). Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*, 304: 1644-1647.
- López-Andreo, M.J., Gómez-Fernández, J.C., Corbalán-García, S. (2003). The simultaneous production of phosphatidic acid and diacylglycerol is essential for the translocation of protein kinase C $\epsilon$  to the plasma membrane in RBL-2H3 cells. *Mol. Biol. Cell*, 14: 4885-4895.
- Manifava, M., Thuring, J.W., Lim, Z.Y., Packman, L., Holmes, A.B., Ktistakis, N.T. (2001). Differential binding of traffic-related proteins to phosphatidic acid- or phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate-coupled affinity reagents. *J. Biol. Chem.*, 276, 8987-8994.
- Margis, R., Margis-Pinheiro, M. (2003). Phytocalpains: orthologous calcium-dependent cysteine proteinases. *Trends Plant Sci.*, 8(2): 1360-1385.
- Matsumura, H., Xie, Y., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Ueno, Y., Izui, K., Kai, Y. (2002). Crystal structures of C<sub>4</sub> form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylases. *Structure*, 10: 1721-1730.

- Matsuoka, M., Yamamoto, N. (1989). Induction of mRNAs for phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate, orthophosphate dikinase in leaves of C<sub>3</sub> plant exposed to light. *Plant Cell Physiol.*, 30: 479-486.
- McNaughton, G.A., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G. (1989). Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.*, 261: 349-355.
- McNaughton, G.A., MacKintosh, C., Fewson, C.A., Wilkins, M.B., Nimmo, H.G. (1991). Illumination increases the phosphorylation state of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by causing an increase in the activity of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1093: 189-195.
- Meijer, H.J., Munnik, T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 265-306.
- Monreal, J. A., Ferial, A.B., Vinardell, J.M., Vidal, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S. (2007). ABA modulate the degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in sorghum leaves. *FEBS Lett.*, 581: 3468-3472.
- Monreal, J. A., McLoughling, F., Echevarría, C., García-Mauriño, S., Testerink, C. (2010). Phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> leaves is selectively targeted for inhibition by anionic phospholipids. *Plant Physiol.*, 152: 634-638.
- Munnik, T. (2001). Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends Plant Sci.*, 6: 227-233.
- Munnik, T., de Vrije, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1996). Identification of diacylglycerol pyrophosphate as a novel metabolic product of phosphatidic acid during G-protein activation in plants. *J. Biol. Chem.*, 271, 15708-15715.
- Munnik, T., Irvine, R.F., Musgrave, A. (1998). Phospholipid signalling in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, 1389: 222-272.
- Munnik, T., Testerink, C. (2009). Plant phospholipid signaling- 'in a nut shell'. *J. Lipid Res.*, 50: S260-S265.
- Nakanishi, H., de los Santos, P., Neiman, A.M. (2004). Positive and negative regulation of a SNARE protein by control of intracellular localization. *Mol. Biol. Cell*, 15: 1802-1815.
- Nelson, T., Langdale, J. A. (1992). Developmental genetics of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 43: 25-47.

- Nimmo G.A., Mc Naughton G.A., Fewson C.A., Wilkins M.B., Nimmo H.G. (1987). Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* leaves in response to light and dark. FEBS Lett., 213: 18-22.
- Nimmo, G.A., Nimmo, H.G., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. (1984). Diurnal changes in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: a possible covalent modification. FEBS Lett., 178: 199-203.
- Nimmo, H. G. (2000). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. Trend Plant Sci., 5 (2): 75-80.
- Nimmo, H. G. (2003). Control of phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. Arch. Biochem. Biophys., 414: 189-196.
- O'Leary, M. (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. Ann. Rev. Plant Physiol., 33: 297-315.
- O'Leary, B., Rao, S. K., Kim, J., Plaxton, W. C. (2009). Bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) functions as a catalytic and regulatory subunit of the novel class-2 PEPC complex of vascular plants. J. Biol. Chem., 284 (37): 24797- 24805.
- Oaks, A. (1994). Efficiency of Nitrogen Utilization in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> Cereals. Plant Physiol., 106: 407-414.
- Osuna, L., Coursol, S., Pierre, J.N., Vidal, J. (2004). A Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase with characteristics of protein kinase C in leaves and mesophyll cell protoplasts from *Digitaria sanguinalis*: possible involvement in the C<sub>4</sub>-phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade. Biochem. Biophys. Res. Commun., 314: 428-433.
- Osuna, L., Gonzalez, M.C., Cejudo, F.J., Vidal, J., Echevarria, C. (1996). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. Plant Physiol., 111: 551-558.
- Osuna, L., Pierre, J.N., Gonzalez, M.C., Alvarez, R., Cejudo, F.J., Echevarria, C., Vidal, J. (1999). Evidence for a slow-turnover form of the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone-endosperm tissue of germinating barley seeds. Plant Physiol., 119: 511-520.

- Outlaw, W.H. (1990). Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. Physiol. Pflanzen.*, 186: 317-325.
- Pacquit, V., Giglioli, N., Créatin, C., Pierre, J.N., Vidal, J., Echevarría, C. (1995). Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum*: An immunological study using specific anti-phosphorylation site-antibodies. *Photosynth. Res.*, 43: 283-288.
- Palicz, A., Foubert, T.R., Jesaitis, A.J., Marodi, L., McPhail, L.C. (2001). Phosphatidic acid and diacylglycerol directly activate NADPH oxidase by interacting with enzyme components. *J. Biol. Chem.* 276: 3090-3097.
- Paterson, A., Bowers, J., Bruggmann, R., Dubchak, I., Grimwood, J., Gundlach, H., Haberer, G., Hellsten, U., Mitros, T., Poliakov, A., Schmutz, J., Spannagl, M., Tang, H., Wang, X., Wicker, T., Bharti, A., Chapman, J., Feltus, F., Gowic, U., Grigoriev, I., Lyons, E., Maher, C., Martis, M., Narechania, A., Robert, O., Penning, B., Salamov, A., Wang, Y., Zhang, L., Carpita, N., Freeling, M., Gingle, A., Hash, C., Keller, B., Klein, P., Kresovich, S., McCann, M., Ming, R., Peterson, D., Mehboob-ru-Rahman, Ware, D., Westhoff, P., Mayer, K., Messing, J., Rokhsar, D. (2009). The *Sorghum bicolor* genome and the diversification of grasses. *Nature*, 457: 551-556.
- Peters, W., Becj, E., Piepenbrock, M., Lenz, B., Schmitt, J.M. (1997). Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. *J. Plant Physiol.*, 151: 362-367.
- Pierre, J.N., Pacquit, V., Vidal, J., Gadal, P. (1992). Regulatory phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Sorghum* mesophyll cells and the role of pH and Ca<sup>2+</sup> as possible components of the light-transduction pathway. *Eur. J. Biochem.*, 210, 531-537.
- Pierre, J.N., Prieto, J.L., Gadal, P., Vidal, J. (2004). In situ C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *Digitaria sanguinalis* mesophyll cells. *Photosynth. Res.*, 79, 349-355.
- Plaxton, W. C. (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 185-214.
- Popova, L.P., Stoinova, Z.G., Maslenkovaa, L.T. (1995). Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. *J. Plant Growth Regul.*, 14: 211-218.

- Rajagopalan, A.V., Tirumala-Devi, M., Raghavendra, A.S. (1994). Molecular biology of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth. Res.*, 39: 115-135.
- Rawling, N. D., Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.*, 290: 205-218.
- Rawling, N. D., Morton, F. R., Barrett, A. J. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 38: D227-D223.
- Rizzo, M., Romero, G. (2002). Pharmacological importance of phospholipase D and phosphatidic acid in the regulation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Pharmacol. Ther.*, 94: 35-50.
- Rizzo, M.A., Shome, K., Watkins, S.C., Romero, G. (2000). The recruitment of Raf-1 to membranes is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J. Biol. Chem.*, 275: 23911-23918.
- Sánchez, R., Cejudo, F.J. (2003). Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiol.*, 132: 949-957.
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 220: 183-197.
- Serrato, A.J., Perez-Ruiz, J.M., Cejudo, F.J. (2002). Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat. *Biochem. J.*, 367: 491-497.
- Shenton, M., Fontaine, V., Hartwell, J., Marsh J.T., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G. (2006). Distinct patterns of control and expression amongst members of PEP carboxylase kinase gene family in C<sub>4</sub> plants. *Plant J.*, 48: 45-53.
- Smalle, J., Viestra, R. D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55: 555-590.
- Stiborova, M., Leblova, S. (1986). Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *FEBS Lett.*, 205: 32-34.
- Terada, K., Kai, T., Okuno, S., Fujisawa, H., Izui, K. (1990). Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: phosphorylation of Ser<sup>15</sup> with a mammalian cyclic AMP-dependent protein kinase diminishes sensitivity to inhibition by malate. *FEBS Lett.*, 259: 241-244.

- Testerink, C., Dekker, H.L., Lim, Z.Y., Johns, M.K., Holmes, A.B., Koster, C.G., Ktistakis, N.T., Munnik, T. (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. *Plant J.*, 39: 527-536.
- Testerink, C., Munnik, T. (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci.*, 10: 368-375.
- Thomas, M., Créatin, C., Keryer, E., Vidal, J., Gadal, P., Monsinger, E. (1990). Light-regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase mRNA in leaves of C<sub>4</sub> plants; evidence for phytochrome control on transcription during greening and for rhythmicity. *Plant Sci.*, 69: 65-78.
- Toh, H., Kaamura, T., Izui, K. (1994). Molecular evolution of Phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.*, 17: 31-43.
- Tovar-Méndez, A., Mújica-Jiménez, C., Muñoz-Clares, R.A. (2000). Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.*, 123: 149-160.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 (9): 4350-4354.
- Traverso, J., Vignols, F., Cazalis, R., Serrato, A., Pulido, P., Sahrawy, M., Meyer, Y., Cejudo, F. J., Chueca, A. (2008). Immunocytochemical localization of *Pisum sativum* TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *J. Exp. Bot.*, 59(6): 1267-1277.
- Uhrig, R.G., She, Y.M., Leach, C.A. and Plaxton W.C. (2008) Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds. *J. Biol. Chem.*, 283: 29650-29657.
- Van der Hoorn, R. (2008). Plant proteases: from phenotypes to molecular mechanism. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 191-223.
- Van Quy, L., Foyer, C., Champigny, M.L. (1992). Effect of Light and NO<sub>3</sub> on Wheat Leaf Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity: Evidence for Covalent Modulation of the C<sub>3</sub> Enzyme. *Plant Physiol.*, 97: 1476-1482.
- Vidal, J., Bakrim, N., Hodges, M. (2002). The regulation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. *En: Advances*

- in Photosynthesis; Photosynthetic Nitrogen assimilation and associated carbon metabolism. Ed. Kluwer Academic Publisher, 12: 135-150.
- Vidal, J., Chollet, R. (1997) Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase. Trends Plant Sci., 2: 230-237.
  - Vidal, J., Gobbillon, G., Gadal, P. (1980). Recovery of active highly purified phosphoenolpyruvate carboxylase from specific immunoabsorbant column. FEBS Lett., 118: 31-34.
  - Viestra, R. D. (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat. Rev. Mol. Cell Bio., 10: 385-397.
  - Walker, G.H., Ku, M.S., Edwards, G.E. (1986). Activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to tautomerization and nonenzymatic decarboxylation of oxaloacetate. Arch. Biochem. Biophys., 248: 489-501.
  - Wang, Y.H., Duff, M.G., Lepiniec, L., Crétin, C., Gautam, S., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P., Chollet, R. (1992). Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser 8) in C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum*. The effect of a negative charge at the position 8. J. Biol. Chem., 267: 16759-16762.
  - Wang, X. (1999). The role of phospholipase D in signaling cascades. Plant Physiol., 120: 645-652.
  - Wedding, R. T., Kay Black, M. (1997). Oligomerization and the sensitivity of Phosphoenolpyruvate carboxylase to inactivación by proteinases. Plant Physiol., 84: 979-981.
  - Weigend, K., Hinch, D.K. (1992). Quaternary structure of PEPC from CAM, C<sub>4</sub> and C<sub>3</sub>-plants; no evidence for diurnal changes in oligomeric state. J. Plant Physiol., 140: 653-660.
  - Willeford, K. O., Wu, M. X., Meyer, C. R., Wedding, R. T. (1990). The role of oligomerization in regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activity. Influence of Mg-PEP and malate on the oligomeric equilibrium of PEP carboxylase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 168: 778-785.

- Xu, W., Ahmed, S., Moriyama, H., Collet, R. (2006). The importance of the strictly conserved, C-terminal Glycine residue in phosphoenolpyruvate carboxylase for overall catalysis. *J. Biol. Chem.*, 281 (25): 17238-17245.
- Yamada, T., Ohta, H., Masuda, T., Ikeda, M., Tomita, N., Ozawa, A., Shioi, Y., Takamiya, K. (1998). Purification of a novel type of SDS-dependent protease in maize using a monoclonal antibody. *Plant Cell Physiol.*, 39: 106-114.
- Yamada, T., Ohta, H., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Shimada, H., Tsuchiya, T., Masuda, T., Takamiya, K. (2000). A cysteine protease from maize isolated a complex with cystatin. *Plant Cell Physiol.*, 41(2): 185-191.
- Zhang, S.Q., Li, B., Chollet, R. (1995). *In Vivo* Regulatory Phosphorylation of Soybean Nodule Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant Physiol.*, 108: 1561-1568.
- Zhang, W., Qin, C., Zhao, J., Wang, X. (2004). Phospholipase D  $\alpha$  1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 9508-9513.
- Zhang, W., Yu, L., Zhang, Y., Wang, X. (2005). Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, 1736: 1-9.
- Zollner, H. (1990). *Handbook of enzyme inhibitors*. Ed. VCH. Verlagsgesellschaft. Weinheim.





*ANEXOS*



# Proteolysis of the C<sub>4</sub>-Phosphoenolpyruvate carboxylase by a peptide-dependent protease activity in sorghum leaf extracts

Jacinto Gandullo, Rosario Álvarez, Jean Vidal<sup>1</sup>, Cristina Echevarría \*

Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda Reina Mercedes nº 6, 41012 Sevilla, Spain. <sup>1</sup> Institut de Biotechnologie des Plantes, Unité de recherche Associé Centre National de la Recherche Scientifique D 1128, Bâtiment 630, Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, Cedex, France.

## Abstract

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) is a key enzyme of C<sub>4</sub> and CAM photosynthesis. Here we describe a new PEPC protease that is specifically activated *in vitro* by synthetic peptides encompassing the C-terminal domain of the C<sub>4</sub>-PEPC subunit (C19 and C15 peptides). We also show that Thr944 and Thr948 are key amino acid for interaction. Proteolysis of PEPC by this neutral (pH 7 to 8), protease is prevented by glucose-6P, it is insensitive to EGTA, and displays an AC<sub>50</sub> (Activation Constant) of 490 nM for the C19 peptide. The protease can be separated from its PEPC target by native PAGE, Altogether these data support the hypothesis that this protease is physiologically relevant and participates to the control of the PEPC amount in the mesophyll tissue.

**Keywords:** Phosphoenolpyruvate carboxylase, Protease, *Sorghum bicolor*.

**Abbreviations:** PEPC, phosphoenolpyruvate carboxylase; glc-6P, glucose-6P; AC<sub>50</sub>, activation constant; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; PEP, phosphoenolpyruvate.

## 1. Introduction

C<sub>4</sub>-PEPC catalyses the first carboxylation step in C<sub>4</sub> photosynthesis. Due to its key role in this important pathway in C<sub>4</sub> plants the enzyme has received much attention and a wealth of data is presently available on the biochemical and signalling mechanisms controlling C<sub>4</sub>-PEPC activity in the mesophyll cell cytosol [1, 2,3,4]. Notably, the enzyme is subjected to a light-dependent phosphorylation process of a regulatory serine in the N-terminal domain of the protein that interacts with metabolite effectors, e.g., the feedback inhibitor malate, and the allosteric activator glucose-6P, to fasten the C flux in the C<sub>4</sub> photosynthesis pathway [3]. The regulation of the C<sub>4</sub>-PEPC encoding gene and ensuing synthesis of the

protein subunit in mesophyll cells has also been investigated in a variety of works [1]. This gene expression is activated during the greening process of the C4 leaf leading to accumulate high levels of C4-PEPC in the MC cytosol as needed by the functioning of the C4 pathway. However, nothing is known about the protease balancing synthesis of the enzyme, which determines its final quantity in the tissue. It has been shown that the C3 PEPC is ubiquitinated in guard cells from developing castor oil seed [5]. Recently, the bacterial-like PEPC from castor oil seed has been shown to be degraded in vitro by a thiol protease [5].

In this work we report on the biochemical characterization of a new proteolytic activity degrading C4-PEPC in sorghum leaf partially purified extracts. Very interestingly, this protease requires the presence of the peptide encompassing the C-terminus domain of the sorghum C4-PEPC, is inhibited by the C4-PEPC allosteric activator glucose-6P. In addition, the activatory domain is located downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr944 and 948 are essential amino acid for interaction.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

The peptides used in this paper were previously described in Alvarez et al., 2003 [6] except peptide C19mut were Thr944, 948 and 958 has been substitute by Tyr ([ $(Y)942EDY_{944}LILY_{948}MKGIAAGMQNY_{958}G960$ ]).

### 2.2 Plant growth conditions

Sorghum plants (*Sorghum bicolor* (L.) Moench, var. PR87G57; Pioneer Hi-Bred Spain) were grown under controlled environmental conditions in a greenhouse under a 12 h photoperiod ( $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), a temperature of 28/20°C (light/dark) and 60% relative humidity. The plant were irrigated with a nutrient solution [7] every 3 d.

### 2.3. Preparation of semipurified PEPC protein fraction

Preparation of the PEPC protein fraction (semipurified fraction) from dark or illuminated (2h a  $700 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) sorghum leaves was previously described [9].

### 2.4. Assay of PEPC activity.

PEPC activity was performed as previously described in Echevarría et al. 1994 [10]. Malate sensitivity was determined at suboptimal pH 7.3 in the presence or absence of 1 mM

L-malate [10]. Total protein amounts were determined by the method of Bradford [11], using bovine serum albumin (BSA) as standard.

### *2.5. Protease activity and Incubation with different peptides and metabolites*

In most of experiments, an aliquot (0.3 U) of semipurified PEPC was incubated in absence or presence of different peptides (C19, C15, C19mut and L1, L2 and L3) and metabolites (glc-6P, PEP or L-malate) in 50  $\mu$ l of a medium containing 100 mM Tris-HCl pH 8, 20% glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM PMSF, 0.01  $\mu$ g/ $\mu$ l quimostatin and  $2.2 \times 10^{-3}$  mM leupeptin, at 30°C during 3 h. At the indicated time aliquots of 5  $\mu$ l were taken to measure PEPC activity at pH 8.0 and 2.5 mM PEP. Activity was expressed as the percentage of the initial activity. To explore the amount of PEPC, at the end of the incubation period samples were analyzed by SDS-PAGE (10% [W/V] acrylamide) or PAGE (7% [W/V] acrylamide) according to Laemmli, 1970 [12]. All gels were stained with Coomassie Blue.

### *2.5. Analysis of protease activity in gel (zymography)*

Samples containing 0.6 U of semipurified PEPC were incubated at 30°C in the presence or absence of 80 nmoles of peptide C19 for 3 h. Then the samples were analyzed by zymography in gel containing casein as described in Monreal et al., 2007[13]. Protease activity was assayed at pH 6.5 and 1mM of peptide C19.

### *2.6. Purification of PEPC from Native PAGE.*

The electroeluted PEPC was obtained from semipurified PEPC (50 units of PEPC) using the method detailed in Álvarez et al., 2003 [7].

## **3. Results and discussion**

### *3.1. PEPC activity decreases in the presence of the C19 peptide.*

PEPC from darkened sorghum leaves was purified by polyethylene glycol precipitation, chromatography on hydroxyapatite and Mono Q, as described in the Materials and Methods section. This protein fraction, named semipurified PEPC, was highly enriched in C4-PEPC that was found to be stable for several months at 4°C in a medium containing 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, and 40% glycerol [v/v]. However, it was observed a dramatic loss of activity during incubation (1 to 3 h at 30°C) in the presence

of a synthetic, relatively hydrophobic peptide (C19-peptide); containing the sequence of the last 19 amino acids ([**(Y)942EDT<sub>944</sub>LILT<sub>948</sub>MKGIAAGMQNT<sub>958</sub>G960**]) of the C-terminal end of the C4-PEPC (Fig. 1A). Interestingly, the loss of PEPC activity in the presence of the C19 peptide was prevented by the allosteric activator glc-6P (Fig. 1A, PEPC + C19 + G6P). Other related metabolites like L-malate (feedback inhibitor), or the substrate PEP had no effect on this process (data not shown).

### *3.2. The loss of PEPC activity is due to a protease activity*

SDS-PAGE (10% acrylamide) analysis of the semipurified protein fraction (0.3 PEPC unit) after incubation with the C19 peptide (3h at 30°C) revealed that the decrease in PEPC activity was due to a tremendous loss of the corresponding protein amount (Fig. 1B. lines 4 and 5), while it was entirely recovered in the control omitting the C19 peptide (Fig. 1B, line 2). It was checked that this decrease was not due to insolubilization of the enzyme following the incubation (Fig. 1B, line 3). In agreement with the results shown above (Fig. 1A), the presence of glc-6P prevented the loss of PEPC protein (Fig. 1C, line + G6P). The protection effect of glc-6P was only observed in samples analyzed by native gel electrophoresis, not by SDS-PAGE (Fig. 1D, line + G6P). This observation suggested that this metabolite effect was related to the native conformation of the enzyme. SDS-denatured PEPC was degraded thereby showing that the protease can act in the presence of the detergent. There are many reports of proteases whose activity is stimulated by SDS [14,15]. These results led us to propose that the loss of PEPC activity was promoted by a peptide-dependent protease that was copurified with the enzyme.

### *3.3. The activatory domain is located downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr944 and 948 are essential amino acid in the activatory domain.*

In order to analysed essential aminoacid in the interaction motive a truncated C19 peptide lacking the last four amino acids QNT<sub>958</sub>G (C15 peptide) was assayed and found to be as effective as the C19 peptide in activating the protease (Fig. 2A). However, substitutions of Thr944, 948 and 958 by 3 Tyr ([**(Y)942EDY<sub>944</sub>LILY<sub>948</sub>MKGIAAGMQNY<sub>958</sub>G960**]) totally abolish the activation of protease (Fig. 2B). As Thr<sub>958</sub> is in the QNTG motive and the activatory domain is located downstream from the QNT<sub>958</sub>G tetrapeptide we conclude that Thr944 and 948 but not the QNTG motive are essential amino acid for interaction. Since the protease is activated by a PEPC related peptide other PEPC peptides were checked in the incubation assay. The synthetic peptides L1, L2, and L3 were designed from computer-based modelling of the sorghum C<sub>4</sub>-PEPC by reference to the 3D structure of the maize and *E. coli* PEPC that has been solved recently [16,17]. They correspond to protein loops that are supposedly exposed to the solvent, though two of them, peptides L2 and L3 were as hydrophobic as peptide C19. Results in figure 2 show that peptides L1, L2 or L3 did not affect PEPC activity/amount in the incubation assay (Figure 2A, graphic and gel), suggesting that the effect is specific of C19 peptide. These results show for the first time the activation of PEPC proteolysis by a synthetic peptide corresponding to the C-terminal end of C4 PEPC. In this peptide the activatory domain is located downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr944 and 948 are essential amino acid for interaction.

### *3.4. Native SDS-PAGE separates PEPC from the protease and electroeluted PEPC activity or amount was not affected in the presence of C19 peptide*

The semipurified PEPC preparation (50 Units) was subjected to native-PAGE (7%). After electrophoresis the enzyme was localized by an in-gel assay (see Material and Methods). The corresponding band was cut out and PEPC recovered by electroelution. In this case, incubation of the electroeluted enzyme with the C19 peptide did not affect neither its activity (Fig. 3A) nor corresponding protein amount (Fig. 3B, line 4). This showed that the peptide-dependent protease activity can be physically separated from the PEPC and that C19 peptide does not modify PEPC activity or amount of electroeluted PEPC. In addition, sub forms, dimeric or monomeric, or higher oligomeric forms of PEPC were not observed in our native PAGE after incubation with the C19 peptide. However, it has been observed that in aging or diluted semipurified PEPC where the dimeric or monomeric form is abundant (Fig. 4A, 1 and 2 versus 3) proteolysis in presence of C19 peptide was 3 times more rapid than in fresh preparation (Fig. 4B) suggesting that the dimeric or monomeric form of PEPC is a better substrate for the C19 protease. This result is in agreement with Wedding and Black (1987) [18], where it is shown a relation between the oligomerization state of PEPC in CAM plant and sensitivity of PEPC to inactivation by proteinases.

### *3.5. Characterization of the C19 protease*

In order to visualize the protease, aliquots of the semipurified PEPC fraction, 0.6 enzyme units were first incubated in the presence, or absence of the C19 peptide for 3 h at 30°C. After incubation non denatured proteins were then separated by SDS-PAGE in gel co-polymerized with casein. SDS was then removed and the gel was incubated for 24 h on a reaction medium for protease activity (see Material and Method) at pH 6.5, in presence of the C19 peptide. Proteins were stained with Naphtol Blue Black and after destaining, protease activity was monitored as clear bands against a dark background. Figure 5 shows a clear single band of casein proteolytic activity with a much lower molecular mass (about 50 kDa) than that of PEPC (darken band of about 110 kDa) in samples preincubated with C19 peptide (line 2) but not in the control (line 1). Thus, the protease can degrade casein in a peptide dependent manner. This result definitely establishes that the protease is peptide dependent, however can use other substrates than the PEPC.

Other biochemical parameters are as follows: in the classical assay, the protease was not affected by EGTA, showed optimal activity in the pH range 7 to 8 (Fig. 6A), and is strictly dependent on the presence of the C19 peptide (Fig. 6B). In the absence of the peptide no proteolytic activity was observed from pH 5.5 to 9 (Fig. 6C). The  $AC_{50}$  (the peptide concentration leading to a loss of 50% of initial PEPC activity) for the C19 peptide was found to be around 490 nM (Fig. 6C). The protease activity was only

affected (around 50%) by PMSF (1 mM) and chymostatin (100  $\mu$ M), both being known as inhibitor of the Cys/Ser protease type (data not shown). Other inhibitors as aprotinin (1 and 2  $\mu$ g/ml), a plant protease inhibitor cocktail (Sigma P9599) that contains an unspecified mixture of 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride, bestatin, pepstatin A, E-64, leupeptin and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl disulfide (DPDS) that has been shown to be effective with an asparaginyl endoprotease that attack the N-terminal domain of PEPC in castor oil seed [6] were ineffective.

Finally, We shows that the C19 protease is present in similar amount (PEPC proteolytic activity by 0.3 Units of PEPC) in semipurified fraction prepared from darkened or illuminated leaves indicating that was not regulated by transcription or postransductional mechanism in a day/night dependent manner (Fig. 7).

### 3.6. Concluding remarks

In this work we have identified and partially characterized a new protease degrading the PEPC from darkened or illuminated sorghum leaf extracts. This enzyme does not require metals for its activity and is partially sensitive only to Serine protease inhibitors, but displays the original property to be active only in the presence of a hydrophobic 19 amino acid peptide (C19 peptide) identical to the C-terminal end of the C4-PEPC. The activator motive is downstream from the QNTG tetrapeptide and Thr942 and 944 are essential amino acid for interaction. Other C4-PEPC related peptides, L1, L2 or L3 have no effect on this process. The protease can use casein as substrate and even with this substrate the protease activity depend on the presence of C19 peptide. The allosteric activator of PEPC, glucose-6P, blocks the protease activity on this PEPC form suggesting that glucose-6P-related conformation impairs the protease to attack its target. These results strongly suggest that the protease is controlling PEPC amount in the physiological context of C4-photosynthesis by the presence of metabolites and changes in the conformational state that implicate the C-terminal end of its substrate. Whether the C19 peptide exists *in vivo*, via degradation of the C4-PEPC, or if the C-terminus of C4-PEPC is exposed following conformational changes like tetramer/dimer interconversion increasing the sensitivity of PEPC to proteolysis as proposed by Wedding and Black, 1987, for a CAM PEPC rest to be elucidated.

This new protease open a myriad of studies and it will be of future interest to explore: i) the cellular environment where the C-terminal end of PEPC is exposed allowing the peptide-dependent protease to be activated via direct interaction with the C4-PEPC C-terminus, ii) the presence of this protease in other non-photosynthetic tissues or C3 type plants or its relation with stress condition. In addition, the purification of the enzyme and the cleavage site in PEPC will can be also identified.

## Figure Legend

**Fig. 1.** (A-D), The PEPC activity or amount decrease in semipurified PEPC fraction in presence of C19 peptide but not in presence of the peptide and glc-6P. Protease activity was determined in aliquots of

0.3 units of semi-purified PEPC at 30 °C in absence (PEPC ) or presence of 60 nmoles of C19 peptide or C19 peptide an 5mM of glc-6P (+ G6P). (A) PEPC activity was recorded at the indicated times at pH 8 and 2.5 mM of PEP. Dates are means of three experiments. (B-D) PEPC amount was analyzed by native (C) or SDS (B and D) PAGE. (B) After 3 h of incubation, samples were centrifuged (12.000g, 10 min) and supernatants (Sp) or precipitates (Pr) were analyzed by SDS-PAGE. (C) After incubation with C19 peptide (+ C19) or the peptide and 5 mM of glc-6P (+ C19 + G6P) samples were analyzed by native-PAGE. (D) The effect of glc-6P was abolished by protein denaturation. The experiment was similar to C except that protein were analyzed by SDS-PAGE. Numbers in parentheses represent the PEPC activity expressed as the percentage of the initial activity. PC, 0.2 U of PEPC before incubation.

**Fig. 2.** (A-C), Effect of different peptides in PEPC activity or amount. Experiments were performed as described in legend 1 using 60 nM of each peptide. (A) C15 peptide. (B) C19mut-peptide. (C) L1, L2 and L3 peptide. Protein amount was analyzed after 3 h of incubation by native PAGE.

**Fig. 3.** Native-PAGE separates PEPC from the protease and electroeluted PEPC was not affected in presence of C19-peptide. Aliquots containing 0.6 U of semipurified PEPC (semip PEPC) or electroeluted PEPC (Elec. PEPC, see materials and methods) were incubated for 4 h in the presence or in the absence of 120 nmoles of C19 peptide in 100 µL of incubation medium as described in Legend 1. (A), PEPC activity expressed as the percentage of the initial activity along the incubation time. (B) Analysis by native-PAGE. MW, molecular weight markers.

**Fig. 4.** The Oligomerization stated of PEPC affect sensitivity to proteolysis by the C19-PEPC protease. In gel, Line 1 and 2 correspond to old semipurified PEPC fraction (2 moth at -20 ° C) and line 3 to fresh semipurified PEPC. All lines correspond to 6 µg of protein. The 100% of PEPC activity in graphic correspond to 0.3 units of PEPC.

**Fig. 5.** Detection of the protease activity in native gels polymerized with casein (zymography). After 3 h of incubation of 0,6 U of PEPC in absence (Line 1) or presence of 60 nM of C19 peptide (line 2) non denatured protein were separated by SDS-PAGE in gel co-polimerized with casein. SDS was then removed and the gel was incubated for 24 h on a reaction medium for protease activity (see Material and Method) at pH6.5, in presence of the C19 peptide. Proteins were stained with Naphtol Blue Black and after destaining, protease activity was monitored as clear bands against a dark background (line 2). PEPC was detected as a dark band (line 1 and 2).

**Fig 6.** (A-B), PEPC-protease activity was active at different pHs in presence (A) but not in absence of C19-peptide (B). (A) PEPC activity in absence or presence of C19 peptide at different pH. (B) PEPC amount after 4 h of incubation at different pH in absence of C19 peptide. Samples were analyzed by native-PAGE. Acidic pH was assayed in buffer 0.1 M MES, 20% glycerol [w/v]. (C), AC<sub>50</sub> for peptide C19. Semipurified PEPC (0.3 U) was incubated with increasing amounts of peptide C19 for 3 h and analyzed by native-PAGE. The amount of PEPC PEPC was expressed as percentage of the initial quantity

in the absence of C19-peptide. The quantification was performed using the program PCBAS 2.0. ( $AC_{50}$ , the concentration of peptide necessary to proteolyze the 50% of initial PEPC).

**Fig.7.** The C19-protease activity was obtained from darkened or illuminated leaves. Sorghum plants were exposed to direct sunlight or kept in the dark for 2h. Subsequently, the leaves (20 g) were subject to partial purification by chromatography as described in materials and methods. An aliquot of semipurified PEPC (0.3 U) from darkened or illuminated leaves was incubated in the absence or presence of 60 nmoles of peptide C19 for 3 h. (A), PEPC activity. (B), Analysis by native- PAGE.

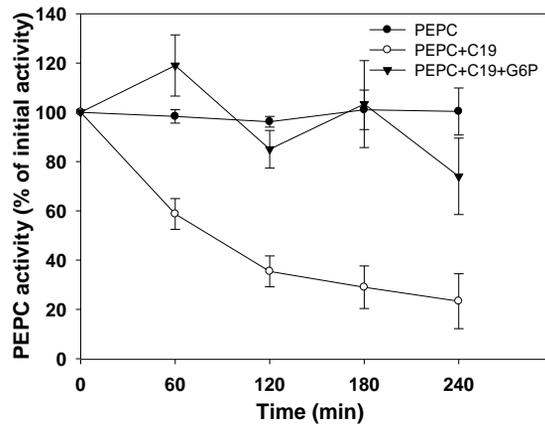
## References

1. Chollet, R., Vidal, J. and O'Leary, M.H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 273–298.
2. Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y (2004) Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* 55: 69-84.
3. Echevarría C. and Vidal, J. 2003. The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 541-547.
4. Shenton, M., Fontaine, V., Hartwell, J., Marsh J.T., Jenkins, G.I., Nimmo, H.G., 2006. Distinct patterns of control and expression amongst members of PEP carboxylase kinase gene family in  $C_4$  plants. *The Plant Journal*, 48, 45-53.
5. Uhrig, R.G., She, Y.M., Leach, C.A. and Plaxton W.C. (2008) Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds. *J. Biol. Chem.* 283, 29650-29657.
6. Crowley, V., Gennidakis, S. and Plaxton W.C. (2005) In vitro proteolysis of phosphoenolpyruvate carboxylase from developing castor oil seeds by an endogenous thiol endopeptidase. *Plant Cell Physiol.* 46, 1855-1862.
7. Alvarez, R., García-Mauriño, S., Ferial, A.B., Vidal, J. and Echevarría, C. (2003) A conserved 19 amino acid synthetic peptide from the carboxy terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the in Vitro phosphorylation of the enzyme by the calcium-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. *Plant Physiol.* 132, 1097-1106.
8. Hewitt, E J (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticultural and Plantation Crops, East Malling Tech Commun N° 22.
9. Álvarez, R., Castillo, J.M., Mateos-Naranjo, E., Gandullo, J., Rubio-Casal, A.E., Moreno, F.J. and Figueroa, M.E (2010) Ecotypic variations in phosphoenolpyruvate carboxylase activity of the cordgrass *Spartina densiflora* throughout its latitudinal distribution range. *Plant Biol.* 12, 154-160.
10. Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M. and Vidal, J. (1994) The effect of pH on the covalent and metabolic control of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum leaf. *Arch Biochem Biophys.* 315, 425-430.
11. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.
12. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
13. Monreal, J.A., Ferial, A.B., Vinardell J.M., Vidal, J., Echevarría, C., García-Mauriño, S. 2007. ABA modulates the degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in sorghum leaves. *FEBS letters*, 581: 3468-3472
14. Dalling, M.J., Tang, A.B. and Huffaker, R.C (1983) Evidence for the existence of peptide hydrolase activity associated with chloroplasts isolated from barley mesophyll protoplast. *Z. Pflanzenphysiol.* 111, 311-318.
15. Yamada, T.Y., Ohta, H., Shinohara, A., Iwamatsu, A., Shimada, H., Tsuchiya, T., Masuda, T. and Takamiya K. (2000) A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. *Plant Cell Physiol.* 41, 185-191.

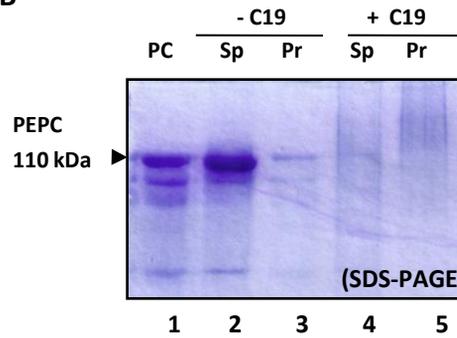
16. Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, T., Tsumura, K. and Izui, K. (1999) Tree-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: A proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96, 823-828.
17. Matsumura, H., Xie, Y., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Ueno, Y., Izui, K. and Kay, Y. (2002) Crystal structure of C<sub>4</sub> form maize and quaternary complex of E. coli phosphoenolpyruvate carboxylase. *Structure*. 10, 1721-1730.
18. Wedding, R.T. and Black, M.K. (1987) Oligomerization and the sensitivity of phosphoenolpyruvate carboxylase to inactivation by proteinases. *Plant Physiol*. 84, 979-981.

Fig. 1

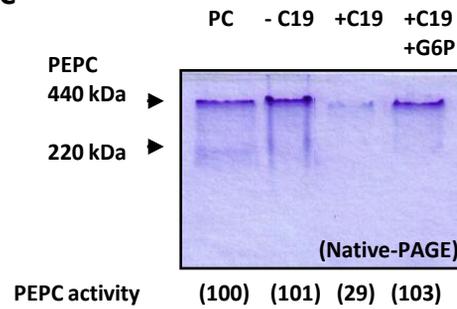
A



B



C



D

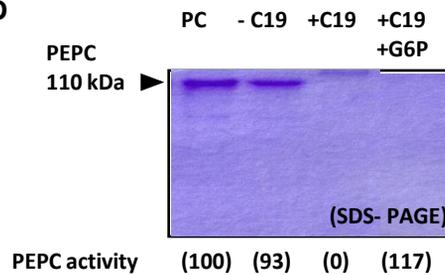
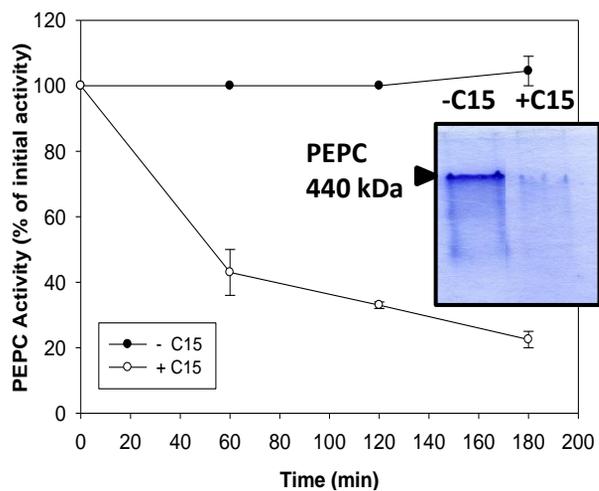
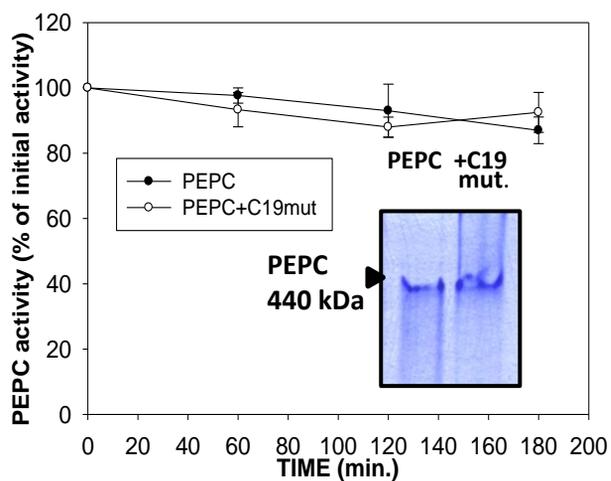


FIG. 2

A



B



C

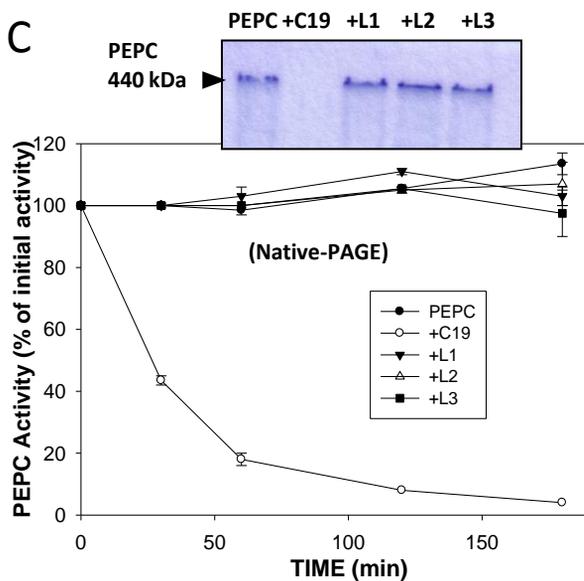
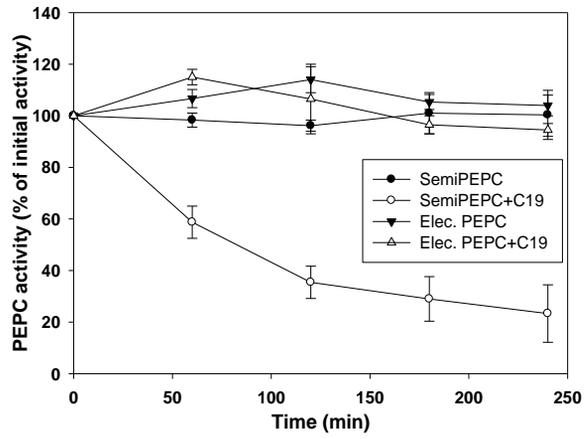
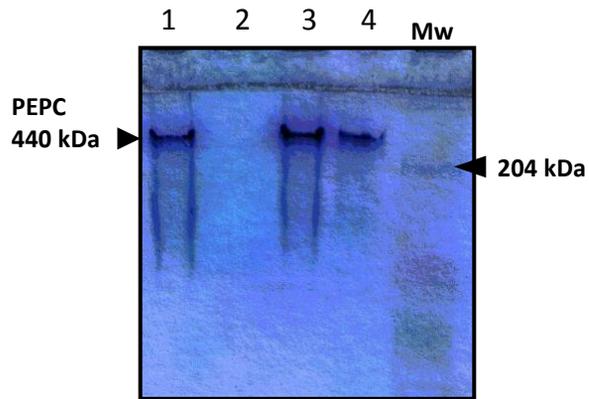


Fig. 3

A



B



	1	2	3	4
Semip. PEPC	+	+	-	-
Elec. PEPC	-	-	+	+
C19 peptide	-	+	-	+

FIG. 4

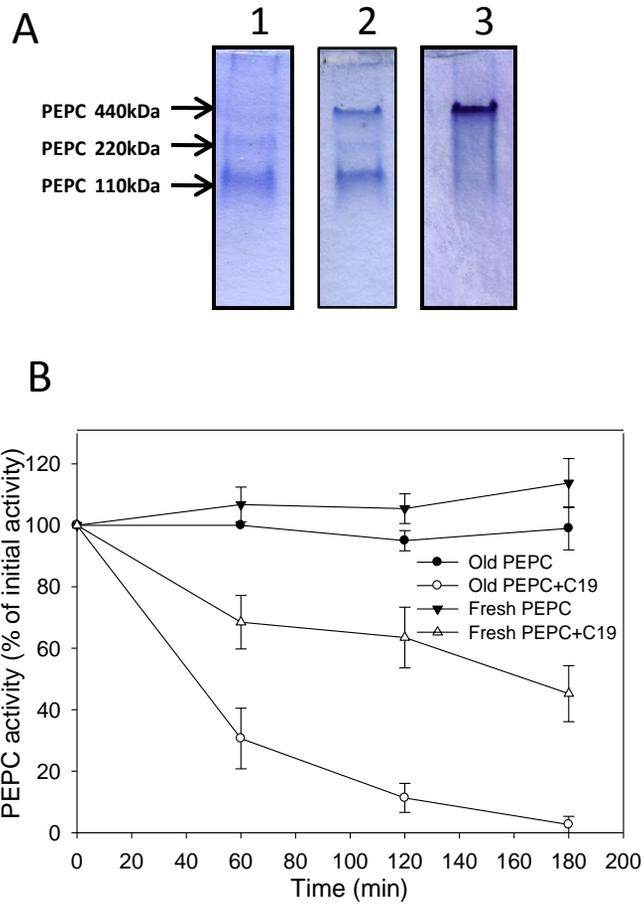
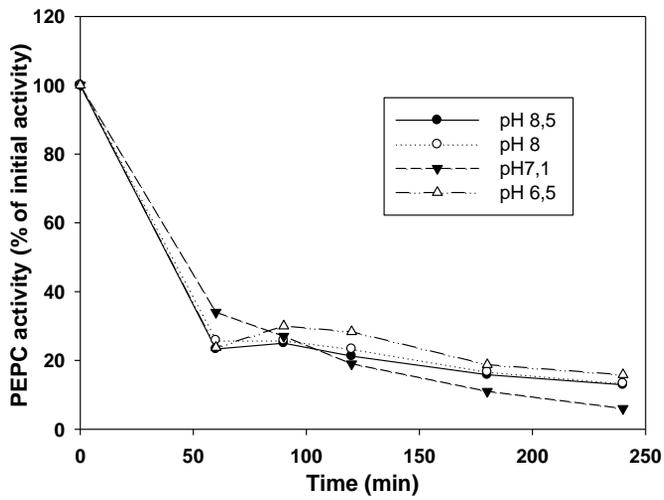


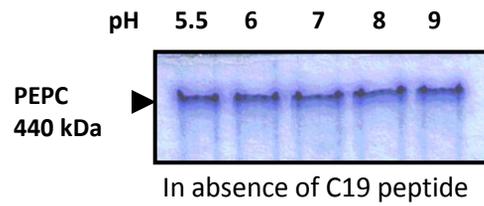


Fig 6

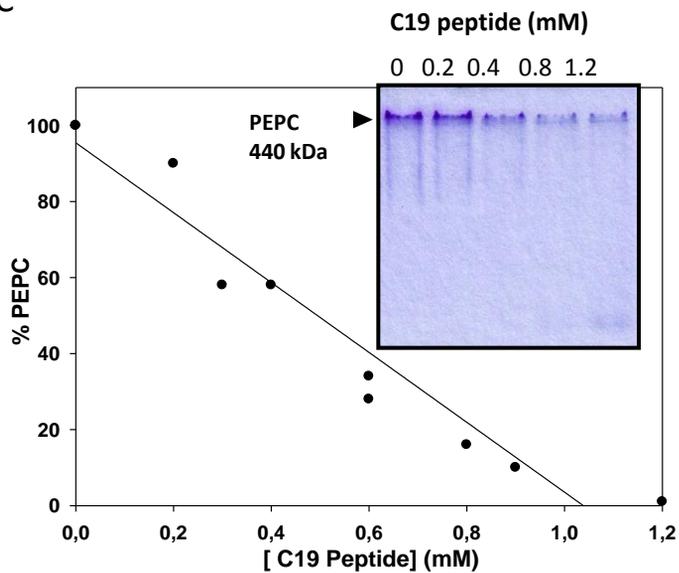
A



B



C



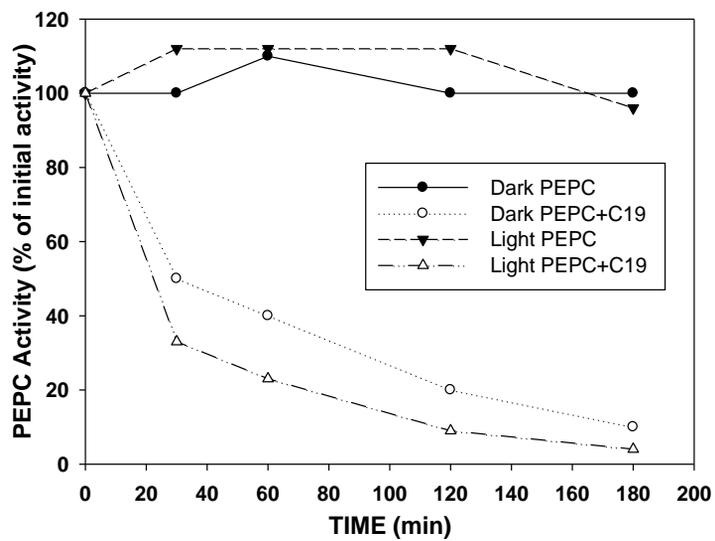
R = 0,9681

Recta de regresión  $\rightarrow Y = - 91,93x + 95,46$

IC50 = 0,49 mM de péptido C19

Fig. 7

A



B

