

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias
Biológicas

*“Caracterización de sistemas de regulación por modificaciones
postraduccionales de proteínas de la partición del carbono en
células vegetales”*

Lic. Bruno Ezequiel Rojas

Director: Dr. Alberto A. Iglesias

Laboratorio de Enzimología Molecular

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

-Año 2021-

Agradecimientos.

Quiero agradecer a las instituciones que hicieron posible el desarrollo de esta Tesis doctoral, a la *Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas*, a la *Universidad Nacional del Litoral*, al *Instituto de Agrobiotecnología del Litoral* y al *CONICET*.

Así también, agradecer al *Dr. Alberto Iglesias* por darme la oportunidad de realizar esta Tesis en su Laboratorio. Por ser una guía científica constante todos estos años y compartir sus experiencias de vida. Al *Dr. Carlos Figueroa* por ser otra guía y participar activamente en el desarrollo de esta Tesis. También, quisiera agradecerle su generosidad al incluirme en sus proyectos, que me brindaron nuevos horizontes.

Por otra parte, quisiera agradecer a la *Dra. Raquel Chan*, la directora del IAL, como así también a lxs compañerxs becarixs, investigadores y personal de apoyo del instituto, que ponen su grano de arena para hacer el IAL un lugar maravilloso.

A todos mis compañeros (presentes y pasados) del *Laboratorio de Enzimología Molecular*. A la *Dra. Ana Demonte* por estar siempre dispuesta a escuchar atentamente a quien lo necesite y por brindar sabios consejos. Al *Dr. Matías Asención*, al *Dr. Diego Arias* y al *Dr. Sergio Guerrero* por intercambiar conocimientos y ser siempre serviciales al consultarles cualquier duda. A *Anto, Romi, Danisa, Vicky, Robertino, Nati, Alem, Franco, Rodrigo y Nadia* por ser buenos compañeros y hacer que el trabajo diario sea muy divertido.

A grandes amigos que conocí en estos años, a *Mati* por haberme acompañado durante el desarrollo de esta Tesis y brindarme su amistad todos estos años. A *Ceci*, por irradiar felicidad y energía todos los días que compartimos. A *Jesi* por todas esas charlas en el almuerzo y compartirme su experiencia. A *Juli* por brindarme su amistad desde hace tanto tiempo y ayudarme siempre que la necesito.

A mis padres, *Maria y Héctor*, sin los cuales nada de esto hubiera sido posible, por haberme enseñado la importancia de la educación y apoyarme siempre en los proyectos que emprendí. Por enseñarme el valor de la responsabilidad y ser las personas a las que acudo cuando necesito ayuda, sin importar la hora o el momento del día. A *Daniela, Anahí y Ariana* por estar siempre a mi lado y brindarme su amor incondicional. A mis tíos *Raúl y Carlos* por ser una parte importante de mi familia.

Por último, quisiera agradecer a *Coke*, quien siempre me escucha y brinda el consejo adecuado. Por tener una personalidad que me complementa y todos los días me hace crecer un poco más. Por brindarme su inmenso amor todos los días.

“No sé lo que le podré parecer al mundo, pero a mí me parece como si hubiese sido un niño que juega en la orilla del mar y se divierte de tanto en tanto encontrando un guijarro más pulido o una concha más hermosa de lo común, mientras que el inmenso océano de la verdad se extiende inexplorado frente a mí”.

Isaac Newton

Publicaciones.

Bruno E. Rojas, Matías D. Hartman, Carlos M. Figueroa, Alberto A. Iglesias. “Proteolytic cleavage of *Arabidopsis thaliana* phosphoenolpyruvate carboxykinase-1 modifies its allosteric regulation”. *Journal of Experimental Botany*. *Aceptado para ser publicado*.

Ferrero Danisa M. L., Piattoni Claudia V., Asencion Diez Matías D., Rojas Bruno E., Hartman Matías D., Ballicora Miguel A., & Iglesias Alberto A. “Phosphorylation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase During Wheat Seeds Development”. *Frontiers in Plant Science* (2020), Volume 11, Pages 1058. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01058>

B. E. Rojas, M. D. Hartman, C. M. Figueroa, L. Leaden, F. E. Podestá, & A. A. Iglesias. “Biochemical characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Arabidopsis thaliana*”. *Biochemical Journal* (2019), BCJ20190523. <https://doi.org/10.1042/bcj20190523>.

Bruno E. Rojas, Franco Santin, Rita M. Ulloa, Alberto A. Iglesias, & Carlos M. Figueroa. “A fluorometric method for the assay of protein kinase activity”. *Analytical Biochemistry* (2018), Volume 557, Pages 120-122, ISSN 0003-2697. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.07.018>.

Índice.

Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción.....	5
<i>1.1 El metabolismo del carbono en células autótrofas.....</i>	<i>5</i>
1.1.1 Los cloroplastos.....	5
1.1.2 La fase luminosa de la fotosíntesis.....	6
1.1.3 La fase sintética de la fotosíntesis: el ciclo de Benson-Calvin-Basham.....	7
1.1.4 La partición de los fotoasimilados.....	9
1.1.5 La síntesis y el transporte de Suc.....	10
<i>1.2 El metabolismo del carbono en células heterótrofas.....</i>	<i>12</i>
1.2.1 La glucólisis.....	12
1.2.2 La síntesis de compuestos de reserva en plantas.....	17
1.2.3 La degradación de los compuestos de reserva.....	18
1.2.3.1 La lipólisis.....	18
1.2.3.2 La β -oxidación.....	18
1.2.3.3 El ciclo del glioxilato.....	19
1.2.3.4 La gluconeogénesis.....	20
<i>1.3 El metabolismo del PEP.....</i>	<i>22</i>
1.3.1 La PEPCasa.....	24
1.3.1.1 Mecanismo de reacción.....	24
1.3.1.2 Origen evolutivo.....	25
1.3.1.3 Localización subcelular.....	26
1.3.1.4 Funciones fisiológicas.....	26
1.3.1.5 Mecanismos regulatorios de las PEPCasas.....	33
<i>1.4 El metabolismo de los azúcares alcoholes.....</i>	<i>35</i>
1.4.1 La Ald6PRasa.....	35
<i>1.5 Panorama biológico y objetivos planteados.....</i>	<i>37</i>
2. Objetivo del trabajo.....	38
<i>2.1 Objetivos específicos.....</i>	<i>38</i>

3. Materiales y métodos.	39
3.1 <i>Materiales utilizados.</i>	39
3.1.1 Reactivos químicos.	39
3.1.2 Dipéptidos	39
3.1.3 Vectores.	40
3.1.4 Cepas bacterianas.	40
3.1.5 Medios de cultivo bacterianos.	40
3.1.6 Medios de cultivo vegetales y soluciones de riego.	40
3.1.7 Material vegetal y condiciones de cultivo.	40
3.2 <i>Técnicas de Biología Molecular</i>	41
3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	41
3.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.	41
3.2.3 Oligonucleótidos.	42
3.2.4 Obtención de las secuencias codificantes de interés.	43
3.2.5 Clonado.	43
3.2.6 Técnicas de mutagénesis.	43
3.2.7 Transformación de células.	44
3.2.8 Extracción de ADN plasmídico y secuenciación.	44
3.2.9 Corte con enzimas de restricción.	45
3.2.10 Subclonado.	45
3.3 <i>Técnicas de proteínas.</i>	45
3.3.1 Expresión de proteínas recombinantes.	45
3.3.2 Cuantificación de proteínas.	46
3.3.3 Purificación de las proteínas recombinantes.	46
3.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.	47
3.3.5 Inmunodetección.	47
3.3.6 Anticuerpos.	48
3.3.7 Cromatografía de filtración por gel.	48
3.3.8 Ensayos de desnaturalización de proteínas.	49
3.3.9 Ensayos de actividad enzimática.	49
3.3.10 Estudios de óxido-reducción.	51
3.3.11 Método de medida radiactivo de ProtKasas.	52
3.3.12 Método de medida luminiscente de ProtKasas.	53
3.3.13 Método de medida fluorescente de ProtKasas.	53

3.3.14 Extracción de proteínas de tejidos vegetales.....	55
3.3.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Phos-Tag.....	55
3.3.16 Fosforilación <i>in vitro</i> de proteínas.....	55
3.3.17 Inmunoprecipitaciones.....	56
<i>3.4 Análisis informático y estadístico.</i>	<i>56</i>
3.4.1 Análisis cinético de la actividad enzimática.....	56
3.4.2 Análisis estadístico.	57
3.4.3 Cálculo del límite de detección, límite de cuantificación, relación señal-ruido y factor Z.	57
3.4.4 Cuantificación de geles por densitometría.....	58
3.4.5 Modelado Molecular	58
3.4.6 Obtención de datos de fosfoproteómica.....	58
3.4.7 Búsqueda de secuencias homólogas.....	58
3.4.8 Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético.	59
4. Resultados.	60
<i>4.1 Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las AthPEPCKasas</i>	<i>60</i>
4.1.1 Análisis filogenético de las ATP-PEPCKasas de plantas.	60
4.1.2 Análisis de la expresión génica.	62
4.1.3 Clonado y expresión recombinante.....	64
4.1.4 Caracterización cinética.....	67
4.1.5 Regulación alostérica.....	73
4.1.6 Modelado molecular de las AthPEPCKasas.	80
<i>4.2 Regulación de la AthPEPCKasa1 por dipéptidos.</i>	<i>82</i>
4.2.1 Análisis de la interacción de la AthPEPCKasa1 con dipéptidos.....	83
4.2.2 Efecto de los dipéptidos en la actividad de la AthPEPCKasa1.	87
<i>4.3 Regulación de la AthPEPCKasa1 por corte proteolítico.</i>	<i>92</i>
4.3.1 Proteólisis de la AthPEPCKasa1 durante la germinación de las semillas.....	94
4.3.2 Efectos cinéticos y regulatorios sobre la AthPEPCKasa1 provocados por el corte por la metacaspasa AthMC9.....	100
<i>4.4 Ubiquitinilación y degradación proteolítica de la AthPEPCKasa1.</i>	<i>111</i>
<i>4.5 Regulación de la AthPEPCKasa1 por fosforilación.</i>	<i>116</i>
<i>4.6 Regulación de la AthPEPCKasa1 por óxido-reducción.</i>	<i>125</i>

4.7 Identificación y caracterización de las ProtKasas involucradas en la fosforilación de las enzimas en estudio.	127
4.7.1 Caracterización de las ProtKasas <i>AthSnRK1</i>	127
4.7.2 Caracterización de la ProtKasa <i>MdoSOS2</i>	131
4.7.3 Análisis de la fosforilación de la <i>PpeAldPRasa</i> y la <i>TaeADP-Glc PPasa</i>	135
4.7.4 Desarrollo de un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa.	137
5. Discusión.....	142
5.1 Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las <i>AthPEPCKasas</i>	142
5.1.1 La regulación alostérica en el contexto metabólico.	148
5.2 Regulación de la <i>AthPEPCKasa1</i> por dipéptidos.	151
5.3 Regulación de la <i>AthPEPCKasa1</i> por corte proteolítico.	155
5.4 Ubiquitinilación y degradación proteolítica de la <i>AthPEPCKasa1</i>	158
5.5 Regulación de la <i>AthPEPCKasa1</i> por fosforilación.	161
5.6 Regulación de la <i>AthPEPCKasa1</i> por óxido-reducción.	164
5.7 Caracterización de las ProtKasas involucradas en la fosforilación de las enzimas en estudio.	165
5.7.1 Caracterización de las ProtKasas <i>AthSnRK1</i> y <i>MdoSOS2</i>	165
5.7.2 Desarrollo de un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa.	166
6. Conclusiones.	169
7. Referencias.	172
8. Material suplementario.	205

Abreviaturas y símbolos.

1,3-bisPGA	1,3-bisfosfoglicerato
3-PGA	3-fosfoglicerato
3-PGAKasa	3-fosfoglicerato quinasa
ADP	Adenosina-5'-difosfato
ADP-Glc	Adenosina-5'-difosfo-glucosa
ADP-GlcPPasa	Adenosina-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa
AGs	Ácidos grasos
Ald6PRasa	Aldosa-6P reductasa dependiente de NADPH
AMP	Adenosina-5'-monofosfato
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
ATP-PFKasa	Fosfofructoquinasa dependiente de ATP
C ₄	Ácidos dicarboxílicos de cuatro carbonos
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CBCB	Ciclo de Benson-Calvin-Basham
CoA	Coenzima A
cpm	Cuentas por minuto
DAHP	3-deoxi-7-fosfoheptunolato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
dNTPs	Mezcla equimolar de desoxinucleótidos
DO	Densidad óptica determinada a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
E4P	Eritrosa-4-fosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
FBPasa	Fructosa-1,6-bisfosfato fosfatasa
Fru	Fructosa
Fru-1,6-bisP	Fructosa-1,6-bisfosfato
Fru-2,6-bisP	Fructosa-2,6-bisfosfato
Fru-6P	Fructosa-6-fosfato
FS	Fotosistema
g	gramo
Ga3P	Gliceraldehído-3-fosfato
Ga3PDHasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
Ga3PDHasa A/B	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP ⁺
Glc	Glucosa
Glc-1P	Glucosa-1-fosfato
Glc-6P	Glucosa-6-fosfato
Gol	Glucitol

GoldHasa	Glucitol deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
Gro	Glicerol
Gro-3P	Glicerol-3-fosfato
h	Hora
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etano-sulfónico
IDA-Ni ²⁺	Ni ²⁺ - ácido iminodiacético
IMAC	Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
kcal	kilocaloría
kDa	kiloDalton
LDHasa	Lactato deshidrogenasa
LB	Medio Luria Bertani
l	Litro
M	Molar
MDHasa	Malato deshidrogenasa dependiente de NAD ⁺
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
MM	Masa molecular
mM	Milimolar
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido, reducida
NAD-ME	Enzima málica dependiente de NAD ⁺
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato, reducida
NADP-ME	Enzima málica dependiente de NADP ⁺
nmol	Nanomol
np-Ga3PDHasa	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa no-fosforilante dependiente de NADP ⁺
OAA	Oxaloacetato
OPPP	Vía oxidativa de las pentosas fosfato
PC	Plastocianina
PF	Peso fresco
PQ	Plastoquinona
PQH ₂	Plastoquinona reducida
% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPasa	Fosfoenolpiruvato fosfatasa

PEPCasa	Fosfo <i>enol</i> piruvato carboxilasa
PEPCKasa	Fosfo <i>enol</i> piruvato carboxiquinasa
Pi	Ortofosfato inorgánico
PPi	Pirofosfato inorgánico
PPDKasa	Piruvato ortofosfato diquinasa
PPi-PFKasa	Fosfofructoquinasa dependiente de PPi
PRKasa	Fosforibuloquinasa
ProtKasa	Quinasa de proteínas
Pyr	Piruvato
PyrKasa	Piruvato quinasa
Rib-5P	Ribosa-5-fosfato
rpm	Revoluciones por minuto
RuBisCO	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
Rul-5P	Ribulosa-5-fosfato
Rul-1,5-bisP	Ribulosa-1,5-bisfosfato
SBPasa	Sedoheptulosa bisfosfatasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
Suc	Sacarosa
TAE	Solución Tris-acético-EDTA
TAGs	Triacilglicéridos
TBS	Solución Tris salino
TPIasa	Triosa-fosfato isomerasa
Tre-6P	Trehalosa-6-fosfato
Triosa-P	Triosa fosfato
Tris	N-Tris-(hidroximetil) aminoetano
TTP	Transportador de triosas fosfato/fosfato
U	Unidades internacionales de actividad enzimática
UDP	Uridina-5'-difosfato
UDP-Glc	Uridina-5'-difosfo-glucosa
UDP-GlcPPasa	Uridina-5'-difosfo-glucosa pirofosforilasa
V_{max}	Velocidad máxima
x g	Fuerza centrífuga relativa
μg	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

Resumen.

La fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa dependiente de ATP (PEPCKasa, EC 4.1.1.49) es una enzima citosólica que cataliza la descarboxilación reversible del oxaloacetato (OAA) a PEP. En plantas, esta enzima posee múltiples funciones: *i*) es parte de los mecanismos de concentración del CO₂ que operan en la fotosíntesis C₄ y CAM, *ii*) participa en las respuestas al estrés biótico y abiótico, *iii*) está involucrada en el metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos y *iv*) juega un rol clave en la gluconeogénesis. En este trabajo de Tesis, estudiamos detalladamente ambas PEPCKasas presentes en *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis): la *Ath*PEPCKasa1 (At4g37870) y la *Ath*PEPCKasa2 (At5g65690). Realizamos la caracterización cinética, estructural y regulatoria de las proteínas recombinantes expresadas en *Escherichia coli*. Ambas enzimas son homohexaméricas con una actividad máxima a pH 7. Además, ambas *Ath*PEPCKasas requieren de cationes divalentes (Mg⁺² y Mn⁺²) para la catálisis, siendo el Mn²⁺ un activador. Por otra parte, ambas enzimas son reguladas por mecanismos alostéricos, siendo la *Ath*PEPCKasa1 más sensible a la regulación. De forma interesante, la *Ath*PEPCKasa1 fue activada por malato e inhibida por glucosa-6-fosfato (Glc-6P), mientras que la *Ath*PEPCKasa2 fue insensible a estos efectores alostéricos. Determinamos que la *Ath*PEPCKasa1 interacciona *in vivo* con una serie de dipéptidos hidrofóbicos-polares, los cuales inhibieron *in vitro* a la enzima recombinante y a la actividad PEPCKasa en extractos crudos de hojas.

Mediante estudios *in vivo*, determinamos que durante la germinación de las semillas la enzima se encuentra proteolizada. La proteólisis llega a un pico entre las 48-72 horas posteriores a la imbibición de las semillas, cuando la actividad PEPCKasa es máxima. Además, la *Ath*PEPCKasa1 es sustrato de la metacaspasa 9 de Arabidopsis (*Ath*MC9), una proteasa dependiente de cisteína que la corta en su extremo N. Generamos dos mutantes truncas de la *Ath*PEPCKasa1 (Δ 19 y Δ 101) en los sitios de corte de *Ath*MC9. De esta manera, encontramos que ambas enzimas mostraron una cinética y una estructura cuaternaria similar a la enzima completa, a excepción por la respuesta diferencial a la regulación por malato y Glc-6P. También encontramos que tratamientos con el inhibidor de proteasoma MG132 produce una acumulación de la enzima y, utilizando inmunoprecipitaciones encontramos que la misma se encuentra ubiquitinilada. Concentraciones fisiológicas de H₂O₂ inactivaron a la enzima, con una constante de segundo orden que sugiere la regulación por óxido reducción *in vivo*. Además, la *Ath*PEPCKasa1 es fosforilada en varios sitios localizados en el dominio N-terminal. Por esto, construimos mutantes en las cuales se mimetizó de la fosforilación en los residuos Ser-62 y Thr-66, lo cual generó enzimas más activas que la enzima salvaje y que no respondían a los inhibidores alostéricos.

Por otra parte, expresamos de forma recombinante en *E. coli* y realizamos la caracterización cinética de diferentes quinasas de proteínas (ProtKasas) de plantas: las subunidades catalíticas de las *sucrose non-fermenting related kinase 1* (SnRK1) de *Arabidopsis thaliana* (*AthAKIN10* y *AthAKIN11*), la *calcium dependent kinase 1* de *Solanum tuberosum* (*StuCDPK1*), y la *salt overly sensitive 2* de *Malus domestica* (*MdoSOS2*). Luego, estas ProtKasas se utilizaron para estudiar la fosforilación de la aldosa-6-fosfato reductasa de *Prunus pérsica* (*PpeAld6PRasa*), una enzima clave en la síntesis de los azúcares alcoholes. Finalmente, desarrollamos un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa, sin la necesidad de emplear materiales radiactivos.

A modo de conclusión, en esta Tesis estudiamos la regulación del metabolismo del carbono por mecanismos postraduccionales. Los resultados obtenidos muestran que tanto las *AthPEPCKasas* como la *PpeAld6PRasa* son reguladas de forma compleja y en varios niveles, de modo de ajustar su actividad. Estas regulaciones serían importantes para coordinar el metabolismo vegetal ante los desafíos del ambiente, como así también las múltiples funciones en las que participan. Anticipamos que nuestros resultados generan nuevas perspectivas en la regulación del metabolismo vegetal, en especial en la gluconeogénesis y la síntesis de azúcares alcoholes en plantas.

Abstract.

ATP-dependent phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase (PEPCK, EC 4.1.1.49) is a cytosolic enzyme that catalyzes the reversible decarboxylation of OAA to PEP. In plants, PEPCK has multiple functions: *i)* it is part of the CO₂-concentrating mechanism operating in C₄ and CAM photosynthesis, *ii)* it participates in biotic and abiotic stress responses, *iii)* it is involved in nitrogen and amino acid metabolism, and *iv)* it plays a key role in gluconeogenesis. In this Thesis project, we studied in detail both PEPCKs present in *Arabidopsis*; *AthPEPCK1* (At4g37870) and *AthPEPCK2* (At5g65690). We performed the kinetic, structural, and regulatory characterization of the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli*. Both proteins are homohexamers with maximum activity at pH 7. Also, both *AthPEPCKs* require divalent cations (Mg⁺² and Mn⁺²) for catalysis, being Mn²⁺ an activator. Both enzymes are regulated by allosteric mechanisms, being *AthPEPCK1* more sensitive to regulation. Interestingly, *AthPEPCK1* was activated by malate and inhibited by glucose-6-phosphate (Glc-6P), but *AthPEPCK2* was insensitive to these allosteric effectors. We determined that *AthPEPCK1* interacts *in vivo* with a series of hydrophobic-polar dipeptides, which inhibited *in vitro* the recombinant enzyme and the protein from leaves.

We studied the *in vivo* state of *AthPEPCK1* polypeptide and found that it is proteolyzed in germinating seedlings but not in mature leaves. In seedlings, proteolysis peaks at 48-72 hours post imbibition, when the activity of PEPCK reaches a maximum. *AthPEPCK1* is a substrate of metacaspase9 (*AthMC9*), a cysteine protease that cleaves its N-terminal domain. We constructed truncated Δ19 and Δ101 mutants of *AthPEPCK1*, which had a kinetic and quaternary structure similar to the WT, except for altered response to allosteric regulation by malate and Glc-6P. Also, we found that physiological concentrations of H₂O₂ inactivated the enzyme, with a second-order constant that was in a range supporting the *in vivo* functionality as a redox-regulating mechanism. *AthPEPCK1* is subject to phosphorylation at various sites located at the N-terminal domain. In this context, we constructed phosphomimic mutants on Ser-62 and Thr-66, which were more active than the WT.

Also, we characterized plant protein kinases expressed in *E. coli*; the catalytic subunits of the sucrose non-fermenting related kinase 1 (SnRK1) from *Arabidopsis thaliana* (*AthAKIN10* y *AthAKIN11*), the calcium dependent kinase 1 from *Solanum tuberosum* (*StuCDPK1*), and the salt overly sensitive 2 from *Malus domestica* (*MdoSOS2*). These kinases were employed to study the phosphorylation of Aldose-6-phosphate reductase of *Prunus persica* (*PpeAld6PRase*). Finally, we developed a fluorometric protein kinase assay to study protein phosphorylation without the need of employing radioactive materials.

In summary, in this Thesis we studied the regulation of carbon metabolism by postranslational mechanisms. Our results show that both *AthPEPCKs* and *PpeAld6PRase* are

regulated in a complex manner and at multiple levels, to adjust their activity. These regulations might be important to coordinate the metabolism in front of the challenges imposed by the ambient, and the functions in which they participate. We anticipate that our results generate new perspectives in the regulation of plant metabolism, especially in gluconeogenesis and the synthesis of sugar alcohols in plants.

1. Introducción.

1.1 El metabolismo del carbono en células autótrofas.

Las plantas son organismos autótrofos capaces de convertir la energía solar en química (en la forma de ATP y NADPH), la cual luego se emplea para fijar el dióxido de carbono (CO₂) en carbohidratos [1]. Este proceso se denomina fotosíntesis y ocurre en los cloroplastos de los tejidos verdes de las plantas, principalmente en las hojas. Luego, los azúcares sintetizados mediante la fotosíntesis son repartidos intracelularmente entre las diferentes vías metabólicas y son la base para la síntesis de todos los compuestos necesarios en la célula. La partición del carbono también puede darse a nivel intercelular entre los distintos tejidos para alimentar aquellos que no tienen capacidad fotosintética [2, 3]. A una escala ecológica, la fotosíntesis representa el primer eslabón del ciclo del carbono y es la que sustenta toda la vida en la tierra [4].

La fotosíntesis puede dividirse en dos fases. Una directamente dependiente de la luz, en la que se captura la energía solar para formar moléculas de alta energía y capacidad reductora. La otra fase es denominada sintética, en la que se utilizan las moléculas formadas en la fase dependiente de luz para fijar el CO₂ y sintetizar azúcares [2]. Ambas etapas operan en conjunto y la fase sintética no puede desarrollarse en ausencia de las moléculas que se generan durante la fase luminosa [5].

1.1.1 Los cloroplastos.

Los cloroplastos son las organelas especializadas en las cuales se desarrolla la fotosíntesis. Éstos son muy abundantes en los tejidos verdes de las plantas, principalmente en las células del mesófilo de las hojas [6]. Están rodeados por dos membranas (sistema que forma la envoltura), una externa que es permeable a iones y moléculas pequeñas y una interna que es altamente selectiva. La membrana interna contiene al estroma en el cual, a su vez, se distribuyen numerosas vesículas membranosas achatadas, los tilacoides, que se apilan en estructuras denominadas *grana* [1] (Figura 1 A). En las membranas de los tilacoides se ubican los pigmentos fotosintéticos y los complejos enzimáticos que llevan a cabo las reacciones luminosas de la fotosíntesis y, en el estroma, se localizan todas las enzimas necesarias para la asimilación del carbono [1].

Los principales pigmentos encargados de absorber la luz en las membranas tilacoides son las clorofilas. Las plantas poseen dos formas (a y b) del pigmento, las cuales difieren en su espectro de absorción en el rango visible [1, 5]. Las clorofilas están unidas a proteínas específicas formando complejos antena que, a su vez, están insertos en las membranas tilacoides [1]. Estos complejos antena son los encargados de coleccionar los fotones y transferirlos al centro de reacción, en los cuales ocurre la oxidación y la reducción química [6]. También existen pigmentos accesorios, como los carotenos,

que absorben luz a otras longitudes de onda, de forma de aumentar el espectro de luz funcional al proceso [1].

1.1.2 La fase luminosa de la fotosíntesis.

Las reacciones dependientes de luz de la fotosíntesis ocurren en la cadena de transporte de electrones ubicada en las membranas tilacoides. Esta cadena está formada por cuatro complejos multiproteicos: el fotosistema II (FSII), el citocromo *b6f*, el fotosistema I (FSI) y la ATP sintasa (Figura 1 B). Una vez excitado, el FSI transfiere electrones desde su centro de reacción P700 a la ferredoxina, empleando una serie de transportadores en el proceso. Luego, la ferredoxina-NADP⁺ reductasa (EC 1.18.1.2) utiliza a la ferredoxina como cofactor para reducir el NADP⁺ a NADPH hacia el estroma del cloroplasto. Cuando el FSII es excitado, transfiere sus electrones desde su centro de reacción P680 a la plastoquinona. Los electrones que pierde el FSII en el proceso son reemplazados por los que se obtienen de la fotólisis del H₂O con generación de O₂. A su vez, la plastoquinona reducida transfiere los electrones al citocromo *b6f* que los transfiere a la plastocianina y luego, al centro P700 del FSI para reemplazar los electrones perdidos durante la fotoexcitación [1, 6] (Figura 1 B).

Como consecuencia del flujo de electrones a través del citocromo *b6f*, se transportan protones a través de la membrana tilacoide hacia el lumen. Esto provoca una diferencia de ~1000 veces en la concentración de protones ($\Delta\text{pH} = 3$) a cada lado de la membrana tilacoide, lo cual crea un potencial electroquímico a través de la misma [1]. Luego, estos protones regresan nuevamente al estroma del cloroplasto a través de la ATP sintasa (EC 7.1.2.2), que emplea la fuerza protón motriz para condensar ADP y Pi y generar ATP [6]. En resumen, la fase dependiente de luz de la fotosíntesis puede describirse en forma global por la siguiente ecuación:



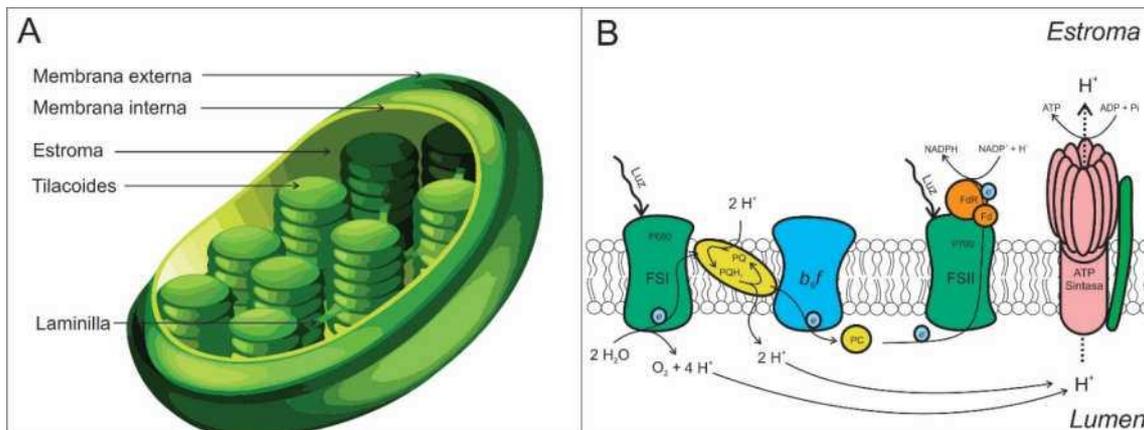


Figura 1. Fase luminosa de la fotosíntesis. Esquema de la estructura del cloroplasto (A) y del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones (B) ubicada en las membranas tilacoides del cloroplasto. FSI, fotosistema I; FSII, fotosistema II; Fd, ferredoxina; FdR, ferredoxina reductasa; *b₆f*, citocromo *b₆f*; PQ, plastoquinona oxidada; PQH₂, plastoquinona reducida; PC, plastocianina; *e*⁻, electrones.

1.1.3 La fase sintética de la fotosíntesis: el ciclo de Benson-Calvin-Basham.

El ciclo de Benson-Calvin-Basham (CBCB) es la vía cíclica por la cual plantas, algas y bacterias fotosintéticas fijan el CO₂ [7, 8]. Mediante esta ruta metabólica cíclica se fijan tres moléculas de CO₂ para formar una de triosa-fosfato (triosa-P), que puede ser dihidroxiacetona fosfato (DHAP) o gliceraldehído-3-fosfato (Ga3P). Las triosas-P representan el principal producto de asimilación fotosintética y son un nodo clave del metabolismo vegetal, puesto que pueden repartirse hacia diferentes usos dentro de la célula. Dentro del cloroplasto, pueden utilizarse para sintetizar almidón o bien regenerar la ribulosa-1,5-bisfosfato (Rul-1,5-bisP) mediante las propias reacciones del CBCB. Alternativamente, las triosas-P pueden ser transportadas al citosol, donde se utilizan para producir otros azúcares o bien como sustrato respiratorio para la célula. Las reacciones del CBCB ocurren en el estroma del cloroplasto y pueden agruparse en tres grandes fases [2] (Figura 2):

i) Carboxilación: la Rul-1,5-bisP carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO, EC 4.1.1.39) cataliza la adición de una molécula de CO₂ a la Rul-1,5-bisP generando dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3-PGA).

ii) Reducción: dos moléculas de 3-PGA son reducidas a expensas de dos moléculas de ATP y dos moléculas de NADPH por la 3-PGA quinasa (3-PGAKasa, EC 2.7.2.3) y la Ga3P deshidrogenasa

dependiente de NADP^+ (Ga3PDHasa A/B, EC 1.2.1.13). En esta etapa se utilizan el ATP y el NADPH generados en la etapa luminosa.

iii) *Regeneración*: involucra diez reacciones en las que se reconfiguran moléculas de triosas-P para regenerar el aceptor primario del ciclo, la Ru1-1,5-bisP, con el uso del ATP generado en la etapa luminosa.

El balance general del ciclo demuestra que por cada tres moléculas de CO_2 que se fijan se genera una de triosa-P, por lo que el ciclo es auto catalítico y puede generar más aceptor de CO_2 del que consume. El mismo se puede expresar por la siguiente ecuación global:



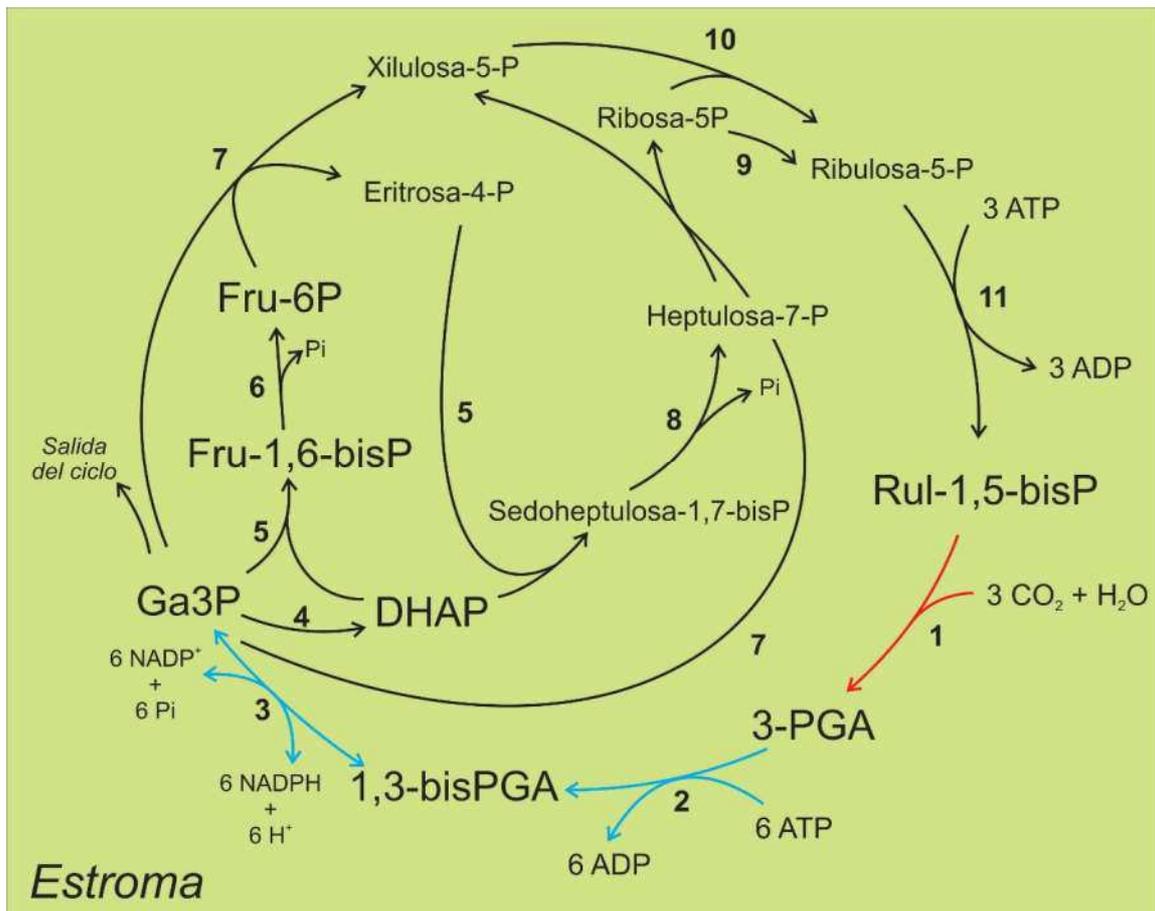


Figura 2. Fase sintética de la fotosíntesis. En la Figura se esquematizan los pasos enzimáticos involucrados en el CBCB. Los números corresponden a las siguientes enzimas: (1) RuBisCO, EC 4.1.1.39; (2) 3-PGAKasa, EC 2.7.2.3; (3) Ga3PDHase A/B, EC 1.2.1.13; (4) triosa-P isomerasa, EC 5.3.1.1; (5) Fru-1,6-bisP aldolasa, EC 4.1.2.13; (6) Fru-1,6-bisP fosfatasa, EC 3.1.3.11; (7) transcetolasa, EC 2.2.1.1; (8) sedoheptulosa-bisfosfato fosfatasa, EC 3.1.3.37; (9) ribosa-5P (Rib-5P) isomerasa, EC 5.3.1.6; (10) ribulosa-5P (Rul-5P) 3-epimerasa, EC 5.1.3.1; (11) Rul-5P quinasa, EC 2.7.1.19. El color de las flechas corresponde a las diferentes fases del CBCB: carboxilación (rojo), reducción (azul) y regeneración (negro).

1.1.4 La partición de los fotoasimilados.

La asimilación del carbono por el CBCB resulta en la producción de triosas-P y hexosas-P, las cuales se reparten intracelularmente hacia las diferentes vías metabólicas [2]. Dentro del cloroplasto, la Fru-6P es el punto de partida para la síntesis de almidón, el cual se almacena de forma transitoria en las hojas durante el día. Este almidón transitorio es una reserva de carbono y energía que será utilizada durante la noche para mantener el metabolismo y el crecimiento cuando la planta

no puede realizar la fotosíntesis [9, 10]. De esta forma, el almidón transitorio actúa en las hojas como un balanceador del metabolismo y el crecimiento en contra de las oscilaciones naturales de la luz [9]. Por esto, las tasas de síntesis y degradación del almidón son muy robustas, ajustándose de acuerdo a señales externas, como la longitud del día, e internas, como el ciclo circadiano [9, 10].

Las triosas-P también pueden movilizarse al citosol mediante la lanzadera de triosas-P/3-PGA con el fin de exportar del cloroplasto el carbono y la energía fijada por la fotosíntesis [2, 11]. Este transporte ocurre a través del transportador de triosas-P/Pi (TTP) ubicado en la membrana interna del cloroplasto, que intercambia las triosas-P por ortofosfato inorgánico (Pi) proveniente del citosol [12, 13]. Una vez en el citosol, las triosas-P son metabolizadas por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fosforilante dependiente de NAD⁺ (Ga3PDHasa, EC 1.2.1.12) y la 3-PGAKasa a 3-PGA. De esta forma, se exporta poder energético (ATP) del cloroplasto al citosol. Alternativamente, las triosas-P pueden metabolizarse por la Ga3PDHasa no fosforilante dependiente de NADP⁺ (np-Ga3PDHasa, EC 1.2.1.9) a 3-PGA, reduciendo el cofactor NADP⁺ a NADPH, exportando poder reductor del cloroplasto al citosol [11, 14, 15]. Esto hace a las triosas-P un punto clave de comunicación entre el citoplasma y los cloroplastos. Una vez en el citosol, las triosas-P también pueden emplearse para la síntesis de sacarosa (Suc) o bien metabolizarse por la glucólisis para proveer energía y esqueletos carbonados a la célula [2].

Las plantas son organismos con diferentes órganos y tejidos especializados [16, 17], los cuales pueden clasificarse en tejidos fuente o sumidero, según exporten o importen carbono, respectivamente [2, 16, 18]. Esta clasificación en tejido fuente o sumidero no es estática y existen transiciones entre ambas fases. Así, las hojas jóvenes dependen del carbono importado durante la fase de crecimiento, hasta que maduran y se vuelven autotróficas, capaces de fijar carbono, que exportan al resto de la planta [16]. Otra transición importante es la que ocurre durante la germinación de las semillas, las cuales en un principio se alimentan de los compuestos de reserva y no fijan carbono, por lo que poseen un metabolismo heterotrófico [19]. Luego, cuando se expanden las primeras hojas, se desarrolla el aparato fotosintético y adquieren un metabolismo autotrófico [20].

1.1.5 La síntesis y el transporte de Suc.

El carbono fijado por la fotosíntesis en las hojas se transporta a los distintos tejidos de la planta en la forma del disacárido no reductor Suc, mientras que el transporte de nitrógeno se realiza como aminoácidos [21]. Además, en ciertas plantas el carbono también puede transportarse como azúcares alcoholes (glucitol o manitol) en especies de la familia *Rosaceae*, o bien como rafinosa u oligosacáridos derivados de la misma (estaquiosa y verbascosa, entre otros), en el caso de las familias *Cucurbitaceae* y *Leguminosae* [2, 17, 22] (Figura 3).

La síntesis de Suc comienza con la producción de Fru-1,6-bisP a partir de Ga3P y DHAP por la Fru-1,6-bisP aldolasa (EC 4.1.2.13). Luego, la Fru-1,6-bisP es desfosforilada a Fru-6P por la Fru-1,6-bisP 1-fosfatasa citosólica (EC 3.1.3.11). A continuación, la Glc-6P isomerasa (EC 5.3.1.9) convierte a la Fru-6P en Glc-6P y la fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) toma a la Glc-6P y la convierte en Glc-1P. La Glc-1P y el UTP son utilizados por la UDP-glucosa (UDP-Glc) pirofosforilasa (UDP-GlcPPasa, EC 2.7.7.9) para sintetizar UDP-Glc. Finalmente, la Suc-6-fosfato sintasa (EC 2.4.1.14) usa como sustratos a la UDP-Glc y la Fru-6P para sintetizar la Suc-6-fosfato, que luego es desfosforilada a Suc por una fosfatasa específica (EC 3.1.3.24) [23] (Figura 3).

Así como las hojas se especializaron en la fijación del CO₂, las raíces lo hicieron en la captación de agua y sales minerales del suelo [17]. Para intercambiar los nutrientes entre los distintos órganos existen dos conductos distribuidores. Uno es el xilema, que lleva los nutrientes de las raíces al tallo y las hojas, y el otro es el floema, que lleva los azúcares de las hojas a las raíces, los brotes y los órganos reproductivos [17]. Para que la Suc, como así también los aminoácidos y otros nutrientes, se transporten al resto de los tejidos es necesario que sean cargados al floema [24]. El floema es un tejido complejo formado por diferentes tipos celulares: las células cribosas, encargadas de conducir los azúcares y otros nutrientes a través de la planta, y las células acompañantes, que transportan los fotosintatos de las células productoras en las hojas maduras hacia los elementos cribosos de las venas menores de las hojas [6]. La Suc puede cargarse por dos caminos diferentes: la ruta apoplástica, que ocurre a través del espacio de la pared celular entre las membranas plasmáticas de dos células adyacentes, o la ruta simplástica, que ocurre a través de los plasmodesmos de dos células adyacentes [2, 24].

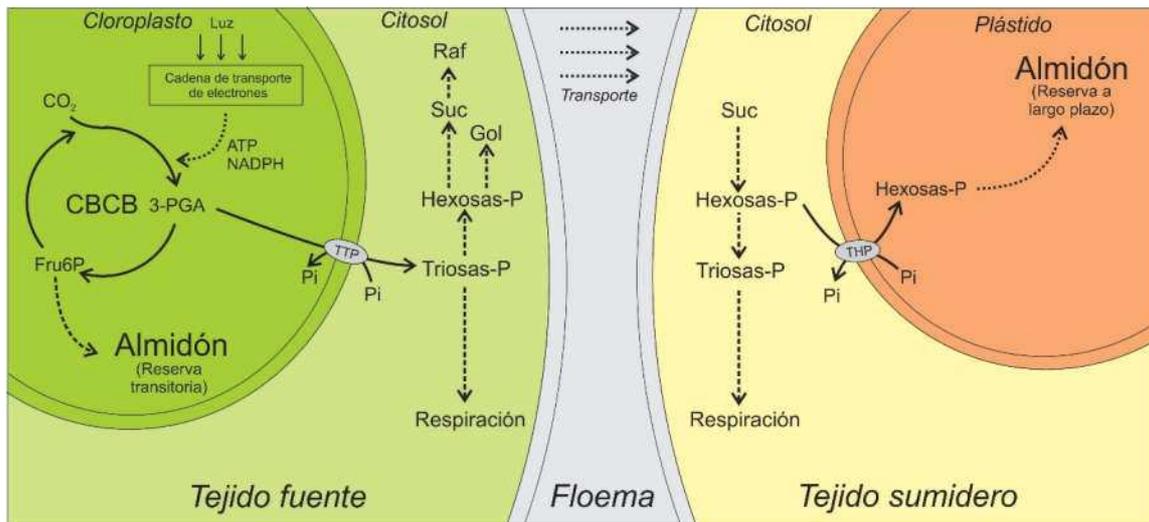


Figura 3. Partición intra- e intercelular del carbono en las células vegetales. Las líneas discontinuas corresponden varios pasos consecutivos. TTP; transportador de triosas-P/Pi, THP; transportador de hexosas-P/Pi, CBCB; ciclo de Benson-Calvin-Basham.

1.2 El metabolismo del carbono en células heterótrofas.

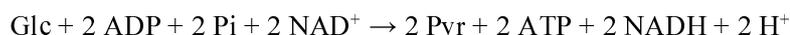
En los tejidos de reserva de las plantas, como los tubérculos y las semillas, se desarrolla un metabolismo heterotrófico orientado a utilizar la Suc proveniente de los tejidos fuente. La Suc se puede utilizar para suplir los requerimientos energéticos del tejido, o bien para sintetizar compuestos de reserva. Estos compuestos que se almacenan a largo plazo, pueden ser almidón, lípidos y proteínas [2, 3], y se acumulan en diferentes proporciones dependiendo de la especie vegetal [25]. Las plantas oleaginosas como el girasol, el ricino, la soja y Arabidopsis acumulan en sus semillas aceites en la forma de triacilglicéridos (TAGs). Por esto, en las semillas el metabolismo transita en dos fases. En la primera fase se acumulan los compuestos de reserva, por lo cual se debe catabolizar la Suc para obtener el carbono y la energía necesaria para la síntesis de los mismos. En la segunda fase estos compuestos de reserva se degradan durante la germinación para ser empleados como alimento por la plántula naciente [26].

1.2.1 La glucólisis.

La glucólisis es una vía catabólica anaeróbica con dos funciones principales: oxidar las hexosas para generar ATP, poder reductor y piruvato (Pyr) y generar los intermediarios metabólicos necesarios para las reacciones biosintéticas [27, 28]. Además, salvo por algunos pasos irreversibles

que requieren reacciones distintas, puede funcionar de forma inversa para generar hexosas a partir de varios compuestos de bajo peso molecular mediante la gluconeogénesis [29]. Esta vía se encuentra en casi todos los seres vivos, aunque en algunos de ellos ha adquirido modificaciones que le imparten características particulares [28].

La glucólisis clásica ocurre en el citosol y consiste en una secuencia lineal de 10 reacciones que degrada una molécula de Glc para generar dos de Pyr, además de dos de ATP y NADH, según la reacción global:



Para que la Glc ingrese a la glucólisis primero debe ser fosforilada a Glc-6P por la hexoquinasa (EC 2.7.1.1), que utiliza ATP como dador de fosfato. Luego, la fosfoglucoisomerasa (EC 5.3.1.9) convierte a la Glc-6P en Fru-6P, la que a su vez es fosforilada a Fru-1,6-bisP por la fosfofructoquinasa dependiente de ATP (ATP-PFKasa, EC 2.7.1.11). A continuación, la Fru-1,6-bisP aldolasa (EC 4.1.2.13) escinde a la Fru-1,6-bisP en dos moléculas de triosa-P, una de Ga3P y otra de DHAP, las cuales están en equilibrio gracias a la triosa-P isomerasa (EC 5.3.1.1). Luego, la Ga3PDHasa oxida el Ga3P a 1,3-bisfosfoglicerato (1,3-bisPGA). El 1,3-bisPGA generado por fosforólisis acoplada a la oxidación, a expensas del Pi, contiene un enlace fosfato de alto contenido energético en la posición 1 que es empleado por la 3-PGAKasa para realizar una fosforilación a nivel de sustrato del ADP para generar ATP y 3-PGA. Puesto que se forman dos moléculas de triosa-P por cada molécula de Glc que ingresa a la glucólisis, en esta etapa se generan dos moléculas de ATP por molécula de Glc metabolizada. Luego, el 3-PGA es convertido en 2-fosfoglicerato por la fosfogliceratomutasa (EC 5.4.2.12). El paso siguiente es catalizado por la enolasa (EC 4.2.1.11) e implica una deshidratación y redistribución de la energía dentro de la molécula, lo cual eleva el fosfato de la posición dos al estado de alta energía, formándose fosfo*eno*piruvato (PEP). El fosfato de alta energía del PEP es transferido al ADP por la Pyr quinasa (PyrKasa, EC 2.7.1.40) para generar dos moléculas más de ATP por molécula de Glc oxidada, generándose Pyr como producto. A continuación, este Pyr puede ser transportado a las mitocondrias, donde es empleado como fuente de carbono y energía para las reacciones de respiración y biosíntesis (Figura 4).

Las plantas poseen en su metabolismo una serie de particularidades que les brindan una marcada flexibilidad, requisito necesario para sobrellevar su estilo de vida sésil y poder desarrollarse y aclimatarse a las situaciones adversas que les impone el medioambiente [29, 30]. Una particularidad de las plantas es la duplicación de la vía glucolítica, con una que funciona dentro de los plástidos y otra en el citosol (Figura 4). Ambas vías interaccionan entre sí mediante el flujo de metabolitos, lo

cual es posible por la presencia de transportadores ubicados en la membrana interna de los plástidos [27]. La otra particularidad es la presencia de caminos alternativos para metabolizar varios de los intermediarios involucrados en etapas clave del proceso [28, 29]. Estos pasos enzimáticos alternativos se encuentran a nivel de la Suc, la Fru-6P, el Ga3P y el PEP, y están catalizados por enzimas no convencionales.

En virtud de que las plantas utilizan a la Suc como molécula de transporte a través de sus tejidos, se la podría considerar como el punto de inicio de la glucólisis. En el caso de las células no-fotosintéticas que reciben el carbono y la energía en forma de Suc, se necesitan pasos adicionales a la glucólisis clásica para desdoblar este disacárido e incorporarlo a su metabolismo [18, 23]. Estos pasos también son necesarios en aquellas plantas que transportan azúcares alcoholes y oligosacáridos de rafinosa [3]. La ruptura de la Suc puede ser llevada a cabo por dos enzimas distintas: la invertasa (EC 3.2.1.26), que la degrada a Glc y Fru; o la Suc sintasa (EC 2.4.1.13), que la hidroliza a Fru y UDP-Glc [3, 18, 31] (Figura 4). La actividad de una u otra enzima puede predominar según el tejido o estadio de desarrollo y, dependiendo de la enzima que catalice la reacción, los productos son incorporados al metabolismo celular de distinta manera. La Glc y la Fru generadas por las invertasas serán fosforiladas en el carbono-6 por la hexoquinasa para generar Glc-6P y Fru-6P. En cambio, la UDP-Glc es convertida a Glc-1P mediante la UDP-GlcPPasa en una reacción que genera UTP y utiliza PPi. Luego, la Glc-1P es convertida a Glc-6P mediante la fosfoglucomutasa (EC 5.4.2.2) y continúa siendo metabolizada por la vía glucolítica o es transportada al plástido (Figura 4). A pesar de las diferencias iniciales en la degradación de Suc, la conversión a Glc-6P es el punto común en las dos vías de hidrólisis del disacárido, metabolito que puede ser particionado entre diferentes vías metabólicas [18, 23, 32].

Otra bifurcación ocurre al nivel de la Fru-6P, que puede ser convertida a Fru-1,6-bisP mediante la ATP-PFKasa clásica o bien mediante la fosfofructoquinasa dependiente de PPi (PPi-PFKasa, EC 2.7.1.90) (Figura 4). Esta última enzima, cataliza una reacción reversible que se encuentra cercana al equilibrio *in vivo* y utiliza PPi como dador del grupo fosfato en lugar de ATP [27, 33]. Esta bifurcación es ventajosa para la conservación de energía y se vuelve especialmente relevante bajo condiciones de depleción de Pi. En esta situación hay un drástico descenso en las concentraciones de ATP y ADP, lo cual se vuelve un factor limitante para el metabolismo, mientras que los niveles de PPi tienden a ser constantes [34]. La PPi-PFKasa es marcadamente activada por niveles micromolares de fructosa-2,6-bisfosfato (Fru-2,6-bisP) y plantea una bifurcación crítica del paso catalizado por la ATP-PFKasa que es altamente regulado [27]. Desde su descubrimiento, los numerosos estudios realizados con la PPi-PFKasa han llevado a la idea de que podría considerársela como una enzima adaptativa, involucrada fundamentalmente en la glucólisis en lugar de la

gluconeogénesis, capaz de dar a la planta la flexibilidad de adaptar su metabolismo a situaciones de estrés [23].

A nivel del Ga3P se genera otra bifurcación debido a la presencia de dos deshidrogenasas diferentes, la Ga3PDHasa y la np-Ga3PDHasa, las cuales pueden direccionar este metabolito siguiendo dos caminos diferentes, como se explicó anteriormente (Figura 4). Con respecto al PEP, en la glucólisis clásica es convertido a Pyr y ATP por la PyrKasa; sin embargo, en el citosol de las células vegetales el PEP puede ser convertido en OAA mediante la PEP carboxilasa (PEPCasa, EC 4.1.1.13) que utiliza bicarbonato y no sintetiza ATP. El OAA producido es convertido luego a malato mediante la malato deshidrogenasa (MDHasa, EC 1.1.1.37) dependiente de NAD^+ , pudiendo el malato ser transportado a la mitocondria o al plástido, donde es utilizado en vías metabólicas biosintéticas. Dentro de las organelas, el malato es convertido a Pyr mediante la enzima málica dependiente de NAD^+ (NAD-ME, EC 1.1.1.39) o de NADP^+ (NADP-ME, EC 1.1.1.40), respectivamente [18, 23, 27] (Figura 4). Este cortocircuito generado por el conjunto PEPCasa/MDHasa/NAD(P)-ME es importante durante la depleción nutricional de Pi, cuando la actividad de la PyrKasa se encuentra limitada por las bajas concentraciones de ADP [27].

El funcionamiento de la glucólisis es diferente en los distintos tejidos de las plantas y ante los diferentes estadios fisiológicos. Por ejemplo, durante los periodos de luz son las triosas-P, en lugar de las hexosas-P, los principales intermediarios fotosintéticos que van a ingresar a la glucólisis [18]. Además, los transportadores presentes en la membranas de los plástidos también pueden variar según si el tejido tiene o carece de capacidad fotosintética [35].

1.2.2 La síntesis de compuestos de reserva en plantas.

Las plantas almacenan, en sus tejidos de reserva, almidón, lípidos o proteínas en diferentes proporciones. A diferencia del almidón transitorio que se acumula en los cloroplastos de los tejidos verdes, en los tejidos heterotróficos el almidón se almacena en los amiloplastos como reserva de largo plazo [23]. El primer paso en la síntesis de almidón es realizado por la fosfoglucomutasa, que convierte la Glc-6P en Glc-1P. Luego, la Glc-1P es utilizada por la ADP-glucosa (ADP-Glc) pirofosforilasa (ADP-GlcPPasa, EC 2.7.7.27) para sintetizar ADP-Glc empleando ATP como cofactor. Esta ADP-Glc luego es utilizada por la almidón sintasa (EC 2.4.1.21) para elongar una cadena de α -1,4-glucano que conforma la amilosa y luego la enzima ramificante (EC 2.4.1.18) completa el proceso formando las ramificaciones α -1,6 presentes en la porción amilopectina del almidón [23]. La reacción catalizada por la ADP-GlcPPasa es el paso limitante para la síntesis del polisacárido [36, 37]. A pesar de que termodinámicamente esta reacción es libremente reversible, en la célula funciona en el sentido de síntesis de ADP-Glc debido a la hidrólisis de PPi por las pirofosfatasas [38] y el empleo del nucleótido-azúcar por la almidón sintasa [23]. La ADP-GlcPPasa no sólo es regulada alostéricamente por metabolitos [37, 39–41], sino que también está regulada por mecanismos de óxido-reducción [42, 43] y fosforilación [44].

El carbono almacenado en la forma de lípidos se encuentra más reducido que en los azúcares, es por esto que el catabolismo de los primeros libera el doble de energía que el de carbohidratos [45, 46]. Los TAGs se sintetizan en los plástidos de los tejidos heterotróficos y luego se almacenan en los cuerpos oleosos, unas organelas esféricas simples formadas por una monocapa de fosfolípidos con proteínas insertas [47]. Las oleosinas, que son las proteínas insertas más abundantes en las membranas de estas organelas, determinan el tamaño [48, 49] y promueven la repulsión eléctrica entre las vesículas [50] para prevenir que colapsen entre sí durante la maduración, desecación y germinación de las semillas [51, 52]. Además, la repulsión generada por las oleosinas permitiría mantener una importante relación superficie a volumen, dando mayor superficie de acción a las lipasas encargadas de degradar los TAGs [25].

En las oleaginosas, las proteínas de reserva se almacenan en vacuolas especiales presentes en el endosperma y el embrión de las semillas. En *Arabidopsis* se han descrito dos tipos, las 2S albúminas y las 12S globulinas, y su metabolismo durante la germinación es muy importante [53]. Por ejemplo, se ha descrito que en plántulas de la mutante *prt6*, en las cuales el metabolismo de las 12S globulinas se encuentra alterado, el crecimiento está retrasado con respecto a las plántulas salvajes [53].

1.2.3 La degradación de los compuestos de reserva.

Durante la germinación de las semillas, el metabolismo se orienta a degradar los compuestos de reserva almacenados para emplearlos como fuente de carbono y energía hasta que la plántula desarrolla el aparato fotosintético [26]. El catabolismo de los TAGs depende de una secuencia de reacciones metabólicas que se desarrollan en diferentes compartimientos subcelulares y pueden agruparse en cuatro fases: *i)* la lipólisis, *ii)* la β -oxidación, *iii)* el ciclo del glioxilato, y *iv)* la gluconeogénesis.

1.2.3.1 La lipólisis.

El primer paso para degradar los TAGs consiste en hidrolizarlos a 3 moléculas de ácidos grasos libres (AGs) y una de glicerol (Gro), lo cual es llevado a cabo de forma secuencial por tri-, di- y mono-acilglicerolipasas. Estas lipasas se ubican en la interfase entre el aceite y el agua de los cuerpos oleosos y, si bien han sido estudiadas en varias oleaginosas, existen en la literatura diferencias importantes respecto a las actividades enzimáticas, la localización subcelular y la regulación [54]. *Arabidopsis* posee dos genes codificantes para TAG lipasas (EC 3.1.1.3); *sdp1* y *sdp1L*. Durante la germinación de semillas mutantes nulas en estos genes, la hidrólisis de los TAGs se reducen en un 70 y 90% para las mutantes simples y dobles, respectivamente [55, 56]. Los AGs liberados en este paso son transportados al peroxisoma por un transportador específico para ser catabolizados mediante la β -oxidación [25, 54].

Estudios realizados en semillas de ricino en germinación, demostraron que el Gro generado por la hidrólisis de los TAGs puede ser incorporado al metabolismo para sintetizar Suc mediante la gluconeogénesis, o bien usarse como sustrato respiratorio [57–59]. Para esto, la Gro quinasa (EC 2.7.1.30) lo fosforila a Gro-3-fosfato (Gro-3P) en el citosol y luego, la Gro-3P deshidrogenasa lo convierte a DHAP. Existen dos isoformas de Gro-3P deshidrogenasas, una citosólica, dependiente de NAD^+ (EC 1.1.1.8) y una mitocondrial, dependiente de FAD (EC 1.1.5.3) [60] (Figura 5).

1.2.3.2 La β -oxidación

Una vez en el peroxisoma, los AGs deben ser activados por esterificación con coenzima A (CoA) para poder ingresar a la vía cíclica de la β -oxidación [61]. Para esto, la acil-CoA sintetasa (EC 6.2.1.3) convierte a los AGs en acil-AMP empleando ATP y luego, el grupo carbonilo del adenilato reacciona con el grupo tiol de la CoA para dar el acil-CoA [62]. Esta esterificación de los AGs a acil-CoA los activa para el ataque oxidativo en la posición del carbono β [25]. En cada ciclo de la β -oxidación una molécula de acil-CoA (n carbonos) es escindida a una molécula de acetil-CoA (2 carbonos). El acil-CoA remanente ($n-2$ carbonos) ingresa nuevamente a la espiral de la β -oxidación

para repetir el proceso nuevamente. El ciclo comienza con la acil-CoA oxidasa (EC 1.3.3.6), que oxida el acil-CoA a trans-2-enoil-CoA y H_2O_2 empleando FAD como cofactor. En plantas, las acil-CoA oxidasas forman una familia de enzimas con diferentes propiedades moleculares y especificidades para AGs de diferente longitud [63, 64]. Luego actúa la proteína multifuncional que posee dos actividades enzimáticas, una hidratasa (EC 4.2.1.17), que lo convierte a hidroxil-CoA y una deshidrogenasa (EC 1.1.1.35), que lo convierte en 3-cetoacil-CoA [25]. La proteína multifuncional también posee las actividades enzimáticas auxiliares necesarias para oxidar ciertos AGs insaturados [65]. Por último, la 3-cetoacil-CoA tiolasa (EC 2.3.1.16) cataliza la ruptura tiolítica del acil-CoA. De esta forma, los productos finales de la β -oxidación son acetil-CoA, H_2O_2 y NADH.

Dada la toxicidad del H_2O_2 para la célula, en los peroxisomas existe abundante actividad catalasa (EC 1.11.1.6) que escinde el H_2O_2 en H_2O y O_2 , para proteger a la célula de su efecto oxidante [66]. Como la membrana del peroxisoma es permeable a pequeños metabolitos, pero no a moléculas de mayor tamaño como el NADH, éste debe ser re-oxidado dentro de esta organela [67–69]. Los mecanismos propuestos para oxidar el NADH involucran a la lanzadera de ascorbato-monodehidroascorbato [25] y a la MDHasa peroxisomal (EC 1.1.1.37) [25, 70]. Finalmente, el acil-CoA es transportado al glioxisoma, para ser metabolizado por el ciclo del glioxilato.

1.2.3.3 El ciclo del glioxilato.

El ciclo del glioxilato ocurre en unas organelas especializadas llamadas glioxisomas, las cuales están formadas por una monocapa fosfolipídica [25, 71]. Este ciclo es una forma modificada del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, en el cual se saltan los pasos en los que ocurre la descarboxilación. De esta manera, este ciclo permite producir nuevos esqueletos carbonados, sin perder carbono como CO_2 en el proceso [72]. Tres de las cinco enzimas que actúan en este ciclo se encuentran también en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos: la citrato sintasa (EC 4.1.3.7), la aconitasa (EC 4.2.1.3) y la MDHasa. Las dos enzimas restantes son exclusivas de esta vía y son las encargadas de saltar los pasos descarboxilativos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos: la isocitrato liasa (EC 4.1.3.1) y la malato sintasa (EC 4.1.3.2), que se encargan de convertir al acetil-CoA en citrato y malato, respectivamente [72]. Durante la germinación de las semillas, la isocitrato liasa, la malato sintasa y la citrato sintasa se ubican en el peroxisoma, mientras que la aconitasa y la MDHasa lo hacen en el citosol [72]. Es por esto que la operación del ciclo del glioxilato precisa del transporte de los metabolitos a través de la membrana del glioxisoma, aunque estos mecanismos de transporte aún son desconocidos [25]. A pesar de que los peroxisomas de *Arabidopsis* poseen dos isoformas de la MDHasa, estas proteínas no participan en el ciclo del glioxilato, sino que operan en conjunto con enzimas extra-peroxisomales en una lanzadera redox para regenerar el NAD^+ [54].

1.2.3.4 La gluconeogénesis.

El malato sintetizado en el ciclo del glioxilato es convertido a OAA por la MDHasa, y luego, este OAA es descarboxilado a PEP por la PEPCKasa dependiente de ATP (EC 4.1.1.49) [73, 74]. La reacción catalizada por la PEPCKasa es la única mediante la cual los eucariotas pueden saltar la reacción irreversible catalizada por la PyrKasa [25]. Por otra parte, el Pyr resultante del metabolismo de los aminoácidos Ala, Cys, Gly, Ser, Thr, Trp, provenientes de la degradación de las proteínas de reserva, es canalizado hacia el flujo gluconeogénico por la Pyr Pi diquinasa (PPDKasa, EC 2.7.9.1) [75].

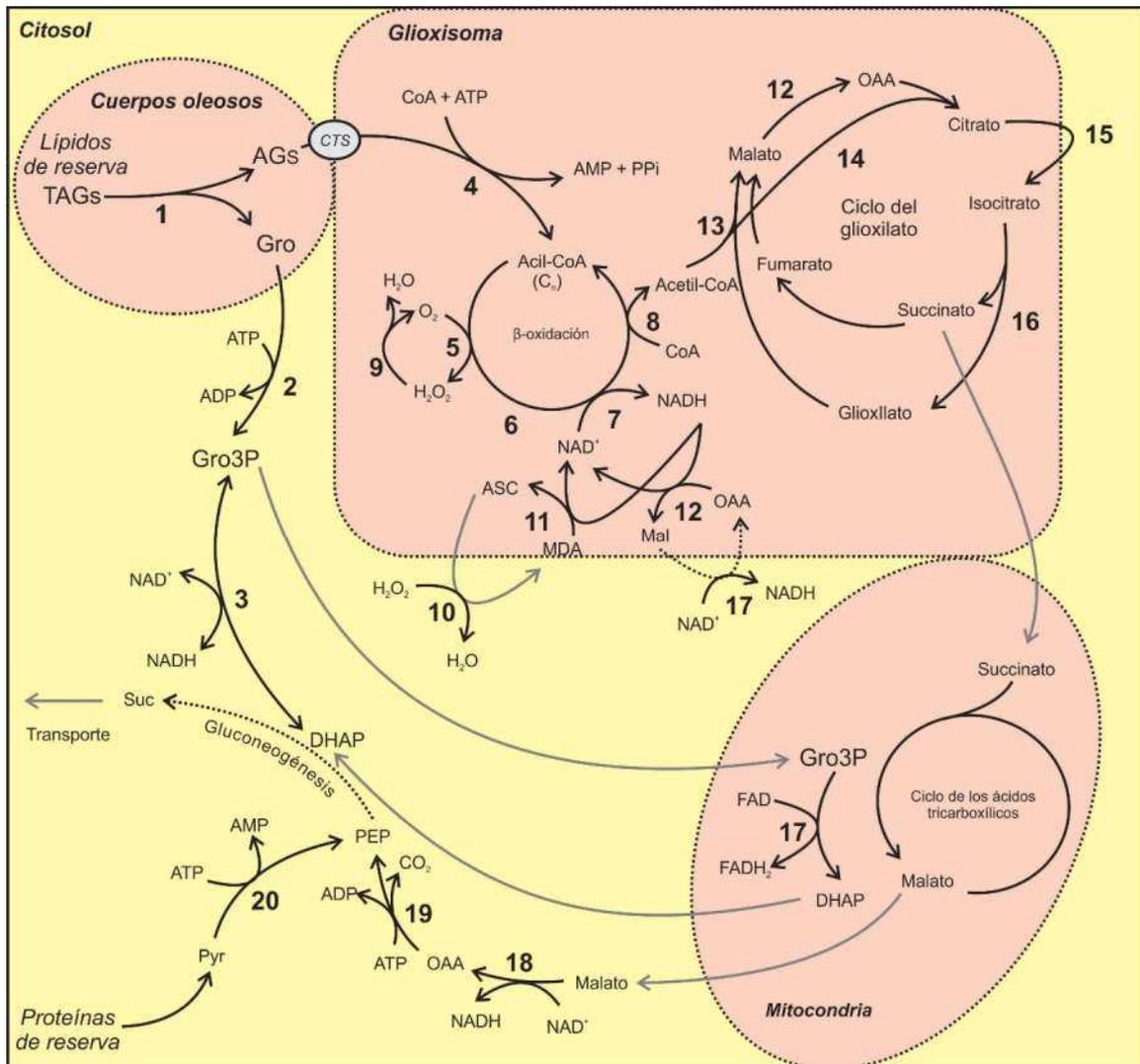


Figura 5. Vías metabólicas y compartimentos subcelulares implicados en la conversión de los aceites de reserva en sacarosa durante la germinación de las semillas. Los números corresponden a las enzimas: 1) TAGs lipasas, 2) Gro quinasa, 3) Gro-3P deshidrogenasa citosólica, 4) acil-CoA sintetasa de cadena larga, 5) acil-CoA oxidasa, 6) proteína multifuncional-hidratasa, 7) proteína multifuncional-deshidrogenasa, 8) 3-cetoacil-CoA tiolasa, 9) catalasa, 10) ascorbato peroxidasa, 11) monodehidroascorbato reductasa, 12) MDHasa glioxisomal, 13) malato sintasa, 14) citrato sintasa, 15) aconitasa, 16) isocitrato liasa, 17) Gro-3P deshidrogenasa mitocondrial, 18) MDHasa citosólica, 19) PEPCKasa, 20) PPDKasa, CTS) transportador de AGs. Las líneas de puntos resumen varios pasos enzimáticos y las grises pasos de transporte.

1.3 El metabolismo del PEP

El PEP es un intermediario clave en el metabolismo de todos los organismos vivos, puesto que funciona como un punto de conexión entre la glucólisis, la gluconeogénesis y el metabolismo de los ácidos carboxílicos [76]. Este rol clave se debe a que es un compuesto con un alto contenido energético, ubicado en la posición más alta en la escala de los metabolitos fosforilados. La hidrólisis del PEP posee un ΔG de -14,8 kcal, contra -7,3 y -3,3 kcal para el fosfato terminal del ATP y la Glc-6P, respectivamente [77]. Esta alta energía de hidrólisis se debe en parte a que el equilibrio entre la formas *ceto* y *enol* del Pyr está favorecida hacia la forma *ceto*, puesto que la *enol* posee una energía considerablemente más elevada [77, 78]. Por otra parte, el PEP participa en una gran variedad de reacciones debido a que el corte enzimático a cada lado del átomo de oxígeno *enol* produce dos grupos activos diferentes: el corte del enlace C-O produce uno pirúvico y el carbono O-P uno fosforilo [77].

El rol central del PEP en el metabolismo se pone en evidencia por las diferentes enzimas que lo utilizan como sustrato y que lo reparten hacia diferentes vías metabólicas del metabolismo primario y secundario [77, 78] (Figura 6). Además, en las plantas su importancia es mayor porque participa en la regulación de “abajo hacia arriba” de la glucólisis, pues inhibe fuertemente a las ATP-PFKs y PPI-PFKs, actuando como un regulador del flujo a través de esta vía [28, 29, 78]. De esta forma, el PEP es una señal metabólica que actúa como un efector alostérico de numerosas enzimas citosólicas y plastídicas [27, 30, 77, 79–81].

La función del PEP como nodo de bifurcación del metabolismo se evidencia en la conservación evolutiva de su unión estereoquímica a diferentes enzimas que catalizan el reemplazo alélico del fosfato. En las reacciones catalizadas por la PEPCasa, la PyrKasa, la PEPCKasa, la 3-deoxi-7-fosfoheptunolato (DAHP) sintasa (EC 2.5.1.54) y la 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), la sustitución ocurre en la cara *si* del carbono-2, a pesar de que no existe ninguna ventaja en la orientación de la cara *re* o *si* del PEP hacia el ataque de un agente electrofílico [77, 82–84]. El hecho de que en todas estas enzimas la sustitución ocurra en la fase *si* sugiere que una vez dada la evolución del sitio de unión al PEP, la estructura básica fue retenida cuando las distintas vías metabólicas evolucionaron [77, 84].

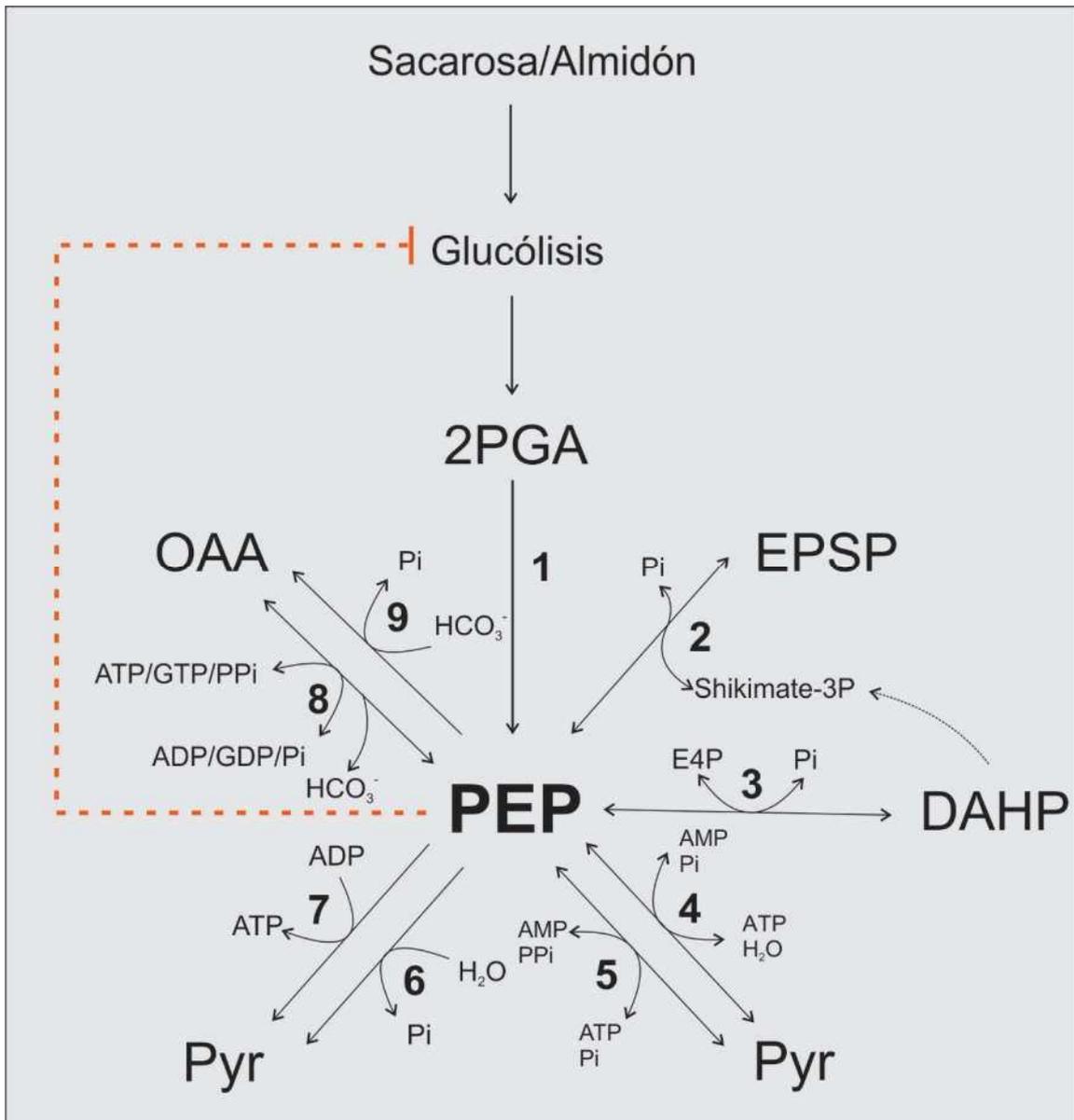


Figura 6. Enzimas involucradas en el metabolismo del PEP. Los números corresponden a las enzimas involucradas en el metabolismo del PEP; 1) enolasa (EC 4.2.1.11), 2) 3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa (EC 2.5.1.19), 3) DAHP sintasa (EC 2.5.1.54), 4) PEP sintasa (EC 2.7.9.2), 5) PDKasa (EC 2.7.9.1), 6) PEP fosfatasa (3.1.3.60), 7) PyrKasa (EC 2.7.1.40), 8) PEPCKasa dependiente de GTP (EC 4.1.1.32), ATP (EC 4.1.1.49) o PPi (EC 4.1.1.38), 9) PEPCasa (EC 4.1.1.31). DAHP, 3-deoxi-7-fosfoheptunolato; E4P, eritrosa-4-fosfato, ESPS, 5-*eno*piruvilshikimato 3-fosfato. La imagen fue inspirada en el trabajo de Plaxton y O'Leary, 2012 [78].

1.3.1 La PEPCKasa.

1.3.1.1 Mecanismo de reacción.

Las PEPCKasas catalizan la descarboxilación del OAA formando un *enol* de Pyr que luego es fosforilado para dar PEP (Figura 7) [85, 86] mediante un mecanismo conservado de transferencia del fosforilo que ocurre por una sustitución nucleofílica del tipo S_N2 [87]. Aunque *in vitro* esta reacción es totalmente reversible, el funcionamiento de la enzima en el sentido de formación de PEP es el más favorable y sería el sentido de funcionamiento *in vivo*. Esta enzima necesita de dos iones metálicos para ser activa, uno que es necesario para formar un complejo con el sustrato nucleotídico y otro que actúa como cofactor uniéndose a la enzima en ausencia del sustrato [20] (Figura 7). La activación del nucleótido puede ser realizada por el Mg^{+2} y el Mn^{+2} , mientras que el segundo metal, que actúa como cofactor, por lo general es un metal de transición como el Mn^{2+} , Co^{2+} o Ca^{2+} . La función de este segundo metal sería promover la descarboxilación del OAA mediante la formación de complejos y estabilizar el ión enolato durante la catálisis [85, 86, 88].

En lo que respecta al mecanismo de reacción, existen diferentes opiniones en la literatura [85, 86, 89, 90]. Para la PEPCKasa de *E. coli* y levaduras, se ha propuesto un mecanismo cinético del tipo semi-ordenado o totalmente al azar [85, 90], mientras que para la enzima citosólica de rata se ha propuesto un mecanismo ordenado [86]. Sin embargo, en ambos casos se propuso que durante la catálisis se forma un intermediario enolato reactivo, el cual, para mediar efectivamente la conversión química del OAA en PEP, debe ser estabilizado para protegerlo de la protonación que podría desacoplar el consumo de OAA con la producción de PEP mediante la formación de Pyr (Figura 7). En el caso de la enzima de rata, se ha propuesto que para mediar la catálisis, la enzima debe experimentar una transición desde una forma abierta y desordenada a una conformación cerrada, rígida y catalíticamente competente, luego de la unión de los sustratos [86]. Sin embargo, para la enzima de *E. coli*, no se han descrito cambios significativos en la estructura luego de la unión de los sustratos mediante el análisis de la estructura cristalina y estudios espectroscópicos [85, 89].

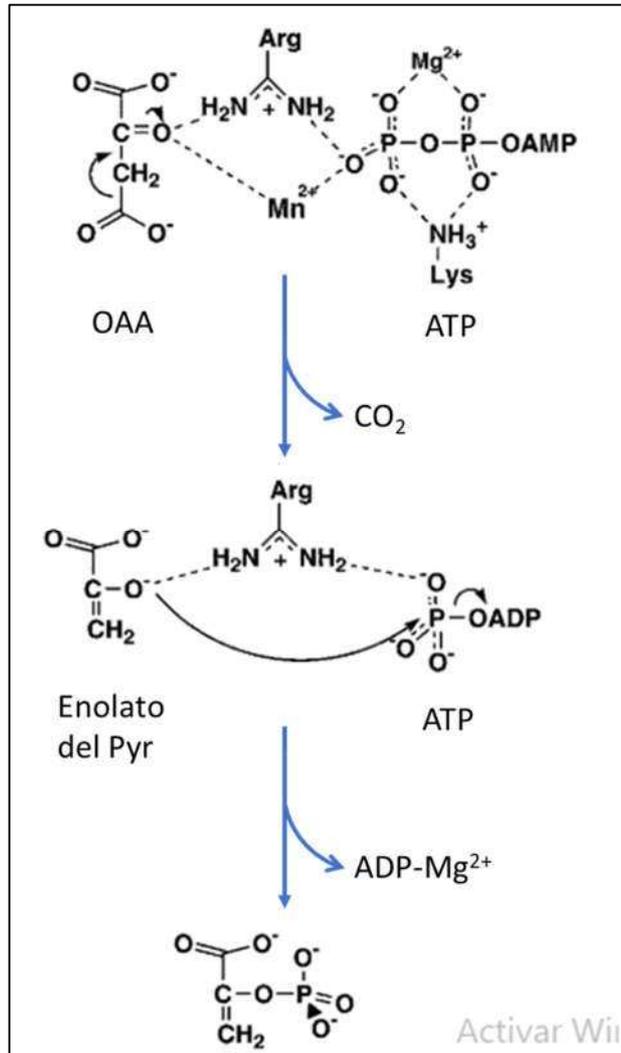


Figura 7. Esquema de reacción propuesto para la PEPCKasa de *E. coli*. La imagen fue adaptada de la figura presente en el trabajo de Matte y col., 1997 [85].

1.3.1.2 Origen evolutivo.

Las PEPCKasas están presentes en todos los seres vivos y se clasifican, de acuerdo con la especificidad de nucleótidos, en dependientes de ATP, GTP o PPi [20]. Las dependientes de ATP se encuentran en bacterias, levaduras y plantas, y las dependientes de GTP en mamíferos, arqueas y un pequeño grupo de bacterias [76, 91, 92]. La distribución de las dependientes de PPi es menos clara. Esta actividad enzimática fue descubierta en 1961 en extractos crudos de *Propionibacterium shermanii* [93]. Sin embargo, recién en el año 2015 se identificó el gen codificante para esta enzima en *Entamoeba histolytica* [76]. Además de la especificidad de sustratos, las diferentes PEPCKasas también difieren en su estructura cuaternaria, siendo las enzimas bacterianas y las dependientes de

GTP monoméricas [85], las dependientes de PPi homodiméricas [94] y las dependientes de ATP homomultiméricas, con cuatro o seis subunidades [95–97].

No existe homología entre las PEPCKasas dependientes de ATP y GTP, sin embargo en su secuencia primaria se encuentran sitios similares de unión a sus sustratos y al metal [85, 91, 92]. Con respecto a las PEPCKasas dependientes de PPi, éstas no poseen ninguno de los dominios catalíticos descritos en las dependientes de ATP y GTP, por lo que la distancia evolutiva en este caso es aún mayor [76]. El origen evolutivo de estas enzimas es bastante confuso, pues no existe homología entre ellas y, en el caso de las dependientes de PPi, tampoco se identifican los dominios consenso de unión a sustratos. Sin embargo, al comparar las estructuras tridimensionales de estas enzimas se observan similitudes, tanto en la conformación de sus dominios N- y C- terminales como en la ubicación de los iones metálicos [94]. Es por esto que se ha propuesto que el punto de divergencia entre las distintas PEPCKasas es anterior al nacimiento del último ancestro común vivo [94].

1.3.1.3 Localización subcelular.

Las PEPCKasas de plantas superiores se localizan en el citosol [98–100]. En el caso de las ATP-PEPCKasas de la diatomea *Skeletonema costatum* y del alga parda *Laminaria setchellii*, se ha descrito una ubicación cloroplástica [101]. La GTP-PEPCKasa de *Euglena gracilis*, también se localiza en el citosol [102]. En el caso de las GTP-PEPCKasas de mamíferos, existe una isoforma localizada en el citosol, que al ser fosforilada se traslada hacia el retículo endoplasmático [103], y otra localizada en la mitocondria [104].

1.3.1.4 Funciones fisiológicas.

1.3.1.4.1 Descarboxilación de ácidos C₄ en la fotosíntesis C₄ y CAM.

El proceso por el cual las plantas fijan el CO₂ por reacción con un azúcar de cinco carbonos a través de la RuBisCO produciendo dos moléculas del compuesto de tres carbono (3-PGA) es denominada fotosíntesis C₃, la cual es un proceso trascendente que sustenta el ciclo de toda la vida en la Tierra [105]. Sin embargo, este metabolismo presenta el problema de la fotorrespiración, la cual es el resultado de la actividad oxigenasa de la RuBisCO, que puede fijar O₂ en lugar de CO₂, generando 3-PGA y 2-fosfoglicolato como productos [105]. Dado que el 2-fosfoglicolato es un compuesto tóxico para la planta, debe ser reciclado mediante la vía de la fotorrespiración, la cual consume energía y provoca la pérdida de las formas orgánicas del carbono y nitrógeno [105].

Durante el transcurso de la evolución, surgió la fotosíntesis C_4 que es una adaptación evolutiva que hizo a un grupo de plantas más productivas, en especial en las zonas tropicales y subtropicales, puesto que permite una mayor productividad en ambientes cálidos y con limitaciones de agua [106]. A pesar de que las plantas C_4 representan sólo el 3% de todas las especies vegetales, son responsables de aproximadamente el 25% de toda la fijación terrestre de CO_2 , lo que las convierte en actores muy importantes del ciclo global del carbono [107]. Este proceso evolutivo, que surgió de forma independiente en diferentes grupos taxonómicos [106, 108], precisó de una serie de adaptaciones morfológicas y metabólicas. La adaptación morfológica implicó una modificación en la estructura de las hojas, diferenciando dos tipos celulares diferentes: las células de la vaina vascular y las del mesófilo, las cuales se configuran en una estructura llamada anatomía de Kranz [6]. La adaptación metabólica, implicó que en las células del mesófilo se concentraron todas las enzimas necesarias para la fijación inicial del CO_2 , mientras que en las de la vaina vascular aquellas involucradas en el CBCB [105].

En las células del mesófilo de las plantas C_4 el CO_2 es convertido a HCO_3^- por la anhidrasa carbónica (EC 4.2.1.1), el cual luego es fijado sobre el PEP por la PEPCasa, generando OAA (un compuesto de 4 carbonos) [106]. Luego, el OAA es reducido a malato o transaminado a Asp, por la MDHasa o la Asp aminotransferasa (EC 2.6.1.1), respectivamente [109]. Estos compuestos de cuatro carbonos son transportados a las células de la vaina vascular, donde son descarboxilados para liberar CO_2 en el entorno donde se localiza la RuBisCO para ser fijado nuevamente. De esta forma, se reduce marcadamente la concentración relativa de oxígeno alrededor de la RuBisCO, reduciendo la fotorespiración y aumentando la eficiencia de todo el proceso [105]. Los diferentes linajes C_4 reclutaron a tres descarboxilasas de ácidos C_4 diferentes; la NADP-ME, la NAD-ME y la PEPCKasa [106, 110]. En los linajes C_4 que transportan principalmente malato a las células de la vaina vascular, éste es descarboxilado en los cloroplastos a Pyr por la NADP-ME. En cambio, otros linajes transportan principalmente Asp a las células de la vaina vascular, el cual es desaminado a OAA por la Asp aminotransferasa y luego el OAA es convertido a Pyr por la acción secuencial de la NADP-MDH y la NAD-ME. El Pyr resultante puede ser convertido a Ala por la acción de la Ala aminotransferasa (EC 2.6.1.2). En el tercer linaje, que puede transportar tanto malato como Asp a las células de la vaina vascular, el Asp es descarboxilado por la acción consecutiva de la Asp aminotransferasa y la PEPCKasa, mientras que el malato es descarboxilado a través de la NAD-ME mitocondrial [111]. Finalmente, los intermediarios generados (Pyr, PEP y Ala) regresan a las células del mesófilo para reanudar el ciclo [105].

De acuerdo con la principal descarboxilasa empleada en el proceso, se pudo establecer una clasificación en tres subtipos diferentes. Sin embargo, se ha demostrado que las vías de descarboxilación son relativamente flexibles y operarían de forma simultánea en muchas especies [109, 111]. Por ejemplo, el maíz se clasifica como una planta del subtipo NADP-ME, pero estudios de marcado con $^{13}\text{CO}_2$ y $^{14}\text{CO}_2$ demostraron que si bien la mayoría del carbono es incorporado como malato, una parte sustancial se fija como Asp [112, 113]. Además, las células de la vaina vascular aisladas de hojas de maíz poseen actividad PEPCKasa [114] y pueden usar el Asp para producir CO_2 [115]. Por esto, se ha propuesto que el nivel de descarboxilación del Asp podría variar de acuerdo con las distintas situaciones del desarrollo o el ambiente [113, 115].

Una estrategia fotosintética diferente que también fue adquirida durante la evolución de las plantas es el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM), en la cual se fija el CO_2 en un ácido C_4 pero en este caso existe una separación temporal con respecto al funcionamiento del CBCB [116, 117]. Este metabolismo recibe su nombre por la prominencia que tiene en las plantas de la familia de las crasuláceas (que incluye a los cactus, al ananá, la vainilla y el agave, entre otras), pero también ha sido descrito en otras familias de angiospermas [6]. Las plantas CAM poseen una alta eficiencia en el uso del agua, lo que les permite habitar ambientes desérticos extremos. Esta eficiencia la logran al abrir sus estomas para tomar el CO_2 ambiental durante las noches frías y húmedas y mantenerlos cerrados durante los días calurosos y secos, reduciendo al mínimo la transpiración [6, 116, 117].

Durante la noche, estas plantas abren sus estomas para permitir el ingreso del CO_2 , que es disuelto en el citosol a HCO_3^- por la anhidrasa carbónica. Luego, la PEPCKasa fija el HCO_3^- a OAA, el cual luego se reduce a malato por la MDHasa y se almacena en la vacuola. Durante el día, las plantas mantienen cerrados sus estomas para evitar la pérdida de agua por evaporación. En esta condición, el malato almacenado sale de la vacuola para ser descarboxilado por la NAD(P)-ME o la PEPCKasa, liberando el CO_2 en la cercanía de la RuBisCO para ser fijado por el CBCB [6, 118]. A pesar de que el proceso de acidificación y desacidificación diurna en las hojas en las crasuláceas fue descrita en el año 1920 [119], los mecanismos moleculares que subyacen a este metabolismo aún no han sido completamente dilucidados. El análisis de diferentes especies con metabolismo CAM permitió agruparlas en dos grandes grupos: uno que utiliza las NAD(P)-ME para descarboxilar el malato (y en la que no se detecta actividad PEPCKasa) y un segundo grupo que utiliza a la PEPCKasa (y que posee muy baja actividad NAD(P)-ME) [118, 120]. De esta forma, en el metabolismo CAM se establecieron dos caminos diferentes de descarboxilación del ácido C_4 , similar a lo descrito anteriormente para la fotosíntesis C_4 .

1.3.1.4.2 Fijación del CO₂ atmosférico en algas.

Se ha sugerido la existencia de un metabolismo del tipo C₄ en algas, aunque la evidencia hasta el momento no es concluyente [121]. En un trabajo realizado en el alga marina *Udotea flabellum*, la cual posee una fotosíntesis similar al tipo C₄ pero no posee una compartimentación celular del tipo Kranz, se observó que la actividad carboxilasa de la PEPCKasa era equivalente a la de la RuBisCO [100]. Además, al inhibir a la PEPCKasa con el inhibidor específico ácido 3-mercaptopicolínico la fotosíntesis disminuyó en un 70% [100]. Por otra parte, en la diatomea *Thalassiosira weissflogii* se describió un metabolismo del tipo C₄, en la cual la PEPCKasa tendría un rol en la descarboxilación de los ácidos C₄ [122]. De forma sorprendente, en las diatomeas *Skeletonema costatum* y *Laminaria setchellii* se determinó para la PEPCKasa una localización cloroplastídica, lo que coincidiría con el rol de esta enzima como descarboxilasa que entrega el CO₂ en la cercanía de la RuBisCO [101].

1.3.1.4.3 Gluconeogénesis en semillas oleaginosas.

El rol clave de la PEPCKasa en la gluconeogénesis ha sido establecido en bacterias [123, 124], levaduras [125, 126], mamíferos [104, 127] y plantas [128, 129]. El rol de esta enzima en la gluconeogénesis vegetal fue determinado en el año 1978, cuando Leegood y Ap Rees [128, 129] encontraron la actividad PEPCKasa en extractos crudos de *Cucurbita pepo* y purificaron la enzima a partir de estos tejidos. Además, mediante el empleo de ácido 3-mercaptopiconílico, lograron frenar el flujo gluconeogénico. Posteriormente, se determinó que la acumulación de la PEPCKasa coincidía con el de otras enzimas gluconeogénicas (isocitrato liasa y malato sintasa) en los cotiledones de *Cucurbita pepo* y *Cucurbita sativus* [130], *Arabidopsis thaliana* [131] y *Ricinus comunis* [132] a los pocos días de la imbibición de las semillas.

Mediante estudios genéticos llevados a cabo en *Arabidopsis* fue posible profundizar el conocimiento sobre el rol fisiológico de la PEPCKasa. *Arabidopsis* es un organismo modelo para el cual se han desarrollado gran cantidad de herramientas que la hacen ideal para este tipo de estudios: posee el genoma secuenciado con un alto nivel de confianza, existen colecciones de mutantes insercionales por T-DNA y protocolos sencillos de transformación genética. *Arabidopsis* posee dos genes codificantes para ATP-PEPCKasas: *PEPCK1* (At4g37870) y *PEPCK2* (At5g65690). El gen *PEPCK1* es el que más se expresa durante la germinación de las semillas, siendo el gen *PEPCK2* de expresión menos abundante y más restringida a otros órganos de la planta [74]. A través del estudio de líneas silenciadas por la tecnología de ARN antisentido [74] y de mutantes insercionales nulas [133] en el gen *PEPCK1*, se determinó el rol clave de esta enzima en el flujo gluconeogénico. Estas líneas mutantes estaban seriamente afectadas en el crecimiento de las plántulas en un medio de cultivo basal sin el agregado externo de una fuente de carbono. De forma opuesta, al crecer las semillas en

medio suplementado con Suc, el crecimiento era normal [74, 133]. Una vez que las plántulas desarrollaban aparato fotosintético, no se observaban diferencias con las plantas salvajes. Además, estas mutantes no tenían alteraciones en la tasa de catabolismo de los lípidos de reserva, pero sí existía una disminución en los niveles de azúcares solubles en las plántulas. Sin embargo, cuando las mutantes se crecían bajo condiciones de iluminación subóptimas o bien en la oscuridad, el crecimiento estaba aún más afectado y la elongación del hipocótilo se veía reducido en comparación con las plántulas salvajes. Esta reducción en la elongación del hipocótilo se obtenía también al eliminar el endosperma de las semillas, tejido en el cual las plantas oleaginosas almacenan los lípidos. Es por esto que ambos fenotipos podían explicarse como el resultado de una reducción en las cantidades de Suc que llegaban al embrión desde el endosperma [73].

Si bien las mutantes *pepck1* poseen un desarrollo afectado en comparación con las plantas salvajes, las plántulas llegan a desarrollar su aparato fotosintético y a convertirse en plantas adultas. Esto indicaba que el paso catalizado por la PEPCKasa, si bien era importante, no representaba la única vía por la cual podría fluir el carbono hacia la gluconeogénesis [73, 74]. Un trabajo posterior realizado por Eastmond y col. [75], determinó que *Arabidopsis* utiliza dos caminos diferentes para canalizar el carbono proveniente de degradación de las reservas hacia la gluconeogénesis. Uno es el camino clásico catalizado por la PEPCKasa, que direcciona el flujo de carbono proveniente de la degradación de los lípidos de reserva. El segundo es un camino catalizado por la PPDKasa, que se encarga de orientar el flujo de carbono proveniente de la degradación de las proteínas de reserva que se acumulan en las semillas (Figura 5). En *Arabidopsis*, la PPDKasa muestra un patrón de expresión similar al de la PEPCKasa, con un pico de expresión alrededor de los 2 días luego de la imbibición y las mutantes en el gen *ppdk* muestran la misma dificultad en el crecimiento de las plántulas. Por otra parte, el crecimiento de las plántulas mutantes dobles *pepck1/ppdk* está seriamente afectado y muestran una típica respuesta de hambruna [75].

1.3.1.4.4 Gluconeogénesis durante la maduración de los frutos.

Los frutos acumulan una gran variedad de compuestos, entre los que se incluyen los ácidos orgánicos [134]. Uno de los ácidos orgánicos predominantes es el malato y su patrón de acumulación varía entre los diferentes frutos y no existe una división clara. Así, algunos frutos climatéricos, como la ciruela y el tomate, parecen utilizar el malato durante el estallido respiratorio; mientras que otros, como el mango y la banana, continúan acumulando malato más allá del estadio de maduración. En aquellos frutos que utilizan el malato como sustrato respiratorio, se da una fase inicial durante el desarrollo en la cual se sintetiza y acumula dentro de la vacuola, y luego, una fase secundaria durante la maduración en la cual es degradado para sintetizar azúcares [134].

El metabolismo del malato ha sido estudiado con gran detalle en las uvas, dado el rol clave que tiene la acidez de los frutos en la fermentación del vino [134]. En las uvas, la Suc transportada desde las hojas ingresa a la glucólisis para ser respirada o bien ser utilizada para la síntesis de malato. El PEP resultante de la glucólisis es convertido en malato a través de la acción de la PyrKasa y la NADP-ME, o bien por la acción combinada de la PEPCasa y la MDHasa [134–138]. Durante el desarrollo de los frutos, se detecta un alto nivel de actividad PEPCasa, lo cual coincide con la acumulación de malato, y luego una disminución abrupta de esta actividad durante la maduración [134].

Una vez que los frutos pasan a la fase de maduración, el metabolismo vira hacia la acumulación de azúcares. En este estadio, se liberan cantidades importantes de malato de la vacuola, induciendo la gluconeogénesis y, en consecuencia, la síntesis de azúcares [134, 137]. En este punto el malato se convierte en azúcares por la acción combinada de la MDHasa y la PEPCKasa, o bien la NADP-ME y la PPDKasa [134]. En este estadio se da un aumento de la actividad PEPCKasa, lo cual coincide con un pico en la degradación del malato. Sin embargo, cabe aclarar que la PEPCKasa también está presente en la fase previa de maduración de los frutos, así como también la PEPCasa se mantiene durante la fase de maduración [134]. Es por esto que probablemente existan sistemas de regulación cruzados para evitar la acción opuesta de ambas enzimas.

En plantas de tomate en las que la PEPCKasa fue silenciada mediante ARN de interferencia ocurrió una disminución en el contenido de azúcares, junto con un aumento en los niveles de malato [139, 140]. Un efecto opuesto se observaba cuando este mismo gen se sobre-expresaba mediante el promotor constitutivo *35S CAMV* o con el promotor específico de frutos *E8* [141]. Además, estas plantas sobre-expresantes mostraron una germinación adelantada y mejor crecimiento de las plántulas, como así también un mejor crecimiento ante el agregado exógeno de Suc.

1.3.1.4.5 Respuesta al estrés.

En *Arabidopsis*, la expresión del gen *PEPCK1* ocurre en los hidátodos, los tricomas y las células de la guarda, estructuras que participan en la respuesta a estrés biótico [142–144]. En plantas de *Capsicum annuum*, se aisló el gen codificante para una PEPCKasa a partir de una biblioteca de cDNA enriquecida en genes de respuesta al estrés biótico, construida a partir de hojas de plantas infectadas con una cepa avirulenta de *Xanthomonas* [145]. Frente a la infección, aumentaba tanto la expresión del gen como la actividad PEPCKasa, lo que hacía suponer el rol de esta enzima en la respuesta al estrés biótico. Además, el silenciamiento de este gen hacía a las plantas de pimiento más susceptibles a la infección, mientras que la sobreexpresión en *Arabidopsis* aumentaba la resistencia a la infección [145]. En este trabajo, se determinó también que la inducción de este gen se daba por

sequía y frío, como así también por hormonas involucradas en la señalización del estrés, como ácido salicílico, ácido abscísico, etileno y metil-jasmonato.

Con respecto al rol de la PEPCKasa ante el estrés abiótico, las mutantes de *Arabidopsis pepck1* son más susceptibles a la sequía por un funcionamiento deficiente de sus estomas, lo que las lleva a transpirar más [142]. Los estomas son poros microscópicos y ajustables ubicados en la superficie de las hojas, a través de los cuales se toma el CO₂ del medio ambiente y se libera O₂ y H₂O, productos de la fotosíntesis y la transpiración, respectivamente [6, 146, 147]. Estos poros están rodeados por dos células altamente especializadas llamadas células de la guarda, cuya apertura está regulada mediante la modificación del volumen celular (en el orden del 40-50%), producto de la acumulación de osmolitos y agua en el interior de la vacuola [148]. Estos cambios en el volumen celular están regulados por el metabolismo que opera en dichas células, el cual, a su vez, es regulado mediante señales endógenas y ambientales [146].

Durante la apertura de los estomas, se acumula una serie de osmolitos en el interior de la vacuola, siendo el K⁺ el principal. Este ion ingresa a las células de la guarda mediante canales ubicados en la membrana plasmática y luego se importa a la vacuola mediante transportadores que lo intercambian por H⁺ [146]. Como contraiones del K⁺, también se importa a la vacuola malato, cloruro y nitrato. Durante el cierre de los estomas, se da un eflujo de los iones y metabolitos acumulados en la vacuola, con la consiguiente pérdida de agua y, en consecuencia, turgencia de las células [6, 146, 148]. El malato juega un rol muy importante en el mecanismo de apertura y cierre estomático. Este ácido orgánico puede ser sintetizado en las células de la guarda o bien ser importado desde las células mesofílicas [146, 147]. La síntesis de malato en las células de la guarda se da a través del tándem enzimático PEPCasa–MDHasa descrito anteriormente. El carbono para la síntesis proviene de la degradación del almidón, cuyo metabolismo en las células de la guarda presenta características muy particulares. A diferencia de lo que ocurre en las células mesofílicas, en las células de la guarda el almidón es degradado durante el día para soportar la síntesis de malato [146].

Durante el cierre de los estomas, el malato que escapa de la vacuola puede ser transportado al apoplasto o bien ser metabolizado en el citosol por dos vías diferentes. En una vía la NADP-ME lo convierte en Pyr, que luego es metabolizado por el ciclo de los ácidos tricarbónicos. Otra vía es a través de la MDHasa que lo convierte en OAA, el cual luego es convertido a PEP por la PEPCKasa e ingresa a la gluconeogénesis. Las hexosas-P sintetizadas a través de la gluconeogénesis se emplean para sintetizar almidón [146]. La deficiencia en el funcionamiento de los estomas en las mutantes *pepck1* estaría relacionado a una anomalía en el metabolismo del malato, puesto que en estas plantas la señalización por ABA no está afectada [142]. Por otra parte, también se ha informado la inducción

del gen codificante para una PEPCKasa en plantas de tomate sometidas a estrés salino [149] y en hojas de *Brassica napus* sometidas a estrés por frío [150].

1.3.1.4.6 Funciones catapleróticas.

La remoción de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos es necesaria para evitar que su concentración se eleve demasiado ante determinadas situaciones metabólicas. Las reacciones que pueden tomar intermediarios de este ciclo reciben el nombre de reacciones catapleróticas [151]. La PEPCKasa participa de estas reacciones convirtiendo el OAA en PEP, que luego es empleado por la gluconeogénesis o bien convertido a Pyr [152]. Esta función es muy importante en varias situaciones fisiológicas, como la ruptura de las proteínas de reserva durante la germinación de semillas de ricino [153], la respiración de aminoácidos en semillas de *Pisum sativum* [154] o la utilización del glutamato como sustrato respiratorio en el floema de la remolacha azucarera [155]. Esta función no ha sido estudiada en profundidad en plantas. Sin embargo, recientemente se ha propuesto que la principal función de la PEPCKasa en mamíferos sería en las reacciones catapleróticas [104].

1.3.1.5 Mecanismos regulatorios de las PEPCKasas.

1.3.1.5.1 Regulación alostérica.

La modulación alostérica es un mecanismo regulatorio que se encarga de modificar de forma rápida y coordinada las actividades de las enzimas para ajustar los flujos metabólicos de acuerdo con los requerimientos momentáneos de las células [30]. Mediante el estudio de las PEPCKasas purificadas a partir de fuente, se determinó que estas enzimas son reguladas alostéricamente por diferentes metabolitos. Para las enzimas de *Urochloa panicoides*, *Chloris gayana* y *Panicum máximum* (las cuales realizan fotosíntesis C₄) se determinó inhibición por los intermediarios glucolíticos 3-PGA, Fru-6P, Fru-1,6-bisP y DHAP [97, 156]. Sin embargo, para la PEPCKasa de maíz (otra especie que realiza fotosíntesis C₄) no se observó ningún efecto por el 3-PGA sobre la enzima completa, pero sí había inhibición sobre la enzima proteolizada en su extremo N [157].

Un estudio detallado sobre la regulación alostérica se realizó sobre una versión corta de la enzima de *Ananas comosus*, una especie con un metabolismo CAM. En este trabajo se observaron diferencias en regulación alostérica entre los diferentes sentidos de reacción. La actividad decarboxilasa era inhibida por Fru-2,6-bisP, 3-PGA, Asp y Pro, mientras que el succinato la activó. Por otra parte, la actividad carboxilasa fue inhibida por Fru-6P, Fru-1,6-bisP, 3-PGA, citrato, malato

y UDP-Glc [95]. Cabe aclarar que en este trabajo no fue posible purificar a homogeneidad la forma completa de la enzima para determinar si existían diferencias en la regulación alostérica.

1.3.1.5.2 Proteólisis.

Se ha descrito que las PEPCKasas de plantas experimentan proteólisis *in vivo*, aunque la ocurrencia y los efectos regulatorios de esta modificación en la actividad enzimática no son del todo claros [96, 158]. Walker y col. [158] describieron el corte de la PEPCKasa al realizar su purificación a partir de cotiledones de *Cucumis sativus*. Esta degradación, se daba en el extremo N de la enzima de 74 kDa para dar una forma de 62 kDa. Esta modificación, que no podía ser evitada con inhibidores de proteasas, disminuía si se realizaban las extracciones a pH 9-10, lo cual sugería que el factor involucrado en esta degradación era sensible al pH [96, 158]. Cuando los autores purificaron la forma completa de la enzima observaron que su actividad específica y su estructura homotetramérica no se modificaban con respecto a la forma proteolizada [96]. Lo que no quedaba claro en estos trabajos era si la proteólisis era el resultado de un proceso fisiológico o un mero artefacto del proceso de purificación.

En un trabajo de proteómica realizado en plántulas jóvenes de Arabidopsis sobre las proteínas blanco de la metacaspasa 9 de Arabidopsis (*AthMC9*), un miembro de la familia de proteasas dependientes de cisteína, se ubicó a *AthPEPCKasa1* como uno de sus sustrato blanco [99]. La *AthMC9* corta el extremo N de la *AthPEPCKasa1* pero, contrario a los resultados de Walker y col. [96], la proteólisis parecía aumentar la actividad PEPCKasa. Extractos crudos de plántulas mutantes insercionales por T-DNA en el gen *AthMC9* poseen menor actividad, mientras que los de líneas sobreexpresantes 35S::*AthMC9* muestran una mayor actividad PEPCKasa [99]. La *AthMC9* se localiza en el núcleo, el citosol y el apoplasto [99, 159, 160], y participa en la regulación de la muerte celular ante situaciones fisiológicas diversas, por ejemplo durante la respuesta inmune [161, 162] y el desarrollo de los haces vasculares [163, 164].

1.3.1.5.3 Fosforilación.

Otro mecanismo rápido de regulación de la actividad enzimática es mediado por la fosforilación reversible [30]. Walker y Leegood [96, 165] determinaron que en hojas de plantas C₄ y CAM la PEPCKasa es fosforilada en el dominio N-terminal en la oscuridad. Esta fosforilación podía recrearse *in vitro* al incubar a la enzima con la PEPC quinasa o con una ProtKasa dependiente de cAMP [96]. Al medir actividad en extractos crudos de hojas de *Megathyrsus maximus*, se observó una menor actividad durante la noche, lo cual indicaba un efecto inhibitorio de la fosforilación [166]. Sin embargo, al purificar a la PEPCKasa a partir de estas muestras, no observaron diferencias en la

actividad, y solamente se encontró un aumento del doble en el K_M para el OAA y el ATP en la enzima purificada a partir de hojas en oscuridad (fosforilada) [166]. De esta forma, Walker y Leegood [152, 167] propusieron una regulación opuesta entre la PEPCasa y la PEPCKasa a través de la fosforilación. Durante el día, ambas enzimas están desfosforiladas, por lo cual la actividad de la PEPCasa está inhibida, mientras que la PEPCKasa es estimulada. Durante la noche, al fosforilarse ambas enzimas, la actividad PEPCasa es estimulada, mientras que la PEPCKasa es inhibida.

1.4 El metabolismo de los azúcares alcoholes.

Numerosas especies de importancia económica como el manzano, el duraznero y el peral además de usar como molécula de transporte a la Suc, también emplean al glucitol (Gol) [168]. Dependiendo de la especie, la cantidad de carbono fijado fotosintéticamente que es repartido hacia la síntesis del poliol puede representar alrededor del 35-45% del total [169, 170]. La síntesis del Gol ocurre en las hojas por la acción consecutiva de dos enzimas, la aldosa-6-fosfato reductasa (Ald6PRasa, EC 1.1.1.200) reduce la Glc-6P a Gol-6P usando NADPH como dador de electrones; luego, la Gol-6P fosfatasa (EC 3.1.3.50) hidroliza el grupo fosfato para generar el Gol [171, 172]. Se ha propuesto que el NADPH citosólico necesario para sustentar la síntesis del poliol sería generado por la np-Ga3PDHasa [173, 174]. El Gol es transportado a los tejidos sumideros a través del floema. Con respecto a los transportadores de Gol, se ha informado su presencia tanto en los tejidos fuente como en los tejidos sumideros de plantas [2]. Una vez que el Gol es descargado en los tejidos sumidero, es oxidado a Fru por la Gol deshidrogenasa (GoldHasa, EC 1.1.1.14) de forma de incorporarlo al metabolismo [175, 176].

1.4.1 La Ald6PRasa.

La Ald6PRasa es una enzima que pertenece a la superfamilia de las aldo-ceto reductasas, ubicándose dentro de la familia II [177, 178]. Esta enzima se purificó a partir de hojas de níspero [179] y de plántulas y hojas de manzano [180, 181]. En el caso de la enzima de duraznero, se realizaron detallados estudios sobre la enzima recombinante [176]. En todos los casos, se determinó que la velocidad de reacción es mayor en el sentido de reducción de la Glc-6P respecto a la de oxidación del Gol-6P. En manzano y peral, los niveles de ARNm de la enzima fueron mayores en las hojas maduras que en las inmaduras, lo cual se traducía en mayores niveles de la proteína y de la actividad enzimática [182–184]. Esto resalta la importancia de la Ald6PRasa en la biosíntesis del Gol en los órganos fuente. En este sentido, se determinó que la actividad de la Ald6PRasa es diez veces mayor que la actividad de la Suc-6-fosfato sintasa, lo cual sugiere que en las rosáceas la primera enzima sería la principal productora del fotosintato exportable [184]. Además, la actividad

Ald6PRasa en manzano es crítica para determinar el crecimiento vegetativo y la calidad del fruto a través de la síntesis de Gol [185, 186].

En lo que respecta a su regulación, las Ald6PRasas son inhibidas por ATP y Pi [171, 187]. La regulación por metabolitos sería importante para modular la actividad de esta enzima durante el ciclo diurno. Durante el día, las triosas-P son intercambiadas por Pi por el TTP, aumentando la relación Glc-6P/Pi en el citosol, lo cual promueve la actividad de la Ald6PRasa, aumentando la cantidad de uno de los sustratos (Glc-6P) y liberando la inhibición por Pi. Además, la Ald6PRasa de hojas de durazno es inactivada de forma irreversible por los agentes oxidantes.

1.5 Panorama biológico y objetivos planteados.

A partir de los antecedentes expuestos en la Introducción, podemos asegurar que existe una gran diversidad y complejidad en los mecanismos bioquímicos y fisiológicos en los que intervienen las PEPCKasas en plantas. Estas enzimas tienen un rol importante en el crecimiento de las plántulas posterior a la germinación, la fijación del CO₂, la maduración de los frutos y la respuesta al estrés. Sin embargo, en lo que respecta a su regulación, los mecanismos aún no están del todo claros. A pesar de los numerosos estudios biológicos llevados a cabo en Arabidopsis, aún se desconocen las propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias de las PEPCKasas de este organismo. Por otra parte, es de relevancia ampliar el estudio de la Ald6PRasa de duraznero, una enzima clave en la síntesis de azúcares alcoholes en un grupo importante de plantas de interés agronómico. Si bien la caracterización de esta enzima ha sido realizada de forma detallada en nuestro grupo de trabajo, está faltando indagar sobre su regulación postraduccional por fosforilación.

De esta manera, llevaremos a cabo un estudio profundo sobre enzimas vegetales para obtener nuevos conocimientos en el área de la bioquímica vegetal, en especial sobre los mecanismos regulatorios de la gluconeogénesis, las relaciones entre vías anabólicas y catabólicas en plantas y el metabolismo de los azúcares alcoholes. Estos estudios buscan alcanzar resultados que permitan comprender cómo operan los mecanismos de regulación alostérica y por modificación postraduccional sobre enzimas centrales del metabolismo vegetal. La aproximación experimental se realizará a nivel de investigación básica, aunque los resultados permitirían diseñar estrategias biotecnológicas orientadas a mejorar los procesos fisiológicos en los cuales intervienen.

2. Objetivo del trabajo.

Caracterizar los mecanismos de regulación postraduccional de enzimas clave en el metabolismo de hidratos de carbono en plantas, particularmente por procesos de fosforilación, óxido-reducción y proteólisis. Estos mecanismos se estudiarán en combinación con la sensibilidad a efectores alostéricos de las enzimas blanco y de las proteínas ejecutoras de la modificación.

2.1 Objetivos específicos

- I) Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las *AthPEPCK*asas.

- II) Estudio de la regulación de la *AthPEPCK*asa1 por corte proteolítico. Evaluar el efecto del corte en las propiedades cinéticas y regulatorias de la enzima.

- III) Estudio de la ocurrencia de la fosforilación de la *PpeAld6P*Rasa y de la *AthPEPCK*asa1 y caracterización del efecto de la fosforilación (tanto *in vivo* como *in vitro*) sobre ambas enzimas.

- IV) Análisis de la regulación por óxido-reducción de la *AthPEPCK*asa1.

- V) Identificación y caracterización de las ProtKasas involucradas en la fosforilación de las enzimas en estudio. Caracterización de las ProtKasas SnRK1 de Arabidopsis.

- VI) Análisis y discusión de los resultados en el contexto metabólico y en forma comparativa.

3. Materiales y métodos.

3.1 Materiales utilizados.

3.1.1 Reactivos químicos.

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima calidad disponible, de grado “pro-análisis” o similar. Los materiales y reactivos químicos empleados en este trabajo se obtuvieron comercialmente de las siguientes compañías:

- Componentes de medios bacteriológicos: Britania.
- Reactivos de biología molecular: Thermo Fischer, Invitrogen, Productos Bio-Lógicos.
- Materiales utilizados en la purificación y análisis de proteínas: GE Healthcare, Bio-Rad, Agrisera, AbCam.
- Reactivos químicos: Sigma-Aldrich, Merck.
- Oligonucleótidos: Genbiotech.

3.1.2 Dipéptidos

Los dipéptidos que se muestran en la Tabla 1, se sintetizaron por fase sólida en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. El control final del producto se realizó por cromatografía de capa fina con UV, iodo y ninhidrina.

Tabla 1. Dipéptidos empleados en este trabajo de tesis.

Dipéptido	Masa molecular (Da)	Cantidad sintetizada (mg)
Ser-Val	204,226	3,5
Ile-Gln	259,31	4,5
Leu-Thr	232,28	3,5
Ser-Tyr	268,27	2,3
Phe-Gln	293,32	3,5
Ala-Ile	202,25	0,7

3.1.3 Vectores.

Los vectores empleados en esta Tesis se presentan a continuación:

- pGEM-T (Productos Bio-Lógicos).
- pDEST17 (Thermo Fischer).
- pUC57 (Genscript).
- pETDuet-1 (Novagen).
- pRSFDuet-1 (Novagen).

3.1.4 Cepas bacterianas.

Las cepas bacterianas empleadas en esta Tesis fueron las siguientes:

- *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen).
- *Escherichia coli* BL21 (DE3) (Invitrogen).
- *Escherichia coli* SHuffle (T7) (New England Biolabs).

3.1.5 Medios de cultivo bacterianos.

Para el crecimiento de las bacterias en cultivos líquidos se empleó el medio Luria-Bertani (LB) que consiste en tripteína 10 g.l⁻¹, extracto de levadura 5 g.l⁻¹ y NaCl 5 g.l⁻¹. Para el crecimiento en medio semi-sólido, se empleó el medio LB-agar que consistía en medio LB suplementado con agar 1,6% (p/v). En todos los casos, se empleó como marcador de selección el antibiótico correspondiente en una concentración final de 100 µg.ml⁻¹.

3.1.6 Medios de cultivo vegetales y soluciones de riego.

Para el cultivo vegetal *in vitro* se empleó medio Murashine y Skoog [188] diluido al medio (MS) (*PhytoTechnology Labs*). El riego de las plantas crecidas en tierra se realizó con una solución basada en la formulación de Hoagland [189].

3.1.7 Material vegetal y condiciones de cultivo.

Todos los experimentos se realizaron con *A. thaliana* ecotipo Columbia-0. La mutante *pepck1* corresponde al stock SALK_072899C del *Arabidopsis Biological Resource Center*.

En todos los casos, previo a la siembra, las semillas se desinfectaron con etanol 70% (v/v) por 5 min, luego con lavandina 55 g.l⁻¹ 10% (v/v) por 10 min y, finalmente, se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Luego, se embebieron en agar 0,1% (p/v) estéril y se sometieron a una estratificación por frío a 4 °C en la oscuridad por 2 días.

En los ensayos de germinación, las semillas se dispusieron en una tela embebida con medio MS 0,5X en placas de Petri de 16 cm y se transfirieron a cámaras de cultivo [190]. En los ensayos realizados con hojas maduras, las semillas se crecieron en tierra en macetas de 8 cm de

diámetro x 7 cm de altura, una planta por maceta. En todos los casos, las plantas se crecieron en una cámara a 22-24 °C, con una iluminación de 120-150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, bajo un fotoperíodo de día largo que consistía en 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Todos los experimentos se realizaron con semillas cosechadas al mismo tiempo, que se secaron en oscuridad a temperatura ambiente y luego se almacenaron a 4 °C. La toma de muestras se realizó con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis.

3.2 Técnicas de Biología Molecular

3.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las reacciones de amplificación se realizaron a partir de ADN copia de hojas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 o bien a partir de otros plásmidos cuando fue necesario cambiar los sitios de clonado. De forma estándar, las reacciones consistían en solución reguladora 1X, dNTPs 2 mM, oligonucleótidos 0,1 mM, MgCl_2 2 mM, *Taq* o *Pfu* ADN polimerasa 2,5 U (Productos Bio-Lógicos) y una cantidad adecuada de molde inicial, en un volumen final de 50 μl . El programa de PCR básico utilizado fue el siguiente:

- 1 ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min
- 30 ciclos que consistían en 3 pasos de:
 - (i) 1 min de desnaturalización a 95 °C,
 - (ii) 30 s de hibridación a la temperatura de hibridación (T_h) adecuada,
 - (iii) el tiempo de elongación (t_e) adecuado a 72 °C,
- 1 ciclo de elongación final a 72 °C por 10 min

La T_h se calculó con la ecuación $T_h = [4 (G + C) + 2 (A + T)] - 5 \text{ °C}$ y el t_e se calculó según la longitud del fragmento de ADN a amplificar de acuerdo con la relación 1 min.kpb⁻¹ y 0.5 min.kpb⁻¹, para la *Taq* y la *Pfu* ADN polimerasa, respectivamente. Las reacciones se realizaron en un termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf) y, una vez finalizadas, los productos de reacción se analizaron mediante una electroforesis en gel de agarosa.

3.2.2 Electroforesis en gel de agarosa.

Las muestras de ADN se separaron electroforéticamente en gel de agarosa al 1% (p/v) preparado con solución TAE, la cual consistía en Tris-HCl pH 8,0 40 mM, ácido acético 40 mM y EDTA 1 mM. Además, se le adicionó el colorante de ADN *Gel green* (Genbiotech). Antes de la carga en el gel, las muestras se acondicionaron con solución de siembra que contenía Gro 3% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). La corrida del gel se realizó en una cuba electroforética a 100 V

constantes durante el tiempo necesario para obtener la resolución de los fragmentos de ADN, que se visualizaron con un iluminador de luz led azul.

3.2.3 Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos empleados en esta Tesis se detallan en la Tabla 2 que se muestra a continuación.

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en esta Tesis. Las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción introducidos para el posterior clonado.

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción
<i>Ath</i> PEPCK1 Fow	<u>GAGCTCGAT</u> GTTCGGCCGTAACGGAAATG	<i>SacI</i>
<i>Ath</i> PEPCK1 Rev	<u>GTCGACCT</u> AAAAGATAGGACCAGCAGCGAG	<i>SalI</i>
<i>Ath</i> PEPCK1 (K19) Fow	<u>GAGCTCGG</u> GACCGGTGATGCCGAAG	<i>SacI</i>
<i>Ath</i> PEPCK1 (R101) Fow	<u>GAGCTCGG</u> AGTCAGGACCAAAGGTGG	<i>SacI</i>
<i>Ath</i> PEPCK1 Int	GTTCCAACTTGATAGCGTTC	-
<i>Ath</i> MC9 Fow	<u>GGATCCGAT</u> GGATCAACAAGGGATGGTCAAG	<i>BamHI</i>
<i>Ath</i> MC9 Rev	<u>GAATTC</u> TCAAGGTTGAGAAAGGAACGTCG	<i>EcoRI</i>
<i>Ath</i> PEPCK1 S62D Fow	CGTTACAGAAGAAACGTGATGCTCCTACCACACCGATC	-
<i>Ath</i> PEPCK1 S62D Rev	GATCGGTGTGGTAGGAGCATCACGTTTCTTCTGTAACG	-
<i>Ath</i> PEPCK1 T66D Fow	GCTCCTACCGATCCGATCAACC	-
<i>Ath</i> PEPCK1 T66D Rev	GGTTGATCGGATCGGTAGGAGC	-
<i>Ath</i> AKIN10 Fow	<u>GGATCCGAT</u> GTTCAAACGAGTAGATGA	<i>BamHI</i>
<i>Ath</i> AKIN10 Rev	<u>GCGGCCGCT</u> CAGAGGACTCGGAGCTGAG	<i>NotI</i>
<i>Ath</i> AKIN11 Fow	<u>GGATCCGAT</u> GGATCATTTCATCAAATAG	<i>BamHI</i>
<i>Ath</i> AKIN11 Rev	<u>GCGGCCGCT</u> CAGATCACACGAAGCTCTG	<i>NotI</i>
<i>Ath</i> AKIN10-T198D Fow	GGTCATTTTTTGAAGGACAGTTGTGGAAGTCC	-
<i>Ath</i> AKIN10-T198D Rev	GGACTTCCACAACCTGTCCTTCAAAAAATGACC	-
<i>Ath</i> AKIN11-T176D Fow	GGTCATTTTCTAAAGGACAGTTGTGGAAGCCCC	-
<i>Ath</i> AKIN11-T176D Rev	GGGGCTTCCACAACCTGTCCTTTAGAAAATGACC	-

3.2.4 Obtención de las secuencias codificantes de interés.

El gen *PEPCK1* se amplificó a partir de la construcción [pCMV-Sport6/PEPCK] cedida por el Dr. C. Lacomme del INRA, CNRGV *Plant Genomic Center* (Toulouse, Francia) y luego se clonó en el vector pGEM-T (Productos Bio-Lógicos) para su secuenciación y posterior subclonado al vector de expresión. El gen *PEPCK2* fue sintetizado *de novo* con una optimización de codones para expresarlo en *E. coli* (BioBasic Inc) clonado en el vector pUC57, con los sitios de restricción necesarios para su posterior subclonado. Posteriormente, ambos genes se subclonaron en el vector de expresión pRSFDuet-1, entre los sitios *SacI* y *SalI*.

Los genes codificantes para las *Ath*SnRKs se amplificaron a partir de cDNA de *Arabidopsis* con oligonucleótidos específicos (Tabla 2). En el caso de las subunidades α catalíticas, se incorporó por mutagénesis la mutación T198D en el caso de AKIN10 y T176D en el caso de AKIN11, para obtener las ProtKasas constitutivamente activas [191]. Luego, estos genes se clonaron en el vector de expresión pETDuet-1, entre los sitios *BamHI* y *NotI*. El gen codificante para la *MdoSOS2* (GeneBank: ACQ90245.1) fue sintetizado *de novo* con una optimización de codones para expresarlo en *E. coli* (BioBasic Inc) con la mutación T168D en su secuencia, para dar una ProtKasa constitutivamente activa [192]. El gen codificante para la *StuCDPK1* fue cedido por la Dra. Rita Ulloa (INGEBI, CONICET) clonado en el vector de expresión pET22(+).

3.2.5 Clonado.

Los productos amplificados por PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1-2%, dependiendo del tamaño del fragmento a resolver. A continuación, la banda de interés se escindió del gel y se la purificó con el reactivo *EasyPure quick gel extraction kit* (*TransGen Biotech*). Las muestras purificadas se ligaron al vector correspondiente empleando T4 ADN ligasa (Productos Bio-lógicos) y una cantidad adecuada de ADN durante 16 h a 4 °C.

3.2.6 Técnicas de mutagénesis.

Las mutantes trucas en el dominio N-terminal se construyeron amplificando la secuencia codificante del gen *PEPCK1*, empleando como molde la construcción [pGEM-T/*PEPCK1*] y los oligonucleótidos *AthPEPCK1* (K19) *Fow* y *Rev* y *AthPEPCK1* (R101) *Fow* y *Rev* (Tabla 2), para la mutante $\Delta 19$ y $\Delta 101$, respectivamente. Luego, los fragmentos resultantes fueron clonados de la misma forma que lo realizado para el gen codificante para la proteína completa. En el caso de las mutantes fosfomiméticas, se introdujeron las mutaciones puntuales mediante la técnica de *QuikChange* (*Stratagene*). Esta técnica se basa en la utilización de un par de oligonucleótidos

portadores de la mutación que son complementarios entre sí y que llevan en el centro una región portadora de la mutación. Por medio de PCR se extendieron ambas cadenas de los plásmidos [pGEM-T/*PEPCK1*], [pGEM-T/*AKIN10*] y [pGEM-T/*AKIN11*], con los oligonucleótidos correspondientes para cada caso (Tabla 2). Luego, el templado se removió de la reacción de PCR mediante digestión con la enzima de restricción *DpnI* y con el producto de la reacción se transformaron células de *E. coli* TOP10. Una vez que se seleccionaron clones resistentes al agente de selección, se purificó el ADN plasmídico y se envió a secuenciar para comprobar la presencia de la mutación.

3.2.7 Transformación de células.

Las células de *E. coli* se hicieron competentes utilizando el método de CaCl_2 [193]. Con un cultivo saturado crecido durante la noche se inoculó medio LB fresco en una dilución 1/100. Luego, las células se crecieron hasta $\text{DO}_{600} = 0,4$ y se cosecharon por centrifugación a $5000 \times g$ durante 5 min. Paso seguido, las células se resuspendieron en 500 μl de solución ST1 (MOPS-NaOH pH 7,0 10 mM y KCl 10 mM) y se volvieron a cosechar por centrifugación para eliminar el sobrenadante. Se repitió el lavado de las células con 500 μl de solución ST2 (MOPS pH 6,5 100 mM, KCl 10 mM y CaCl_2 100 mM) y, finalmente, se resuspendieron en 100 μl de solución ST2. A estas células competentes se les agregó 2-4 μl de ADN plasmídico y la mezcla se incubó en hielo durante 1 h. Luego, se aplicó a las células a un pulso térmico a 42 °C por 1 min e inmediatamente se recuperaron en medio LB durante 1 h a 37 °C. La selección de las células transformadas se realizó en medio LB-agar (suplementado con 100 $\mu\text{g} \cdot \text{ul}^{-1}$ del antibiótico correspondiente) durante 16-18 h a 37°C. Finalmente, se seleccionaron distintos clones para su posterior análisis.

3.2.8 Extracción de ADN plasmídico y secuenciación.

Las células de *E. coli* transformadas se repicaron en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se cultivaron a 37 °C durante 16-18 h. Las células se cosecharon por centrifugación y se purificó el ADN plasmídico con el reactivo *Easy pure plasmid miniprep kit* (*TransGen Biotech*). La obtención del ADN plasmídico se corroboró por electroforesis en gel de agarosa y su concentración se determinó en un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Fischer) midiendo la absorbancia a 260 nm.

La secuencia de los genes de interés fue determinada de forma automatizada por la empresa Macrogen (Corea) utilizando oligonucleótidos específicos para cada plásmido.

3.2.9 Corte con enzimas de restricción.

Para liberar los fragmentos de ADN a ser clonados, o bien para evaluar el correcto clonado de los genes en los vectores, se hicieron digestiones con enzimas de restricción. El procedimiento típico consistió en la incubación de 1 µg de ADN plasmídico con 10-20 U de la(s) enzima(s) de restricción correspondiente(s) en la solución reguladora provista por el fabricante para cada caso. Las digestiones se realizaron a 37 °C durante 3 h.

3.2.10 Subclonado.

Para clonar el gen de interés en el vector de expresión, se cortó el ADN plasmídico con las enzimas de restricción adecuadas para cada caso, de forma de liberar el inserto. Luego, la muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa y la banda de interés se cortó del gel y se purificó. Por otra parte, el vector de expresión se escindió con las mismas enzimas con las que se liberó el gen de interés del vector de clonado. Luego de la digestión, el vector de expresión digerido se precipitó con etanol 50% (v/v) y acetato de sodio 0,1 M incubando a -20 °C durante 2 h y posterior centrifugación a 15000 x g durante 15 min a 4 °C. Finalmente, el vector digerido se resuspendió en agua ultrapura estéril. El inserto y el vector se ligaron de acuerdo con la reacción de ligación descrita en la sección de clonado. Con la mezcla de ligación se transformaron células de *E. coli* TOP10. Para evaluar la presencia del inserto de interés en el vector de expresión se realizó un procedimiento similar al utilizado para determinar la presencia de inserto en el vector de clonado.

3.3 Técnicas de proteínas.

3.3.1 Expresión de proteínas recombinantes.

Para realizar la expresión de las proteínas recombinantes, se transformaron células de *E. coli* por el método de CaCl₂ y se seleccionaron los clones que expresaban las proteínas recombinantes. Luego, cultivos axénicos de los clones seleccionados se crecieron durante toda la noche en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Al día siguiente, el cultivo saturado se diluyó 1/100 en 2 l de medio LB (dividido en cuatro frascos con 0,5 l cada uno) suplementado con los antibióticos correspondientes. Estos cultivos se crecieron a 37 °C en un agitador orbital a 200 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ ~0,6. Salvo que se indique lo contrario, la inducción se realizó con isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0,5 mM durante 16 h a 25 °C en un agitador orbital a 200 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 5000 x g durante 10 min y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Las condiciones de expresión particulares para cada proteína fueron las siguientes:

AthPEPCKasas: la *AthPEPCKasa1* se expresó en *E. coli* SHuffle T7 transformada con la construcción [pRSFDuet-1/*PEPCK1*] y la *AthPEPCKasa2* se expresó en *E. coli* BL21 (DE3) transformada con la construcción [pRSFDuet-1/*PEPCK2*] [20].

AthMC9: la expresión se realizó en *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con la construcción [pETDuet-1/*MC9*] [20].

AthSnRKs: la expresión se realizó en *E. coli* SHuffle transformadas con las construcciones [pETDuet/*AKIN10*-T198D] o bien [pETDuet/*AKIN11*-T176D].

StuCPDK1: la expresión se realizó en *E. coli* SHuffle transformada con la construcción [pET22(+)/*CDPK1*]. En este caso, las células se crecieron en medio LB suplementado con ampicilina 100 µg.ml⁻¹ y se indujeron con IPTG 0,5 mM por 16 h a 30 °C y 180 rpm [194].

MdoSOS2: la expresión se realizó en *E. coli* codon plus (DE3) transformada con la construcción [pET28c/*SOS2*-T198D].

PpeAld6PRasa: la expresión se realizó en *E. coli* BL21 Star (DE3) transformada con la construcción [pET19b/*PpeAld6PRasa*] [176].

3.3.2 Cuantificación de proteínas.

Las proteínas totales fueron cuantificadas mediante el ensayo de Bradford [195], empleando una curva estándar construida con albúmina sérica bovina.

3.3.3 Purificación de las proteínas recombinantes.

Las células se resuspendieron en solución H [Tris-HCl pH 8,0 25 mM, NaCl 300 mM, Gro 5% (v/v) e imidazol 10 mM] y se lisaron por ultrasonido. El extracto se centrifugó a 16000 x g durante 20 min hasta obtener un sobrenadante limpio de partículas en suspensión. La fracción soluble se sembró en una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare) previamente equilibrada con solución H. La elusión de la proteína retenida se realizó con un gradiente de imidazol de 10-300 mM en solución H. En esta condición la enzima se mantuvo activa durante al menos 3 meses a -80 °C.

3.3.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida.

La electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizante (SDS-PAGE) se realizó según la técnica descrita por Laemmli [196]. La concentración de acrilamida en el gel de apilamiento fue del 4% y en el de separación varió entre el 10-15%, dependiendo de las masas de las proteínas a separar y del ensayo. Previo a la separación electroforética, las muestras se trataron con solución muestra 4 X que contenía: Tris-HCl pH 6,8 240 mM, SDS 8% (p/v), Gro 40% (v/v), 2-mercaptoetanol 5% (v/v) y Azul de Bromofenol 0,04% (p/v).

El marcador de masa molecular empleado contenía las siguientes masas: 99, 66, 45, 29, 18 kDa. En ciertos ensayos se empleó el marcador de masa molecular pre-teñido ARCOIRIS (Productos Bio-Lógicos). Una vez terminada la electroforesis, cada gel fue coloreado con una solución de Azul Brillante de Coomassie R-250 0,125% (p/v), metanol 50% (v/v) y ácido acético 10% (v/v).

3.3.5 Inmunodetección.

Las proteínas resueltas mediante un SDS-PAGE fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa (NTA) o polivinilideno de difluoruro (PVDF). La transferencia se realizó por 60 min a 180 mA en un equipo Mini Protean III (Bio-Rad) con una solución de transferencia [Tris-HCl pH 8,3 0,025 M, glicina 0,192 M y metanol 20% (v/v)]. Finalizada la electrotransferencia, la membrana se bloqueó incubándola 1 h a 25 °C con una solución de TBST [Tris-HCl pH 8,0 50 mM, NaCl 150 mM y tween-20 0,05% (p/v)] suplementada con leche descremada en polvo al 5% (p/v). Luego, se lavaron las membranas con solución de TBST suplementada con leche descremada al 0,1% (p/v) por 10 min a 25 °C. A continuación, se incubó por 16 h a 25 °C con una solución de TBST suplementada con leche al 1% (p/v) que contenía una dilución adecuada del anticuerpo primario preparado en conejo (1/1000 para la *AthPEPCKasa1* y 1/5000 para la *AthGa3PDHasa*). Se lavaron nuevamente las membranas con solución de TBST suplementada al 0,1% con leche por 10 min a 25 °C y, luego, se incubó por 1 h a 25 °C en agitación con una dilución 1/10.000 del anticuerpo secundario de cabra contra las cadenas livianas y pesadas de las IgG de conejo conjugado a la peroxidasa de rábano picante (Abcam) diluido en TBST.

El revelado de la membrana se hizo por el método quimioluminiscente con los reactivos *ECL Bright/SuperBright* (Agrisera). Para tal fin, se incubó a las membranas durante 5 min a 25 °C con 1 ml de la mezcla del reactivo A y B, para luego exponerlas a placas radiográficas que se revelaron en oscuridad con reactivos de revelado fotográfico (AGFA).

3.3.6 Anticuerpos.

La producción de los anticuerpos policlonales se realizó a partir de los cuerpos de inclusión formados por la expresión insoluble de la *AthPEPCKasa1*. La fracción insoluble obtenida luego del sonificado y la centrifugación de un cultivo de *E. coli* que expresó la *AthPEPCKasa1*, se resuspendió en la misma solución H en la cual se realizó la purificación. Luego, se sonicó para lograr una correcta suspensión, se volvió a centrifugar por 10 min a 21 000 x g a 4 °C para precipitar las proteínas y, finalmente, se eliminó el sobrenadante. El precipitado resultante se resuspendió en solución H a razón de 50 mg.ml⁻¹ y se preparó con solución Laemmli reductora. Esta muestra se sembró en un SDS-PAGE al 8% con una única calle y, luego de la corrida, se cortó la porción del gel correspondiente a la *AthPEPCKasa1*, empleando como patrón una porción del gel teñida con Azul Brillante de Coomassie. A continuación, se removió a la proteína del gel con un equipo de electroelución, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para las inoculaciones, se prepararon 4 dosis de 0,1 µg.µl⁻¹ de la proteína purificada en solución fisiológica [NaCl 0,9% (p/v)] estéril, que se emplearon para inocular conejos en el Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET, CONICET-UNL) siguiendo el protocolo estándar de la institución. Finalmente, se procedió a sacrificar el animal para obtener el suero inmune. Para incrementar la especificidad del antisuero obtenido, se lo purificó contra la proteína recombinante His₆::*AthPEPCKasa1* pura, siguiendo un protocolo descrito anteriormente [197].

El anticuerpo policlonal contra la Ga3PDHase de *Triticum aestivum* fue previamente descrito por Piattoni y col. [198]. El anticuerpo comercial anti-ubiquitina (UBQ11) fue adquirido de la empresa *AbCam*.

3.3.7 Cromatografía de filtración por gel.

La masa molecular de las proteínas se determinó mediante cromatografía de filtración por gel con una columna de *Superdex* 200 10/300 (GE Healthcare) equilibrada con HEPES-NaOH pH 8,0 50 mM y NaCl 100 mM. Se construyó una curva de calibrado graficando los valores de K_{av} contra el log (masa molecular) de proteínas estándar de masa molecular conocida. Las proteínas patrones utilizadas fueron: tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolasa (158 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa) y ribonucleasa (13,7 kDa). Los valores de K_{av} se calcularon con la siguiente ecuación: $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$, donde V_e es el volumen de elusión de la proteína, V_o es el volumen de elusión del colorante Azul de Dextrano (Promega) y V_t es el volumen total de la columna.

3.3.8 Ensayos de desnaturalización de proteínas.

Para analizar la unión de los metabolitos a las proteínas recombinantes, utilizamos ensayos de desnaturalización de proteínas acoplados al escaneo diferencial de fluorescencia de acuerdo con el método descrito por Ericsson y col. [199]. El desplegado térmico de las proteínas es un proceso irreversible que sigue un típico modelo de transición entre un estado plegado y uno desplegado, y la T_m se define como el punto medio de esta transición. El cálculo de esta T_m puede realizarse con la ecuación de Boltzmann o bien, de forma más sencilla, como el mínimo de la primera derivada de la fluorescencia en función de la temperatura ($-\partial F \cdot \partial T^{-1}$) [199, 200].

Los ensayos se realizaron en un volumen final de 20 μ l con HEPES-NaOH pH 7,0 25 mM, colorante Sypro Orange 1 X (Sigma) y 0,15 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ de la proteína. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos (*Applied Biosystems*) que se sellaron con la película adhesiva *Microseal* (Bio-Rad). Las placas se calentaron en un equipo de PCR en tiempo real *StepOne* (*Applied Biosystems*) con una rampa de temperatura de 25 a 99 °C, con incrementos de 0,4 °C, con monitoreo simultáneo de los cambios en la fluorescencia. Las longitudes de onda para la excitación y la emisión fueron 490 y 575 nm, respectivamente. La temperatura de desnaturalización (T_m) de cada muestra se calculó graficando la primera derivada de la fluorescencia de emisión ($-\partial F \cdot \partial T^{-1}$) en función de la temperatura (T) e identificando el mínimo de la curva. El cambio en la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) fue calculada restando cada T_m al control sin efector. Todas las reacciones se realizaron con su correspondiente control (sin la proteína y sin el efector).

3.3.9 Ensayos de actividad enzimática.

Una unidad de actividad enzimática (U) se define como la cantidad de enzima necesaria para producir/consumir 1 μ mol de producto/sustrato en 1 min bajo las condiciones especificadas para cada ensayo. En las experiencias en donde se haya seguido la oxidación/reducción de NADH/NAD⁺ a 340 nm se empleó el coeficiente de extinción molar de 6,22 $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para determinar la variación de la forma reducida de la coenzima en el medio.

En el caso de los métodos radiactivo, fluorométrico y luminiscente, la concentración de sustrato/producto consumido/formado se determinó mediante la construcción de una curva de calibrado.

Las condiciones de medida particulares para cada enzima se describen a continuación:

*AthPEPCK*asas: la condición estándar consistía en HEPES-NaOH pH 7,0 100 mM, 2-mercaptoetanol 4 mM, MgCl_2 4 mM, MnCl_2 10 μ M y NADH 0,2 mM. La reacción en la dirección de la carboxilación de PEP contenía (a menos que se indique otra cosa): KHCO_3 90 mM, ADP 0,13 mM, PEP 10 mM y

MDHasa 2 U. La reacción en la dirección de la descarboxilación de OAA contenía (a menos que se indique otra cosa): ATP 0,75 mM y OAA 0,75 mM (preparado fresco en agua), lactato deshidrogenasa (LDHasa) 1 U y PyrKasa 1 U. Los ensayos se realizaron a 30 °C en un volumen final de 50 µl utilizando un lector de microplacas termostatizado *Multiskan Ascent* (*Thermo Electron Corporation*). Las diluciones de la enzima se realizaron en una solución que consistía en HEPES-NaOH pH 7,0 25 mM, Gro 10% (v/v) y 2-mercaptoetanol 1 mM.

Cuando se midió actividad en los extractos crudos de hojas, se adaptó un ensayo con sensibilidad aumentada basada en el método descrito por Rojas y col. [194]. Las reacciones consistían en HEPES-NaOH pH 7,0 100 mM, 2-mercaptoetanol 5 mM, NADH 0,2 mM, MgCl₂ 4 mM, MnCl₂ 1 mM, KHCO₃ 100 mM, ADP 0,5 mM, PEP 10 mM y MDHasa 1 U. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µl en multiplacas de 96 pocillos de color negro (*Thermo Fischer Scientific*). El NADH se preparó equimolar con NaOH y antes de emplearlo se calentó por 15 min a 60 °C para destruir el NAD⁺ presente. Las reacciones se iniciaron con 5 µl del extracto crudo diluido y se finalizaron con 20 µl de HCl 0,3 M. Luego, se cuantificó la formación de compuestos alcalinos del NAD⁺ de acuerdo con lo descrito en la referencia [194].

AthMC9: se ensayó siguiendo las condiciones descritas por Vercammen y col. [201] con modificaciones menores. Las reacciones se realizaron en MES-NaOH pH 5,5 50 mM, NaCl 150 mM, Suc 300 mM, DTT 10 mM, *AthMC9* 0,3 µg.µl⁻¹ y *AthPEPCKasa* 0,15 µg.µl⁻¹. A diferentes intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas que se resolvieron en un SDS-PAGE al 10%.

AthSnRK1: la reacción estándar empleada consistía en HEPES-NaOH pH 7,3 100 mM, DTT 5 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0,5 mM, [γ-³²P] ATP 30 µM (actividad específica 200 cpm.pmol⁻¹), AMARA 90 µM y una cantidad adecuada de la enzima [191]. Las reacciones se iniciaron por el agregado de la ProtKasa y luego se incubaron a 30 °C por 20 – 30 min.

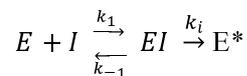
MdoSOS2: la reacción estándar empleada consistía en Tris-HCl pH 7,2 20 mM, MgCl₂ 5 mM, MnCl₂ 2,5 mM, CaCl₂ 0,5 mM, DTT 2 mM, ATP 10 µM y AMARA 100 µM [192]. Las reacciones se iniciaron con el agregado de la ProtKasa y luego se incubaron a 30 °C por 15 min.

StuCDPK1: la reacción estándar empleada consistía en Tris-HCl pH 7,5 20 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, CaCl₂ 1 mM, ATP 50 µM y Syntide-2 100 µM [20]. Las reacciones se iniciaron con el agregado de la ProtKasa y luego se incubaron a 30 °C por 20-30 min.

3.3.10 Estudios de óxido-reducción.

Para analizar el efecto del H₂O₂ en la actividad de la *AthPEPCKasa1*, se la incubó con concentraciones variables del agente oxidante a 25 °C en solución HEPES-NaOH pH 7,0 25 mM y Gro 10% (v/v). A determinados intervalos de tiempo, se tomaron alícuotas que se emplearon para medir la actividad enzimática resultante. En paralelo, se procesó un control donde la muestra se trató de la misma manera, pero sin el agregado del agente oxidante. La actividad de la enzima se relativizó respecto al valor inicial de actividad y al valor de actividad del control, y se graficó la actividad enzimática normalizada en función de la concentración de oxidante. Por otra parte, también se tomaron alícuotas de las reacciones que se prepararon con solución Laemmli no reductora y se sembraron en un SDS-PAGE al 7,5%.

El análisis cinético de la inactivación se realizó de acuerdo con lo realizado por Kitz y Wilson [202] y que ha sido empleado por otros autores [175, 176, 203]. La inactivación de una enzima (E) por un inhibidor (I) podría proceder a través de la formación de un complejo intermediario (EI) que está en equilibrio con la E y el I y que puede formar (irreversiblemente) un enlace covalente que da lugar a la forma inactiva de la proteína, de acuerdo con el mecanismo:



donde k_1 , k_{-1} y k_i son las constantes de velocidad de primer orden para cada etapa de la reacción. A partir de ellas se puede plantear una constante de segundo orden (k'') para la reacción de la enzima con el inhibidor donde:

$$k'' = k_1 \cdot k_i / k_{-1}$$

De esta manera, la velocidad de inactivación de la enzima puede expresarse como:

$$v = k_i \cdot [I] / (K_i + [I])$$

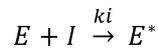
$$\text{donde } k_i = [E] \cdot [I] / [EI] = k_{-1} / k_1$$

Si consideramos que la [I] se encuentra en exceso, la pérdida de actividad de la enzima resulta en un proceso de pseudo primer orden. De esta forma, el análisis experimental de cómo varía la actividad de la enzima en presencia del inhibidor permite obtener una constante de velocidad observada (k_{obs}) (o aparente) de pseudo primer orden:

$$k_{obs} = (k_i \cdot [I]) / (K_i + [I])$$

De la ecuación anterior se pueden determinar los valores de k_i y K_i de un proceso de inactivación a partir de las medidas de k_{obs} obtenidas a diferentes [I]. Para obtener los valores de k_{obs} se efectúan medidas de actividad porcentual en función del tiempo y se ajustan a la ecuación: $E = E_0 \cdot e^{-k_{obs} \cdot t}$, donde E, es la actividad enzimática remanente, E_0 es la actividad enzimática inicial y t el tiempo de reacción.

Si la forma de la curva de k_{obs} en función de [I] tiene forma hiperbólica, la inhibición cursa un mecanismo de inactivación con formación del complejo EI. Si el complejo EI tiene una vida media muy corta, el valor de K_i es elevado, con lo cual se puede asumir que la reacción cursa el siguiente mecanismo bimolecular simple:



El tratamiento matemático para este modelo puede obtenerse a partir de la ecuación de k_{obs} , que en el límite, cuando $K_i \rightarrow \infty$, la [I] se vuelve despreciable frente a K_i obteniéndose la ecuación:

$$k_{obs} = k_i \cdot [I] / K_i = k'' \cdot [I]$$

En este caso puede calcularse directamente k'' a partir de la gráfica de k_{obs} en función [I]. Se construyeron gráficas de actividad enzimática remanente en función del tiempo de incubación para cada concentración del oxidante, de las cuales se calculó la k_{obs} mediante el ajuste con una ecuación exponencial decreciente. Luego, se graficaron los valores de k_{obs} en función de la concentración de oxidante y con un ajuste lineal se obtuvo la k'' .

3.3.11 Método de medida radiactivo de ProtKasas.

Las medidas de actividad con el método radiactivo se realizaron con [γ^{32}] ATP (Perkin Elmer) siguiendo un protocolo descrito anteriormente [204] basado en la adsorción del fosfopéptido resultante a papel de fosfocelulosa. Las reacciones se iniciaron por el agregado de una dilución adecuada de la ProtKasa y se incubaron en un baño acuoso termostatzado a 30 °C. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, las reacciones se terminaron tomando una alícuota que se embebió en un cuadrado de papel de fosfocelulosa P81 de 2 x 2 cm, que se sumergió inmediatamente en ácido ortofosfórico 75 mM. Los papeles se lavaron 3 veces por 5 min en agitación constante en el mismo medio para eliminar el exceso de ATP marcado no incorporado en el sustrato. Por último, los papeles

se lavaron en acetona y se dejaron secar a temperatura ambiente. Dado que en medio ácido los péptidos utilizados adquieren carga positiva, quedan adsorbidos en el papel de fosfocelulosa mientras que el ATP radiactivo remanente se elimina con los lavados [205, 206]. Luego, se colocaron dentro de tubos de microcentrifuga de 1,5 ml y se agregó 1 ml del cóctel de centelleo *Ultima Gold* (Perkin Elmer). Se cuantificaron las cuentas por minuto (cpm) de las muestras con un contador de centelleo de pozo. Para convertir las cpm de las muestras en nmoles de PO_4^{3-} incorporados en el sustrato, se cuantificó la radiactividad de diferentes volúmenes del estándar de ATP utilizado, de forma de calcular la radioactividad específica de la mezcla de reacción (cpm.nmoles de ATP^{-1}).

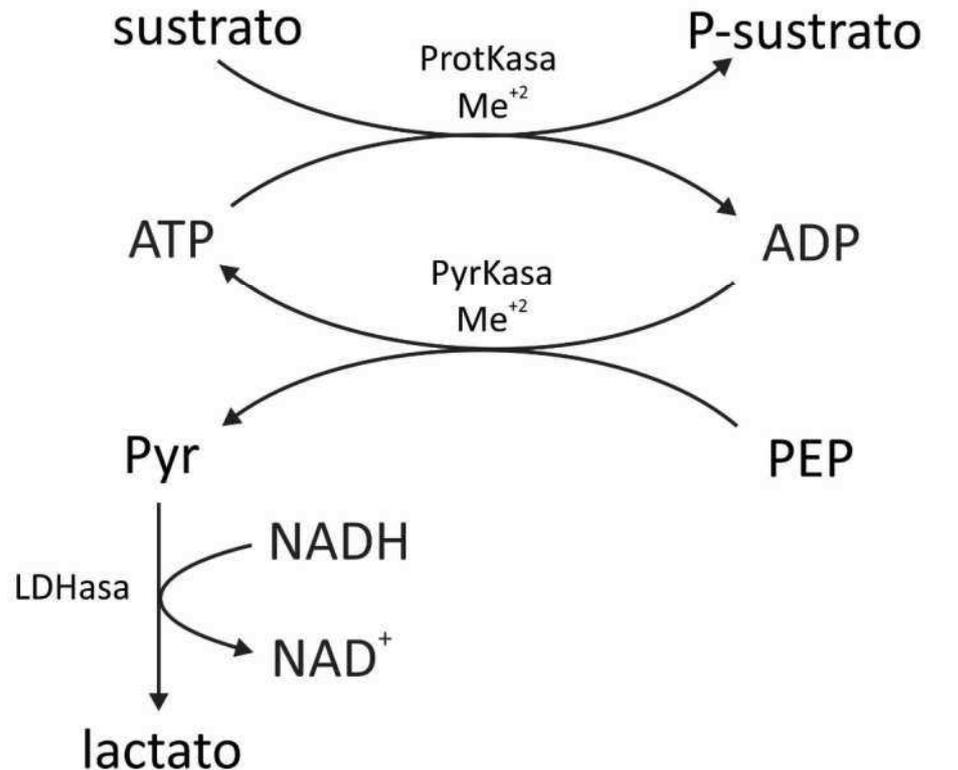
3.3.12 Método de medida luminiscente de ProtKasas.

Las medidas de actividad por este método se realizaron con el reactivo ADP-Glo (Promega) que cuantifica el ADP liberado mediante una reacción multienzimática que termina con la formación de luminiscencia por la luciferasa. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 5 μl , empleando las condiciones antes descritas y siguiendo las instrucciones del fabricante [207].

3.3.13 Método de medida fluorescente de ProtKasas.

Las reacciones por el método fluorométrico se realizaron a 30 °C en un volumen final de 20 μl en placas de 96 pocillos negras (Thermo Scientific) con el agregado a la reacción de la ProtKasa del sistema necesario para convertir el ADP liberado en NAD^+ (PEP 2 mM, NADH 2 mM, LDHase 1 U y PyrKasa 1 U). Las reacciones se cortaron con 20 μl de HCl 0,3 M y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente para destruir el NADH remanente debido a su inestabilidad bajo condiciones ácidas. Luego, se agregaron a las muestras 170 μl de NaOH 9 M y se incubaron a temperatura ambiente por 60 min en oscuridad para desarrollar los derivados alcalinos del NAD^+ . La fluorescencia se cuantificó en un lector de fluorescencia *Fluoroskan Ascent FL* (Thermo Scientific) empleando filtros de excitación y emisión de 355 y 460 nm, respectivamente, con un tiempo de integración de 20 ms. La cantidad de ADP generado fue calculado usando una curva estándar de ADP construida empleando las mismas condiciones. Un procedimiento detallado paso por paso con detalles experimentales importantes se presenta en la Figura 8.

Paso 1: Realizar las reacciones de la ProtKasa (20 μ l) acoplando PyrKasa, LDHasa, PEP y NADH para convertir el ADP liberado en NAD^+ .



Paso 2 | **Destruir el NADH remanente**
Agregar 20 μ l HCl 0,3 M.
Incubar 20 min a temperatura ambiente.

Paso 3 | **Tratamiento alcalino**
Agregar 170 μ l NaOH 9 M.
Incubar 60 min a temperatura ambiente en oscuridad.

Paso 4
Medir la fluorescencia de los derivados alcalinos
(Excitación 355 nm, Emisión 460 nm)

Figura 8. Vista general del método fluorométrico adaptado para medir actividad ProtKasa.

3.3.14 Extracción de proteínas de tejidos vegetales.

En todos los casos, el material vegetal fue homogeneizado en un mortero enfriado con nitrógeno líquido. Para la extracción desnaturalizante de proteínas, 20 mg de peso fresco (PF) de tejido se extrajo con 200 µl de una solución que consistía en SDS 2% (p/v), Gro 20% (v/v), 2-mercaptoetanol 1,4 M, Tris-HCl pH 6,8 125 mM y Azul de Bromofenol 0,05% (p/v). Luego de agregar la solución, las muestras se agitaron en un vortex y seguidamente se calentaron por 5 min a 95 °C con agitación. Cuando las muestras alcanzaron la temperatura ambiente, se centrifugaron a 21.000 x g por 10 min para separar el extracto proteico de los restos del tejido.

Para la extracción ultra-desnaturalizante de proteínas, se emplearon dos métodos diferentes. En el método de Wu y Wan [208], se extrajo el material con ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) por 30 min a 4°C. En el método de Isaacson [209], se extrajo el material con TCA 10% (p/v), 2-mercaptoetanol 2% (v/v) en acetona por 16 h a -20 °C. En ambos casos se extrajeron 20 mg PF de tejido con 500 µl de la respectiva solución. Luego, se centrifugó a 21.000 x g por 10 min para precipitar las proteínas y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se hicieron 3 lavados con acetona fría 90% (v/v) [en el caso del primer método, primero se hizo un lavado con TCA 5% (p/v)]. Finalmente, se dejó secar el precipitado de proteínas por evaporación y luego, se resuspendió en 200 µl de solución Laemmli.

Para la extracción de proteínas en estado nativo, 20 mg PF de tejido se extrajeron con 500 µl de una solución de bicina pH 9,0 100 mM, Gro 10% (v/v), tritón X-100 0,1% (v/v), 2-mercaptoetanol 5 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, benzamidina 1 mM, ácido aminocaproico 1 mM, PMSF 2 mM, cóctel para proteasas Set III (Merck, 539134), NaF 1 mM, Na₂MO₄ 1 mM y Na₃VO₄ 1 mM. Luego de agregar la solución de extracción, las muestras se agitaron con un vortex e incubaron en hielo por 10 min. A continuación, se centrifugaron a 21.000 x g por 10 min y el extracto proteico se separó de los restos de tejidos transfiriéndolo a un nuevo tubo.

3.3.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de Phos-Tag.

Se prepararon extractos crudos desnaturalizados que luego se resolvieron en un SDS-PAGE al 7,5% suplementado con el reactivo PhosTag-Mn²⁺ 25 µM (Fujifilm) siguiendo el instructivo del fabricante y las recomendaciones generales de la referencia [210].

3.3.16 Fosforilación *in vitro* de proteínas.

La fosforilación *in vitro* de la *PpeAld6P*Rasa se realizó incubando 1 µg de la proteína bajo las condiciones de fosforilación óptimas para cada familia de ProtKasas descritas anteriormente. Las

reacciones enzimáticas se realizaron en un volumen final de 20 µl con 1 µCi de [³²]γ-ATP (Perkin-Elmer) y fueron iniciadas mediante el agregado de la ProtKasa recombinante y terminadas con solución Laemmli reductora. Los productos de la reacción se separaron en un SDS-PAGE al 12% que, una vez finalizada la corrida, se tiñó con colorante Azul Brillante de Coomassie R-250 y se deshidrató. Para cuantificar la radiactividad incorporada se expuso el gel a una placa de almacenamiento (GE Healthcare) que luego fue revelada con el sistema *Typhoon* (GE Healthcare).

3.3.17 Inmunoprecipitaciones.

Se realizó la extracción de proteínas totales en estado nativo a partir de plántulas de *Arabidopsis* de 48 horas posteriores a la imbibición (HPI), siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Luego de igualar el contenido proteico de las muestras, se les agregó matriz de agarosa cargada con proteína A (Sigma Aldrich), la cual previamente se había conjugado al antisuero purificado anti-*AthPEPCKasa1* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron toda la noche a 4 °C en agitación. A continuación, para eliminar las proteínas no unidas, se hicieron 3 lavados con 500 µl de solución de TBST. Por último, se resuspendió el precipitado resultante en solución Laemmli reductora y se procedió a analizar las muestras por SDS-PAGE seguido de inmunodetección.

3.4 Análisis informático y estadístico.

3.4.1 Análisis cinético de la actividad enzimática.

Los datos de actividad enzimática se graficaron en función de la concentración de sustrato o efector y fueron ajustados a una ecuación de Hill modificada [211] que se muestra a continuación.

$$v = v_0 + (V - v_0) \times C^{n_H} / (k^{n_H} + C^{n_H})$$

donde v_0 es la velocidad en la ausencia de sustrato o efector analizado, V es la velocidad máxima (V_{max}), C es la concentración de sustrato o efector bajo estudio, k es la concentración de sustrato o efector produciendo la mitad de la velocidad máxima (K_M), activación ($A_{0,5}$) o inhibición ($I_{0,5}$), y n_H es el coeficiente de Hill. En el caso de las *AthPEPCKasas*, debido a que el comportamiento de las curvas de sustrato fue hiperbólico, los parámetros cinéticos se calcularon fijando la n_H a 1, que convierte a la ecuación de Hill en la clásica ecuación de Michaelis-Menten [212]. Los ajustes se realizaron con el programa informático *OriginPro 8.1* (*OriginLab Corporation*).

3.4.2 Análisis estadístico.

Para comparar medias, se empleó una prueba t de *Student* para dos muestras independientes o un ANOVA de una sola vía. Cuando se necesitó agrupar las medias, se realizó una prueba *post-hoc* Fisher LSD. En todos los casos los análisis se realizaron con el programa informático Minitab 17. Para comparar los parámetros cinéticos de las curvas de sustratos o efectores, los modelos ajustados se compararon con una prueba F de extra suma de cuadrados [213, 214], con el programa informático *GraphPad Prism* (Version 5).

3.4.3 Cálculo del límite de detección, límite de cuantificación, relación señal-ruido y factor Z.

Para el cálculo del límite de detección (LOD) y el de cuantificación (LOQ) se emplearon las siguientes ecuaciones:

$$XL = \overline{XB} + K. SD_B$$

donde XL es definida como la menor señal detectable, \overline{XB} es el valor medio de la respuesta del blanco, SD_B es la desviación estándar de la respuesta del blanco y K es un factor numérico elegido de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La menor concentración detectable se define como:

$$CL = \frac{(XL - \overline{XB})}{m} = \frac{K. SD_B}{m}$$

donde m es la pendiente de la curva de calibrado. Empleamos un K = 3 para el LOD y un K=10 para el LOQ [215].

Para calcular la relación señal-ruido (S:R) y el factor Z se emplearon las siguientes ecuaciones [216]:

$$S:R = \frac{\text{Señal promedio muestra}}{\text{Señal promedio blanco}}$$

$$\text{Factor Z} = 1 - \left(\frac{3 \text{ SD muestra} + 3 \text{ SD blanco}}{|\text{Promedio muestra} - \text{Promedio blanco}|} \right)$$

donde SD es la desviación estándar.

3.4.4 Cuantificación de geles por densitometría.

La cuantificación de intensidad de bandas de geles, *western blots* o geles radiactivos, se realizó con el paquete informático FIJI (<https://imagej.net/Fiji>).

3.4.5 Modelado Molecular

Se obtuvieron modelos de las *AthPEPCK*asas con el servidor informático I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>), el cual construye modelos moleculares de proteínas empleando la técnica de alineamientos estructurales múltiples acoplado a simulaciones iterativas [217]. Se siguió trabajando con los modelos con mejor puntaje (*C-score*) los cuales, para evaluar su calidad, se analizaron con el servidor *Verify3D* (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/Verify3D/>). Este servidor evalúa la compatibilidad del modelo atómico (3D) con su propia secuencia aminoacídica (1D) al asignar una clase estructural basada en su propia ubicación y el ambiente, y comparando los resultados obtenidos con los de estructuras conocidas de buena calidad [218]. Para comparar tridimensionalmente los modelos de las *AthPEPCK*asas, empleamos la herramienta *Multiseq* [219] disponible en el programa informático VMD (versión 1.9.3), siguiendo las instrucciones disponibles en el manual de usuario (<https://www.ks.uiuc.edu/Training/Tutorials/vmd/tutorial-html/node7.html>).

3.4.6 Obtención de datos de fosfoproteómica.

Para obtener datos de espectrometría de masas acerca de modificaciones postraduccionales, se emplearon los servidores *PhosPhat* (<http://phosphat.uni-hohenheim.de/>) que agrupa datos de fosfoproteómica de proteínas vegetales [220] y la base de datos *Plant PTM viewer* (<https://www.psb.ugent.be/webtools/ptm-viewer/>) que agrupa información sobre diferentes modificaciones postraduccionales de proteínas vegetales [221]. En todos los casos, la información que se encontró en las bases de datos, se curó manualmente analizando las publicaciones correspondientes y sus correspondientes materiales suplementarios.

3.4.7 Búsqueda de secuencias homólogas.

Para buscar proteínas homólogas a las *AthPEPCK*asas en diferentes especies vegetales, se empleó la herramienta BLASTP del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>)

y del Phytozome 12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Las secuencias encontradas se curaron manualmente empleando el programa informático *BioEdit* (versión 7.0.5.3), eliminándose aquellas secuencias incorrectas, repetidas o muy cortas [222]. Las secuencias resultantes se muestran en el anexo de Material Suplementario y corresponden a aquellas que se emplearon en los análisis informáticos siguientes.

3.4.8 Alineamiento múltiple de secuencias y análisis filogenético.

Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas empleando el algoritmo Clustal ω [223] con el programa informático *BioEdit* (versión 7.0.5.3) que luego fue mejorado manualmente. Para realizar el análisis filogenético, se eliminaron del alineamiento las regiones poco conservadas, con el servidor *GBlocks* [224]. El alineamiento resultante se empleó para construir un árbol filogenético con el programa informático *SeaView* (Version 5.0.4). El árbol se construyó empleando el método de Bio-NJ [225], una versión mejorada del algoritmo de *neighbor-joining* inicialmente propuesto por Saitou y Nei [226]. Para estimar la confiabilidad del árbol, se empleó el método de *bootstrap*. Este método toma una muestra de los sitios en el alineamiento y crea un árbol basándose en esa muestra. Este proceso se itera múltiples veces y los resultados se compilan para permitir una estimación de la confiabilidad de un agrupamiento particular. Se realizaron 2000 iteraciones, lo cual asegura un 95% de confianza en los valores de *bootstrap* [222].

4. Resultados.

4.1 Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las *Ath*PEPCKasas.

4.1.1 Análisis filogenético de las ATP-PEPCKasas de plantas.

Para realizar un análisis filogenético de las ATP-PEPCKasas de plantas, realizamos la búsqueda de homólogos a la *Ath*PEPCKasa1 en las bases de datos NCBI y *Phytozome*. Las secuencias seleccionadas se emplearon para realizar un alineamiento múltiple. De esta manera encontramos que las PEPCKasas de plantas presentan una elevada identidad de secuencias entre ellas, a excepción de los extremos N, que muestran mayor divergencia. Para realizar el análisis filogenético posterior, empleamos la herramienta *GBlocks* que elimina las zonas poco alineadas, una estrategia que es adecuada y confiable para mejorar la construcción de los árboles filogenéticos [222, 224]. Luego, reconstruimos el árbol con el algoritmo de Bio-NJ empleando como prueba de confiabilidad el método de *bootstrap*. Como puede observarse en la Figura 9, las secuencias de especies fotosintéticas se separan claramente de las ATP-PEPCKasas de *E. coli* y de *S. cerevisiae*, las cuales quedan separadas como grupos divergentes. Luego, se abren dos ramas, una que agrupa a las secuencias de algas verdes (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Volvox carteri* y *Chlorella variabilis*) y otra en el que se ubican las secuencias de plantas.

Al analizar a las PEPCKasas de plantas, el árbol se separa en dos ramas; una que agrupa a las proteínas de plantas no vasculares (*Marchantia polymorpha* y *Physcomitrium patens*) y otra que agrupa al resto de las enzimas de plantas vasculares. Dentro de las plantas vasculares, en una rama se ubica la *Ath*PEPCKasa2, junto con otras pocas secuencias de PEPCKasas de *Brassica napus* y *Brassica rapa*.

En otro grupo se ubica la *Ath*PEPCKasa1 junto con el resto de las secuencias de plantas, ubicándose cerca de las enzimas de otras plantas dicotiledóneas como *Brassica napus*, *Brassica rapa* y *Glycine max*, entre otras (Figura 9). Más alejadas de la *Ath*PEPCKasas se ubican las secuencias de especies monocotiledóneas como *Oryza sativa*, *Setaria viridis* y *Zea mays* (Figura 9).

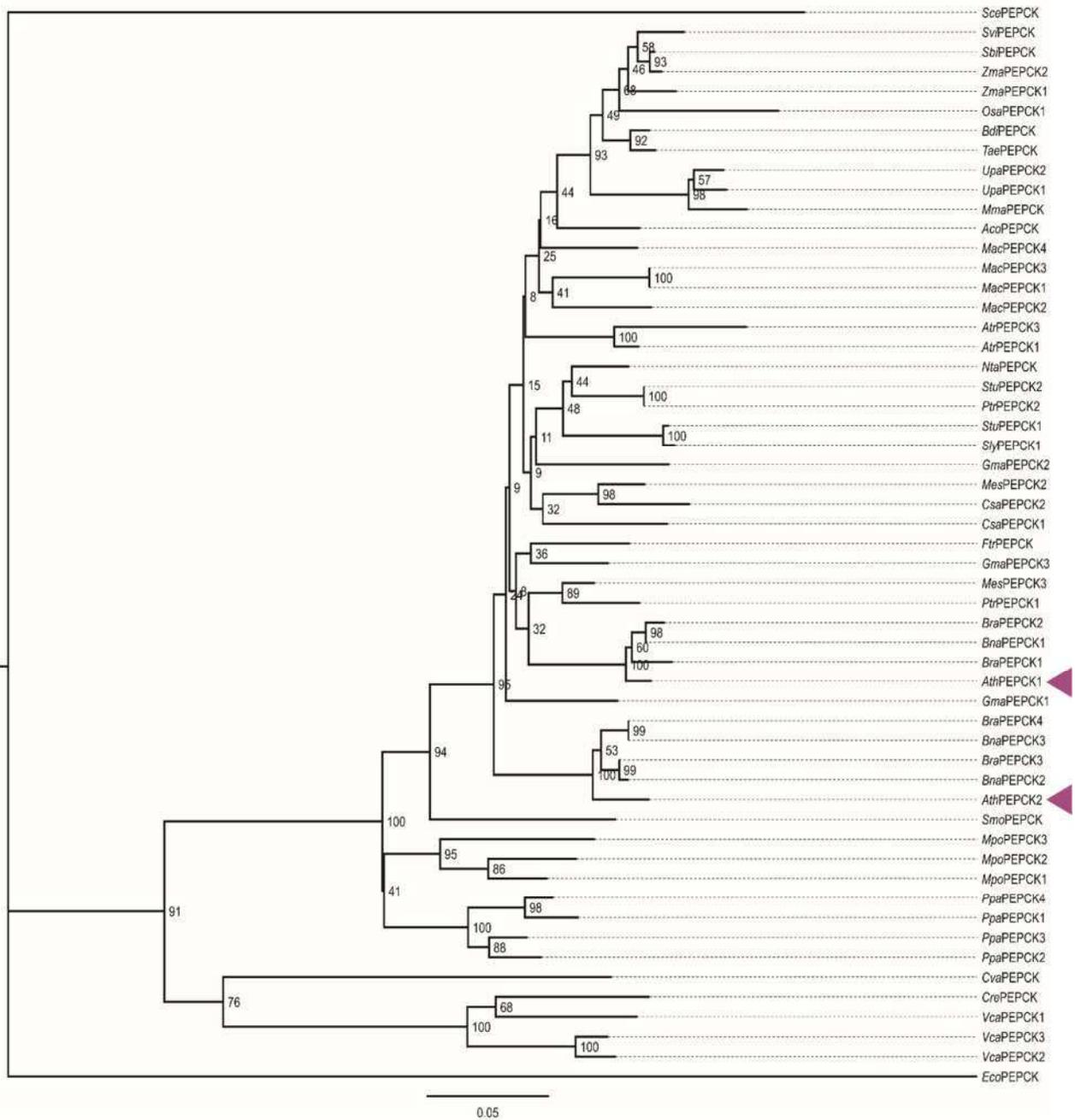


Figura 9. Árbol filogenético de las PEPCKasas. La reconstrucción del árbol se realizó con el algoritmo de Bio-NJ empleando la prueba de *bootstrap*. Las secuencias fueron codificadas para mayor claridad (en el apartado de Material Suplementario, se describen las secuencias en detalle). Los números que aparecen al comienzo de cada rama representan el valor de *bootstrap* obtenido. La ubicación de las *Ath*PEPCKasas se señala con una flecha (►).

4.1.2 Análisis de la expresión génica.

El genoma de *Arabidopsis* contiene dos genes codificantes para las PEPCKasas; *PEPCK1* (AT4G37870.1) y *PEPCK2* (AT5G65690.1). Trabajos previos determinaron que las *Ath*PEPCKasas se expresan en diferentes tejidos vegetales como semillas en germinación, rosetas, hojas, raíces, flores, entre otros [74, 227]. Estos trabajos se realizaron por reacción en cadena de la polimerasa con la transcriptasa inversa (RT-PCR), la cual permite determinar la expresión de un gen en un tejido pero, al no ser cuantitativa, no se pueden hacer inferencias respecto a su nivel de expresión o comparaciones con otros genes. Para comparar los niveles de expresión entre las *Ath*PEPCKasas, se descargaron los datos de expresión génica del servidor *EfP browser* [228] obtenidos del trabajo de transcriptómica realizado por Klepikova y col. [229]. La expresión del gen *PEPCK1* se da en todos los tejidos de la planta, mientras que la expresión de *PEPCK2* está más localizada en flores, semillas en germinación y el ápice de la raíz (Figura 10). Sin embargo, el nivel de expresión de *PEPCK1* es, en general, significativamente mayor que el de *PEPCK2*. Por ejemplo, al comparar la expresión durante la germinación de las semillas, la expresión de *PEPCK1* es entre 500 y 1000 veces superior que la de *PEPCK2*.

Al comparar los distintos tejidos en los que se expresan las enzimas puede observarse que la mayor expresión de estos genes se da durante la germinación de las semillas (Figura 10), lo cual coincide con lo descrito en la Introducción acerca del rol clave de esta enzima en la gluconeogénesis. En este estadio, la expresión aumenta con la germinación de las semillas hasta llegar a un máximo 24 HPI, momento a partir del cual los niveles de expresión comienzan a descender. En los tejidos florales también se observa un aumento en la expresión de estos genes, aunque en menor medida de lo que ocurre durante la germinación de las semillas (Figura 10).

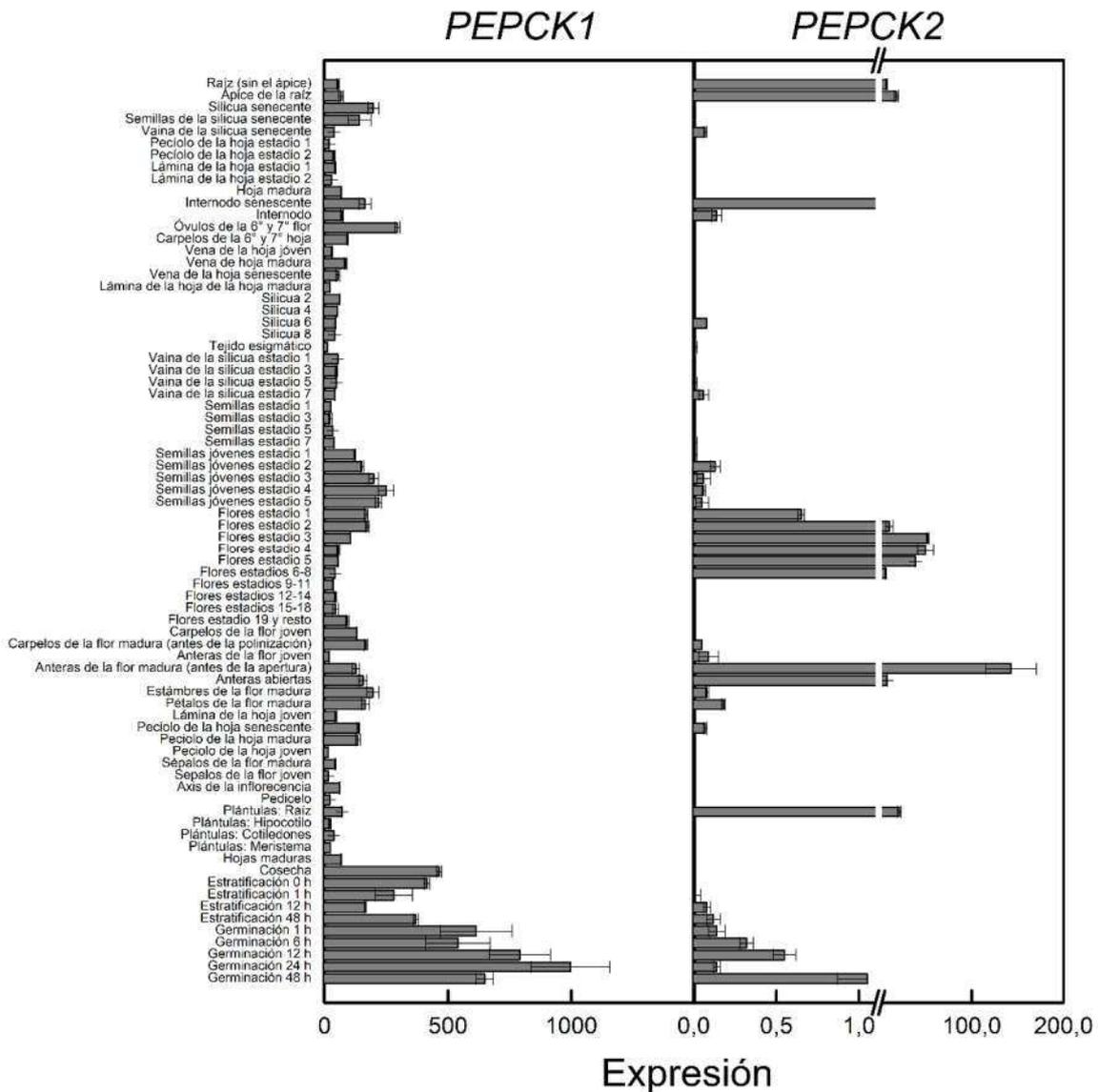


Figura 10. Niveles de expresión de los genes *PEPCK1* y *PEPCK2* en los diferentes tejidos de *Arabidopsis*. Los valores de expresión génica se obtuvieron del servidor *Efp browser* [228] y corresponden a los datos transcriptómicos generados por Klepikova y col. [229].

4.1.3 Clonado y expresión recombinante.

Hasta el momento del desarrollo de esta Tesis, las propiedades bioquímicas de las PEPCKasas de los organismos fotosintéticos habían sido pobremente exploradas, en comparación con sus contrapartes en bacterias, levaduras y mamíferos. Es por esto que, para expandir el conocimiento sobre las propiedades bioquímicas de estas enzimas claves para el metabolismo vegetal, nos propusimos realizar una caracterización exhaustiva de las propiedades cinéticas, estructurales y regulatorias de las dos PEPCKasas de *Arabidopsis*. Todas las PEPCKasas de plantas estudiadas hasta el momento del inicio de esta Tesis provenían de purificaciones realizadas a partir del tejido fuente. Sin embargo, al purificar estas enzimas a partir de su fuente natural, es difícil obtener preparaciones homogéneas debido a su extrema sensibilidad a la proteólisis y la fosforilación [95, 132, 165]. Por esto, decidimos estudiar a las enzimas recombinantes por expresión heteróloga de los respectivos genes en bacterias, pues es una estrategia conveniente para obtener preparaciones homogéneas, no fosforiladas y no proteolizadas adecuadas para realizar caracterizaciones bioquímicas [176, 230].

La *AthPEPCKasa1* es una proteína de 672 aminoácidos con un punto isoeléctrico teórico de 6,6 y una masa estimada de 73,5 kDa; mientras que *AthPEPCKasa2* es una proteína de 671 aminoácidos, con un punto isoeléctrico teórico de 6,0 y una masa estimada de 73,0 kDa. La identidad de secuencias entre ambas proteínas es de 78,4% (con una similitud de 86,5%), estando las principales diferencias localizadas en los primeros 150 aminoácidos (Figura 11 A, B). Por otra parte, las bases de datos predicen tres variantes de *splicing* adicionales para la *AthPEPCKasa2* (AT5G65690.2, AT5G65690.3, AT5G65690.4), con diferencias en el extremo C de la proteína que codificarían. AT5G65690.1 y AT5G65690.4 son iguales, mientras que AT5G65690.2 muestra una inserción de 30 aminoácidos en el extremo C y AT5G65690.3 posee un extremo C más corto (Figura 11 C, D). En este trabajo se dejó de lado el estudio de estas tres últimas variantes de *splicing*. Al analizar las secuencias primarias de las *AthPEPCKasas* pudimos identificar los motivos conservados descritos para las ATP-PEPCKasas [85], los cuales se resaltan en gris en la Figura 11. El motivo PCK, de quinasa 1A, de quinasa 2 y de unión a la adenina descritos para las ATP-PEPCKasas [85] están presentes en todos los transcritos analizados (Figuras 11 B, C). Una excepción sería el transcrita 4 de la *AthPEPCKasa2*, en la cual se encontraría mutado el sitio de unión a la adenina (Figura 11 D).

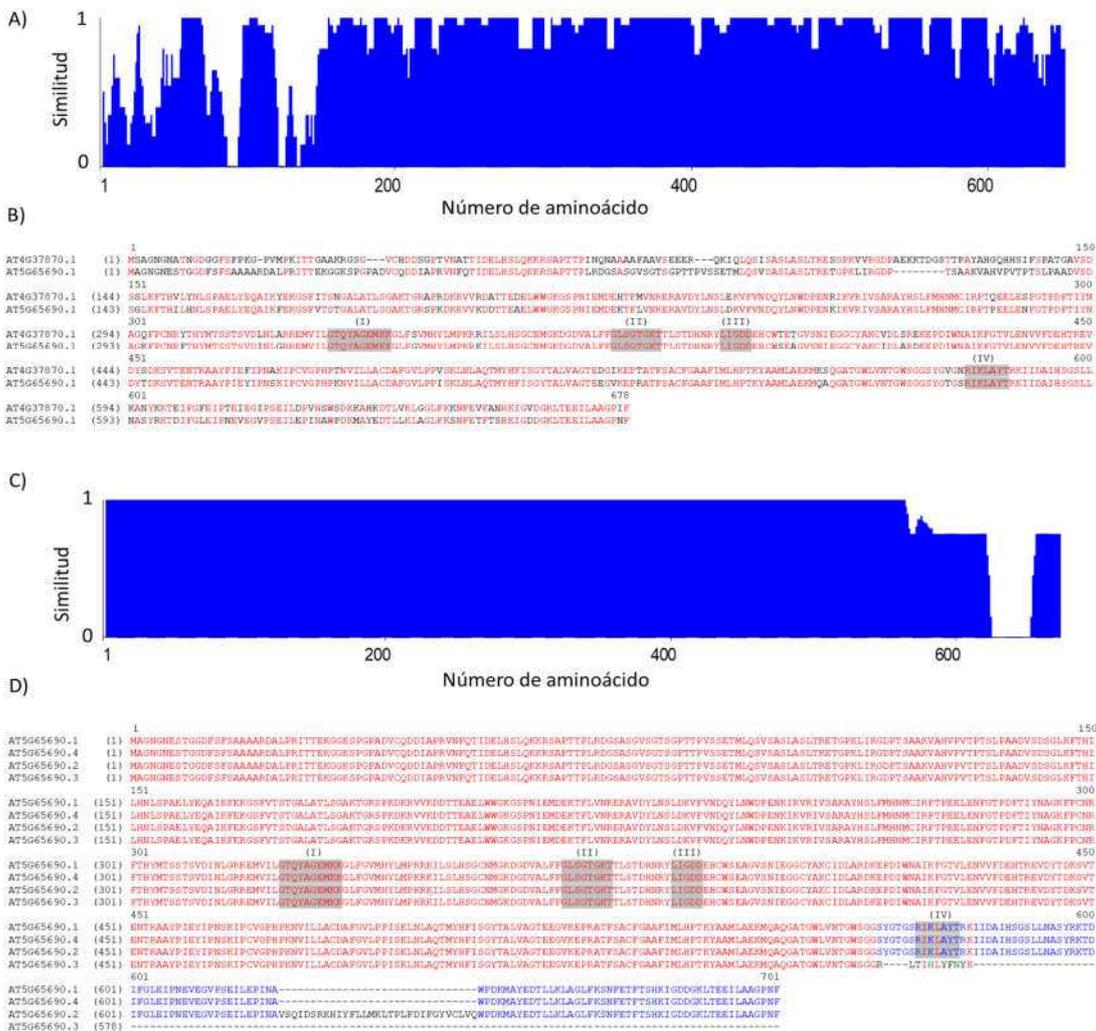


Figura 11. Análisis comparativo de las secuencias primarias de las *AthPEPCK*as putativas.

Las secuencias primarias de las diferentes isoformas de las *AthPEPCK*as se obtuvieron de la base de datos del TAIR [231]. Se realizó un alineamiento y un análisis de la similitud de secuencias entre las *AthPEPCK*asa 1 y 2 (A, B) y de las distintas isoformas de la *AthPEPCK*asa2 (C, D) con el programa informático *Vector NTI Advance 10.3* (Invitrogen). Los motivos coloreados en gris corresponden a el dominio PCK (I), de quinasa 1A (II), de quinasa 2 (III), y el motivo de unión a adenina (IV), que se describieron para las ATP-PEPCKas en la referencia [85].

Realizamos el clonado de ambos genes y los expresamos heterológamente en *E. coli* para producir las respectivas proteínas de forma recombinante fusionadas a una etiqueta de poli-histidinas (His₆) de 2 kDa en sus extremos N. Ambas proteínas se produjeron de forma soluble, por lo que se purificaron por IMAC-Ni²⁺, obteniéndose una preparación altamente pura (>90%) de cada una, con masas moleculares de ~75 kDa (Figura 12 A). Las proteínas recombinantes mostraron una actividad específica de 3 y 5 U.mg⁻¹ (*AthPEPCKasa1* y *AthPEPCKasa2*, respectivamente), cuando se ensayaron en el sentido de descarboxilación del OAA. Para determinar su estructura cuaternaria, se analizó cada enzima por cromatografía de exclusión molecular, determinándose que ambas tienen una masa molecular de ~400 kDa, lo cual corresponde a una estructura homohexamérica (Figura 12 B).

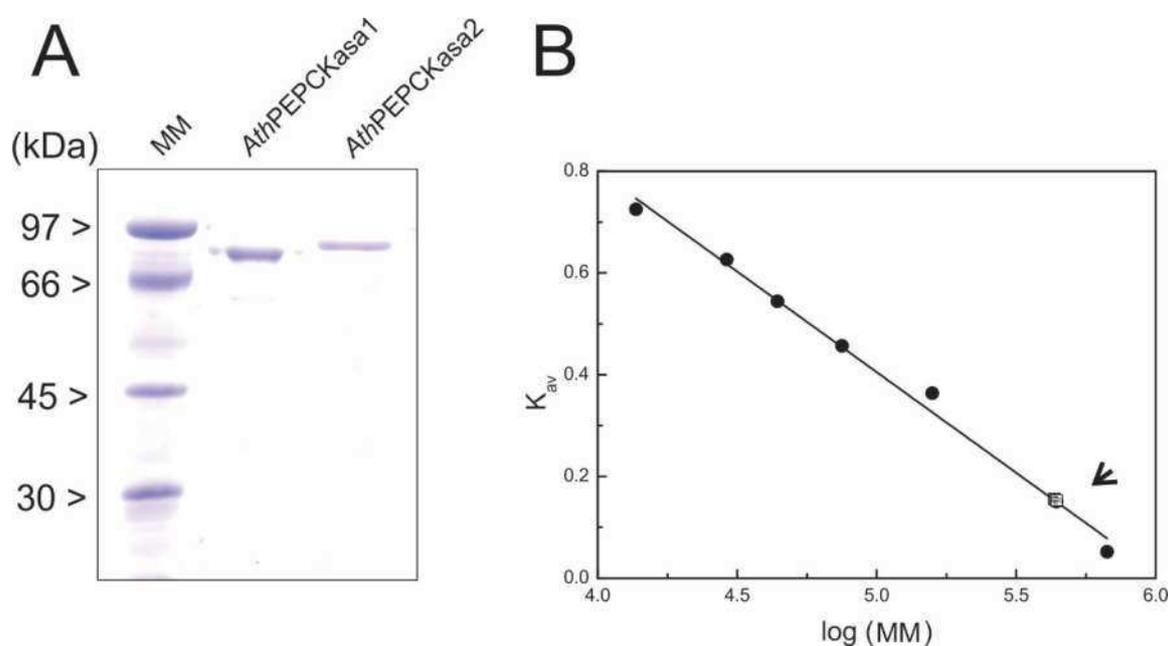


Figura 12. Purificación y determinación de la masa molecular de las *AthPEPCKasas*. (A) La *AthPEPCKasa1* y la *AthPEPCKasa2* purificadas fueron analizadas mediante un SDS-PAGE al 12% para comprobar su grado de pureza. (B) Curva de calibración construida para la columna de filtración en gel *Superdex 200* con los estándares proteicos informados en Materiales y Métodos. Para las muestras (cuadrados blancos señalados con una flecha) se muestran los datos correspondientes al promedio de dos experimentos independientes. El valor de K_{av} se calculó de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. MM: marcador de masa molecular.

4.1.4 Caracterización cinética.

Para encontrar una condición óptima de medida en la cual realizar la caracterización cinética, se hicieron curvas de pH empleando soluciones reguladoras adecuadas para cada rango ensayado. Se determinó que el pH óptimo para la actividad era 7,0 en ambas direcciones de reacción (Figura 13). Es por esto que se decidió realizar la caracterización cinética a pH 7,0 con la solución reguladora HEPES [pK_{a2} (25 °C) = 7,5] puesto que ya había sido empleado para el estudio de otras PEPCKasas [95, 114, 158, 167, 232–234]. Además, esta especie reguladora presenta la ventaja de que su interacción con los iones metálicos es mínima, lo que lo hace ideal para realizar ensayos bioquímicos [235].

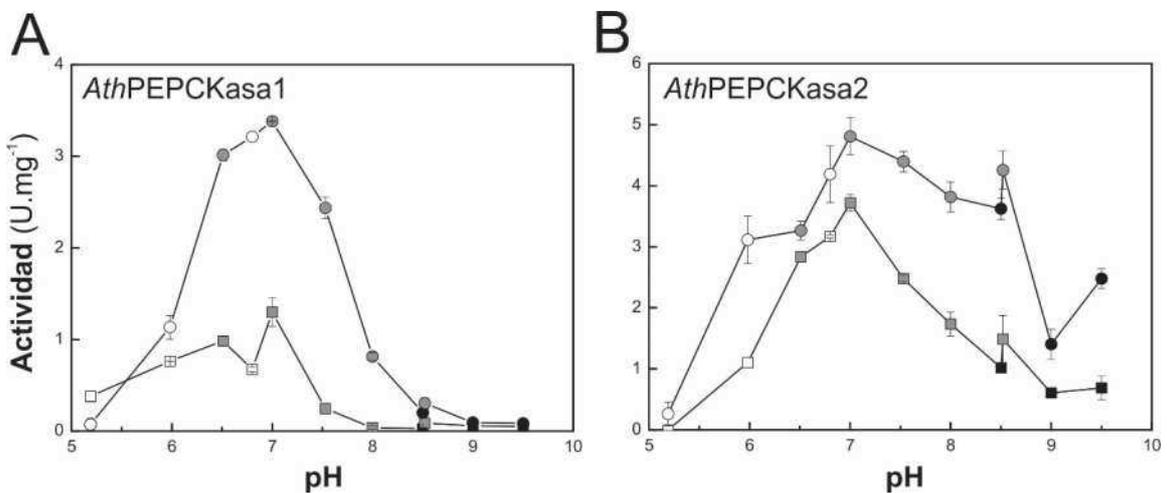


Figura 13. Curvas de pH para las *AthPEPCKasas*. Se ensayó la actividad de la *AthPEPCKasa1* (A) y la *AthPEPCKasa2* (B) usando la condición estándar descrita en Materiales y Métodos, a los valores de pH indicados. Se emplearon las siguientes especies reguladoras de pH; MES-NaOH (blanco), HEPES-NaOH (gris) y Tricina-NaOH (negro). La actividad se ensayó tanto en el sentido de carboxilación (cuadrados) como de descarboxilación (círculos).

Las PEPCKasas necesitan de dos iones metálicos para catalizar la reacción; el Mg^{2+} y el Mn^{2+} , siendo el primero necesario para formar el verdadero sustrato (el complejo ATP- Mg^{2+}) y el segundo un activador [97]. Analizamos en ambas enzimas el efecto de concentraciones crecientes de Mn^{2+} a una concentración fija de Mg^{2+} y viceversa. Estos experimentos se realizaron en la dirección de carboxilación porque medir la actividad PEPCKasa en la dirección opuesta requiere el agregado obligatorio de un ion metálico para la PyrKasa que forma parte del acople [236]. Las mayores actividades (~ 3.5 U.mg⁻¹ para la *AthPEPCKasa1* y ~ 6.0 U.mg⁻¹ para la *AthPEPCKasa2*) se obtuvieron

con una concentración de Mn^{2+} 1 mM en ausencia de Mg^{2+} , mientras que la presencia de Mg^{2+} 0,5 mM disminuyó ~2 veces la actividad de ambas enzimas (Figura 14 A y C). El patrón opuesto se observó a bajas concentraciones de Mn^{2+} (0 a 0,1 mM), dado que la presencia de Mg^{2+} 0,5 mM aumentó levemente su actividad (Figura 14 A y C). Las *AthPEPCK*asa 1 y 2 respondieron exigüamente al Mg^{2+} en ausencia de Mn^{2+} . Sin embargo, una concentración tan baja como Mn^{2+} 10 μM produjo una respuesta discreta al Mg^{2+} (Figura 14 B y D). Tradicionalmente, la actividad PEPCKasa se ensayaba con concentraciones relativamente altas de Mn^{2+} (0,5 – 5 mM), condiciones en la cual se obtiene la máxima actividad (Figura 14). Sin embargo, en las células vegetales la concentración citosólica de Mn^{2+} se encuentra en el rango de 0,3-0,8 μM [237, 238]. Por esto, los parámetros cinéticos se determinaron a concentraciones fisiológicas de ambos iones (Mg^{2+} 4 mM y Mn^{2+} 10 μM), como ha sido realizado previamente por Chen y col. [144] de forma de extraer de las caracterizaciones cinéticas conclusiones fisiológicamente relevantes.

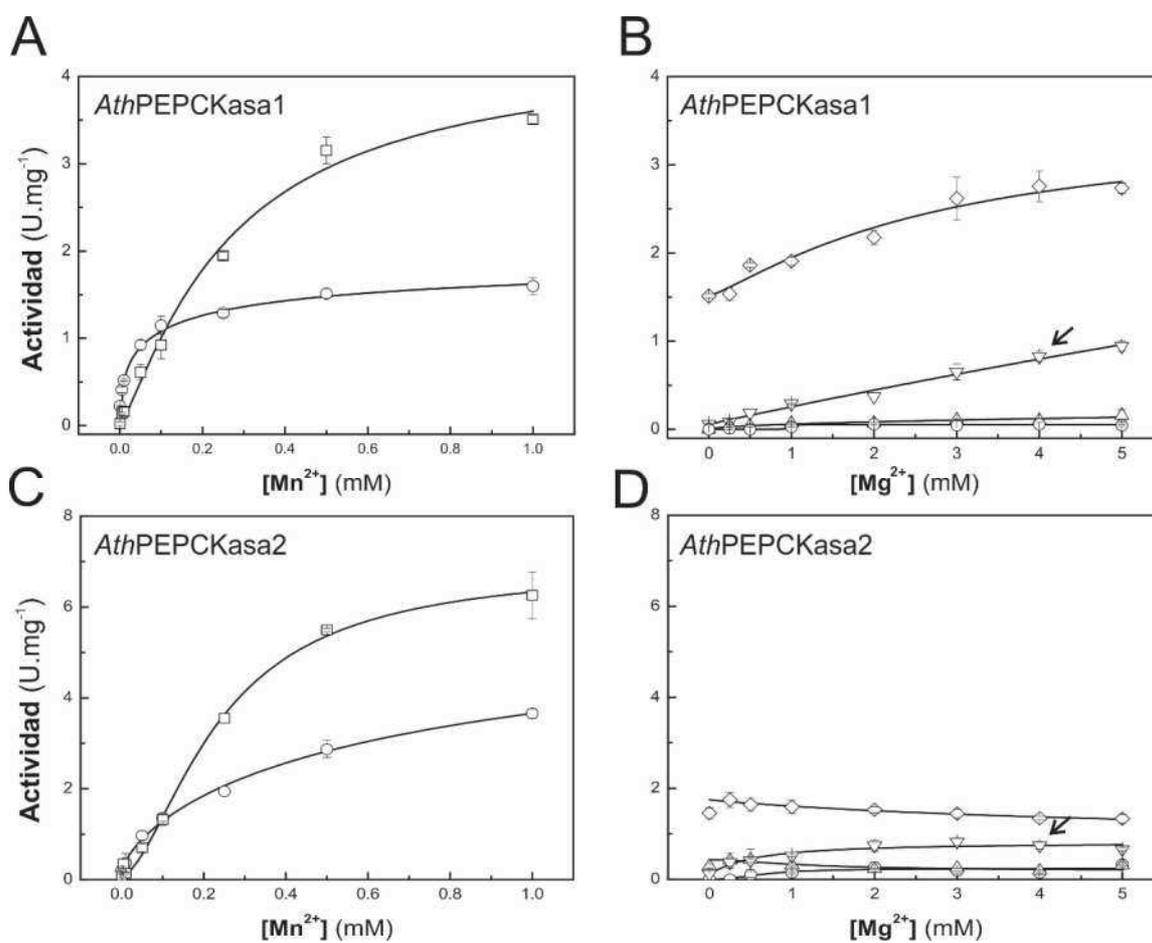


Figura 14. Dependencia de los metales de la actividad carboxilasa de las *AthPEPCKasas*. La actividad para la *AthPEPCKasa1* (A) y la *AthPEPCKasa2* (C) se midió a concentraciones crecientes de Mn^{2+} en ausencia (cuadrados) o presencia de Mg^{2+} 0,5 mM (círculos). También, la *AthPEPCKasa1* (B) y la *AthPEPCKasa2* (D) se midió con concentraciones crecientes de Mg^{2+} en ausencia (triángulos) o presencia de Mn^{2+} 10 μ M (triángulos invertidos) o 100 μ M (diamantes). También, se realizó un control con EGTA 0,1 mM para eliminar posibles trazas de Mn^{2+} (círculos). Las concentraciones de sustratos que se emplearon fueron: ADP 0,3 mM y PEP 6 mM. Las flechas marcan las concentraciones fisiológicas de metales empleadas para la caracterización cinética. Los datos representan la media \pm SE de dos conjuntos de datos independientes.

Para determinar los parámetros cinéticos de ambas enzimas, se realizaron curvas de saturación de sustrato para ambas direcciones de catálisis (Tabla 3, Figuras 15-16). Ambas enzimas poseen una afinidad (estimada a partir de sus valores de K_M) de más de dos órdenes de magnitud más alta para la unión del OAA en comparación con el PEP. En el caso de los nucleótidos, las afinidades por el ADP y el ATP se encuentran en el mismo rango. En general, las actividades específicas y las afinidades por los sustratos son más altas para la *AthPEPCKasa2* que para la *AthPEPCKasa1* (Tabla 3). Los valores de V_{max} en la dirección de descarboxilación fueron moderadamente mayores (~2 veces) en comparación con aquellos observados para la reacción de carboxilación.

Tabla 3. Parámetros cinéticos para los sustratos de la *AthPEPCKasas*. Las reacciones se realizaron de acuerdo con la reacción estándar descrita en Materiales y Métodos. Las constantes se calcularon ajustando los datos experimentales a la ecuación de Hill modificada, ajustando el n_H a 1 (Figuras 15 y 16). Los valores que se reportan son la media \pm SE obtenida del software utilizado en el ajuste. Las concentraciones fijas de sustrato fueron las siguientes: ^a, ADP 0,25 mM; ^b, PEP 15 mM; ^c, ATP 0,75 mM; ^d, OAA 0,75 mM.

Enzima	Reacción	Sustrato	K_M (μ M)	V_{max} (U.mg ⁻¹)	Eficiencia catalítica (x 10 ³ M ⁻¹ .s ⁻¹)
<i>AthPEPCKasa1</i>	Carboxilación	PEP ^a	3700 \pm 500	1,40 \pm 0,03	0,5 \pm 0,1
		ADP ^b	79 \pm 1		25 \pm 2
	Descarboxilación	OAA ^c	230 \pm 20	2,6 \pm 0,3	13 \pm 3
		ATP ^d	72 \pm 2		39 \pm 5
<i>AthPEPCKasa2</i>	Carboxilación	PEP ^a	3800 \pm 300	3,2 \pm 0,1	1,1 \pm 0,1
		ADP ^b	39 \pm 4		100 \pm 16
	Descarboxilación	OAA ^c	100 \pm 10	5,4 \pm 0,1	82 \pm 6
		ATP ^d	18 \pm 3		370 \pm 42

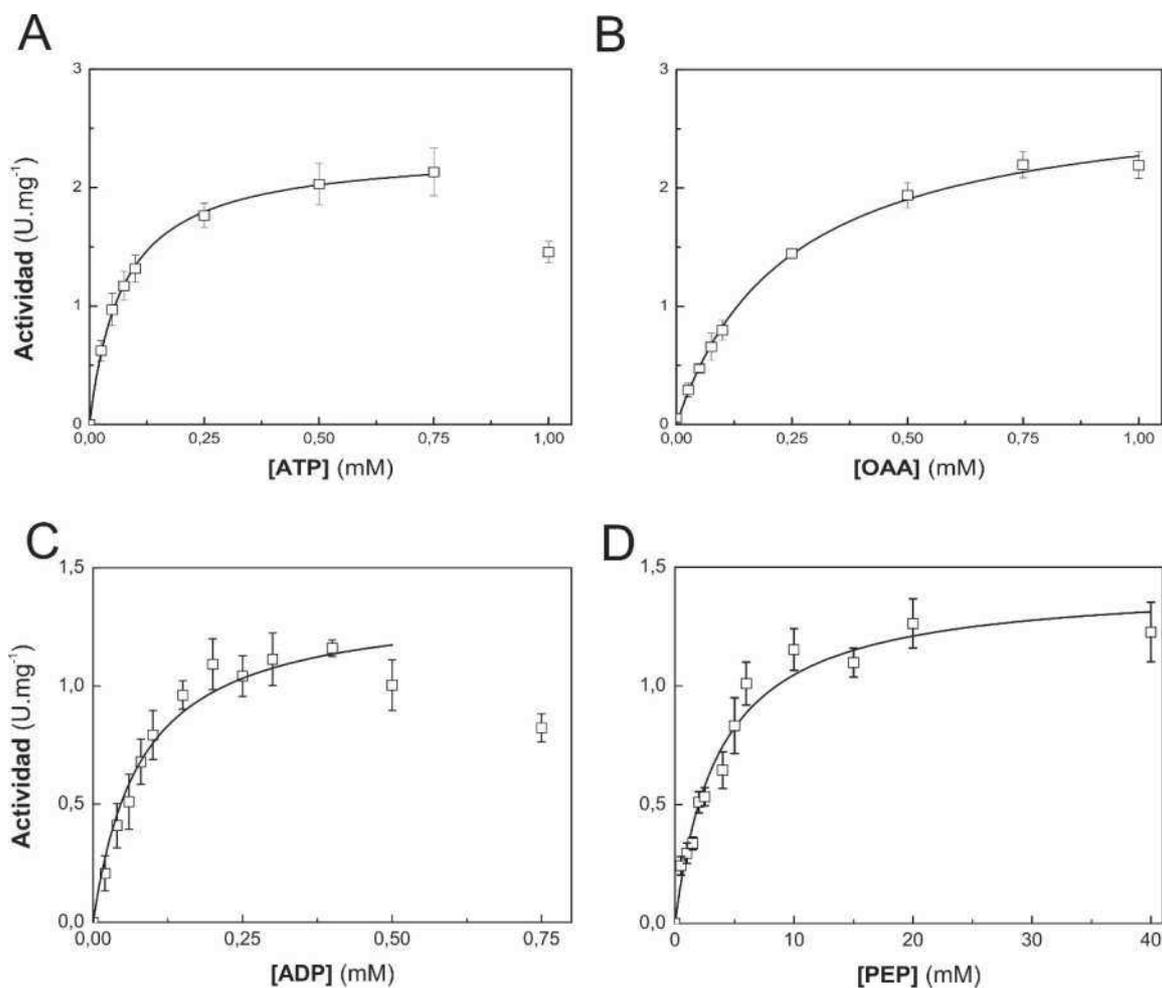


Figura 15. Curvas de saturación de sustratos para la *AthPEPCKasa1*. Cada curva se realizó usando la concentración variable de sustrato descrita en la Figura y una concentración fija de: A) OAA 0,75 mM, B) ATP 0,75 mM, C) PEP 15 mM, D) ADP 0,25 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro sets de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Hill modificada, fijando el nH a 1 (hasta el punto en el cual se observó la mayor actividad en el caso de la curva de ADP). Los parámetros calculados se muestran en la Tabla 3.

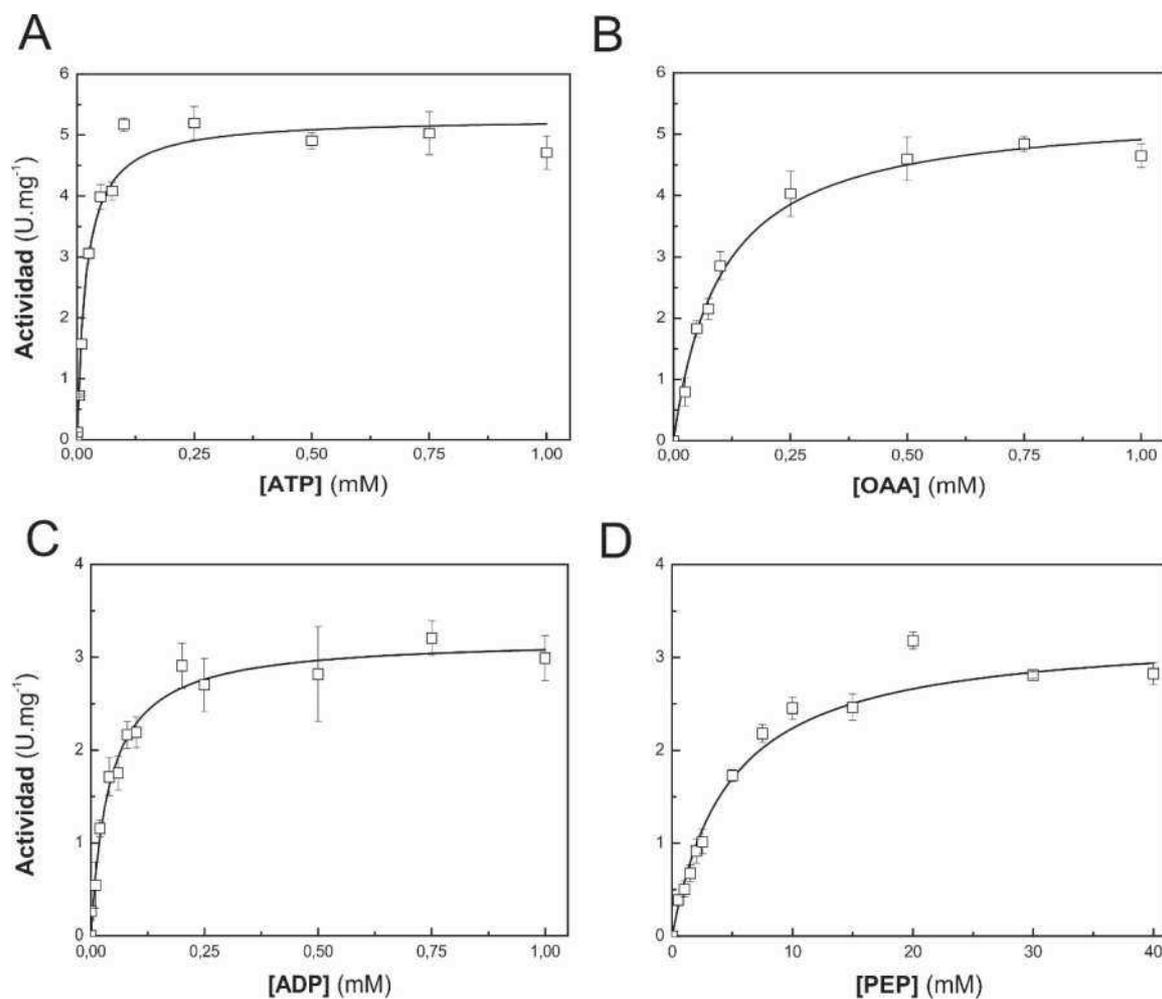


Figura 16. Curvas de saturación de sustratos para la *AthPEPCKasa2*. Cada curva se realizó usando la concentración variable de sustrato descrita en la Figura y una concentración fija de: A) OAA 0,75 mM, B) ATP 0,75 mM, C) PEP 15 mM, D) ADP 0,25 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro sets de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Hill modificada, fijando el nH a 1 (hasta el punto en el cual se observó la mayor actividad en el caso de la curva de ATP). Los parámetros calculados se muestran en la Tabla 3.

4.1.5 Regulación alostérica.

Las enzimas involucradas en pasos metabólicos claves suelen estar reguladas por diferentes mecanismos postraduccionales. Entre estos, la regulación alostérica juega un rol clave en el control fino de las actividades enzimáticas [29, 30, 239, 240]. Para identificar potenciales ligandos de las *AthPEPCK*asas, realizamos ensayos de desnaturalización térmica de proteínas en presencia del colorante *Sypro Orange* acoplado al monitoreo del cambio de la fluorescencia en tiempo real [200, 241–243]. Esta técnica, que permite identificar ligandos de las proteínas [244], se basa en el monitoreo de la desnaturalización irreversible de las proteínas en presencia de un colorante fluorescente. Los colorantes que se emplean tienen mayor fluorescencia al unirse a los sitios hidrofóbicos que exponen las proteínas al desnaturalizarse, en comparación con las soluciones acuosas donde la fluorescencia es apagada [241, 245]. De esta manera es posible seguir el proceso de desnaturalización en tiempo real. Si se observa un aumento en la T_m de la proteína, se puede suponer que existió unión del ligando a la proteína, formando un complejo que es más estable [241]. Esto la hace una herramienta rápida, robusta y económica para analizar efectores alostéricos a gran escala [200, 241–243].

Realizamos el muestreo de potenciales ligandos sobre las *AthPEPCK*asas, utilizando un amplio espectro de metabolitos pertenecientes a diferentes vías metabólicas. En nuestros experimentos las curvas de desnaturalización resultaron ser altamente reproducibles, con coeficientes de variación menores al 1,5% (Figura 17). Entre los metabolitos que se ensayaron, aquellos que modificaron de forma significativa la T_m de las *AthPEPCK*asas fueron: Fru-6P, Glc-6P, Glc-1P, Fru-1,6-bisP, 3-PGA, PPI, el análogo del PEP *N*-(fosfonometil)-glicina, Pyr, acetyl-CoA, citrato, malato, succinato, fumarato, Glu, shikimato, Arg, y Asp (Figura 18). De forma importante en el análisis, y en línea con lo descrito para esta técnica, el aumento en la T_m para algunos metabolitos dependía de su concentración.

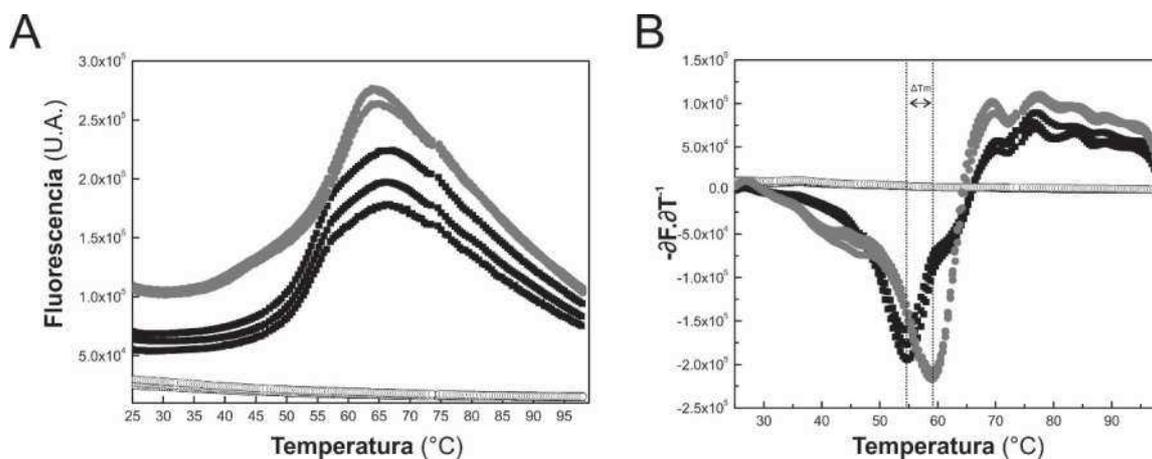


Figura 17. Ensayo de desnaturalización de proteínas acoplado al monitoreo de la fluorescencia para las *Ath*PEPCKasas. (A) Un típico perfil de desnaturalización de la *Ath*PEPCKasa1 en presencia y ausencia de citrato 5 mM. (B) Primera derivada negativa de la emisión de fluorescencia como función de la temperatura ($-\partial F.\partial T^{-1}$). La T_m se identifica como el mínimo de la derivada de la curva. Cuadrados blancos; control sin proteína, cuadrados negros; control sin ligando, círculos blancos; control sin proteína ni ligando, círculos grises; *Ath*PEPCKasa1 en presencia de citrato 5 mM. U.A.: unidades arbitrarias.

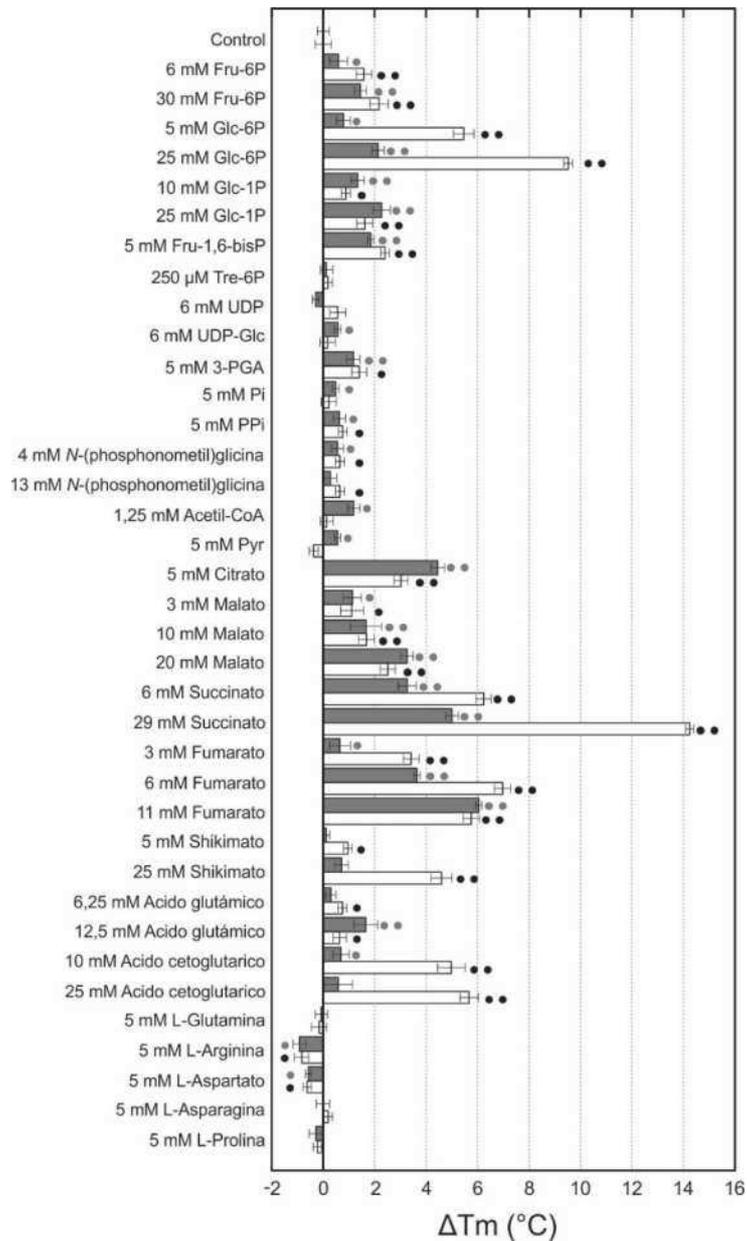


Figura 18. Muestreo de potenciales efectores de las *AthPEPCK*asas por ensayos de desnaturalización de proteínas acoplado al monitoreo simultáneo de la fluorescencia. Se determinó el cambio en la T_m para la *AthPEPCK*asa1 (barras grises) y la *AthPEPCK*asa2 (barras blancas) en presencia de los efectores que se muestran en la Figura. El cambio en la temperatura de desnaturalización se calculó de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos que se muestran corresponden a la media \pm SE de tres réplicas para todas las muestras y nueve réplicas para el control sin el ligando. • corresponde a un valor $P < 0.05$ y •• corresponde a un valor $P < 0.01$ empleando una prueba t de *student* para dos muestras independientes con un intervalo de confianza del 95%.

Los metabolitos identificados en el paso anterior se analizaron como efectores de la actividad descarboxilasa de cada enzima (Figura 19). La Glc-6P, Fru-6P y Glc-1P inhibieron a la *AthPEPCKasa1* pero no a la *AthPEPCKasa2*, mientras que la Fru-1,6-bisP inhibió a ambas enzimas. En el caso de la *AthPEPCKasa1*, la Glc-6P produjo la inhibición más fuerte (~75%) a la mayor concentración analizada, mientras que la Glc-1P, la Fru-6P y la Fru-1,6-bisP produjeron una inhibición de ~50% a la misma concentración (Figura 19). Para la *AthPEPCKasa1*, los valores de $I_{0.5}$ para la Glc-6P y la Fru-1,6-bisP fueron 8,1 y 16 mM, respectivamente, mientras que la Glc-1P y Fru-6P exhibieron valores de $I_{0.5}$ ~3 veces más grandes que la Glc-6P (Tabla 4).

Los ácidos orgánicos α -cetoglutarato, fumarato, succinato y citrato mostraron patrones similares de inhibición para ambas enzimas, mostrando el fumarato el menor valor de $I_{0.5}$ (Tabla 4). Para analizar si la inhibición observada era debida al secuestro del metal libre, realizamos las mismas curvas, pero preparando los ácidos orgánicos con cantidades equimolares de Mg^{2+} . Bajo estas condiciones, los valores de $I_{0.5}$ de la *AthPEPCKasa1* para el α -cetoglutarato, el fumarato y el succinato eran similares a aquellos observados antes de agregar el Mg^{2+} (Tabla 4). Por el contrario, los efectos en la *AthPEPCKasa2* se volvieron mínimos, sugiriendo que la inhibición era causada por una depleción del metal libre. De forma similar, el agregado de Mg^{2+} redujo la inhibición causada por el citrato, reflejándose en un aumento en los valores de $I_{0.5}$ (Tabla 4). Específicamente, el malato activó a la *AthPEPCKasa1* pero no tuvo efecto en la *AthPEPCKasa2*, mientras que la presencia de una concentración equimolar de Mg^{2+} aumentó levemente la respuesta de la *AthPEPCKasa1* al activador (Figura 19). El shikimato y el Glu también inhibieron a la *AthPEPCKasa1* pero no a la *AthPEPCKasa2* (Figura 19). Considerando todos los efectores analizados, el PPi ejerció el mayor grado de inhibición (90%) y mostró el menor valor de $I_{0.5}$ (3,7 y 2,7 mM para la *AthPEPCKasa1* y la *AthPEPCKasa2*, respectivamente). Para eliminar la posibilidad de que la inhibición por PPi fuera el producto de un secuestro del metal libre, realizamos curvas de PPi con concentraciones equimolares de Mg^{2+} ; bajo estas condiciones, los resultados fueron similares a aquellos obtenidos sin agregado del catión divalente.

Tabla 4. Parámetros cinéticos para los efectores alostéricos de las *AthPEPCK*asas. Las reacciones se realizaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos con una concentración fija de sustratos de ATP 0,75 mM y OAA 0,75 mM. Las constantes se calcularon ajustando los datos experimentales presentados en la Figura 19 a una ecuación de Hill modificada.

^a Para analizar el efecto del Mal y el Pyr, la actividad se midió en el sentido de carboxilación con una concentración de sustratos de ADP 0,13 mM y PEP 10 mM.

^{NE} No se observó ningún efecto.

Efector	<i>AthPEPCK</i> asa1		<i>AthPEPCK</i> asa2	
	$I_{0,5}$ (mM)	n_H	$I_{0,5}$ (mM)	n_H
Glc-6P	8,1 ± 0,8	1,5 ± 0,2	N.E. ^b	-
Glc-1P	26 ± 2	1,5 ± 0,2	N.E.	-
Fru-6P	27 ± 2	0,9 ± 0,1	N.E.	-
Fru-1,6-bisP	16 ± 1	1,2 ± 0,1	43 ± 5	0,8 ± 0,1
3-PGA	21 ± 2	1,5 ± 0,2	35 ± 3	0,9 ± 0,1
PPi	3,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	2,7 ± 0,4	1,1 ± 0,2
Pyr ^a	15 ± 2	1,1 ± 0,2	27 ± 3	2,9 ± 0,8
N-fosfonometilglicina	6,1 ± 0,6	0,8 ± 0,1	21 ± 4	0,9 ± 0,1
α -cetoglutarato	13 ± 1	1,7 ± 0,4	41 ± 12	0,4 ± 0,1
α -cetoglutarato-Mg ²⁺	19 ± 2	1,1 ± 0,1	N.E.	-
Fumarato	8,6 ± 0,5	1,7 ± 0,2	10 ± 1	1,8 ± 0,4
Fumarato-Mg ²⁺	9,6 ± 0,7	1,9 ± 0,3	N.E.	-
Succinato	12,1 ± 0,4	1,4 ± 0,1	11 ± 1	0,9 ± 0,1
Succinato-Mg ²⁺	14,5 ± 0,6	3,5 ± 0,6	18 ± 1	3,7 ± 0,9
Citrato	2,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	3,7 ± 0,7	1,4 ± 0,4
Citrato-Mg ²⁺	10,3 ± 0,6	1,5 ± 0,2	11,0 ± 0,6	2,3 ± 0,3
Shikimato	10,4 ± 0,9	1,3 ± 0,1	N.E.	-
Glu	32 ± 5	0,9 ± 0,1	N.E.	-
UDP	N.E.	-	8 ± 1	0,8 ± 0,1

	<i>AthPEPCK</i> asa1		<i>AthPEPCK</i> asa2	
	$A_{0,5}$ (mM)	n_H	$A_{0,5}$ (mM)	n_H
Malato ^a	2,6 ± 0,5	1,2 ± 0,3	N.E.	-
Malato-Mg ^{2+a}	2,1 ± 0,1	4,1 ± 0,8	N.E.	-

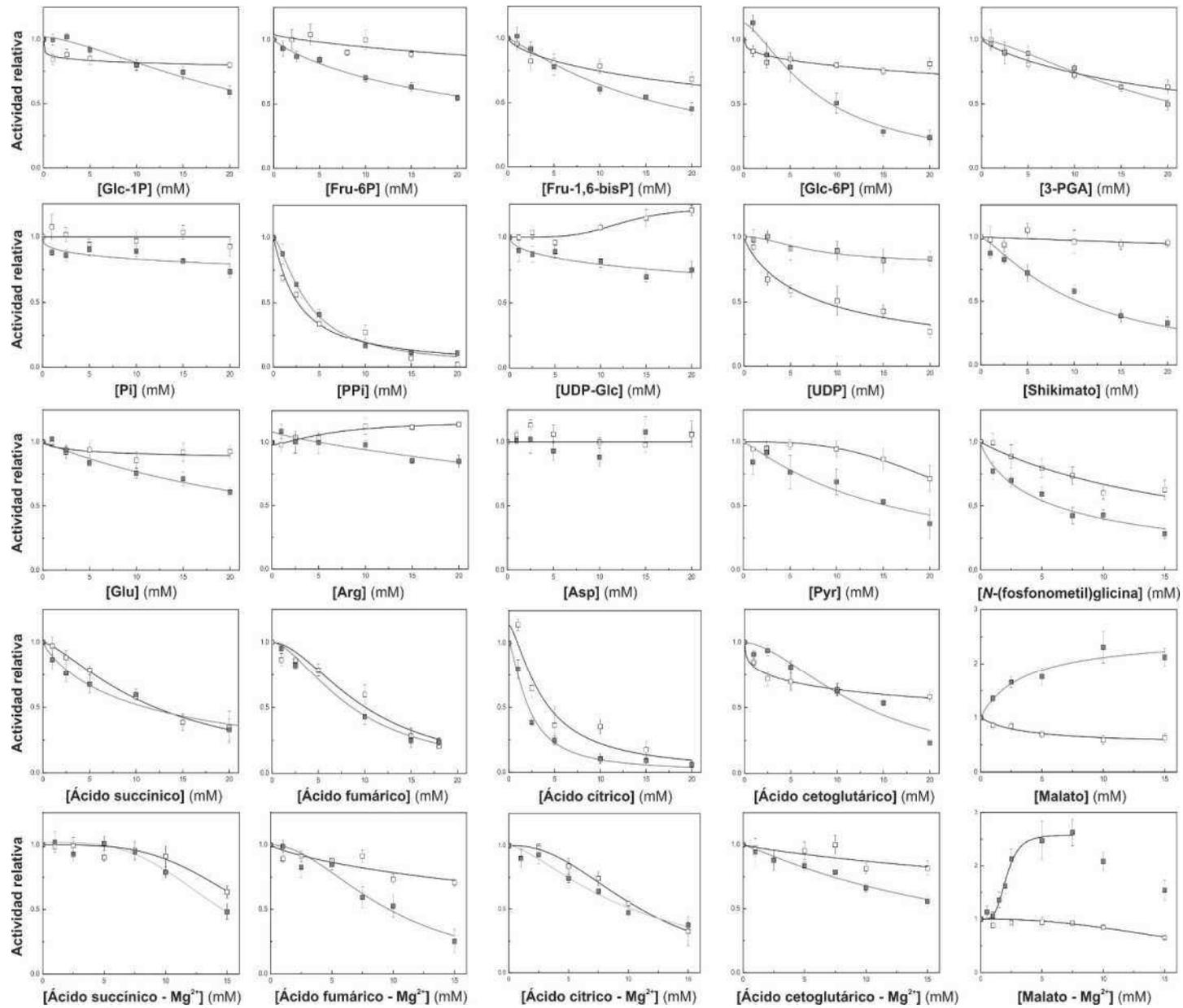


Figura 19. Moduladores alostéricos de las *Ath*PEPCKasas. La actividad de la *Ath*PEPCKasa1 (cuadrados grises) y la *Ath*PEPCKasa2 (cuadrados blancos) se midió en presencia de concentraciones crecientes de los metabolitos que se muestran en la Figura. Las medidas se realizaron de acuerdo con lo descrito en la sección Materiales y Métodos, en presencia de ATP 0,75 mM y OAA 0,75 mM. El efecto del Pyr y el malato se estudió en el sentido de carboxilación, a una concentración fija de ADP 0,13 mM y PEP 10 mM. Los datos que se muestran son la media \pm SE de cuatro grupos de datos independientes. Cuando fue posible, los datos se ajustaron a la ecuación de Hill modificada descrita en Materiales y Métodos (los parámetros calculados se muestran en la Tabla 4). En el caso de las medidas de actividad en presencia de los ácidos dicarboxílicos y Mg^{2+} , la concentración que se muestra corresponde a mezclas equimolares de ambos compuestos.

4.1.6 Modelado molecular de las *Ath*PEPCKasas.

Para profundizar el análisis de la relación estructura/función de las *Ath*PEPCKasas, se realizó un modelado molecular de ambas proteínas. Para esto, se llevó a cabo una búsqueda de proteínas homólogas que tengan su estructura cristalográfica resuelta empleando la herramienta BlastP del NCBI limitando la búsqueda a la base de datos del *Protein Data Bank*. De esta manera encontramos que, hasta el momento de escritura de esta Tesis, las únicas PEPCKasas de las cuales se posee la estructura cristalográfica es de las provenientes de las bacterias *Escherichia coli*, *Thermus thermophilus*, *Actinobacillus succinogenes* y *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. Los alineamientos con las secuencias de estas proteínas muestran una considerable identidad de secuencia (alrededor del 48%) lo cual permite el modelado por homología [246]. Sin embargo, las secuencias bacterianas son más cortas que las de Arabidopsis y no es posible alinear los 135 aminoácidos del extremo N, por lo cual no era factible de modelarlo. Se intentó la búsqueda de homólogos lejanos para este dominio N-terminal mediante el servidor PSI-PRED [247] pero no se encontró ninguna secuencia significativa para realizar el alineamiento de este extremo. Por esto, se empleó el servidor I-TASSER para realizar un modelado de ambas enzimas. La herramienta I-TASSER (*Iterative Threading ASSEMBly Refinement*) utiliza la secuencia primaria para realizar un modelo atómico tridimensional a partir de alineamientos estructurales de proteínas y simulaciones estructurales iterativas [217]. Los mejores modelos obtenidos se analizaron con el servidor *Verify3D* [218, 246, 248] para analizar la compatibilidad del modelo tridimensional con su secuencia primaria y ambos pasaron las pruebas. En la Figura 20 se muestra un modelado de la *Ath*PEPCKasa1, junto con los sustratos ATP, Mg²⁺ y PEP en su sitio activo.

Debido a las diferencias cinéticas y regulatorias que encontramos para las *Ath*PEPCKasas, realizamos un alineamiento estructural de los modelos de ambas proteínas (Figura 21). En la comparación de estructuras tridimensionales de proteínas se emplea el parámetro Q_H, que mide la similitud estructural. Este valor fluctúa entre 0 (estructuras que no se pueden alinear) y 1 (estructuras idénticas) [219, 249]. En el caso del alineamiento de las *Ath*PEPCKasas, obtuvimos un Q_H = 0,5 lo que marca diferencias estructurales. Si se observa el alineamiento estructural que se muestra en la Figura 21, ambos modelos se alinean adecuadamente, a excepción de los dominios N-terminales. Esta diferencia también se observó al alinear las secuencias primarias de las enzimas (Figura 11). Estas regiones de las proteínas fueron predichas y modeladas por el servidor I-TASSER como dominios intrínsecamente desordenados (Figura 21). Como su nombre lo indica, estos dominios evolucionaron para no adoptar una estructura estable bajo condiciones fisiológicas [250]. Estas regiones son capaces de fluctuar rápidamente entre un conjunto de conformaciones diferentes, lo que las suele involucrar en las vías de señalización celular, puesto que la misma secuencia aminoacídica puede emplearse de forma diferente en diferentes contextos [251]. En general, estos dominios desordenados están involucrados en módulos de interacción proteína-proteína, regulaciones alostéricas

complejas, suelen ser blanco de modificaciones postraduccionales o actuar como módulos autoinhibitorios [251].

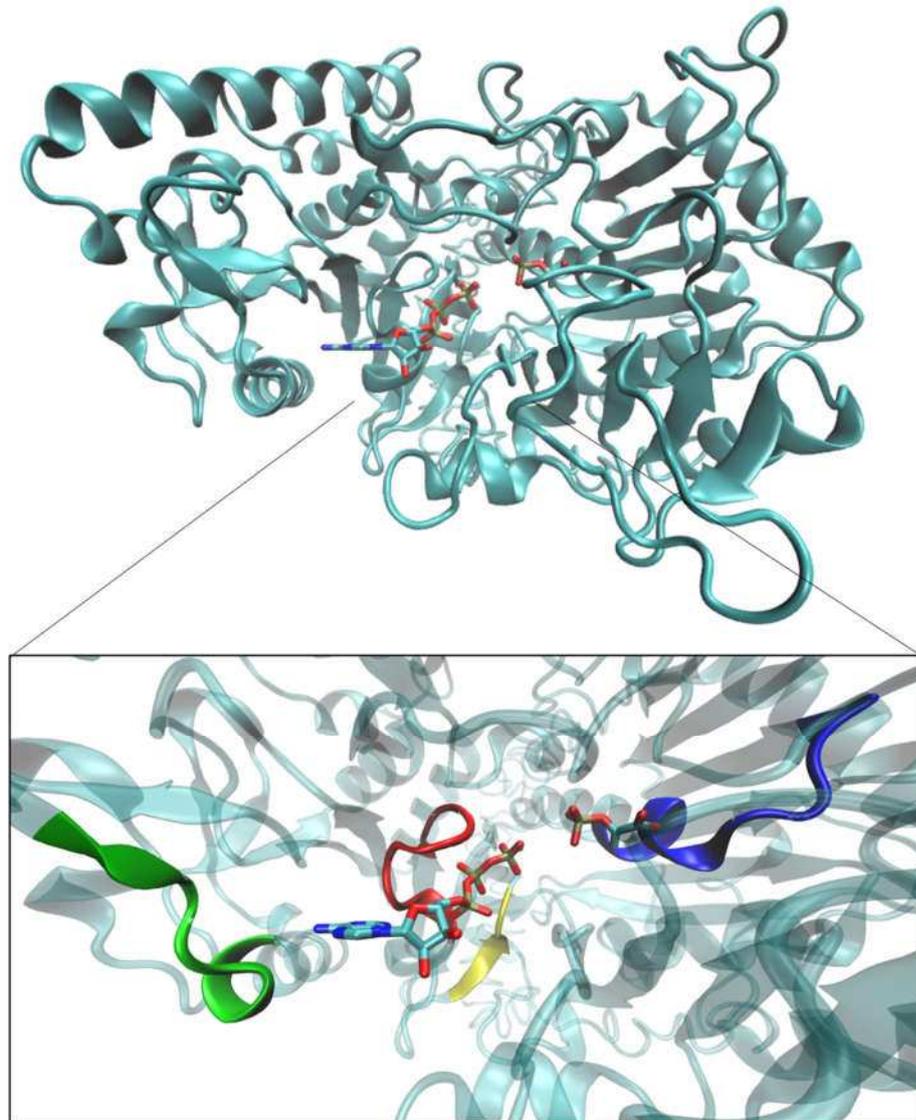


Figura 20. Modelado molecular de la *AthPEPCKasa1*. En la figura se muestra un modelo de un monómero de la *AthPEPCKasa1* obtenido con el servidor I-TASSER. En el panel inferior se muestra un aumento del sitio activo de la enzima en el cual se ubican los sustratos ATP, Mg^{2+} y PEP, los cuales se transfirieron de las estructuras 2PXZX, 1K3DA y 2GMVA, respectivamente. En el panel inferior se resalta el dominio PCK (azul), de quinasa 1A (rojo), de quinasa 2 (amarillo) y el motivo de unión a adenina (verde), que se describieron para las ATP-PEPCKasas en la referencia [85].

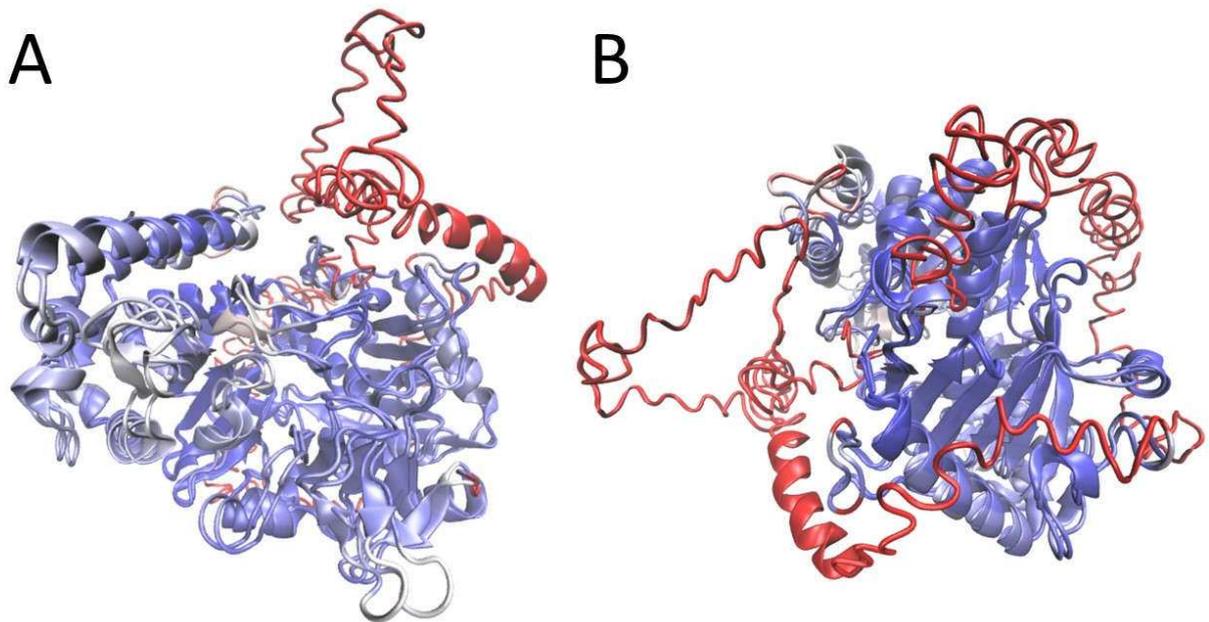


Figura 21. Comparación tridimensional de los modelos obtenidos para las *AthPEPCKasas*. En la Figura se muestran dos visualizaciones de un alineamiento estructural de los modelos para los monómeros de las *AthPEPCKasas* obtenidos con el servidor I-TASSER. En el panel B la estructura se giró 180° respecto a la presentación del panel A. Las estructuras están coloreadas según el grado de conservación en el alineamiento de las secuencias primarias con una gama de colores que va del azul (regiones altamente conservadas) al rojo (regiones no conservadas). Los parámetros del alineamiento fueron: RMSD = 1,5 Å y $Q_H = 0,5$.

4.2 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por dipéptidos.

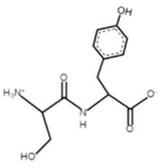
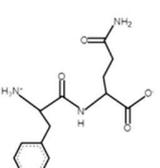
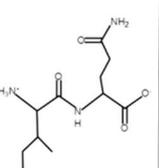
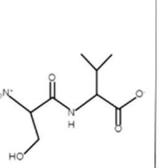
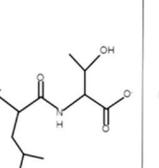
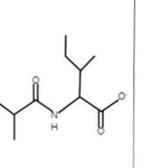
La identificación de nuevas interacciones entre las proteínas y los metabolitos es de gran utilidad para identificar nuevos puntos regulatorios en el metabolismo vegetal. Con esta premisa, Veyel y col. [240] desarrollaron la técnica de PROMIS (*PROtein Metabolite Interactions using Size separation*) que se basa en la partición de los metabolitos en dos fracciones diferentes: uno que se encuentra libre y otro que está firmemente unido a las proteínas. Por esto, si se realiza el fraccionamiento de un extracto crudo en base al tamaño de las moléculas con una cromatografía de exclusión molecular, es posible separar una fracción de baja masa molecular (metabolitos libres) de una de alta masa molecular (metabolitos unidos a las proteínas). De esta manera, los investigadores arriba citados fraccionaron un extracto crudo de *Arabidopsis* y las distintas fracciones que eluyeron de la columna se analizaron por espectrometría de masas, para identificar los metabolitos y las proteínas presentes en cada fracción. El análisis del perfil de elusión de los

componentes con pruebas estadísticas de correlación propone una potencial interacción, que luego debe ser validada mediante ensayos bioquímicos. Esta estrategia identificó ~100 potenciales complejos de proteínas con metabolitos en cultivos celulares de *Arabidopsis* [240, 252]. Sorprendentemente, en dicho trabajo se identificaron numerosos dipéptidos, cuyas funciones hasta el momento no están del todo claras.

4.2.1 Análisis de la interacción de la *AthPEPCKasa1* con dipéptidos.

El conjunto de datos generado por Veyel y col. [240] contiene 92 dipéptidos diferentes que eluyeron unidos a las proteínas en todo el rango de separación de la columna cromatográfica. En el caso de la *AthPEPCKasa1*, se propuso que podría interactuar con seis dipéptidos formados por aminoácidos hidrofóbicos y/o polares (dipéptidos H-P): Ile-Gln, Ala-Ile, Phe-Gln, Leu-Thr, Ser-Tyr, y Ser-Val (Tabla 5). Para evaluar las características fisicoquímicas de estos compuestos (Tabla 5), se empleó el paquete *Peptides* disponible en el programa informático R [253]. El índice de Boman, mide la capacidad de un péptido para interactuar con otras proteínas y corresponde a la suma de las solubilidades individuales de los aminoácidos dividida por el número total de residuos, y cuanto mayor sea habrá un mayor potencial de interacción [254, 255]. Por otra parte, el índice de hidrofobicidad consiste en la suma de las hidrofobicidades individuales de los aminoácidos dividida por la longitud del dipéptido [256]. Al comparar estos parámetros fisicoquímicos con el número de proteínas con las que interactuaría cada dipéptido, no pudimos establecer ninguna relación clara (Tabla 5).

Tabla 5. Características moleculares de los dipéptidos que interactúan con la *AthPEPCKasa1*. Las estructuras de los dipéptidos se graficaron con la herramienta *PePDraw* (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/>). El punto isoeléctrico se calculó con la escala de pKa EMBOSS (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/iep>), el índice de Boman se calculó de acuerdo con la referencia [255], el índice de hidrofobicidad se calculó con la escala de hidrofobicidad de Eisenberg [255]. El número de potenciales interactores se extrajo del conjunto de datos PROMIS, considerando un índice de correlación >0,7 [240].

Dipeptido	Ser-Tyr	Phe-Gln	Ile-Gln	Ser-Val	Leu-Thr	Ala-Ile
Estructura						
Masa molecular (g . mol ⁻¹)	268,3	293,3	259,3	204,2	232,3	202,3
Punto isoeléctrico	8,8	5,3	3,8	5,9	7,0	3,8
Carga a pH 7	0,8	-1,0	-1,2	-0,2	0,0	-1,2
Índice de Boman	1,77	1,28	0,31	-0,32	-1,175	-3,365
Índice de hidrofobicidad	0,04	0,17	0,27	0,45	0,51	1,00
Número de potenciales interactores	506	267	436	484	491	480

Para analizar los procesos en los cuales participarían estos dipéptidos, se aislaron todos los potenciales interactores para cada uno de ellos y se realizó un análisis de ontología génica con los mismos, utilizando el servidor *ShinyGO* [257] para evaluar los procesos biológicos enriquecidos (Figura 22). De esta manera, encontramos que los distintos dipéptidos analizados tienen diferentes perfiles en las funciones enriquecidas. En el caso de Ala-Ile, Ile-Gln y Leu-Tyr las categorías son similares, siendo las principales *Metabolic pathways*, *Carbon metabolism* y *Biosynthesis of secondary metabolites*. Por otra parte, Phe-Gln, Ser-Tyr y Ser-Val muestran un perfil similar con mayor cantidad de interactores en la categoría *RNA transport*, *RNA degradation*, *Spliceosome* y *Proteasome*.

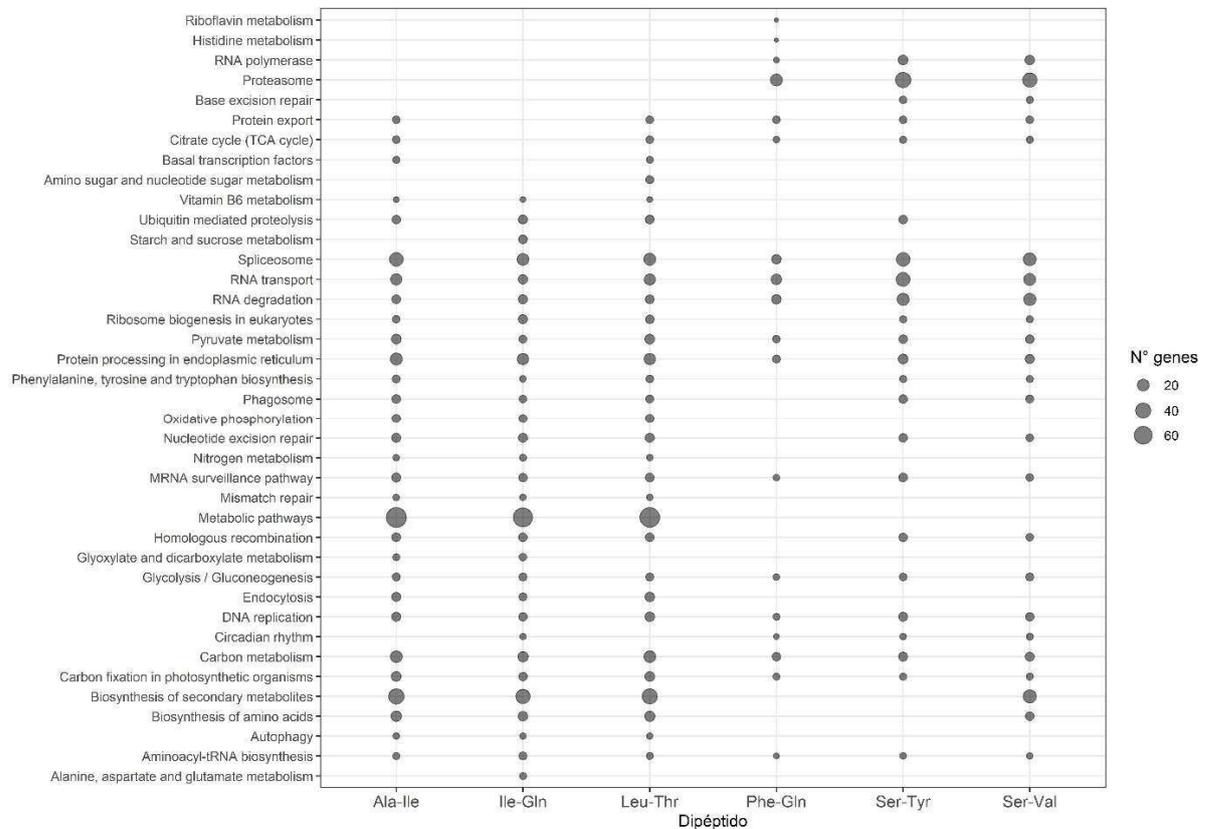


Figura 22. Categorías funcionales enriquecidas en las interacciones de los dipéptidos H-P. Se tomaron los datos suplementarios disponibles en el trabajo de Veyel y col. [240] y se filtraron las potenciales proteínas interactoras (coeficiente de Pearson > 0,7) para cada uno de los dipéptidos que se muestran en el eje x. Luego, las proteínas se analizaron para determinar las categorías funcionales enriquecidas (eje y) con el servidor *ShinyGO v0.61* [257], empleando la clasificación de la *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) con una línea de corte (*false discovery rate*) < 0,5. El tamaño de los círculos es proporcional a la cantidad de genes dentro de cada categoría.

Para analizar cuáles proteínas involucradas en el metabolismo del carbono podrían estar interaccionando, se graficaron las mismas junto con los dipéptidos con los cuales eluyen (Figura 23). Como puede observarse, estos dipéptidos podrían interaccionar con otras enzimas de la gluconeogénesis y el metabolismo primario. Por ejemplo, podría existir una interacción con las PPI-PFKasas y ATP-PFKasas, la Pyr descarboxilasa (PyrDCasa), componentes de la Pyr deshidrogenasa (PyrDHasa), la PEPCasa, la acetil-CoA descarboxilasa y la MDHasa, entre otras (Figura 23).

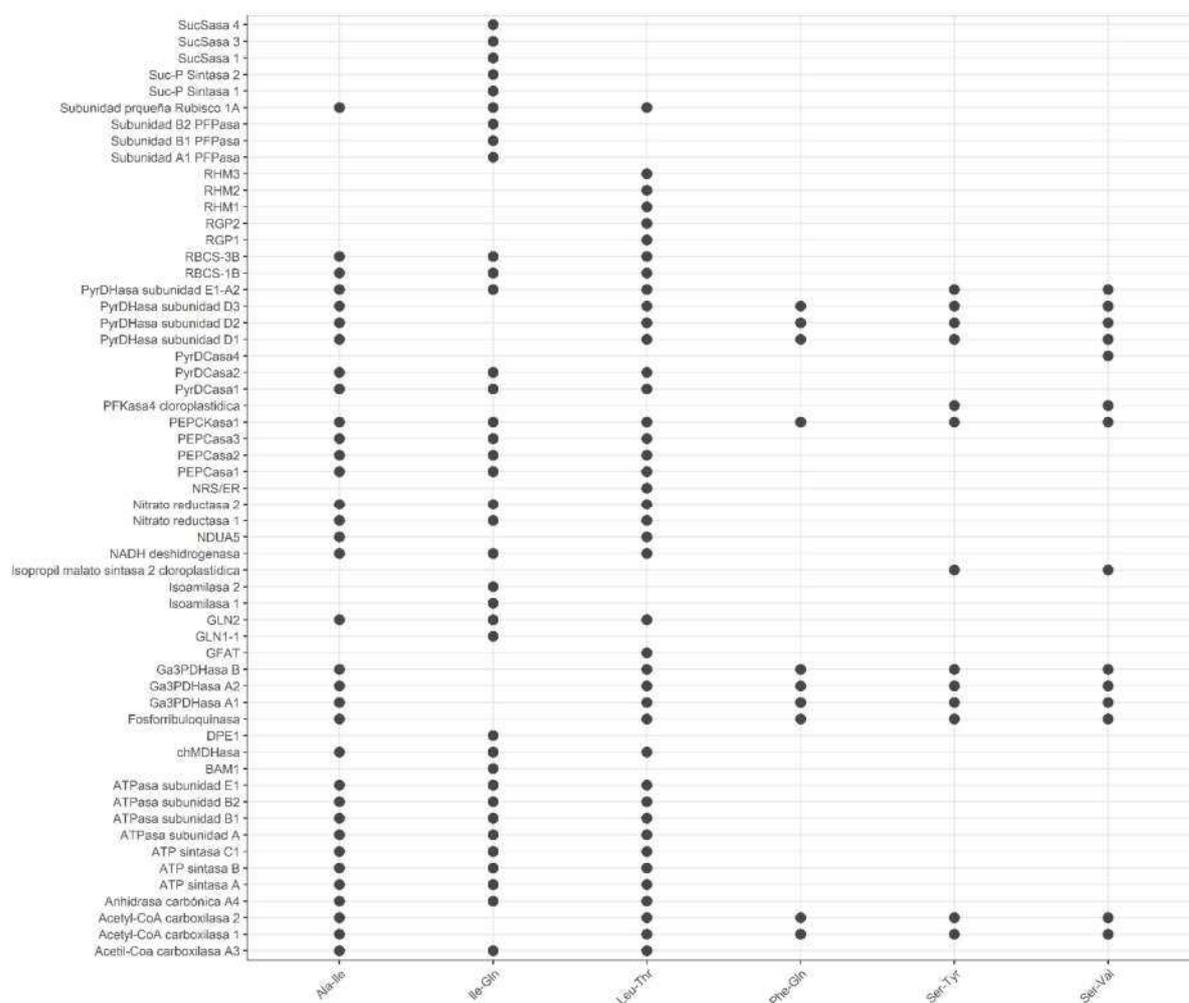


Figura 23. Análisis del perfil de interacción de los dipéptidos H-P con las proteínas involucradas en el metabolismo del carbono en plantas. Se tomaron los datos suplementarios disponibles en el trabajo de Veyel y col. [240] y se filtraron las potenciales proteínas interactoras (coeficiente de Pearson > 0,7) de los dipéptidos que se muestran en el eje x.

4.2.2 Efecto de los dipéptidos en la actividad de la *AthPEPCKasa1*.

Para evaluar el efecto que podrían tener sobre la actividad de la *AthPEPCKasa1*, se sintetizaron los dipéptidos H-P por fase sólida en el Laboratorio de Péptidos Bioactivos (FBCB-UNL). Luego, realizamos ensayos cinéticos y observamos que los seis dipéptidos tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad de la enzima (Figura 24 A). Con respecto al porcentaje de inhibición a la mayor concentración ensayada de dipéptido (1000 μM), el orden de inhibición fue Ala-Ile > Ile-Gln > Ser-Tyr > Phe-Gln > Ser-Val > Leu-Thr. Distintivamente, en el caso de los dipéptidos Ser-Tyr, Ser-Val y Leu-Thr, a bajas concentraciones (< 100 μM), se observó una activación inicial del 25%, lo que muestra que estos dipéptidos provocan un fenómeno de hormesis [258, 259]. Los parámetros de $I_{0.5}$ para los dipéptidos H-P se encontraron en el rango micromolar, teniendo Ala-Ile el menor y Ser-Val el mayor valor de $I_{0.5}$. Dado que la reacción catalizada por la *AthPEPCKasa1* es reversible *in vitro*, también analizamos el efecto de alguno de los dipéptidos en el sentido de carboxilación del PEP, observando que también se daba la inhibición, aunque los valores de $I_{0.5}$ eran mayores (Figura 24 B).

Para evaluar si el efecto inhibitorio podía darse por los aminoácidos individuales que forman a cada uno de los dipéptidos, se probaron algunos de ellos como efectores y ninguno tuvo un efecto marcado en la actividad de la *AthPEPCKasa1*, demostrando que el efecto inhibitorio es específico de los dipéptidos (Figura 25). Además, se probó en dipéptido Tyr-Asp, el cual interacciona e inhibe la actividad de las Ga3PDHasas de Arabidopsis [240], y no se observó ningún efecto significativo (Figura 25).

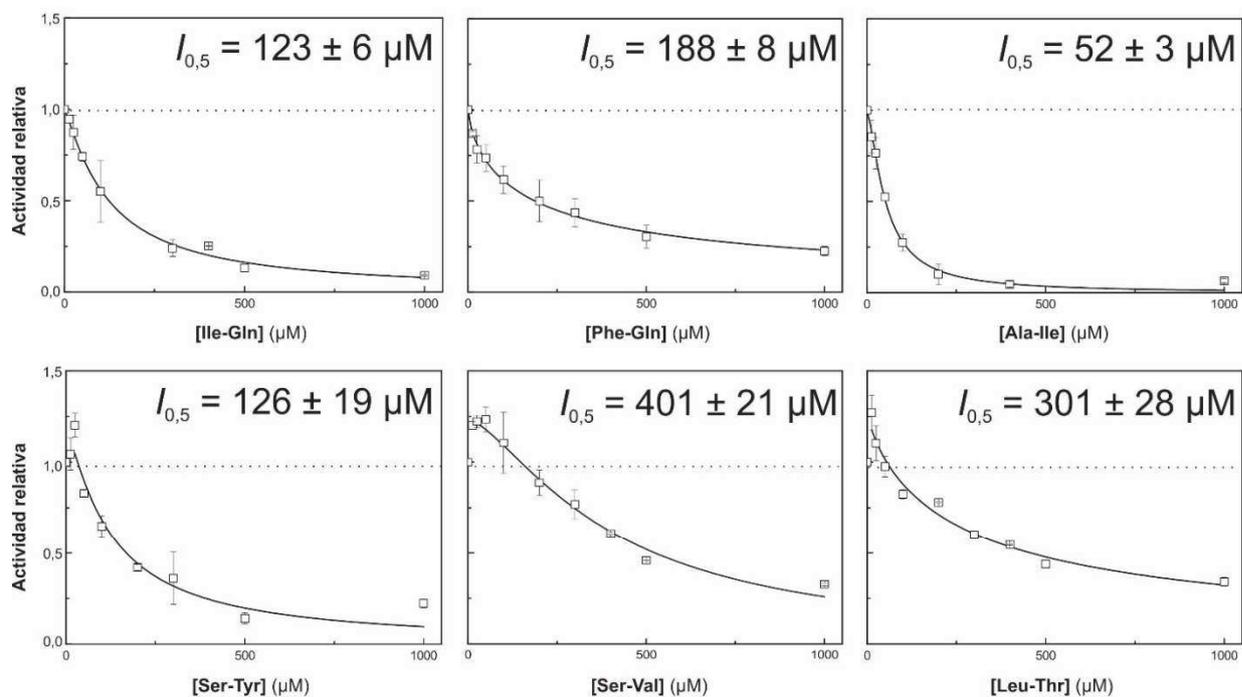
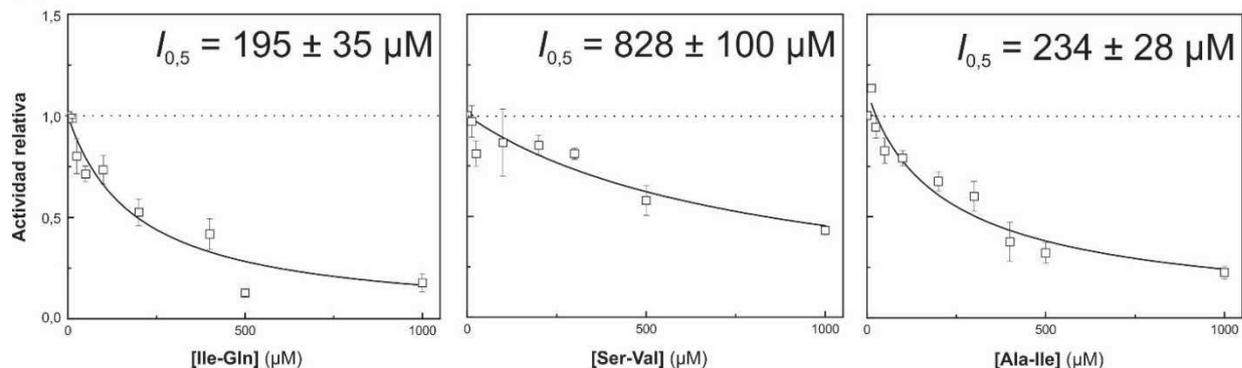
A**B**

Figura 24. Efectos de los dipéptidos H-P sobre la actividad de la *AthPEPCKasa1*. La enzima se ensayó con la reacción estándar descrita en Materiales y Métodos en presencia de concentraciones crecientes de los dipéptidos indicados en el eje x de cada panel, ya sea en el sentido de descarboxilación (A) o de carboxilación (B). Los datos que se muestran son la media \pm SE de cuatro medidas independientes. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill y los parámetros calculados se muestran en cada Figura.

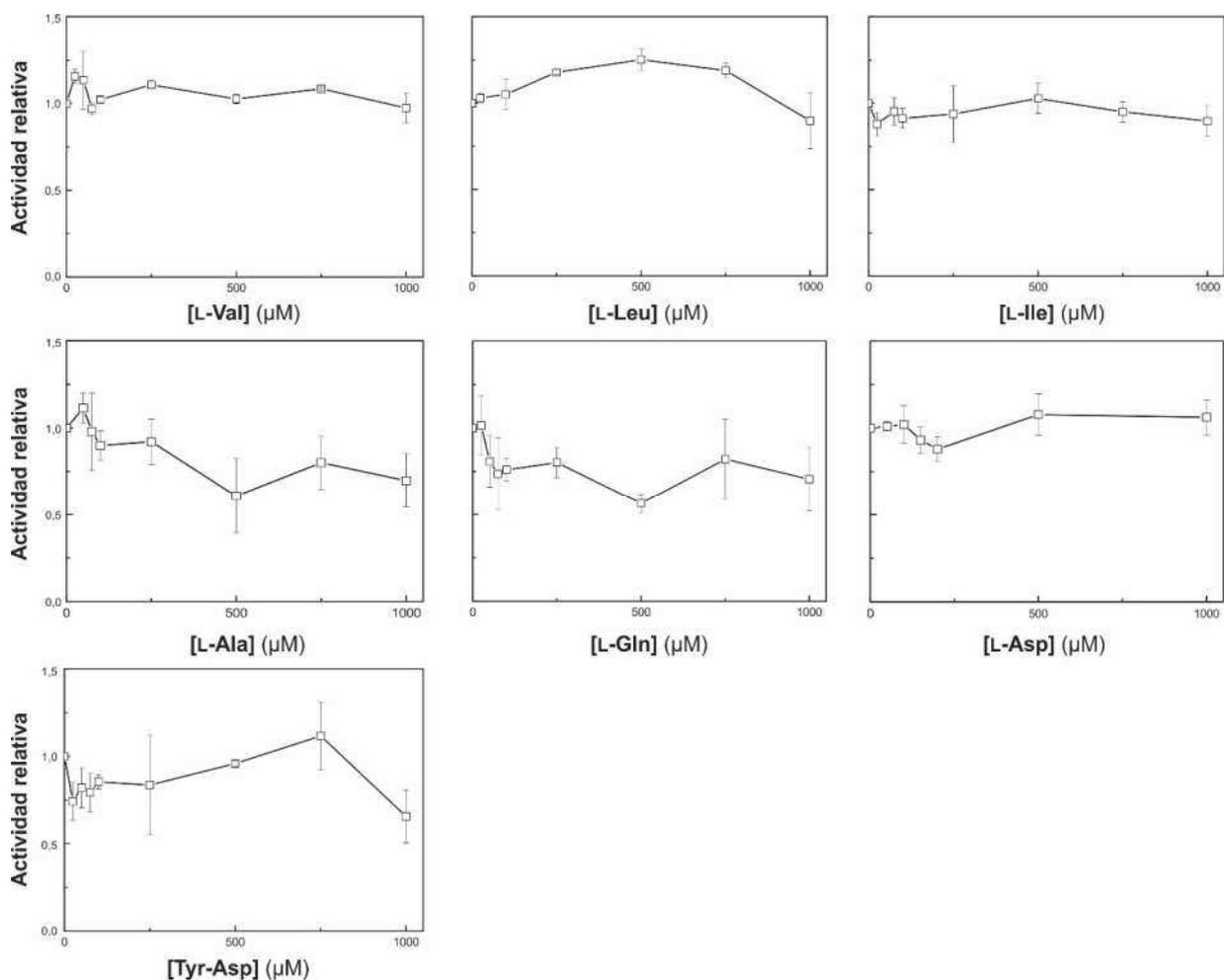


Figura 25. Efecto de los aminoácidos individuales y del dipéptido Tyr-Asp en la actividad de la *AthPEPCKasa1*. La enzima se ensayó en el sentido de descarboxilación con la reacción estándar descrita en Materiales y Métodos bajo concentraciones crecientes de los aminoácidos indicados en el eje x de cada panel. Los datos que se muestran son la media \pm SE de cuatro medidas independientes.

Debido a la baja actividad de la *AthPEPCKasa1* en extractos crudos de *Arabidopsis* ($\sim 0,05 \text{ U.mg PF}^{-1}$) [227], optimizamos un método de medida fluorométrico para medir quinasas con baja actividad [194] (ver más abajo, inciso 4.7.4). Las reacciones fueron lineales entre los 0–15 min con 1,0–4,5 μg de extracto crudo (Figura 26). Además, debido a los reportes previos de proteólisis de esta enzima en los cotiledones de pepino, optimizamos un protocolo de extracción de proteínas totales en condiciones nativas (descrito en Materiales y Métodos) y encontramos que, con este protocolo, la *AthPEPCKasa1* se mantenía estable durante los ensayos, como se muestra en la Figura 26. Con estas herramientas, ensayamos la actividad PEPCKasa en rosetas de 3 semanas de *Arabidopsis* agregando los dipéptidos en el medio de reacción, en una concentración de 1000 μM . De esta forma, observamos que todos los dipéptidos ensayados inhibieron la actividad PEPCKasa (Figura 27).

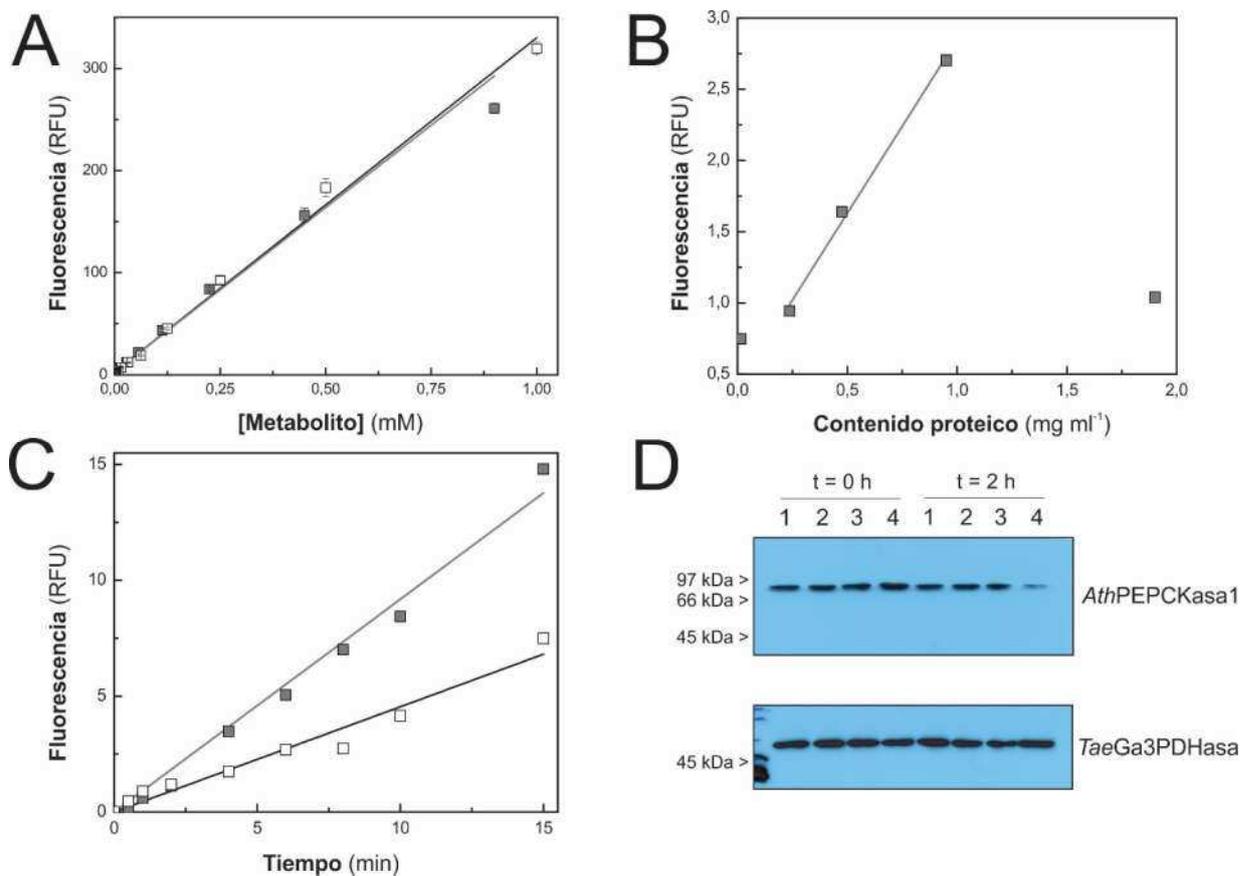


Figura 26. Optimización del ensayo enzimático de la actividad PEPCKasa en extractos crudos de Arabidopsis. (A) La curva de calibración se construyó con NAD⁺ (cuadrados blancos) y OAA (cuadrados grises) en las mismas condiciones de reacción empleadas para medir la actividad PEPCKasa en extractos crudos de Arabidopsis. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro replicas. Las pendientes de la regresión lineal fueron; $327 \pm 7 \text{ RFU} \cdot \text{mM}^{-1}$, $R^2 = 0.99$ para el NAD⁺ y $322 \pm 11 \text{ RFU} \cdot \text{mM}^{-1}$, $R^2 = 0.99$ para el OAA. El análisis de la linealidad de la respuesta con respecto al contenido proteico del extracto crudo en el medio de reacción (B) y con el tiempo de reacción (C), en presencia (cuadrados grises) o ausencia (cuadrados blancos) de ADP. (D) Análisis de la estabilidad de la *AthPEPCKasa1* durante la extracción nativa de proteínas totales, inmediatamente antes de la extracción ($t = 0\text{h}$), o luego de incubar el extracto por dos horas en hielo ($t = 2\text{h}$). Las muestras se resolvieron en un SDS-PAGE al 12% y luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se sometió al protocolo estándar de *western blot*. Las membranas de detectaron con el antisuero policlonal contra la *AthPEPCKasa1* y el control de carga se hizo con el antisuero policlonal anti *TaeGa3PDHase*. RFU: unidades relativas de fluorescencia.

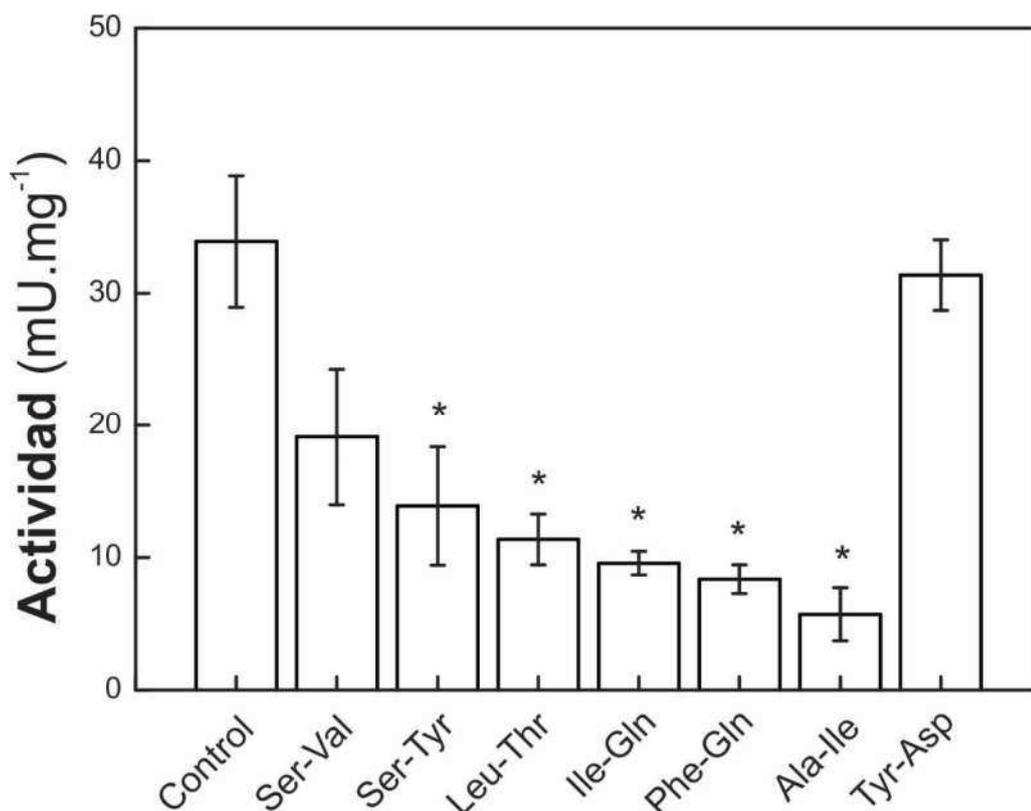


Figura 27. Los dipéptidos H-P inhiben la actividad PEPCKasa en extractos crudos de rosetas de *Arabidopsis*. La actividad se midió en extractos crudos de rosetas de *Arabidopsis* de 3 semanas en la presencia de los dipéptidos que se muestran en el eje x en una concentración de 1000 μ M. Las medidas se realizaron empleando las condiciones de reacción descritas en Materiales y Métodos. Los datos corresponden a la media \pm SE de medidas realizadas en cuatro réplicas biológicas. La actividad del control fue $0,31 \pm 0,04$ U.g⁻¹ PF similar a lo descrito en la referencia [227]. El asterisco corresponde a un valor $P < 0,05$ empleando una prueba t para dos muestras independientes con un nivel de confianza del 95% con respecto al control sin dipéptido.

4.3 Regulación de la *Ath*PEPCKasa1 por corte proteolítico.

Debido a los antecedentes de proteólisis en las PEPCKasas de plantas descritos en la Introducción, se decidió analizar en profundidad este mecanismo de modificación. De esta manera, buscamos identificar cuáles eran los efectos cinéticos y regulatorios de la proteólisis de la enzima, como así también los estadios de desarrollo en los cuales ocurría. Para esto, se inmunizaron conejos para producir anticuerpos policlonales contra la *Ath*PEPCKasa1. Como puede observarse en la Figura 28, el antisuero obtenido luego de la sangría

de los animales reconoció específicamente a la *AthPEPCKasa1* recombinante, como así también se obtuvo una banda del tamaño esperado en extractos de hojas de *Arabidopsis*. Este reconocimiento no fue observado al realizar un *western blot* con el suero basal del animal, lo cual demuestra que los anticuerpos producidos fueron el resultado del proceso de inmunización. Si bien el antisuero fue capaz de reconocer a la *AthPEPCKasa1*, mostró una serie de reconocimientos inespecíficos al probarlo contra extractos de hojas de *Arabidopsis*. Es por esto que se lo purificó con la *AthPEPCKasa1* recombinante, de forma de disminuir el reconocimiento inespecífico. Esto mejoró sustancialmente la especificidad del antisuero (en la Figura 28 puede observarse el reconocimiento de una única banda), aunque disminuyó el título del anticuerpo y la señal obtenida.

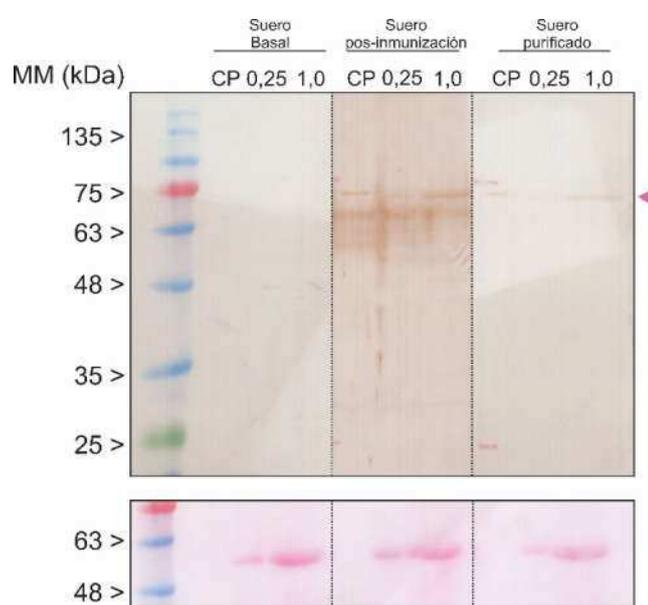


Figura 28. Producción del antisuero anti-*AthPEPCKasa1*. Se realizó una extracción desnaturalizante de proteínas a partir de rosetas de *Arabidopsis* de 32 días. Luego, se sembraron estas muestras en un SDS-PAGE al 12% el cual, luego de la corrida electroforética, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa. A continuación, esta membrana se reveló de acuerdo con protocolo estándar descrito en Materiales y Métodos, con la diferencia de que el revelado se realizó con 5 μ g de diaminobenzidina y 3 μ l de H_2O_2 100 vol. En todos los casos se empleó una dilución 1/1000 del anticuerpo primario. En el gel se muestran los mg PF sembrados. CP: control positivo (0,5 ng de *AthPEPCKasa1*). MM: marcador de masa molecular.

4.3.1 Proteólisis de la *AthPEPCKasa1* durante la germinación de las semillas.

Debido a la importancia de las *AthPEPCK*asas durante la germinación de las semillas, en esta sección nos enfocamos en este estadio de desarrollo. En la Figura 29 se analizan nuevamente datos de transcriptómica pero en un experimento realizado por Narsai y col. [260] en el cual se analizaron semillas durante los estadios de estratificación y germinación. Como puede observarse, la expresión de *PEPCK1* y *PEPCK2* en estos estadios es superior a la que ocurre en hojas maduras. Los transcritos de *PEPCK1* son 620 veces mayores que los *PEPCK2* en la germinación de las semillas 48 HPI (Figura 29). Además, los transcritos en semillas en germinación a 18 HPI son 10 veces mayores que en hojas maduras, mientras que los transcritos *PEPCK2* son relativamente bajos en la germinación de las semillas y no se detectan en hojas maduras.

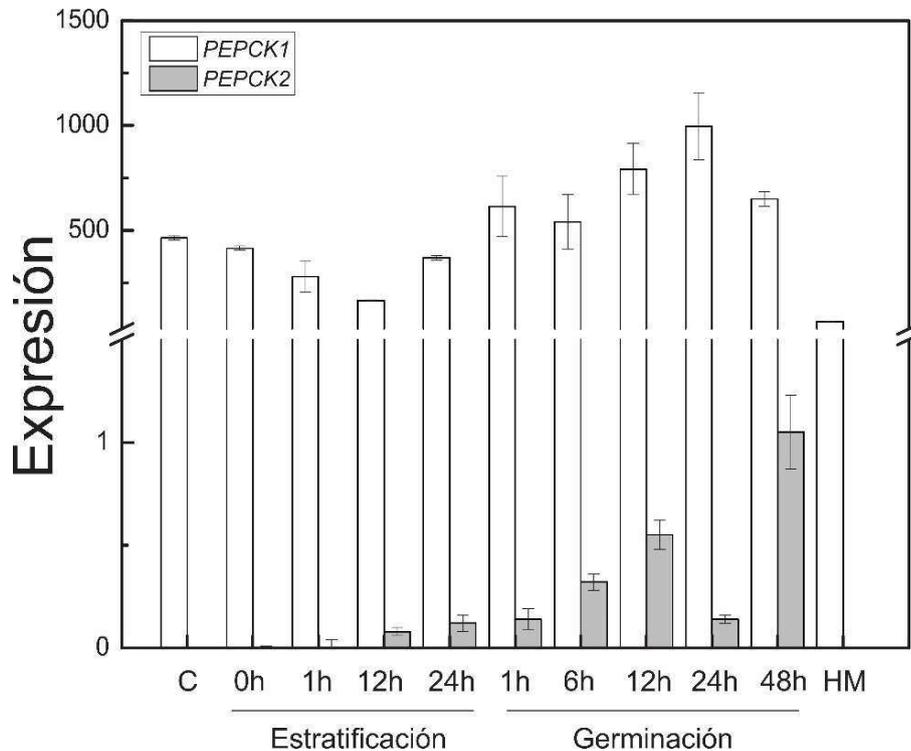


Figura 29. Comparación de los niveles de expresión de las *AthPEPCK*asas durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*. Los datos de transcriptómica para la germinación de las semillas fueron obtenidos del trabajo realizado por Narsai y col. [260] y para las hojas maduras (HM) del trabajo de Klepikova y col. [229], que se encuentran disponibles en la base de datos *eFB browser* [228]. En estos experimentos, semillas de *A. thaliana* Col-0 fueron secadas por 15 días (C) y luego estratificadas a 4 °C en oscuridad. Luego, se sembraron en placas con medio MS suplementado con Suc 3% y se transfirieron a la luz para la germinación.

Para analizar la integridad de la proteína en diferentes estadios de desarrollo, extrajimos proteínas totales en condiciones desnaturalizantes de plántulas en germinación luego de 48 HPI y hojas de rosetas maduras de 32 días (Figura 30). El gen *PEPCK1* codifica para una proteína de 73,5 kDa, la cual luego se ensambla como un hexámero de ~440 kDa para dar la *AthPEPCKasa1* funcional [20]. De esta forma, encontramos que la *AthPEPCKasa1* es proteolizada en semillas en germinación, pero no en hojas maduras (Figura 30). Sin embargo, cabe aclarar que la cantidad de *AthPEPCKasa1* en las hojas maduras es notablemente inferior que la de semillas en germinación (Figuras 29 y 30).

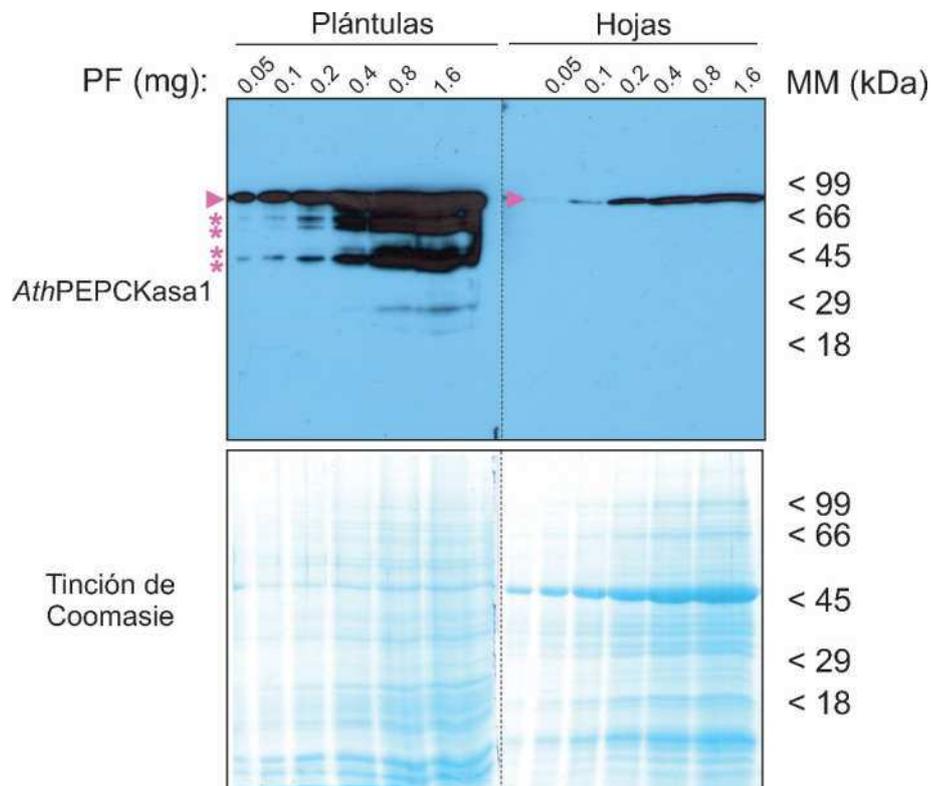


Figura 30. Inmunodetección de la *AthPEPCKasa1* en extractos de semillas en germinación y rosetas maduras. Extractos proteicos desnaturalizantes de semillas en germinación de *Arabidopsis* de 48 HPI (izquierda) y rosetas de 32 días (derecha) se separaron en un SDS-PAGE al 12% (panel inferior) y luego se transfirieron a membranas de nitrocelulosa que se detectaron con el anticuerpo anti-*AthPEPCKasa1* (panel superior) de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. PF: cantidad de PF de tejido cargado en el gel. MM: marcador de masa molecular. La flecha (►) señala a la *AthPEPCKasa1* completa y el asterisco (*) a las formas trucas.

Algunas proteasas pueden mantenerse activas durante la extracción de proteínas, aún en presencia de altas concentraciones de SDS en la solución utilizada [261, 262]. Para descartar la posibilidad de que la *AthPEPCKasa1* de las semillas en germinación sea degradada durante el proceso extractivo, comparamos cuatro métodos de extracción diferentes; *i*) solución muestra desnaturalizante, *ii*) solución muestra desnaturalizante suplementada con urea 2 M, *iii*) TCA 10% (p/v) [208] y *iv*) TCA 10% (p/v), 2-mercaptoetanol 2% (v/v) en acetona [209]. Los protocolos que se basan en el empleo de TCA son considerados extracciones ultra-desnaturalizantes y, por lo tanto, son las técnicas más confiables para determinar si una proteína se encuentra proteolizada o no *in vivo* [208, 209, 261, 262]. De esta forma, determinamos que la proteólisis de la *AthPEPCKasa1* ocurre *in vivo* y no es un artefacto del proceso de extracción (Figura 31). Debe aclararse que en todos nuestros experimentos encontramos que la mayoría de la *AthPEPCKasa1* se encontraba en la forma no proteolizada. Es por esto que en algunos casos, para visualizar las formas proteolizadas debimos ajustar los tiempos de exposición (Figura 32).

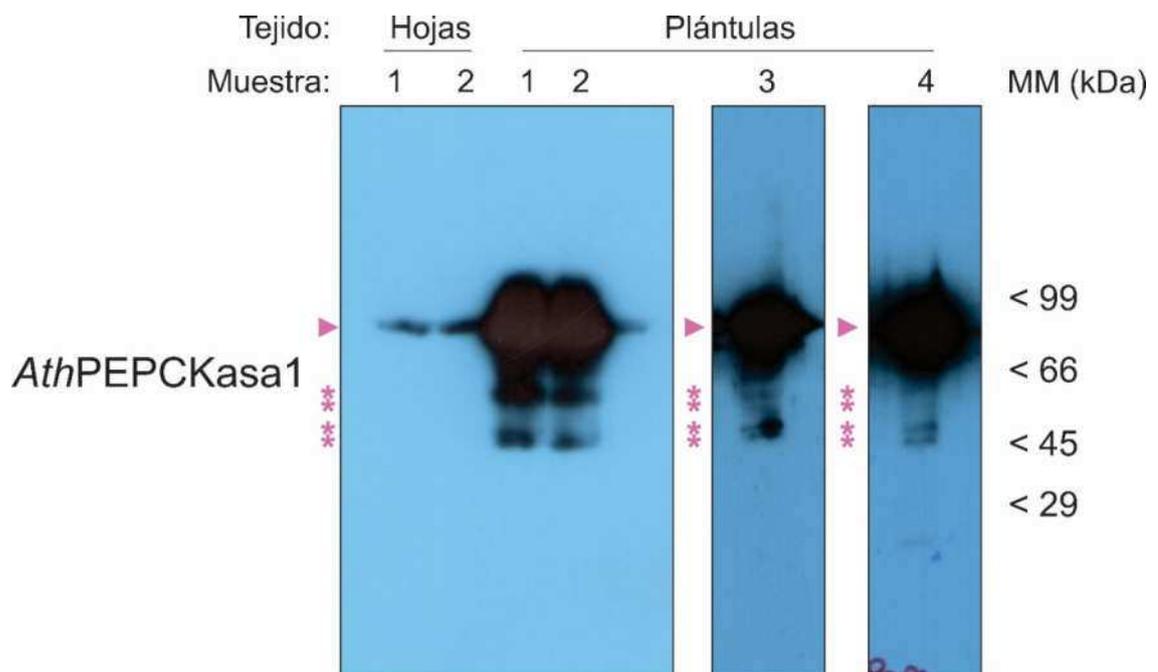


Figura 31. Extracción desnaturalizante de hojas y plántulas de Arabidopsis. Las muestras se extrajeron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos con la solución de extracción desnaturalizante (1), la solución desnaturalizante suplementada con urea 2 M (2), TCA 10% (p/v) (3), y TCA 10% (p/v), 2-mercaptoetanol 2% (v/v) en acetona (4). En todos los casos, el gel se cargó con 0,8 mg de PF de tejido. Hojas: rosetas de Arabidopsis de 32 días. Plántulas: plántulas de Arabidopsis en germinación de 48 DPI. MM: marcador de masa molecular. La flecha (►) marca a la *AthPEPCKasa1* completa y el asterisco (*) a las formas truncas.

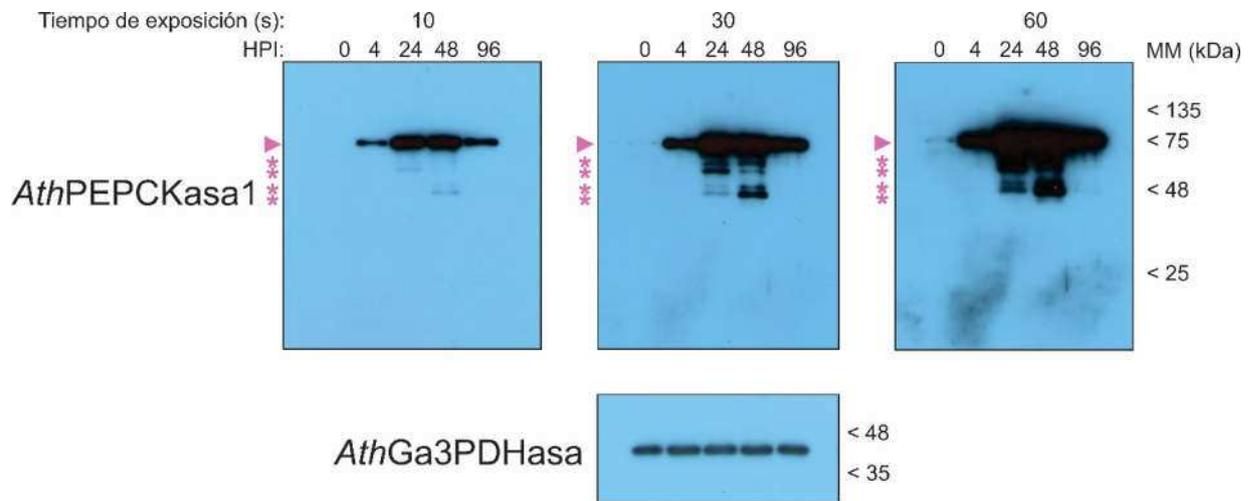


Figura 32. *Western-blot* sobre extractos de plántulas de *Arabidopsis* revelado a diferentes tiempos de exposición. Las muestras se extrajeron con la solución desnaturalizante descrita en la sección de Materiales y Métodos. Luego de realizar la corrida electroforética y la electrotransferencia, la misma membrana se reveló a diferentes tiempos de exposición. El gel se cargó con 0,25 mg PF de tejido en todas las calles. La flecha (▶) marca a la *AthPEPCKasa1* completa y el asterisco (*) a las formas truncas.

El antisuero policlonal obtenido contra la *AthPEPCKasa1* recombinante reacciona de forma cruzada con la *AthPEPCKasa2*, dada la elevada identidad de secuencias (78,4%) entre ambas proteínas. Debido a las diferencias en las abundancias relativas de los transcritos *PEPCK1* y *PEPCK2*, especulamos que la principal isoforma detectada en la Figuras 30-32 era la *AthPEPCKasa1*. Para probar nuestra hipótesis, analizamos extractos proteicos desnaturalizantes de plántulas en germinación de plantas salvajes y de la mutante nula insercional *pepck1*. Las plantas se crecieron bajo condiciones de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad) y las muestras se cosecharon a intervalos de tiempo entre las 4 y las 72 HPI. En la Figura 33 se muestra que la proteólisis de la *AthPEPCKasa1* llega a un máximo a los 24-48 HPI en las plantas salvajes mientras que no se detecta ninguna banda en las muestras de la mutante *pepck1* a ningún tiempo. La proteólisis de la *AthPEPCKasa1* también se observó en las plántulas salvajes crecidas en total oscuridad (escotomorfogénesis), a pesar de que la cantidad de *AthPEPCKasa1* era significativamente menor que las plántulas crecidas bajo condiciones de día largo (Figura 33).

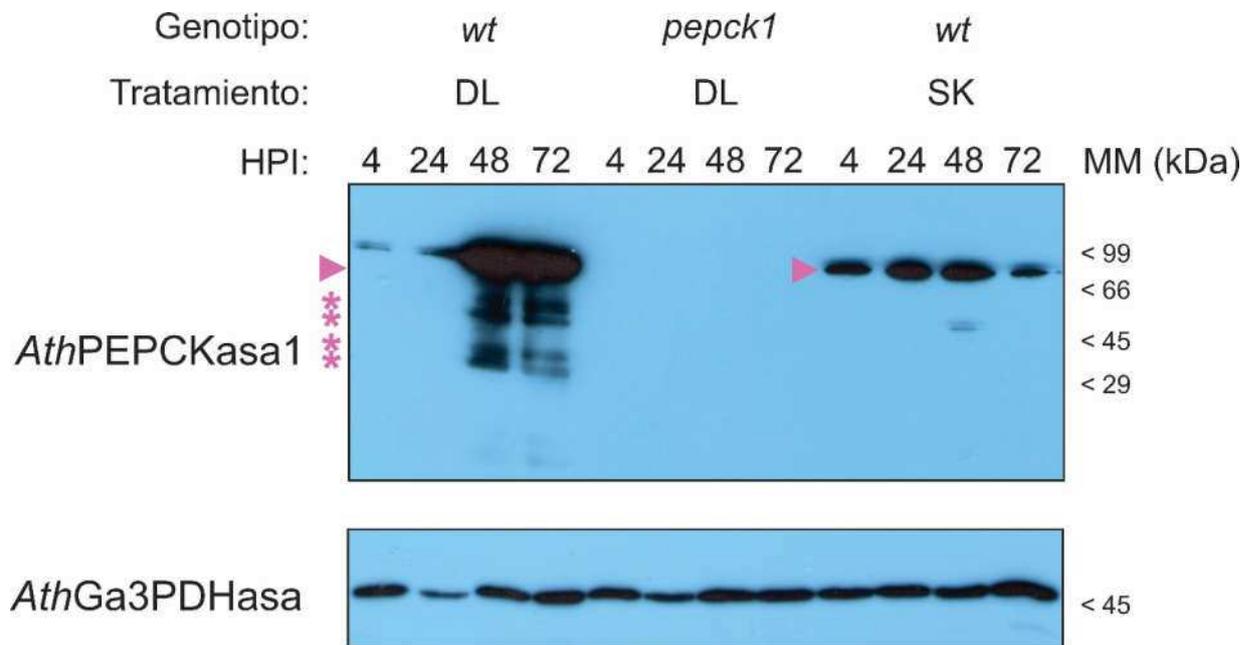


Figura 33. Cinética de proteólisis de la *AthPEPCKasa1* durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*. Las inmunodetecciones se realizaron con el antisuero anti-*AthPEPCKasa1* (panel superior) y el control de carga con el antisuero anti-*TaeGa3PDHasa* (panel inferior) sobre extractos desnaturalizados de plántulas de *Arabidopsis* obtenidas de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. HPI: horas posteriores a la imbibición de las semillas. DL: condición de crecimiento de día largo (16 h de luz y 8 h de oscuridad). SK: condición de escotomorfogénesis (oscuridad total). Todas las calles del gel se cargaron con 1,3 mg PF de tejido. La flecha (►) marca a la *AthPEPCKasa1* completa y el asterisco (*) a las formas truncas.

De acuerdo con nuestros resultados (Figuras 30-33) y debido a los reportes de la degradación de la PEPCKasa en los cotiledones de pepino [158], optimizamos un protocolo para la extracción de proteínas en estado nativo para analizar la actividad PEPCKasa en extractos de plántulas en germinación. La extracción se realizó en una solución a pH 9,0 (el cual disminuye la proteólisis de la PEPCKasa en los extractos proteicos de pepino [96]) y suplementado con inhibidores de proteasas, para evitar una mayor degradación durante los ensayos. De esta forma, encontramos que la *AthPEPCKasa1* se mantenía estable en los extractos crudos por al menos 4 h luego de la extracción (Figura 34) y que la actividad PEPCK en los extractos crudos de plántulas de *Arabidopsis* era similar a la medida por Malone y col. [227]. Como puede apreciarse en la Figura 35, la actividad PEPCKasa era máxima a los 3 días posteriores a la imbibición (DPI), mientras que el pico de expresión proteica se observaba a 1 DPI. El máximo nivel proteico de la *AthPEPCKasa1* coincidía con el pico de proteólisis, alrededor de los 24-72 HPI (Figura 35).

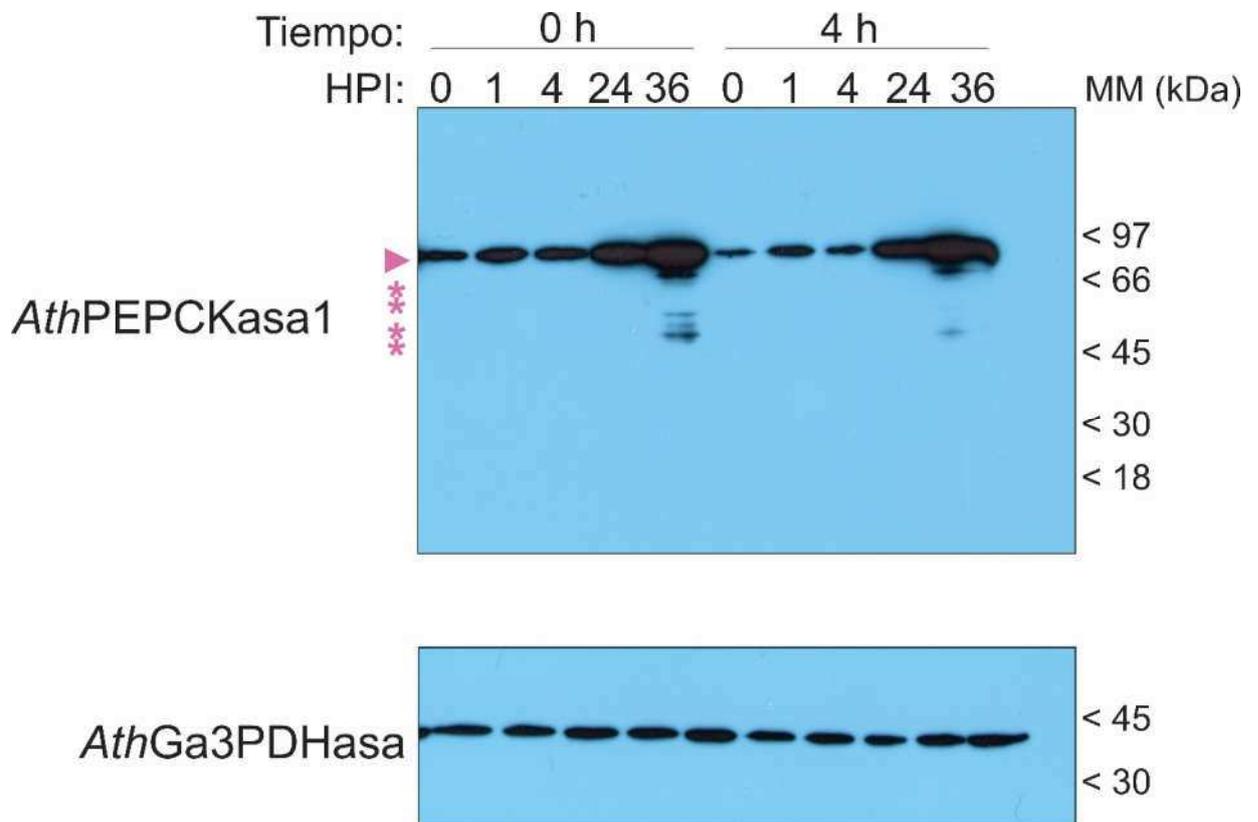


Figura 34. Protocolo de extracción nativa de la *AthPEPCKasa1* en semillas en germinación. Para controlar la estabilidad de la *AthPEPCKasa1* en el protocolo de extracción empleado para medir actividad, se extrajeron muestras que se prepararon inmediatamente, o bien se incubaron por 4 h en hielo antes del agregado de la solución Laemmli. Las muestras se separaron en un SDS-PAGE al 12% que fue transferido a membranas de nitrocelulosa para luego ser detectado con el antisuero anti-*AthPEPCKasa1*. HPI: horas posteriores a la imbibición. MM: marcador de masa molecular. La flecha (►) marca a la *AthPEPCKasa1* completa y el asterisco (*) a las formas truncas. Todas las calles de el gel se cargaron con 3 µg de proteína.

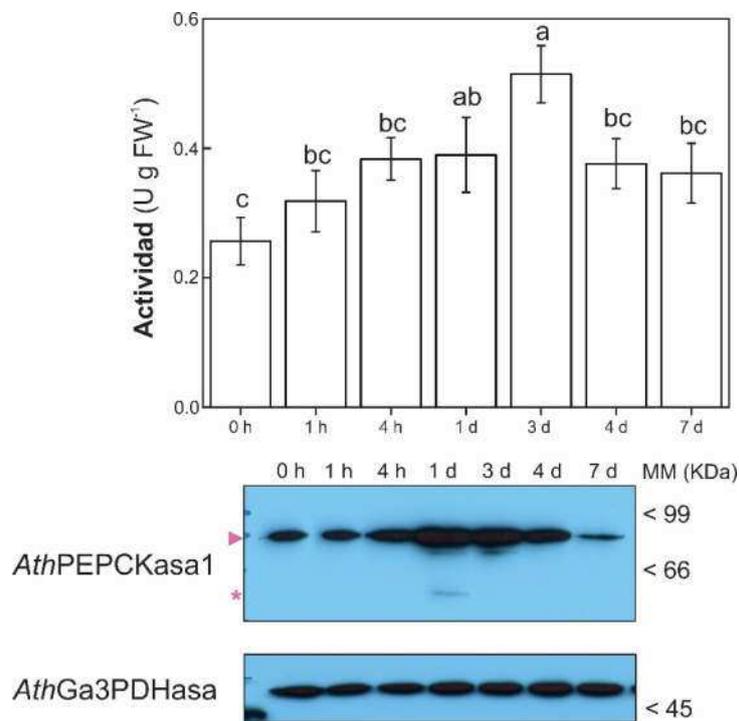


Figura 35. Actividad PEPCKasa en semillas de Arabidopsis en germinación. La actividad PEPCKasa carboxilasa se midió en extractos crudos de plántulas de Arabidopsis de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos que se presentan corresponden a la media \pm error estándar de cuatro réplicas biológicas. Las medias que son significativamente diferentes ($P < 0,05$) en una comparación de ANOVA de una sola vía con un 95% de confianza fueron agrupadas con una prueba *post-hoc* de Fisher LSD. En el panel inferior, se muestra una inmunodetección de las muestras analizadas. El gel se cargó con 3 μ g de proteínas en todas las calles. La flecha (\blacktriangleright) marca a la AthPEPCKasa1 completa y el asterisco (*) a las formas truncas.

4.3.2 Efectos cinéticos y regulatorios sobre la AthPEPCKasa1 provocados por el corte por la metacaspasa AthMC9.

El patrón de bandas en la señal correspondiente a la AthPEPCKasa1 en los *western-blot*s sugería una degradación parcial por una proteasa (Figuras 30-35). Ha sido descrito [99] que la AthPEPCKasa1 es escindida en el extremo N por la metacaspasa AthMC9. Las caspasas (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases-caspases*) son una familia de proteasas dependientes de cisteína que en mamíferos están involucradas en la cascada de señalización de la apoptosis o muerte celular programada [263]. Gracias a su capacidad de generar cortes proteolíticos discretos, las caspasas pueden activar de forma selectiva a otras caspasas ubicadas corriente abajo en la cascada de señalización o bien modificar a una gran variedad de

proteínas blanco, lo cual resulta en un abanico de alteraciones estructurales y metabólicas. En otros organismos, se han encontrado dos familias de homólogos distantes de las caspasas, las paracaspasas en los metazoos y las metacaspasas en plantas, hongos y protozoos [201]. Al igual que las caspasas, las metacaspasas poseen una díada catalítica His-Cys en su sitio activo, siendo la Cys la responsable del ataque nucleofílico que hidroliza el enlace peptídico. La característica más sorprendente de las metacaspasas y que las diferencia de las caspasas es su especificidad estricta para los residuos de Arg y Lys [263].

El genoma de *Arabidopsis* posee 9 genes codificantes para metacaspasas. Las de tipo I (*AthMC1-3*), poseen extensiones de 80 a 120 aminoácidos en sus extremos N, similares a los dominios de interacción presentes en las caspasas “iniciadoras” ubicadas en los primeros pasos de la cascada de señalización en mamíferos. Las del tipo II (*AthMC4-9*), carecen de estos dominios de interacción, por lo que estarían ubicadas corriente abajo de la cascada de señalización. Se ha descrito que la *AthMC9* es inactiva a pH alcalino [201]. Por esto, analizamos si el corte de la *AthPEPCKasa1* podía ser modulado por el pH en el medio de reacción incubándola por 60 min con extractos crudos de plántulas en germinación de 48 HPI a diferentes valores de pH. De esta forma, encontramos que el corte ocurría a pH 5,5 y 7,0 y se evitaba a pH 9,0 (Figura 36).

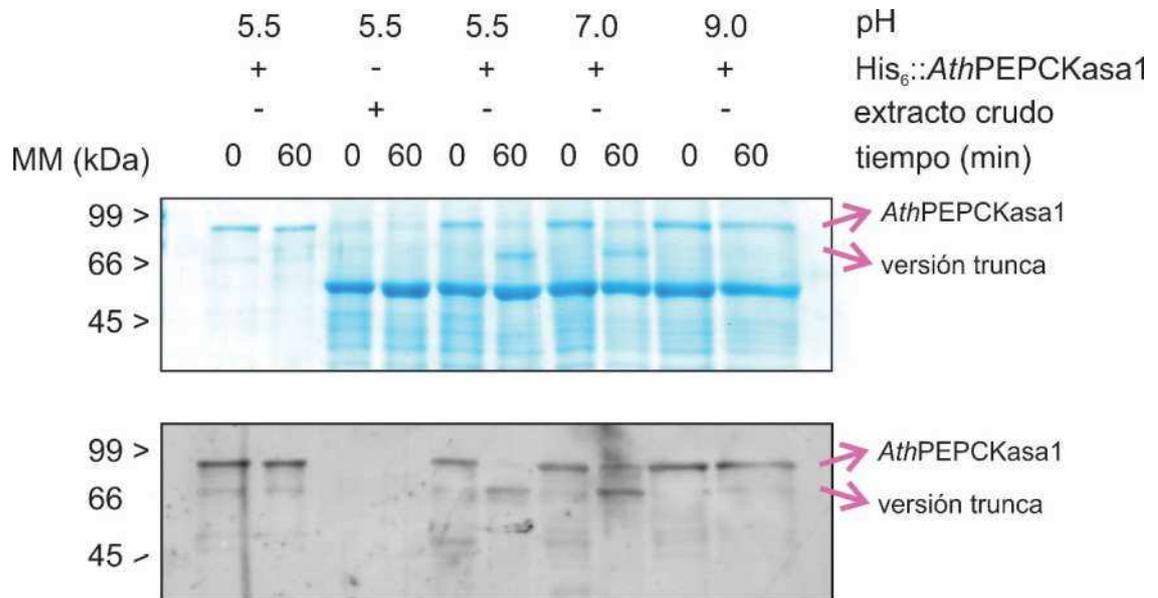


Figura 36. Corte de la *AthPEPCKasa1* por extractos crudos de plántulas de *Arabidopsis*. La *AthPEPCKasa1* se incubó con extractos de plántulas de *Arabidopsis* con solución reguladora MES-NaOH pH 5,5, HEPES-NaOH pH 7,0 y Tricina-NaOH pH 9,0 (en todos los casos a una concentración final de 150 mM). Las reacciones se terminaron por el agregado de solución muestra desnaturante y luego se sembraron en un SDS-PAGE al 10% (panel superior). Luego de la transferencia a membranas de nitrocelulosa, se detectaron con el antisero anti-*AthPEPCKasa1* (panel inferior). El gel se cargó con 0,2 µg de *AthPEPCKasa1* y 2,0 µg de extracto crudo.

Para analizar el efecto del corte en la actividad de la *AthPEPCKasa1*, clonamos el gen codificante para la *AthMC9* a partir de plántulas de *Arabidopsis* y expresamos la proteína recombinante en *E. coli*. La *AthMC9* se expresó como un zimógeno de 37,1 kDa, el cual se auto-proteoliza para producir las subunidades p10 (15,4 kDa) y p20 (21,73 kDa) que conforman a la *AthMC9* activa (Figura 37) [201]. Al incubarse con la *AthPEPCKasa1* por 1 h, se proteolizó completamente a la enzima (Figura 38 A). Los fragmentos observados en la Figura 38 A corresponden a los polipéptidos teóricos predichos de acuerdo con los sitios de reconocimiento de la *AthMC9* (K19 y R101; Figura 38 B) [99]. La actividad de la *AthPEPCKasa1* proteolizada era un poco mayor que la de la proteína completa, a pesar de que el cambio no fue estadísticamente significativo.

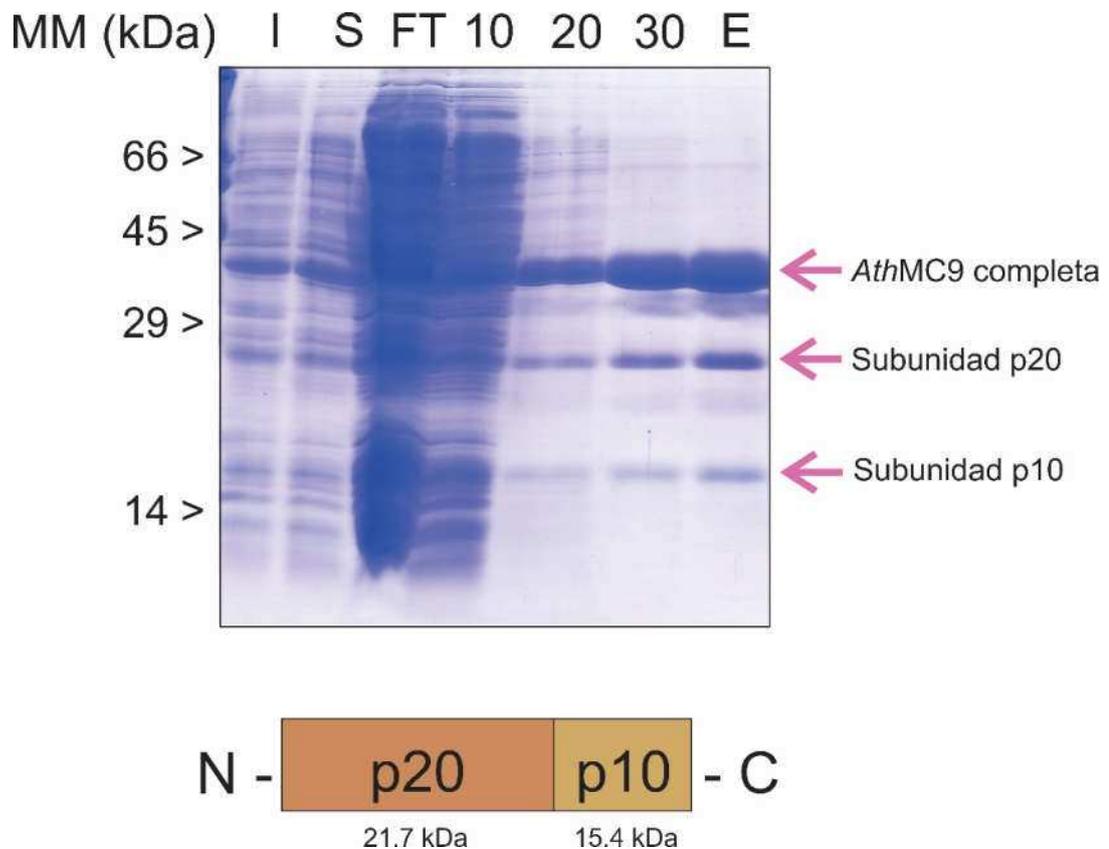


Figura 37. Purificación de la *AthMC9* por IDA- Ni^{2+} . Las fracciones obtenidas durante la purificación de la *AthMC9* fueron analizadas en un SDS-PAGE al 15%. I; fracción insoluble, S; fracción soluble, FT; fracción no retenida en la columna, 10-30; concentraciones de imidazol (en mM) empleadas para lavar la columna, E; elusión con imidazol 300 mM. MM; marcador de masa molecular. En la base del gel se muestra un esquema de las subunidades de la *AthMC9*.

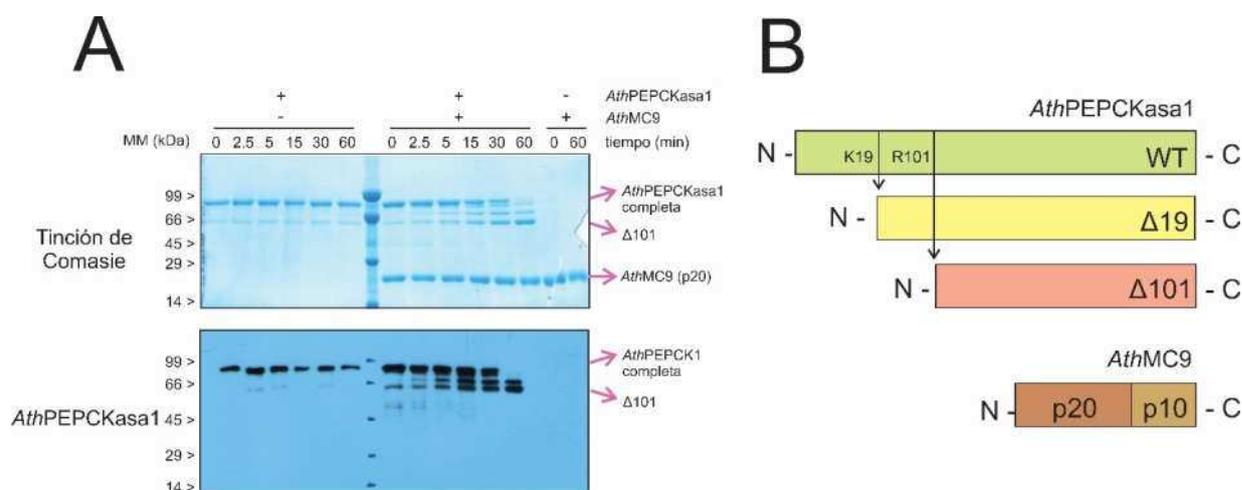


Figura 38. Análisis del corte de la *AthPEPCKasa1* por *AthMC9*. A) Proteólisis de la *AthPEPCKasa1* por la *AthMC9* recombinante. Las reacciones se realizaron de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos y se tomaron alícuotas a los intervalos de tiempo descritos en la figura. Luego, las muestras se separaron en un SDS-PAGE al 10% (panel superior) o se transfirieron a membranas de nitrocelulosa detectadas con el antisero anti-*AthPEPCKasa1* (panel inferior). El gel se cargó con 1 μ g de la *AthPEPCKasa1* y con 2 μ g de la *AthMC9*. B) Esquema de las mutantes truncas *AthPEPCKasa1* construidas de acuerdo con los sitios de reconocimiento de la *AthMC9* identificados por Tsiatsiani y col. (2013) y de las subunidades de la *AthMC9* de acuerdo con Vercammen y col. (2004).

Para estudiar en detalle los efectos del corte de la *AthMC9* en la cinética de la *AthPEPCKasa1*, construimos dos proteínas truncas en el dominio N-terminal, las mutantes $\Delta 19$ and $\Delta 101$ (Figura 38 B). Las expresamos de forma recombinante en *E. coli* fusionadas a una etiqueta de His₆ en su extremo N, de la misma manera que lo hicimos para la enzima salvaje. Ambas proteínas se expresaron de forma soluble y se purificaron por IMAC-Ni²⁺, obteniéndose una preparación altamente pura de las proteínas (>90%), con masas moleculares de ~71 kDa y ~63 kDa, para las mutantes $\Delta 19$ and $\Delta 101$ respectivamente (Figura 39 A). Para determinar su estructura cuaternaria, se procesó una muestra de estas enzimas recombinantes en una columna de cromatografía de exclusión molecular y confirmamos que ambas mutantes son hexámeros (Figuras 39 B), de la misma forma que ocurre para la *AthPEPCKasa1* completa [20].

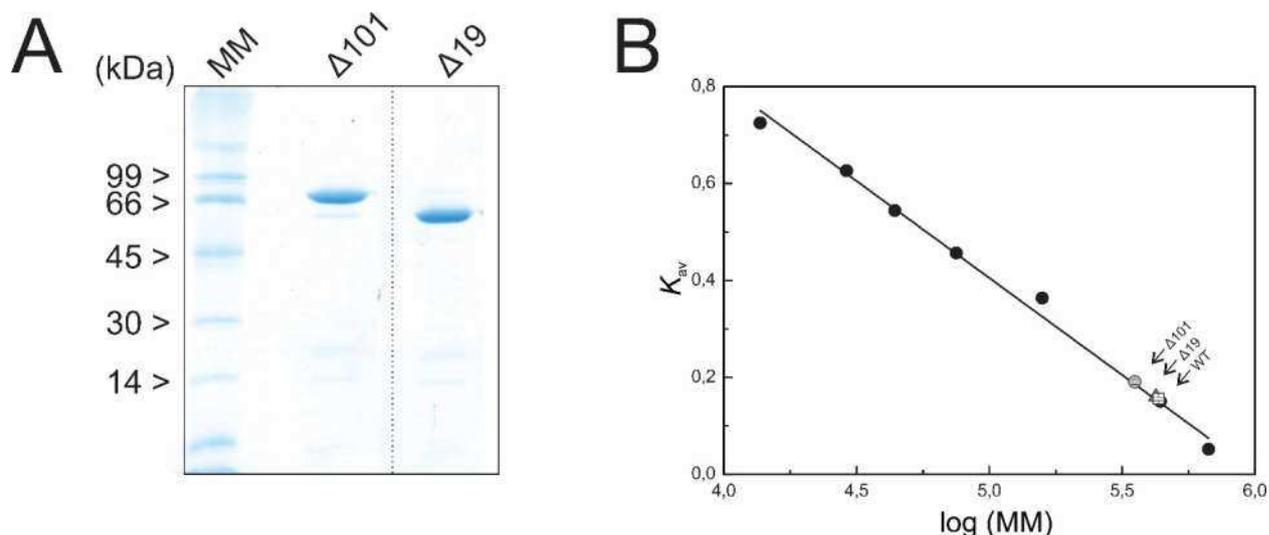


Figura 39. Purificación y determinación de las masas moleculares de las mutantes truncas de las *AthPEPCKasas*. (A) Ambas mutantes fueron purificadas y luego analizadas mediante un SDS-PAGE al 12% para comprobar su grado de pureza. (B) Curva de calibración construida para la columna de filtración en gel *Superdex 200* con los estándares proteicos informados en la sección de Materiales y Métodos. Para las muestras (señaladas en la Figura con una flecha) se muestran los datos correspondientes al promedio de dos experimentos independientes. El valor de K_{av} se calculó de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. MM: marcador de masa molecular.

Luego, caracterizamos estas mutantes de la misma forma que lo hicimos para la enzima salvaje (Tabla 6, Figuras 40-41). En el sentido de carboxilación, la k_{cat} para las mutantes $\Delta 19$ y $\Delta 101$ fue 1,5- y 1,7- veces mayores, respectivamente, que para la enzima salvaje. Por otra parte, todas las enzimas poseían valores de k_{cat} similares en el sentido de descarboxilación (Tabla 6). Con respecto al valor de K_M , todas las mutantes muestran una mayor afinidad por los nucleótidos y el OAA que por el PEP, de la misma forma que ocurre para la enzima salvaje (Tabla 6). La mutante $\Delta 19$ posee 2- y 6- veces mayor afinidad por el PEP y el OAA que la enzima salvaje, respectivamente (Tabla 6). La mutante $\Delta 101$ mostró 2-veces menor afinidad aparente por el PEP y 5-veces mayor afinidad aparente por el OAA que la enzima salvaje (Tabla 6).

Tabla 6. Parámetros cinéticos para las mutantes truncas de la *AthPEPCKasa1*. Las reacciones en ambos sentidos de reacción se realizaron de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Las constantes se calcularon ajustando los datos experimentales de las Figuras 25-26 a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores reportados corresponden a la media \pm SE de los parámetros del ajuste. Las comparaciones entre los parámetros se realizaron con una prueba F de extra suma de cuadrados y las diferencias se marcan con un * ($P < 0,05$) y ** ($P < 0,01$). Las concentraciones fijas de sustrato empleadas fueron las siguientes: ^a ADP 0,25 mM, ^b PEP 15 mM, ^c ATP 0,75 mM, ^d OAA 0,75 mM, ^e ADP 0,5 mM, ^f PEP 5 mM, ^g ATP 1,0 mM, ^h OAA 0,5 mM, ⁱ ADP 0,5 mM, ^j PEP 15 mM, ^k ATP 0,5 mM, ^l OAA 0,5 mM.

Enzima	Sentido de reacción	Sustrato	K_M (μM)	K_{cat} (s^{-1})
<i>AthPEPCKasa1</i> WT	Carboxilación	PEP ^a	3700 \pm 500	1,76 \pm 0,04
		ADP ^b	79 \pm 15	
	Descarboxilación	OAA ^c	240 \pm 20	3,2 \pm 0,3
		ATP ^d	66 \pm 2	
<i>AthPEPCKasa1</i> $\Delta 19$	Carboxilación	PEP ^e	1900 \pm 400 *	2,64 \pm 0,06
		ADP ^f	45 \pm 10	
	Descarboxilación	OAA ^g	36 \pm 9 **	3,38 \pm 0,06
		ATP ^h	31 \pm 8 *	
<i>AthPEPCKasa1</i> $\Delta 101$	Carboxilación	PEP ⁱ	7300 \pm 700 **	3,01 \pm 0,08
		ADP ^j	58 \pm 8	
	Descarboxilación	OAA ^k	44 \pm 7 **	3,9 \pm 0,2
		ATP ^l	78 \pm 15	

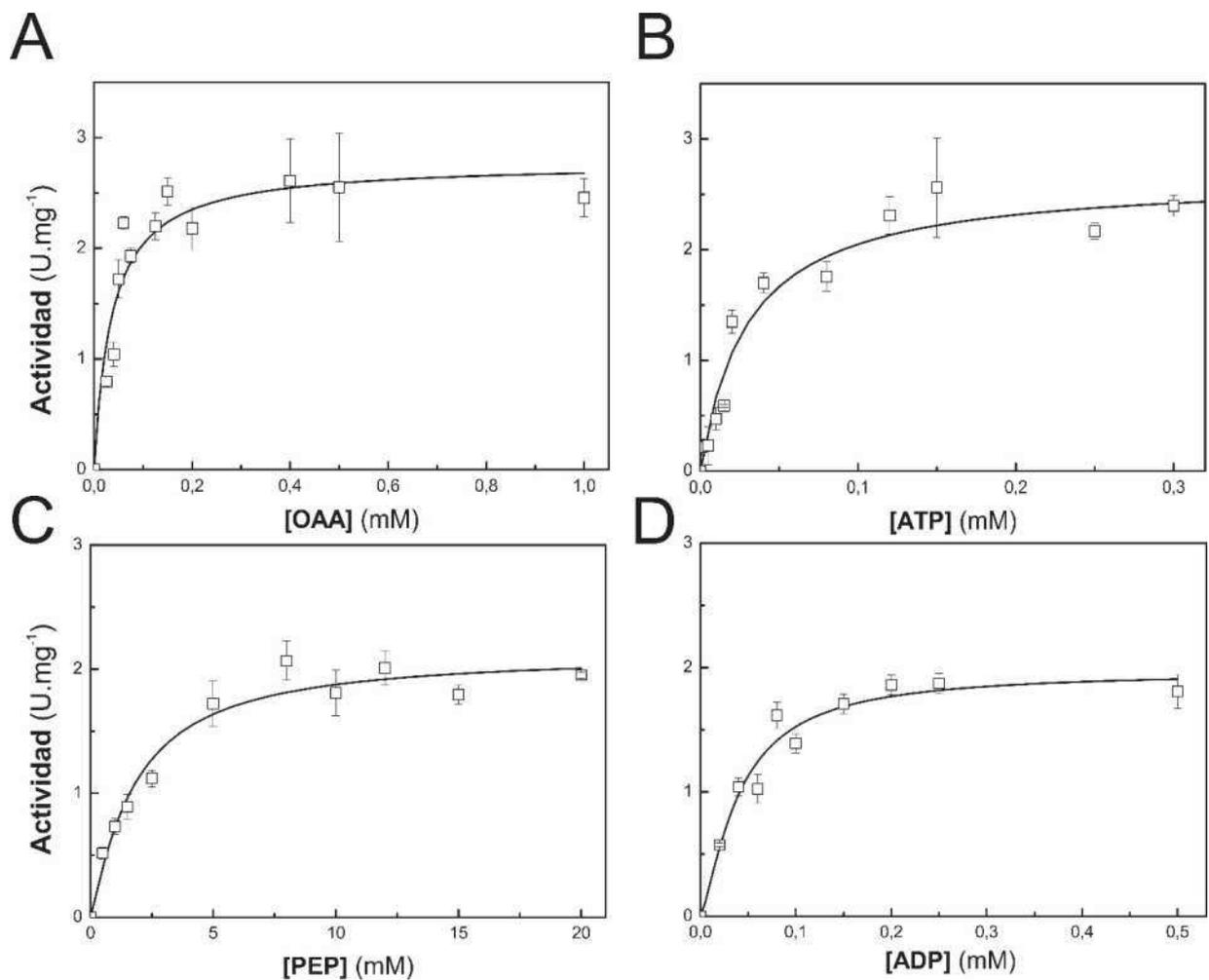


Figura 40. Curva de saturación de sustrato para la mutante *AthPEPCKasa1* $\Delta 19$. Cada curva se realizó empleando la concentración variable de sustrato indicada y las siguientes concentraciones fijas de sustrato: A) ATP 1,0 mM, B) OAA 0,5 mM, C) ADP 0,5 mM, D) PEP 5,0 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro conjuntos de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y los parámetros calculados se muestran en la Tabla 6.

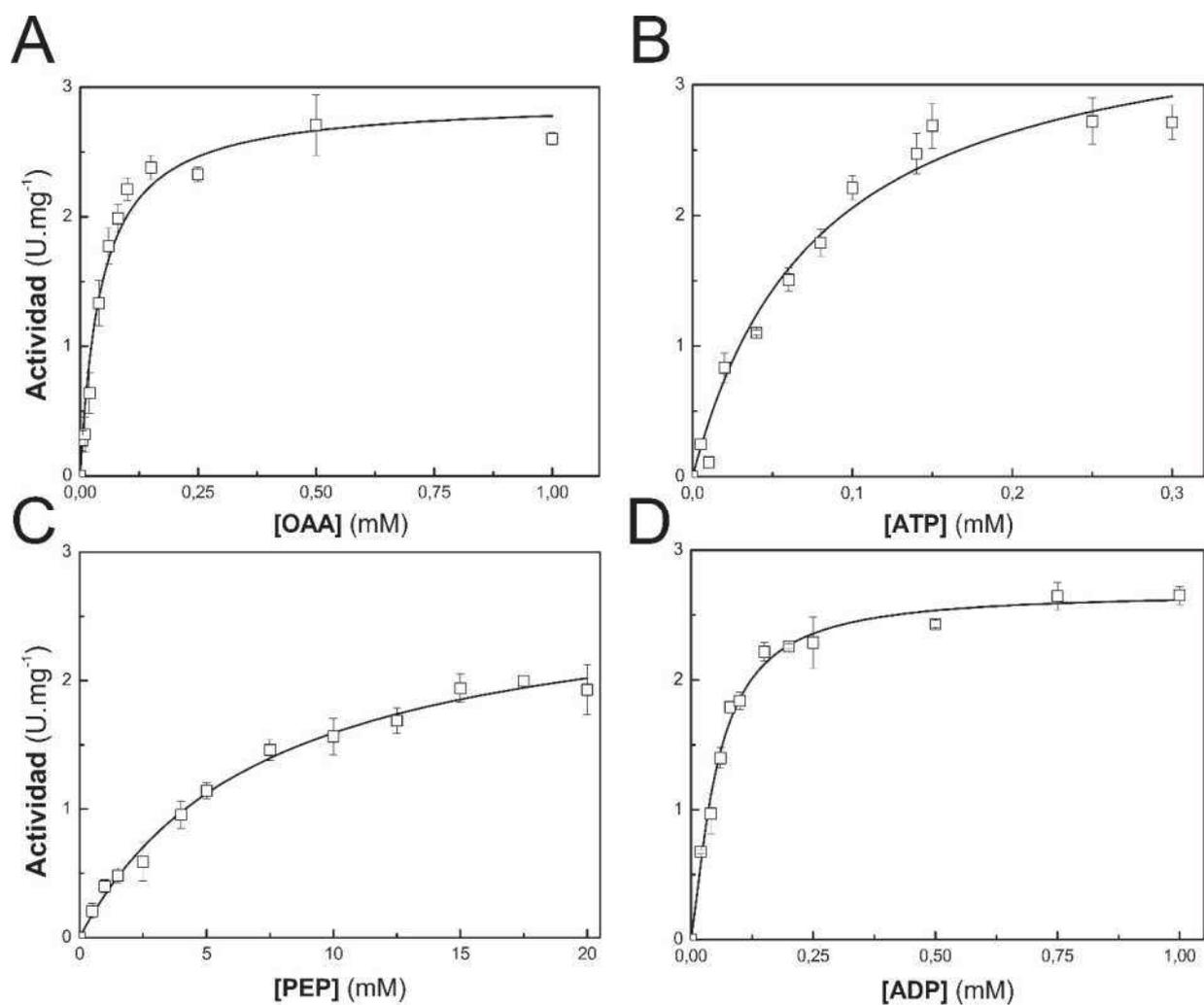


Figura 41. Curva de saturación de sustrato para la mutante *AthPEPCKasa1* $\Delta 101$. Cada curva se realizó empleando la concentración variable de sustrato indicada y las siguientes concentraciones fijas de sustrato: A) ATP 0,5 mM, B) OAA 0,5 mM, C) ADP 0,5 mM, D) PEP 15,0 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro conjuntos de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y los parámetros calculados se muestran en la Tabla 6.

Como se expuso previamente, las PEPCKasas de plantas son reguladas alostéricamente por metabolitos [20, 95, 97, 129, 156]. Resulta de destacar que encontramos que la respuesta de las mutantes $\Delta 19$ y $\Delta 101$ a los metabolitos era diferente en comparación con las versiones completas. Ambas mutantes truncas eran más sensibles al PPI que la enzima salvaje (Figura 42). La sensibilidad al shikimato estaba levemente aumentada en la mutante $\Delta 19$ (aunque sin significancia estadística), mientras que la mutante $\Delta 101$ era insensible a este metabolito (Figura 42). La Glc-6P inhibió a la enzima salvaje y a la mutante trunca $\Delta 19$ pero, de forma sorprendente, la mutante trunca $\Delta 101$ se activaba 2 veces por el mismo metabolito (Figura 42). El malato activó 2 y 1,5 veces a la enzima salvaje y a la mutante trunca $\Delta 19$, respectivamente, mientras que la mutante $\Delta 101$ era insensible a este metabolito (Figura 42). Para probar si el malato era capaz de unirse a la mutante $\Delta 101$, realizamos ensayos de desnaturalización de proteínas y encontramos que el malato producía un cambio similar en la T_m en las enzimas WT, $\Delta 19$ y $\Delta 101$ (Figura 43), sugiriendo que este metabolito aún se une a todas las formas de la enzima.

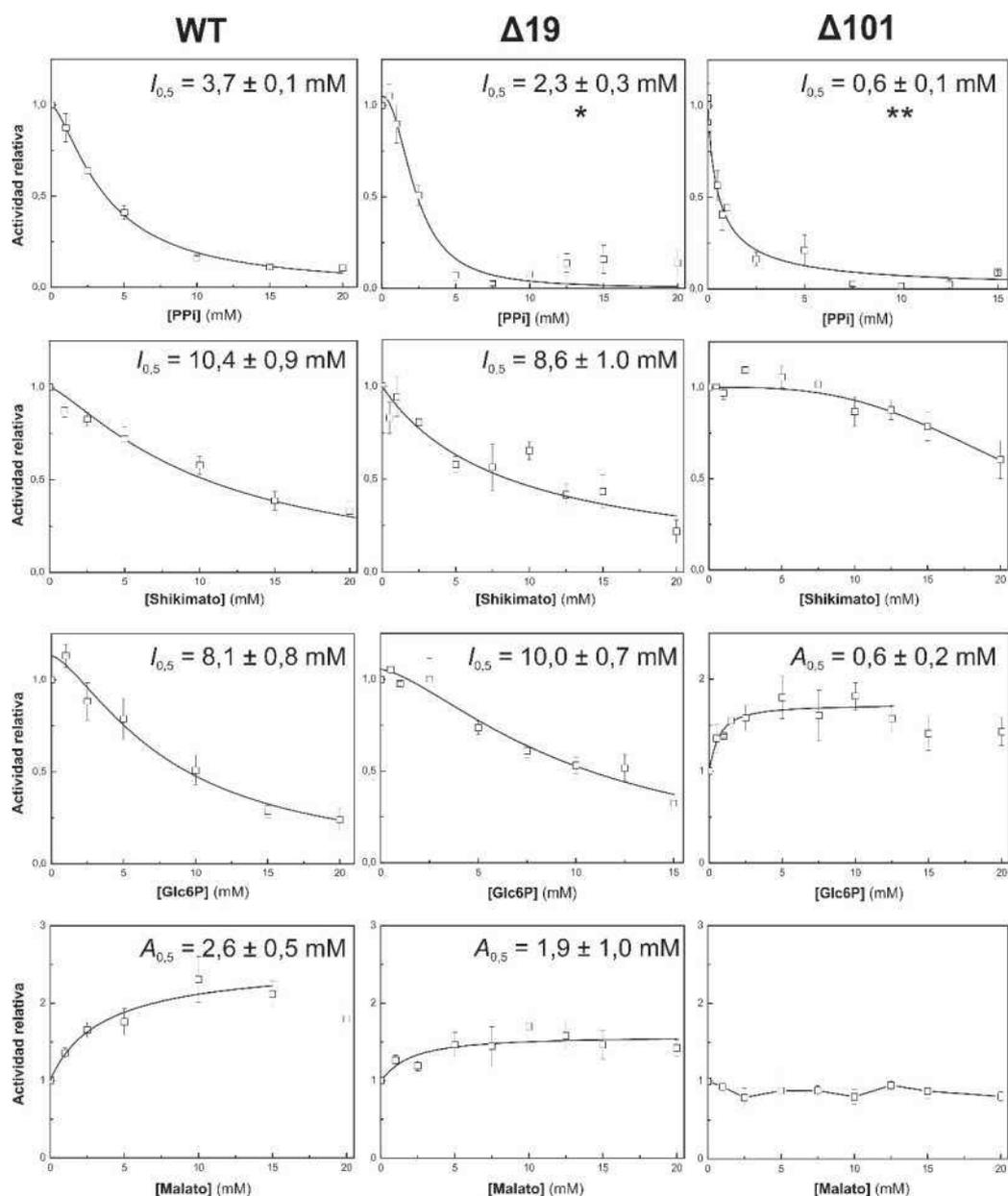


Figura 42. Análisis de los efectores alostéricos en las mutantes truncas *AthPEPCKasa1*. La actividad se midió en el sentido de descarboxilación, con la reacción estándar descrita en Materiales y Métodos, en la *AthPEPCKasa1* WT (panel izquierdo), $\Delta 19$ (panel medio) y $\Delta 101$ (panel derecho) empleando las siguientes concentraciones de sustrato; OAA 0,75 mM y ATP 0,75 mM para la WT, y OAA 0,5 mM y ATP 0,3 mM para las mutantes $\Delta 19$ y $\Delta 101$. En el caso del malato, la actividad se midió en el sentido de descarboxilación con PEP 10 mM y ADP 0,13 mM. Los datos se ajustaron a la ecuación de Hill modificada y los valores informados corresponden a la media \pm SE de los parámetros de ajuste. Las comparaciones se realizaron con una prueba F extra suma de cuadrados (* para $P < 0,05$ y ** para $P < 0,01$).

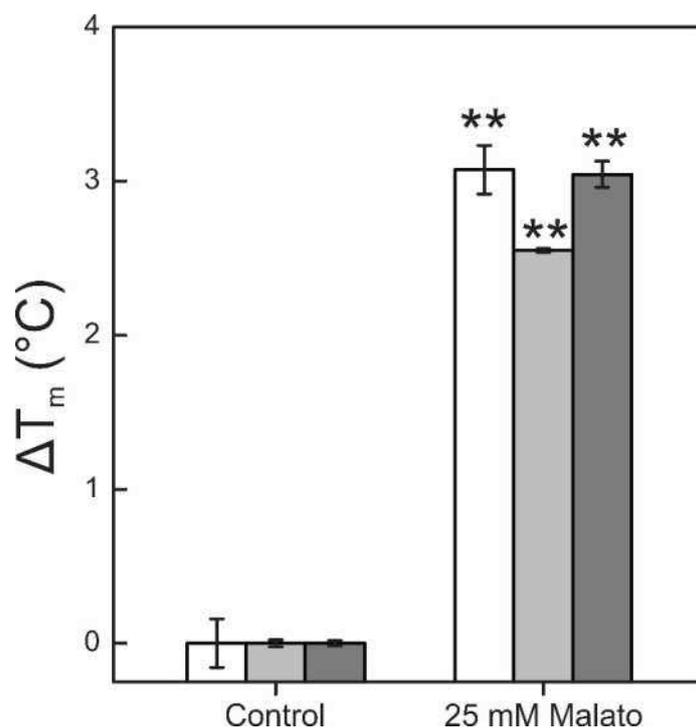


Figura 43. Ensayos de desnaturalización de las mutantes truncas *AthPEPCKasa1* en presencia de malato. Los experimentos se realizaron en la presencia de la enzima salvaje (blanco), $\Delta 19$ (gris claro) y $\Delta 101$ (gris oscuro) en ausencia (control) o en presencia de malato 25 mM. El salto en la temperatura de desnaturalización se calculó de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos que se muestran son la media \pm SE para tres replicas. * corresponde a un valor $P < 0,5$ y ** corresponde a un valor $P < 0,01$ empleando una prueba t para dos muestras independientes con un nivel de confianza del 95%.

4.4 Ubiquitinilación y degradación proteolítica de la *AthPEPCKasa1*.

La degradación de proteínas, suele requerir de la exposición de una señal que involucra modificaciones postraduccionales específicas, como la fosforilación y la ubiquitinilación [264]. En las muestras de plántulas en germinación, además del corte proteolítico también observamos degradación proteica masiva (Figuras 30-35), por lo que decidimos evaluar el marcado de la *AthPEPCK1* por ubiquitinilación. Para esto, incubamos plántulas de 48 HPI con inhibidores de las vías de degradación por el proteasoma (MG132) y por la autofagia (3-metiladenina e hidroxycloroquina). De esta manera, encontramos acumulación de la *AthPEPCKasa1* en las plántulas tratadas por 24 h con el inhibidor de proteasoma MG132. Se encontró una menor señal en las muestras tratadas con 3-metiladenina por 48 h y no observamos diferencias significativas en las muestras tratadas con hidroxycloroquina (Figura 44).

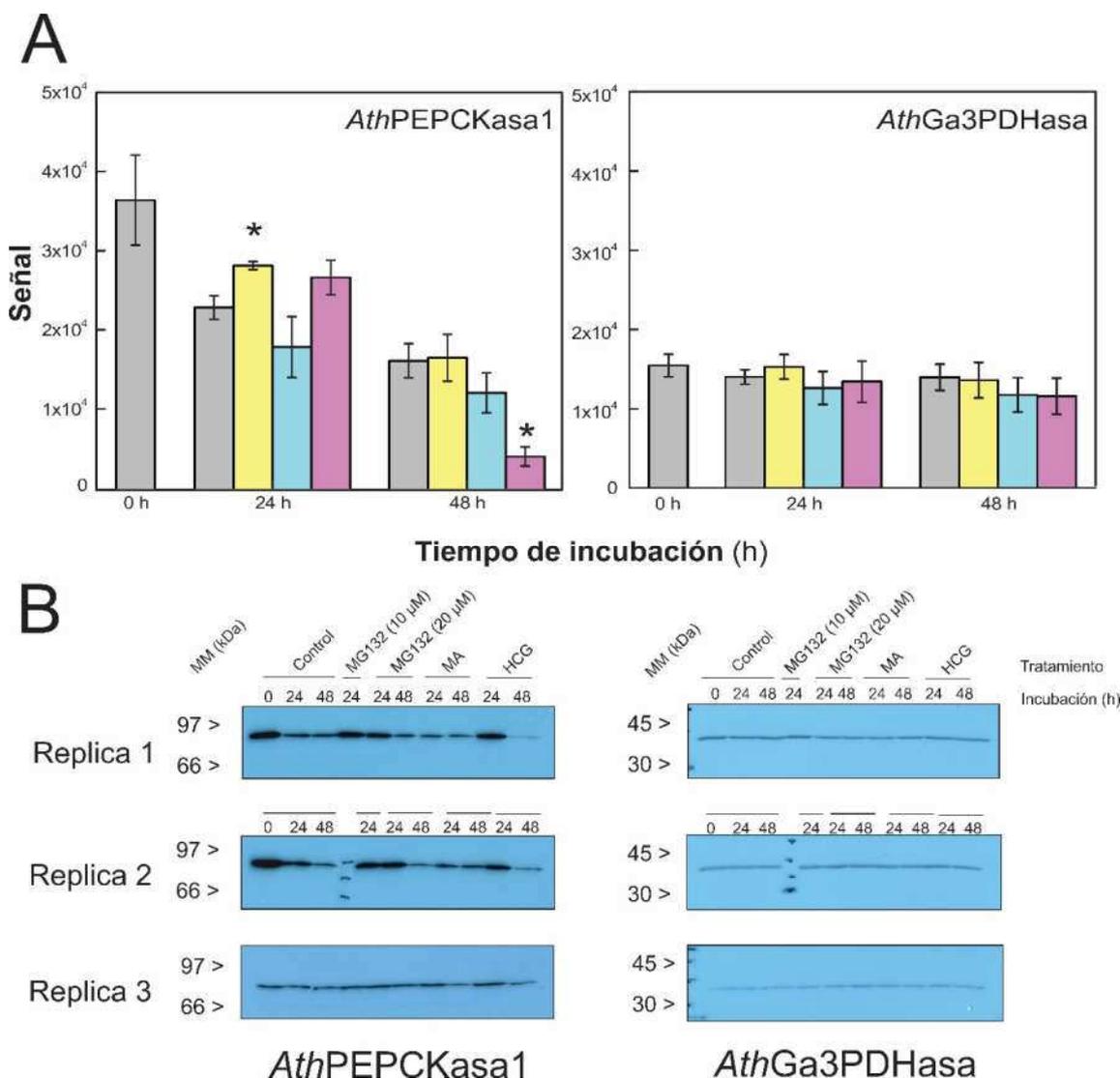


Figura 44. Tratamiento de plántulas de Arabidopsis con inhibidores de proteólisis. A) Cuantificación por densitometría de *western blots* realizados con los anticuerpos anti-*AthPEPCKasa1* y anti-*TaeGa3PDHasa* sobre extractos desnaturalizantes de plántulas de Arabidopsis de 48 HPI incubadas por 24 y 48 h con medio MS al medio bajo condiciones control (gris) o suplementado con MG132 20 μ M (amarillo), hidroxiclороquina 5 mM (azul) y 3-metiladenina 2 mM (violeta). Los valores que se muestran corresponden a la media \pm SE de tres réplicas y el asterisco corresponde a un valor $P < 0,05$ para una prueba t para dos muestras independientes. B) *Western blots* realizados sobre extractos de plántulas tratadas con inhibidores de proteasas. Los westerns se realizaron con los anticuerpos anti-*AthPEPCKasa1* (panel derecho) o anti-*TaeGa3PDHasa* (panel izquierdo). La cuantificación se realizó como el paquete informático Fiji y el resultado se muestra en el panel (A).

Dado que, durante la germinación la cantidad de *AthPEPCKasa1* llega a un pico máximo y luego se reduce drásticamente (Figuras 30-35), y debido a que el tratamiento con MG132 aumentó la cantidad de la enzima (Figura 44), especulamos que la *AthPEPCKasa1* podría ser ubiquitinilada y luego degradada por el proteasoma 26S. Para probar esta hipótesis, y debido a estudios previos que encontraron ubiquitinilación de la *AthPEPCKasa1* en plántulas de 10 días y 3 semanas crecidas en medio líquido [265, 266], analizamos distintas concentraciones de MG132 y tiempos de incubación, para encontrar una condición óptima de acumulación de la proteína (Figura 45). De este modo, observamos que tratamientos de 25-50 μM por 20 h generaban la mayor acumulación de la *AthPEPCKasa1*.

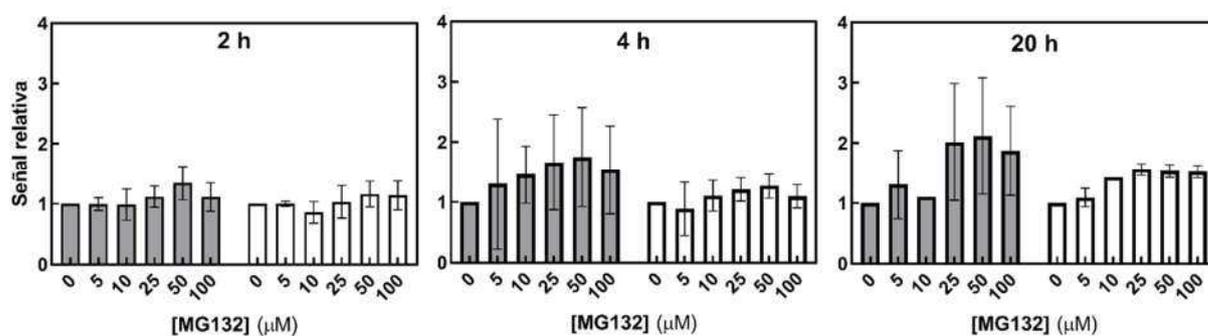


Figura 45. Tratamiento de plántulas de Arabidopsis con MG132. Se realizó una cuantificación por densitometría de *western blots* realizados con los anticuerpos anti-*AthPEPCKasa1* (gris) y anti-*TaeGa3PDHase* (blanco) sobre extractos desnaturalizados de plántulas de Arabidopsis de 72 HPI incubadas por 2, 4 y 20 h en medio MS suplementado con las concentraciones de MG132 que se indican en el eje x. Los valores que se presentan están relativizados a la señal de la muestra sin MG132 y corresponden a la media \pm SE de tres réplicas biológicas.

Utilizamos las muestras de plántulas en germinación tratadas con MG132 50 μM por 20 h para inmunoprecipitar a la *AthPEPCKasa1* (usando la mutante *pepck1* como control negativo). En la Figura 46 puede apreciarse que la proteína inmunoprecipitada fue reconocida por el anticuerpo anti-ubiquitina. Además, la cantidad de la *AthPEPCKasa1* ubiquitinilada era mayor en las muestras tratadas con el inhibidor MG132 (Figura 46). Al analizar el repositorio de interactomas *BioGRID* (<https://thebiogrid.org/>), se pudo identificar que la *AthPEPCKasa1* interactúa con la proteína ubiquitina 3 (AT5G03240) en Arabidopsis [265]. Mediante un análisis de la base de datos *Plant PTM Viewer* pudimos identificar que la Lys-147 sería ubiquitinilada, lo cual coincide con lo identificado en el trabajo de Walton y col. [266].

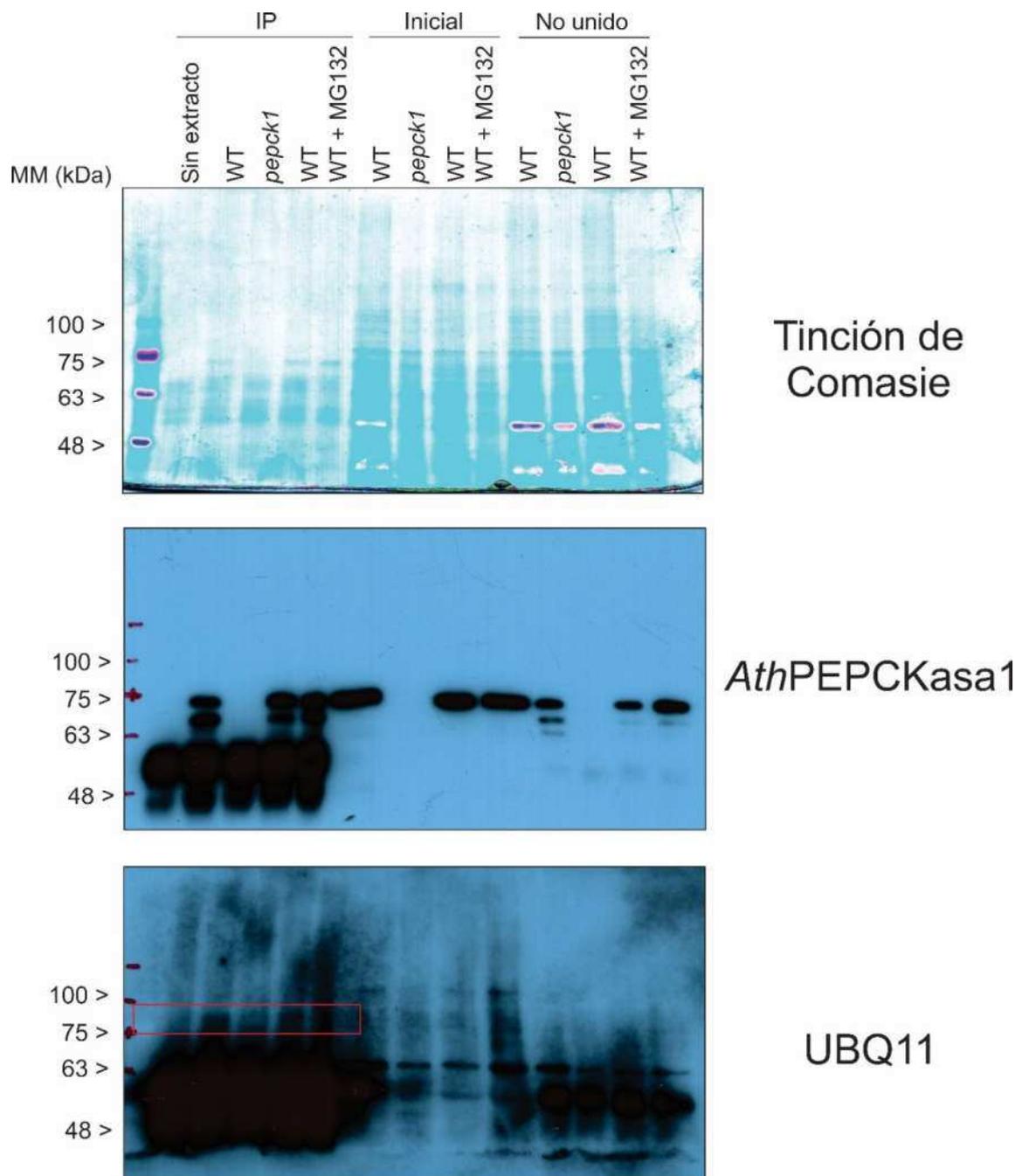


Figura 46. Inmunoprecipitación de la *AthPEPCKasa1* a partir de plántulas de Arabidopsis. Las inmunoprecipitaciones se realizaron a partir de plántulas de Arabidopsis de 72 HPI bajo las condiciones descritas en la parte superior de la Figura siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. WT, planta salvaje; *pepck1*, mutante insercional nula en el gen *PEPCK1*; WT + MG132, plantas salvajes incubadas con MG132 50 μ M; UBQ11, anticuerpo comercial anti-ubiquitina. MM: marcador de masa molecular.

Una rama ancestral del sistema de degradación mediado por el sistema ubiquitina-proteasoma es la regla del extremo N. Esta ruta fue descubierta en el año 1986 cuando Varshavsky y col. [267] encontraron en *Saccharomyces cerevisiae* la rápida degradación de proteínas modificadas para adquirir ciertos motivos en sus extremos N. Este proceso de regulación determina el tiempo de vida media de las proteínas en función de los motivos aminoacídicos expuestos en sus extremos N y es funcional en mamíferos, plantas, levaduras y bacterias [268]. Debido a los antecedentes sobre la regulación de la ATP-PEPCKasa de *Sacharomyces cerevisiae* por esta vía, en conjunto con otras enzimas gluconeogénicas, decidimos analizar el estado de la *Ath*PEPCKasa1 en plántulas en germinación de dos mutantes en los componentes de esta vía; *prt1* (mutante en el gen *PROTEOLYSIS1*) y *prt6* (mutante en el gen *PROTEOLYSIS6*). Estos genes codifican para E3 ligasas encargadas de reconocer los extremos N de las proteínas blanco de degradación y servir de andamio para que una las enzimas conjugadoras E2 las ubiquitinilen [269]. *PROTEOLYSIS1* y *PROTEOLYSIS6* están involucrados en la unión de los dominios N-terminales con aminoácidos aromáticos o básicos, respectivamente [270]. Realizamos *western blots* sobre estas mutantes, pero no obtuvimos diferencias significativas en los estadios analizados en el grado de proteólisis (Figura 47 y 48). Solamente observamos la desaparición de una banda intermedia presente a los 24 HPI en las plantas salvajes y que desapareció en la mutante *prt6* (Figura 48).

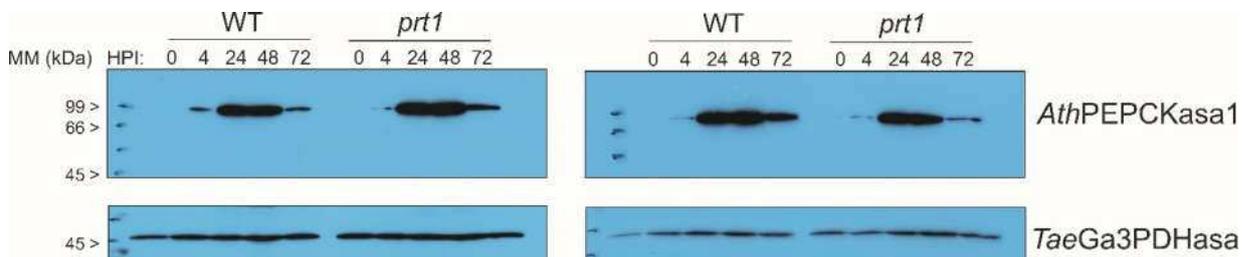


Figura 47. Immunodetección de la *Ath*PEPCKasa1 en plántulas de *Arabidopsis* WT y *prt1*. Las inmunodetecciones se realizaron con el antisuero anti-*Ath*PEPCKasa1 (panel superior) y el control de carga con el antisuero anti-*Tae*Ga3PDHase (panel inferior) sobre extractos desnaturalizantes de plántulas de *Arabidopsis* obtenidas de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. HPI, horas posteriores a la imbibición de las semillas; WT, *Arabidopsis* salvajes Col-0; *prt1*, mutante en el gen *PROTEOLYSIS1*.

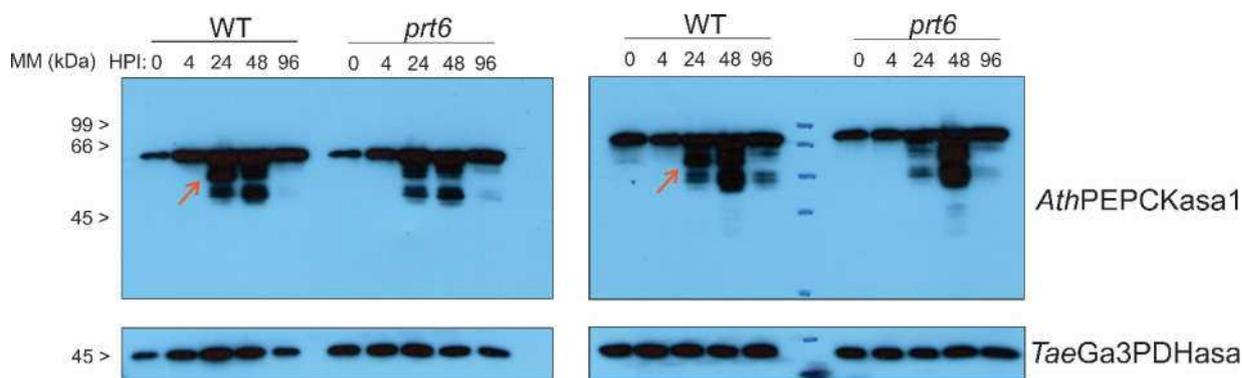


Figura 48. Inmunodetección de la *AthPEPCKasa1* en plántulas de *Arabidopsis* WT y *prt6*. Las inmunodetecciones se realizaron con el antisuero anti-*AthPEPCKasa1* (panel superior) y el control de carga con el antisuero anti-*TaeGa3PDHase* (panel inferior) sobre extractos desnaturalizantes de plántulas de *Arabidopsis* obtenidas de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos. HPI, horas posteriores a la imbibición de las semillas; WT, *Arabidopsis* salvajes Col-0; *prt6*, mutante en el gen *PROTEOLYSIS6*.

4.5 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por fosforilación.

Debido a los informes de fosforilación de la *AthPEPCKasa1* presentes en la literatura [96, 114, 152, 165, 166], como así también a la información disponible en las bases de datos, decidimos analizar si en plántulas en germinación se encontraba modificada de esta manera. Para esto, analizamos extractos crudos desnaturalizados de semillas en germinación mediante un SDS-PAGE suplementado con PhosTag-Mn²⁺, que es un reactivo quelante que retrasa de forma selectiva las proteínas fosforiladas [210, 271, 272]. Como puede observarse en la Figura 49, la *AthPEPCKasa1* de las muestras cosechadas a los 36 HPI migraron con retraso, indicando que la enzima se encuentra fosforilada en este estadio de la germinación.

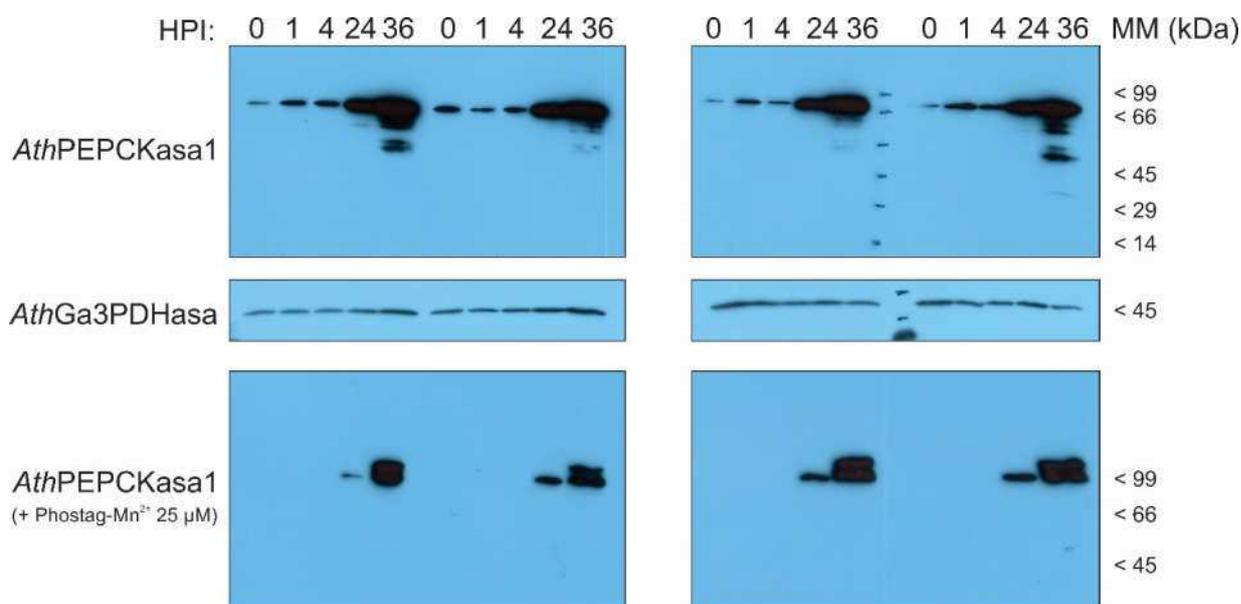


Figura 49. Estado de fosforilación de la *AthPEPCKasa1* durante la germinación de semillas de *Arabidopsis*. Extractos desnaturalizados de *Arabidopsis* se separaron en un SDS-PAGE al 12% y, luego de la transferencia a membranas de nitrocelulosa, se inmunodetectaron con el anticuerpo anti-*AthPEPCKasa1* de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos (panel superior). Control de carga realizado con anti-*TaeGa3PDHase* (panel medio). Los mismos extractos se resolvieron en un SDS-PAGE al 7,5% suplementado con Phostag-Mn²⁺ 25 μM el cual, luego de transferirlo a una membrana de PVDF, fue detectado con el anticuerpo anti-*AthPEPCKasa1*. HPI: horas posteriores a la imbibición. MM: marcador de masa molecular.

Si bien la fosforilación de las PEPCKasas de plantas había sido informada anteriormente, no se conocían los efectos de esta modificación postraduccional en las propiedades cinéticas y regulatorias de la enzima. Dado que los estudios sobre de la proteína fosforilada se hicieron en extractos crudos o bien con las enzimas purificadas a partir de su fuente natural, los resultados se mostraban contradictorios. Es por esto que empleamos el sistema de expresión recombinante desarrollado en esta Tesis para estudiar en detalle los efectos de la fosforilación. En virtud de que la *AthPEPCKasa1* se fosforila en extractos de plántulas en germinación (Figura 49), en esta sección nos centramos en el estudio de esta isoforma, que es la que mayormente se expresa durante la germinación de las semillas y que sería la principal isoforma funcional.

Para identificar los posibles sitios de fosforilación, empleamos las bases de datos *PhosPhat* y *Plant PTM viewer*, las cuales agrupan información de trabajos de fosfoproteómica [220, 221]. Ambas enzimas serían putativamente fosforiladas en varios residuos en su secuencia primaria. En el caso de la *AthPEPCKasa1*, dicha modificación ocurriría en los sitios Ser-62, Thr-65, Thr-66, Thr-122, Ser-135 y Tyr-

407. En el caso de la *AthPEPCKasa2*, los aminoácidos fosforilados serían Ser-35, Ser-66, Ser-69, Thr-70, Thr-131 y Thr-133. Para determinar el grado de conservación de estos residuos fosforilables, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias con el servidor Clustal ω [223] utilizando homólogos de esta enzima en diferentes plantas (Figura 50). De esta forma, encontramos que los residuos Ser-62, Thr-65, y Thr-66 de la *AthPEPCKasa1*, coincidieron con los sitios fosforilados en la enzima de maíz [234]. Además, estos residuos se ubicaron en un motivo altamente conservado en los dominios N-terminales de las PEPCKasas de plantas. En cambio, los sitios Thr-122 y Ser-135 (*AthPEPCKasa1*) y Thr-131 y Thr-133 (*AthPEPCKasa2*) sólo se identifican en las PEPCKasas de Arabidopsis (Figura 50).

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	105	115	125	135	145
<i>AthPEPCK1</i>	MSA--GNGN----	ATNGD	-GGFSFP--	---KGP---	---VMPK	ITTGAA----	---KRGS G--	---VCH--D	DSGPTVNATT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLINQ	---NA--AAA	FA---AVSE	EE---RQKI	QLQSISASLA
<i>AthPEPCK2</i>	MAG--NGNE----	STG--	-GDFSFS--	---AAAARD	---ALPR	ITTEKGG----	---GKSPGP--	---VQDD	DIAPRVNFQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLRD	---GS-ASGV	SGT---SGPT	TP---VSS	MLQSVSASLA
<i>ZmaPEPCK2</i>	-----	-MATPN--	---GDFSFS--	---GLAR	---GLAR	IETNGAT----	---KPDNG--	---VCH--D	DSSAPVRAQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLIKD	G----AAS	FA---AALS	EE---ERHQ	QLQSISASLA
<i>ZmaPEPCK1</i>	-----	-MATPN--	---GDFSFS--	---GLAR	---GLAR	IETTGGK----	---KQDNG--	---VMY--D	DSSAPVRAQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLIKG	G----AASP	FA---AALS	EE---ERHQ	QMQSISASLA
<i>BnaPEPCK1</i>	MS--AGNG--	-----NANGD	-GGFSFP--	---KG---	---PAMPK	ITTEKGG----	---AKR--G-	---SEICH--D	DSGPTVKATT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLINQ	---SG--AAA	FA---AVSE	E---ERQKI	QLQSISASLA
<i>BnaPEPCK2</i>	MAG--NGN-	E---NAD-	-GDFSFS--	---AAAARD	---ALPR	ITTEKGG----	---AKS---	---ADVCH--D	DTASRVNFQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLKE	---GG--GVV	MGT---SGPT	TP---SSG	MLQSVSASLA
<i>BnaPEPCK3</i>	MAG--NG--	---NTD-	-GDFSFS--	---AAAARD	---ALPR	ITTEKGG----	---AKS---	---SDVCH--D	DTASRVNFQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLKE	---GG--GVV	MGT---SGPT	TP---SSG	MLQSVSASLA
<i>OsaPEPCK1</i>	-----	-MASTPN--	---GDFSFS--	---GLAR	---GLAR	IETHGAKT----	---KKHENG--	---ICH--D	DSSAPVRAQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLIKD	G----ASSP	FA---AALS	EE---ERHQ	QLQSISASLA
<i>StuPEPCK2</i>	MA---S---	---NGAGN-	-GEFSFDN--	---KRRIGLPK	---KRRIGLPK	IQTQK----	---TEDEN--	---VVCH--D	DSATPVKAQT	LDELHSLQKK	KSAPTTPLIKS	P-----HV	FGV---AVS	EE---ERQK	QLQSISASLA
<i>Pt rPEPCK1</i>	MAAN-GN---	---GEMA-	MNGKGA-	A---TARK	PK---GLL	S I-TT-----	---S DKHH--	---DVCH--D	MSATPVKAQT	IDELHSLQKK	KSAPTTPLIKG	F--Q-----	---STFAALS	EE---ERQK	QLQSISASLA
<i>Pt rPEPCK2</i>	MA---S---	---NGAGN-	-GEFSFDN--	---KRRIGLPK	---KRRIGLPK	IQTQK----	---TEDEN--	---VVCH--D	DSATPVKAQT	LDELHSLQKK	KSAPTTPLIKS	P-----HV	FGV---AVS	EE---ERQK	QLQSISASLA
<i>Sb iPEPCK</i>	-----	-MATPN--	---GDFSFS--	---GLAR	---GLAR	IETNG-----	---K KHDNG--	---VCH--D	DSSAPVRAQT	IDELHSLQKK	RSAPTTPLIKD	G----AASP	FA---AALS	E---ERHQ	QLQSISASLA
<i>MmaPEPCK</i>	-----	-MASPN--	---GDFSFS--	---GLAK	---GLAK	IDTQGGK----	---EYD---	---GDTAAPVRAQT	IDELHLLQKK	RSAPTTPLIKD	G----ATSA	FA---AAIS	EE---DRSQ	QLQSISASLT	
<i>GmaPEPCK1</i>	MPT-SDN---	---AG---	-NG-----	---NGSARN	---GLAK	I-T-Q-----	---Q L---	---GD---NE	EGRPTVKAQT	IDELHSLQKK	KSAPSTPKG-	---SL---PT	SA---SVFT	EE---ERNKQ	QLQSISASLA
<i>GmaPEPCK3</i>	M---ASNGN-	---GSV-	ANG-----	---NGSARN	---GLAK	IQTQK-----	---KH---	---DGICH--D	DSGPTVKAQT	IDELHSLQKK	KSAPTTPLVTG	---FQA---PF	-----ATLT	EE---ERHQ	QLQSISASLA
<i>CsaPEPCK1</i>	ME---E---	---GKDN-	-GEFSFV-SD	---GAETGRR	---GLK	IHTEKNA----	---PTTER--	---DICH--D	DSTTPMRART	LDELHSLQKK	RSTPTPLT-	---D---SQGV	F-----S PVS	EAER---	QLISISASLA
<i>CsaPEPCK2</i>	MA---DS-	IT---SN-	-G-----	---FKI	---FKI	NT-----	---SM---KQ	GNVCQ---D	GSSSPKKAQT	IDELHSLQKK	RSTPTPLPG-	---SVS-S-A	F-----SVIT	EE---DRQK	QLQSISASLA
<i>GmaPEPCK2</i>	ME---I---	---TENG	-DGVSLA-	---RNTSNARR	---GLPM	QNNMK----	---PTSEF--	---QVCH--D	QSTPPVRAQT	HELHLSLQKK	KSPTPLSL-	---A---TQGP	F-----ATVS	DE---ERQK	QLQSISASLA
<i>Ta ePEPCK</i>	-----	-MATPN--	---GDFSFS--	---GLAR	---GLAR	IDTTHAEKK-	AAAKHENG--	---ICH--D	DSSAPVRAQT	IDELHMQK	RSAPTTPLIKD	TS---ASP	FA---VAVS	DE---DRK	QLQSISASLA
<i>StuPEPCK1</i>	MG---LS---	---N---	-GVALS-	---GLAK	---GLAK	IETQK-----	---LKE---	---EICH--D	DSAVPVKAQT	LDELHSLQVK	KSAGENTHID	L-----QQTV	FG-----S	EA---DKNQ	QLQSISASLA
<i>OsaPEPCK2</i>	-----	-MMEAKD-	---GDFSFS--	---GLAK	---GLAK	LGNTGYGS--	---RREEDG-	---VCH--D	DSATPVRAQT	TVDELHSLQR	KPQVVE---	-----	-----	---DRHL	QLQSISASLA
<i>UpaPEPCK1</i>	M-----	---ASP-	-GGVT---	---T---	---T---	Y--D-----	---YDD---	-----	SDS AAVPRAQ	TIEELHSLQR	KAAATA---	-----	-----	---KDSAS	PLQSISASLA
<i>UpaPEPCK2</i>	M-----	---ASP-	-GGVT---	---T---	---T---	Y--D-----	---YHD---	-----	SDS AAVPNAQ	TIEELHSLQR	KAATTT---	-----	-----	---KDGAS	PLQSISASLA

	155	165	175	185	195	205	215	225	235	245	255	265	275	285	295
<i>AthPEPCK1</i>	SL---TRESG	PKVVRGDPAE	KKADGS---	---TTPAYAHG-	-----	QHHS-----	IF S--PATGAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	NGALATLSGA	KTGRAPRDKR	VV--RDAT-T	EBELNWWG--K
<i>AthPEPCK2</i>	SL---TRETG	PKLIRGDPTS	A-----	-AKVAHV-	-----	PVTP-----	SL-PAADV-	-SDSSLK-FT	HILNLSPA-	-ELYEQAIK-	FEKG-SFVTS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDDT-T	EAELNWWG--K
<i>ZmaPEPCK2</i>	SLT---RETG	PKVVKGD PAR	RGE-----	PTPQAHH-Q	-----	HHH-----	PA AP---TIAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDEV-A	ARDLNNWG--K
<i>ZmaPEPCK1</i>	SLT---RETG	PKVVKGD PAA	KGE-----	AAAGAP-	STPRAHQ-Q	HRH-----	PA AP---AIAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDEV-T	AQDLNWWG--K
<i>BnaPEPCK1</i>	SL---TRESG	PKVVRGDPAE	KKADGS---	---TTPAYAHG-	-----	QHHS-----	IF S P--DLGAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	NGALATLSGA	KTGRAPRDKR	VV--RDAT-T	EGELNWWG--K
<i>BnaPEPCK2</i>	SL---TRETG	PKLIRGDPTS	AAK-----	-VAHV-	-----	PPTP-----	SV-PAADV-	-SDSSLK-FT	HILNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFVTS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDET-T	ASELNWWG--K
<i>BnaPEPCK3</i>	SL---TRETG	PKVIRGDPTS	AAK-----	-VAHV-	-----	QPTP-----	T SV-PAADV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFVTS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDET-T	ASELNWWG--K
<i>OsaPEPCK1</i>	SLT---RETG	PKVVRGDPAR	KGE---AAA	-KGAPS---	PHQPQVH--	HHHP-----	TP---TIAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	IV--KDEA-S	AQELNWWG--K
<i>StuPEPCK2</i>	SL---TRETG	PKVVKGD PAR	Q---AET	-PK-----	VQ---QPVHH	HPT-PSLINS	---DSSLK-FT	HILNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	S GALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--RDET-T	EDDLNWWG--K	
<i>Pt rPEPCK1</i>	SL---TRETG	PKVVRGDPAS	KSQ---TSP	---RV---	HQQ---HVV	AE-PAISAS	---DSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIH-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRAPRDKR	VV--KDDV-T	GEELNWWG--K	
<i>Pt rPEPCK2</i>	SL---TRETG	PKVVKGD PAR	Q---AET	-PK-----	VQ---QPVHH	HPT-PSLINS	---DSSLK-FT	HILNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	S GALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--RDET-T	EDDLNWWG--K	
<i>Sb iPEPCK</i>	SL---TRETG	PKVVKGD PAR	KGE---AAA	-KGAP---P	T-PQKHH-Q	HHH-----	PA A---PTIAV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	NGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDEA-A	AQELNWWG--K
<i>MmaPEPCK</i>	SL---ARETG	PKLVKGD PSD	PAP-----	-HK-----	---HYQ	P---AAPT IVA	TDSSLK-FTH	VLYNLSPA-	-ELYEQAFG-Q	KKS-SFITS	T GALATLSGAK	TGRSPDKR	V--KDEA-TA	QELNWWG--KG	
<i>GmaPEPCK1</i>	SL---TRESG	PKVVKGD PAA	RKYE---ASR	-VEHV---	---PH-	---QI-----	TP-T-IAV-	-SDSALK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRCPDKR	VV--KDEV-T	ENELNWWG--K
<i>GmaPEPCK3</i>	SL---TRETG	PKLVKGD PAR	-KS---DTQ	---KV---	---TH-	VHH-----	H VST-PTIVV	S--DSLK-F	THVLYNLS PA	-ELYEQAIK-	-YEKG-SFIT	STGALATLSG	AKTGRSPDKR	RVV--KDDL-	TENELNWWG--
<i>CsaPEPCK1</i>	SL---TRETG	PKLVKGDPEK	KKEAHH-A-	-SVLDH-	-----	L-----	HF GE-PILNL-	-SDSALK-ST	HILNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDDT-T	KEELNWWG--K
<i>CsaPEPCK2</i>	SL---TRETG	PKVVKGD PAR	KE-T-STK-	-VAHV---	-----	V H---H-QLG	P--N-IS I-	-SDSSMK-FTH	VLYNLS PG-	-ELYEQAIR-V	EKG-SFLTST	GALATLSGAK	TGRSPDKR	V--KDN-TE	KELNWWG--KG
<i>GmaPEPCK2</i>	SL---TRESG	PKVVKGD PAT	KAEGK-T-	-HVHH-	-----	PQPH---YF	AS-TAFDV-	-SDSALK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	HEKG-SFITA	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--RDDT-T	EHDLNWWG--K
<i>Ta ePEPCK</i>	SL---TRETG	PKVVRGDPAR	KGE---AAA	-KTAPAAAP-	PPPQPHH-H	HHH-----	HV AP---TISV-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPG-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITA	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	IV--KDEA-A	AQELNWWG--K
<i>StuPEPCK1</i>	SL---TRETG	PKVVKGD PAR	Q---AET	-PKVH---	---AS	HQH---QH	HPT-TISN-I	-TDSALK-FT	HILNLSPA-	-ELYEQAIQ-	NEKG-SFITS	S GALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDDT-T	SEELNWWG--K
<i>OsaPEPCK2</i>	SMTCC---IG	PKLVND PAR	KKE---MAG	-KAVT---	---H	HQH---IT	VP---TITV-	-SDSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAIK-	YEKG-SFITS	S GALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDET-T	D-DLNNWG--K
<i>UpaPEPCK1</i>	ST---AREYG	PNLVKGD PEA	-----KGA	-PPAPVK-	-----	HQQA---AA	AA---AIAA-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAFG-	QKKS-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDDT-T	AQELNWWG--K
<i>UpaPEPCK2</i>	SL---AREYG	PNLVKGD PEA	T-----KGA	-PPVPIK-	-----	HQQP---SAA	AA---TIAA-	-SDSSLK-FT	HVLNLSPA-	-ELYEQAFG-	QKKS-SFITS	TGALATLSGA	KTGRSPDKR	VV--KDET-T	SQELNWWG--K

Figura 50. Alineamiento de secuencias de PEPCKas de plantas. Utilizando la herramienta BLASTP del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) se buscaron proteínas homólogas a las *AthPEPCK*as provenientes de diferentes especies vegetales que se alinearon con el algoritmo Clustal ω. La identidad de cada una de las secuencias puede encontrarse el apartado de Material Suplementario. Con un cuadro verde se resaltan los dominios de fosforilación identificados en las *AthPEPCK*as.

Para estudiar el efecto de la fosforilación en las enzimas, se construyeron mutantes fosfomiméticas en los sitios de fosforilación, reemplazando el aminoácido fosforilable por Asp. El agregado de la carga negativa que ocurre al realizar esta mutación imita la carga negativa que ocurre durante la fosforilación [273]. Se continuó con el análisis de los aminoácidos Ser-62, Thr-65 y Thr-66 de la *AthPEPCKasa1*, debido a la alta conservación de estos residuos entre las diferentes PEPCKasas, y a que en las bases de datos era mayor la prominencia de los fosfopéptidos correspondientes a estos sitios.

Las mutantes se construyeron mediante la técnica de *QuikChange* y, una vez que se comprobó la presencia de la mutación en cada una de ellas por secuenciación, se expresaron y purificaron de la misma forma que lo realizado para la enzima salvaje, obteniéndose en alto grado de pureza. En la Tabla 7 se resumen los parámetros cinéticos de las mutantes S62D y T66D que lograron caracterizarse. Como puede observarse ambas mutantes fueron aproximadamente dos veces más activas que la enzima salvaje en el sentido de carboxilación. Por otra parte, la actividad en el sentido de descarboxilación no fue significativamente mayor para la mutante T66D, pero fue tres veces mayor para la mutante S62D. Con respecto a los valores de K_M para las mutantes, al igual que en la enzima salvaje, los mismos estuvieron en el rango milimolar para el PEP y en el micromolar para el OAA, el ATP y el ADP (Tabla 7). Con respecto a la afinidad por el PEP, la mutante T66D posee aproximadamente 2 veces menor afinidad para el mismo. Por el contrario, esta mutante mostró aproximadamente 6 veces mayor afinidad para el OAA y el ATP.

Para evaluar la interacción entre la fosforilación y la regulación alostérica de la *AthPEPCKasa1*, se evaluaron algunos de los efectores alostéricos que actúan sobre la enzima salvaje, para analizar su efecto sobre las mutantes fosfomiméticas. Como puede observarse en la Figura 53, solamente con el PPi las enzimas mutantes respondieron de forma similar a la enzima salvaje. Para el resto de los inhibidores, no se observó un efecto importante, si bien para el caso de la Glc-6P se ve una tendencia a la inhibición.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de las mutantes fosfomiméticas de la *AthPEPCKasa1*. Las reacciones se realizaron en ambos sentidos de reacción de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Las constantes se calcularon ajustando los datos experimentales de la Figuras 51 – 52 a la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores reportados son la media \pm SE de los parámetros del ajuste. Las concentraciones fijas de sustrato fueron las siguientes: ^a, ADP 0,25 mM; ^b, PEP 15 mM; ^c, ATP 0,50 mM; ^d, OAA 0,75 mM.

Enzima	Sentido de reacción	Sustrato	K_M (μ M)	V_{max} (U.mg ⁻¹)
<i>AthPEPCKasa1</i> WT	Carboxilación	PEP ^a	3700 \pm 500	1,76 \pm 0,04
		ADP ^b	79 \pm 1	
	Descarboxilación	OAA ^c	230 \pm 20	3,2 \pm 0,3
		ATP ^d	72 \pm 2	
<i>AthPEPCKasa1</i> S62D	Carboxilación	PEP ^a	4200 \pm 400	5,7 \pm 0,1
		ADP ^b	94 \pm 8	
	Descarboxilación	OAA ^c	260 \pm 30	8,6 \pm 0,1
		ATP ^d	56 \pm 12	
<i>AthPEPCKasa1</i> T66D	Carboxilación	PEP ^a	6100 \pm 500	4,2 \pm 0,2
		ADP ^b	31 \pm 5	
	Descarboxilación	OAA ^c	41 \pm 4	4,1 \pm 0,1
		ATP ^d	67 \pm 6	

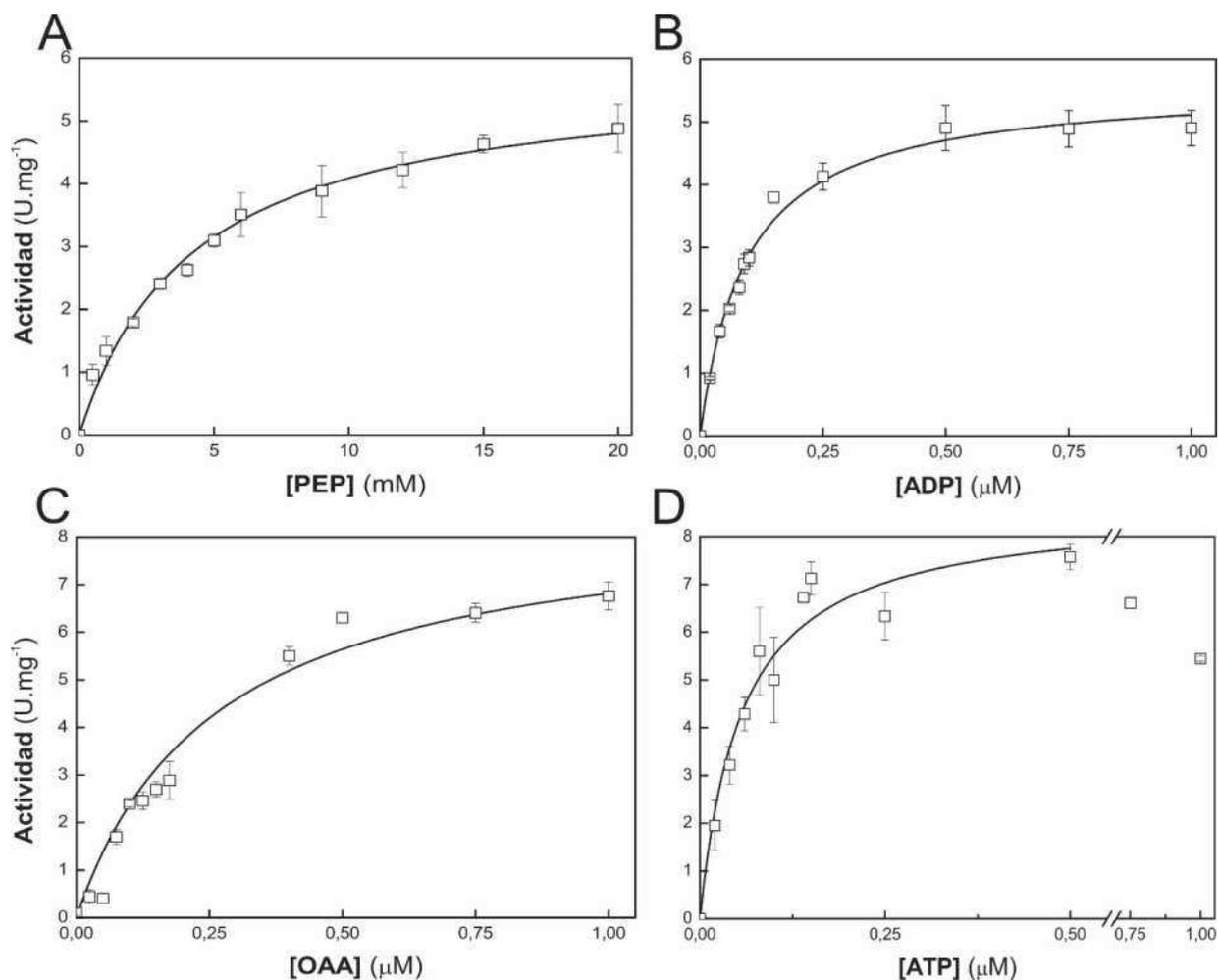


Figura 51. Curvas de saturación de sustrato para la *AthPEPCKasa1 S62D*. Cada curva se realizó empleando la concentración variable de sustrato descrita en la Figura y una concentración fija de sustrato de: A) ADP 0,25 mM, B) PEP 15 mM, C) ATP 0,5 mM, D) OAA 0,75 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro sets de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y los parámetros calculados se muestran en la Tabla 7.

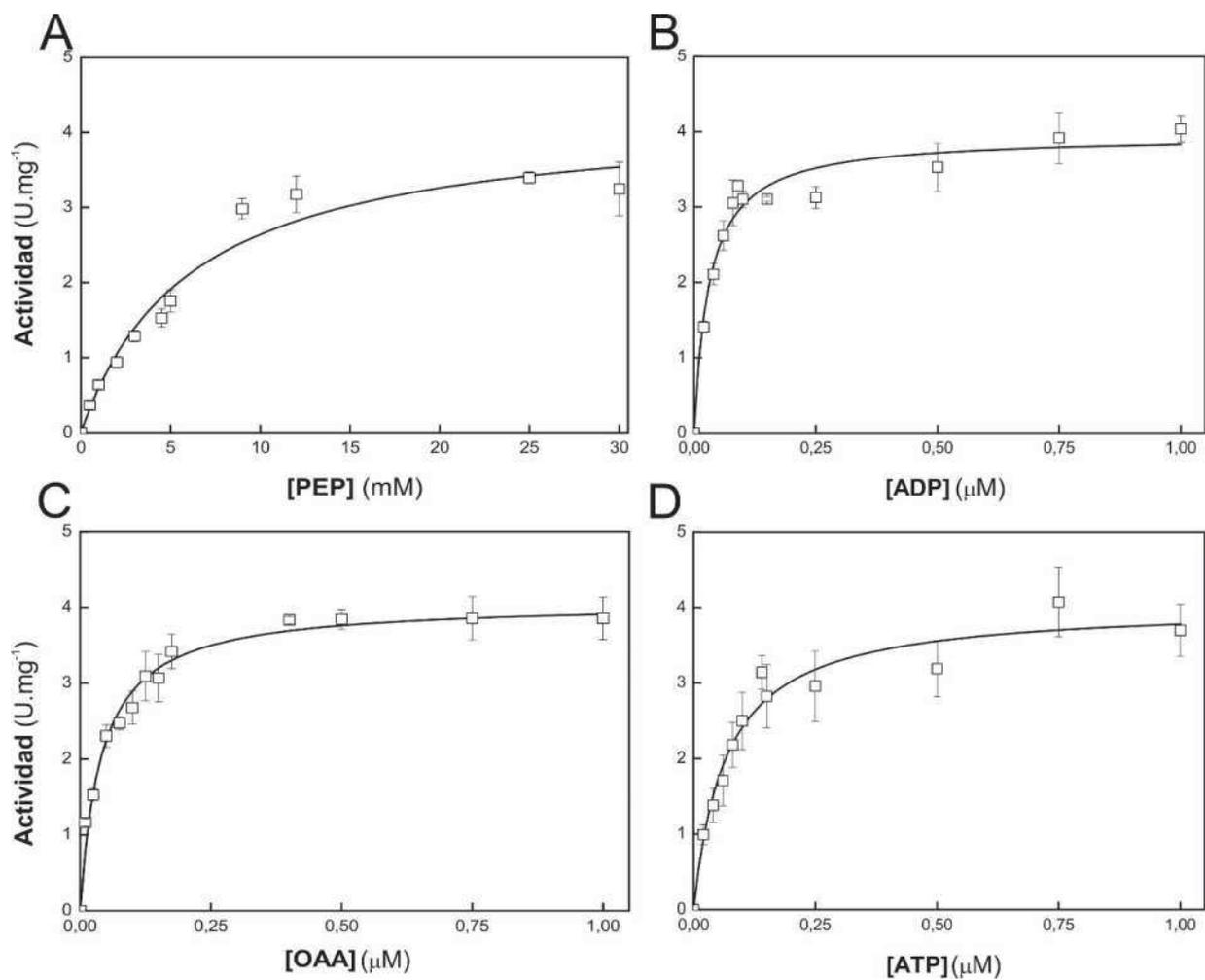


Figura 52. Curvas de saturación de sustrato para la *AthPEPCKasa1 T66D*. Cada curva se realizó empleando la concentración variable de sustrato descrita en la Figura y una concentración fija de sustrato de: A) ADP 0,25 mM, B) PEP 15 mM, C) ATP 0,5 mM, D) OAA 0,75 mM. Cada punto representa la media \pm SE de cuatro sets de datos independientes. Los valores se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y los parámetros calculados se muestran en la Tabla 7.

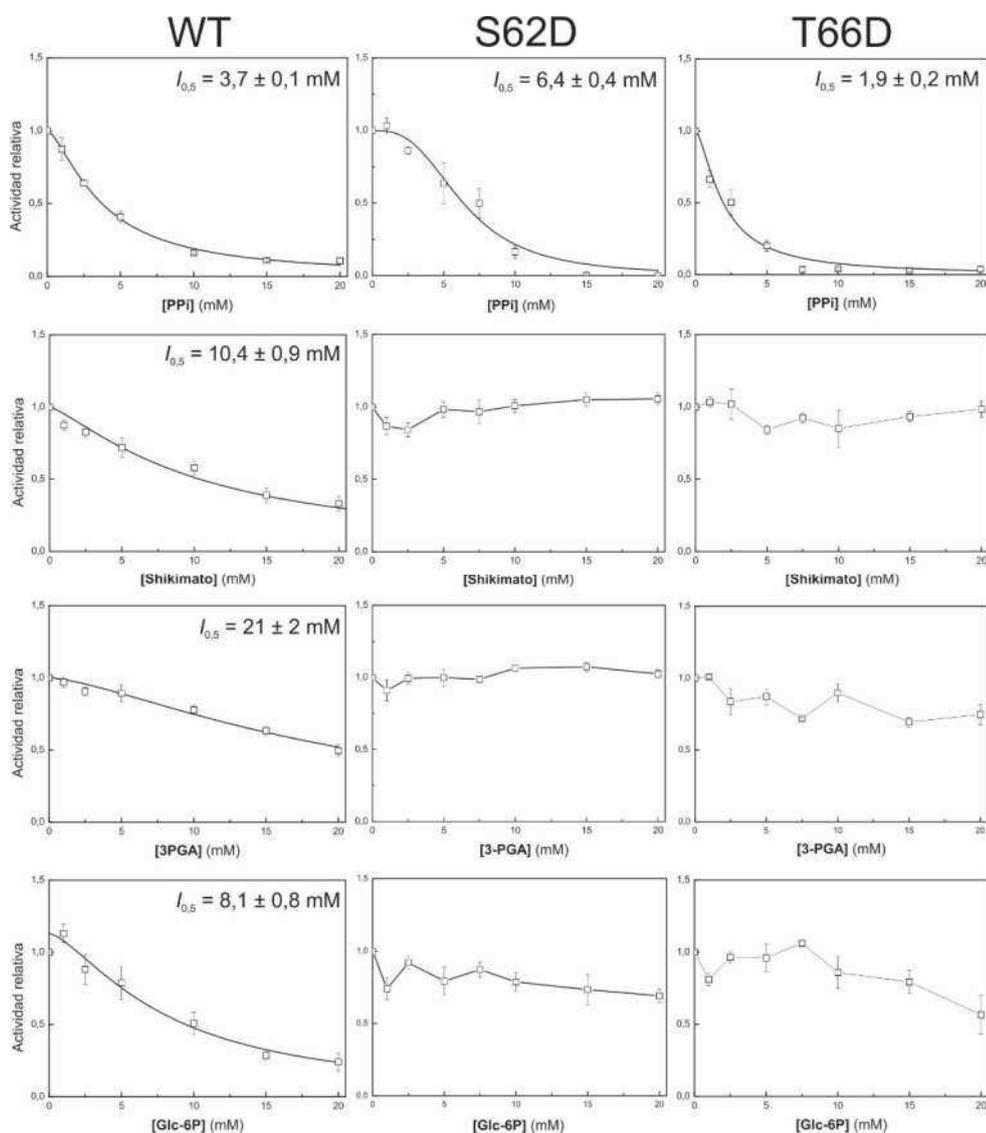


Figura 53. Moduladores alostéricos de las mutantes fosfomiméticas de la *AthPEPCKasa1*. La actividad se midió en presencia de concentraciones crecientes de los metabolitos que se muestran en cada panel. Las medidas se realizaron con la condición estándar de medida, en presencia de ATP 0,75 mM y OAA 0,75 mM. Los datos que se muestran son la media \pm SE de cuatro grupos de datos independientes. Cuando fue posible, los datos se ajustaron a la ecuación de Hill modificada (los parámetros calculados se muestran en cada gráfico).

4.6 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por óxido-reducción.

La regulación de las enzimas por procesos de óxido-reducción resulta crítica para el metabolismo vegetal [66, 274]. Debido a la presencia de diez residuos de Cys en la secuencia primaria de la *AthPEPCKasa1*, analizamos el efecto de agentes oxidantes sobre su actividad. Incubamos a la enzima en presencia de diamida o H_2O_2 y luego medimos la actividad en el sentido de carboxilación. Observamos que el tratamiento con dichos compuestos produjo una disminución de la actividad PEPCKasa del 25% con H_2O_2 y del 60% con diamida (Figura 54).

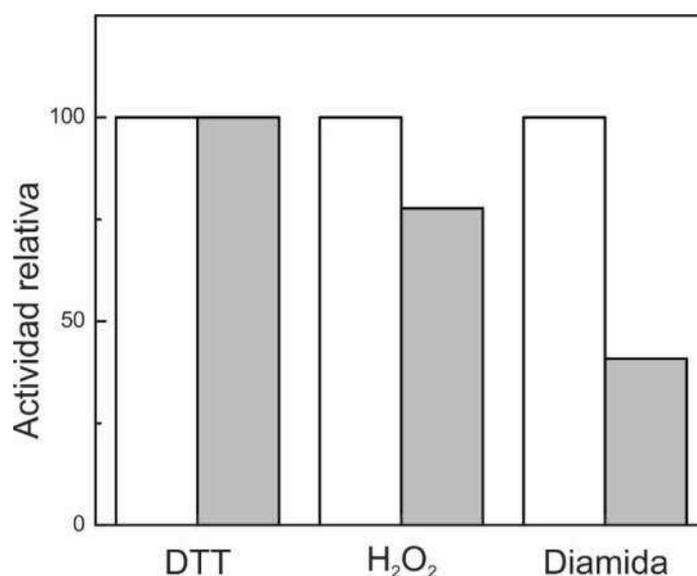


Figura 54. Respuesta de la *AthPEPCKasa1* a los agentes oxidantes y reductores. Se incubó la *AthPEPCKasa1* en condiciones control (barras blancas) o en presencia de los compuestos que se muestran en el eje x (barras grises). En todos los casos, se respetó una relación enzima:agente de 1:100 y se incubó por 20 min a temperatura ambiente. Luego, se midió actividad en el sentido de carboxilación de acuerdo con la condición estándar. Los valores que se muestran corresponden a la media de dos réplicas.

Además, se realizaron curvas a concentraciones crecientes de H_2O_2 y en función del tiempo (Figura 55 A), las cuales permitieron el cálculo de distintas k_{obs} . Luego, estas k_{obs} se graficaron en función de la concentración de H_2O_2 y permitieron el cálculo de la constante de segundo orden (k'' , o potencia del inhibidor [202]) que resultó en $5,87 M^{-1}.s^{-1}$ (Figura 55 B). Además, para explorar como podría ocurrir el mecanismo de oxidación de la enzima, la tratamos con H_2O_2 y luego sembramos los productos de reacción mediante un SDS-PAGE al 7,5% no reductor. De esta manera, determinamos la formación de un aducto de ~ 135 kDa, formado por la unión de dos monómeros mediante un puente disulfuro (Figura 56).

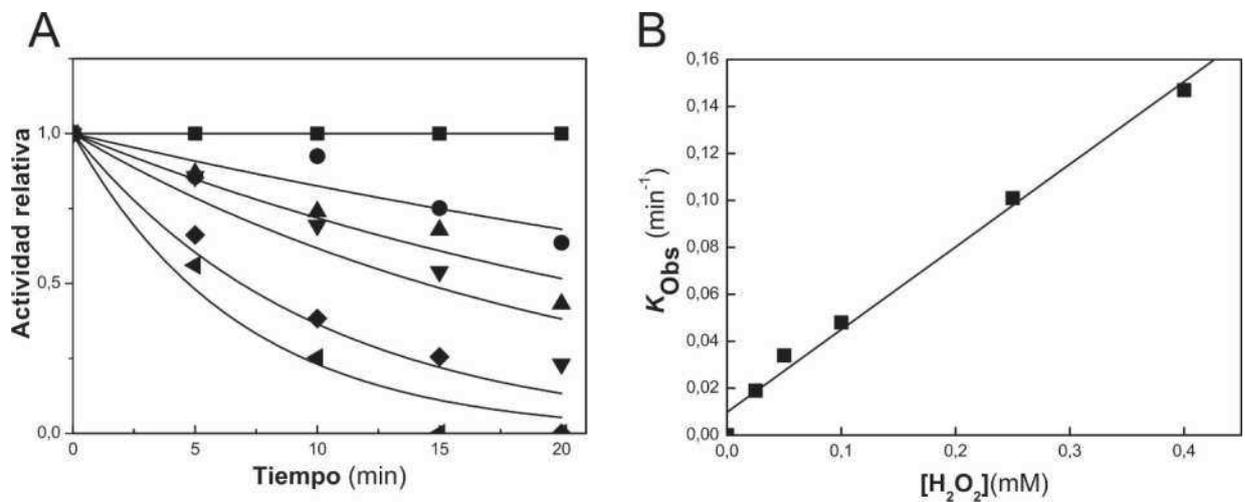


Figura 55. Inactivación de la *AthPEPCKasa1* por H₂O₂. (A) Se analizó la inactivación de la *AthPEPCKasa1* en función de la concentración de H₂O₂ y el tiempo. La enzima se incubó bajo condiciones control (■) o con H₂O₂ 0,025 mM (●), 0,05 mM (▲), 0,1 mM (▼), 0,25 mM (◆), 0,4 mM (◄). La actividad se midió en el sentido de carboxilación. (B) Mediante el ajuste de las curvas del panel A, se calculó la constante de segundo orden (k'') para el H₂O₂ de acuerdo con lo descrito en Materiales y Métodos.

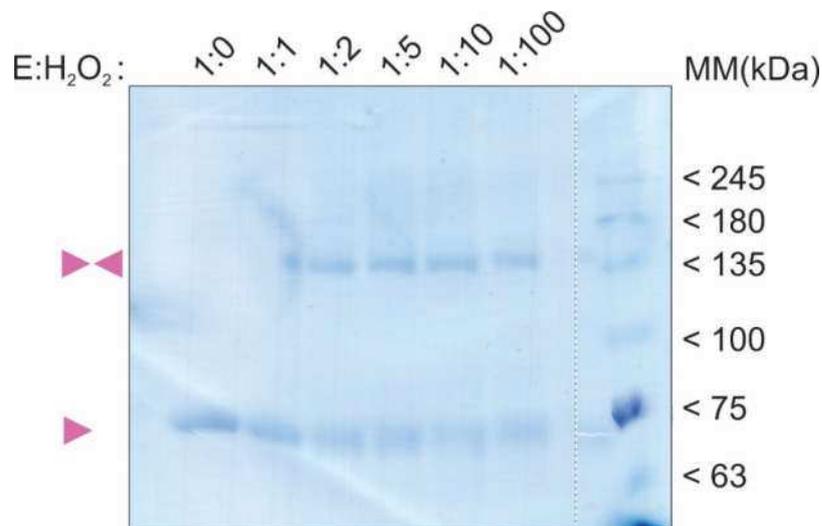


Figura 56. Tratamiento de la *AthPEPCKasa1* con H₂O₂. La enzima (E) se trató con H₂O₂ de acuerdo con las relaciones molares que se muestran en la Figura. En el gel se señala el monómero (▶) y el dímico (▶◄) formado por la *AthPEPCKasa1* al reaccionar con el oxidante. MM: marcador de masa molecular.

4.7 Identificación y caracterización de las ProtKasas involucradas en la fosforilación de las enzimas en estudio.

4.7.1 Caracterización de las ProtKasas *AthSnRK1*.

La familia de las ProtKasas activadas por AMP, que incluye a las AMPK en mamíferos, a las Snfl en levaduras y a las SnRK1 en plantas, son consideradas uno de los principales actores involucrados en el control energético en los eucariotas [275, 276]. Ante situaciones fisiológicas que provocan un déficit energético, estas ProtKasas se activan para inducir un cambio a nivel metabólico, inactivando las vías anabólicas que consumen energía y activando a las vías catabólicas que la generan [277–279]. Tanto las AMPK como las Snfl han sido ampliamente estudiadas. Sin embargo, el conocimiento sobre las SnRK1 es relativamente escaso. Los blancos moleculares identificados para estas ProtKasas son la Ga3PDHasa [198] y np-Ga3PDHasa [280], la 6-fosfofructo-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa [281], la nitrato reductasa [282], la trehalosa-6-fosfato (Tre-6P) sintasa 5 [282], la Suc sintasa [31], la Suc-6-fosfato sintasa [283, 284] y la HMG-CoA reductasa [285]. Entre sus blancos también se han encontrado factores de transcripción como *FUSCA3* [286] y *WRINKLED1* [287], aunque se estima que deben existir muchos más, dado el enorme cambio en la expresión génica que ocurre al mutar los genes codificantes para la subunidad catalítica de estas ProtKasas [288].

Dada la importancia de estas ProtKasas para el control del metabolismo, se hipotetiza que también debe ser compleja su regulación. Estas enzimas son activadas al ser fosforiladas en un residuo de Thr ubicado en un bucle de activación altamente conservado [191]. Al buscar en *Arabidopsis* homólogos a las ProtKasas ubicadas corriente arriba en la cascada de señalización en levaduras (ProtKasas PAK1, TOS3, y ELM1) y en mamíferos (ProtKasas CaMKKs), se identificaron a las ProtKasas GRIK1 y 2 (*geminivirus Rep-interacting kinase 1/2*) como las encargadas de fosforilar y activar a las SnRK1 [289, 290]. Sin embargo, dado que estas solo se expresan en tejidos en proliferación activa o infectados por geminivirus, se propuso que deben existir otras ProtKasas encargadas de catalizar este proceso, debido a que la actividad de las SnRK1 está presente en otros tejidos [291].

Otro nivel de regulación de estas ProtKasas es por mecanismos alostéricos, lo cual es motivo de controversia en la literatura. En una SnRK1 purificada a partir de hojas de espinaca se encontró que el AMP no funciona como activador (a diferencia de lo que ocurre con las AMPK), sino que protege a la ProtKasa de la desfosforilación [292]. Para la misma ProtKasa purificada de hojas de espinaca, otro trabajo determinó que el principal inhibidor de su actividad es la Glc-6P [293]. Por otra parte, un trabajo realizado en extractos crudos de hojas de *Arabidopsis*, identificó a la Tre-6P como el principal metabolito inhibidor [294]. En este último estudio, los autores propusieron que la inhibición se daba a través de un factor proteico desconocido que estaba presente sólo en hojas jóvenes, puesto que cuando se realizaba una cromatografía de intercambio iónico para purificar a la enzima, o bien en extractos crudos de hojas maduras, esta inhibición no se

observaba. El k_i determinado para Tre-6P en extractos crudos fue de 5 μM [294] y se encontraba en el rango estimado para la concentración de este metabolito en rosetas de *Arabidopsis* [295]. Inicialmente hubo controversia respecto a esta regulación, dado que la Tre-6P comercializada por Sigma-Aldrich previo al año 2011 poseía una pureza del 60-70% y más de 40 contaminantes diferentes [296–298]. Sin embargo, recientemente [299] se demostró que la inhibición por la Tre-6P ocurre porque este metabolito reduce la interacción de las ProtKasas GRIK1 y 2 con las SnRK1 y, por lo tanto, se evita la activación de las últimas. En el mismo contexto, en nuestro grupo de trabajo se identificó a la Rib-5P como el principal inhibidor de las SnRK1 en endosperma de trigo [280].

Para estudiar en mayor profundidad a estas ProtKasas decidimos clonaras, para producirlas de forma recombinante por expresión heteróloga de los genes en *E. coli*. Se optó por esta estrategia para independizarnos de trabajar con ProtKasas purificadas de fuente, las cuales podrían tener una composición heterogénea de subunidades o una serie de modificaciones postraduccionales que complicarían las caracterizaciones bioquímicas y el consiguiente análisis. Para esto, clonamos todos los genes codificantes para todos los componentes de estas ProtKasas a partir de ADN copia de *Arabidopsis*. Estas ProtKasas tienen una estructura heterotrimérica formada por una subunidad catalítica α y dos subunidades regulatorias β y γ [279]. En *Arabidopsis*, existen dos subunidades α (α_1 y α_2), tres β (β_1 , β_2 y β_3) y dos γ (γ y $\beta\gamma$). Las subunidades catalíticas están codificadas por los genes *AKIN10* y *AKIN11* para las subunidades α_1 y α_2 , respectivamente. Dado que para ser activas estas subunidades necesitan ser fosforiladas en un residuo de Thr (198 para *AKIN10* y 176 para *AKIN11*) ubicado en un bucle de activación altamente conservado, se construyeron mutantes fosfomiméticas en las que este aminoácido se mutó a Asp y, de esta forma, obtener a las ProtKasas activas de forma constitutiva.

Al intentar producir los distintos polipéptidos recombinantes que componen a estas ProtKasas, se presentaron problemas de solubilidad, una característica que previamente se ha observado para la obtención de otras proteínas de *Arabidopsis* en *E. coli* [300]. Por esto, nos concentramos en la generación recombinante de las subunidades α catalíticas y, luego de probar varias condiciones experimentales, logramos obtenerlas de forma soluble empleando *E. coli* SHuffle. Al purificarlas por IMAC-Ni²⁺, se lograron obtener estas subunidades, aunque con un bajo nivel de pureza (Figura 57).

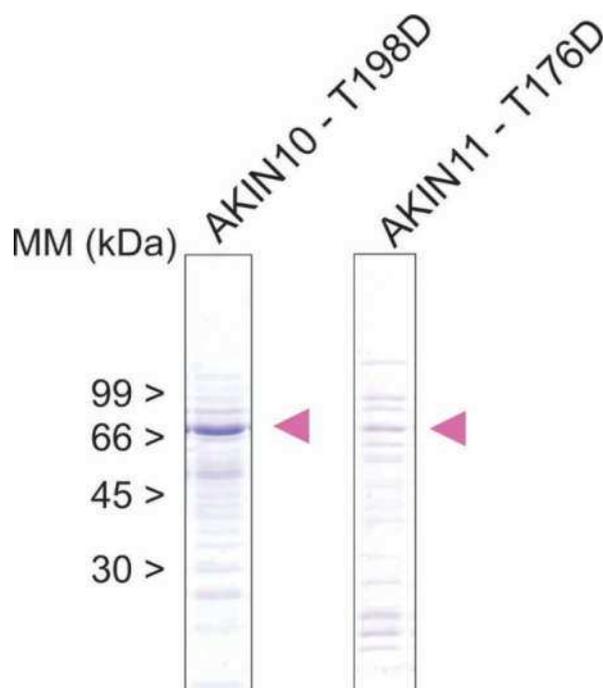


Figura 57. Purificación de las ProtKasas *AthAKIN10-T198D* y *AthAKIN11-T176D*. En las imágenes se muestran las preparaciones de las AKIN10-T198D y AKIN11-T176D empleadas en los ensayos posteriores. Las muestras se resolvieron en un SDS-PAGE al 12%. MM: marcador de masa molecular. La flecha señala la banda proteica correspondiente a las ProtKasas en estudio.

Para comprobar la identidad de las proteínas purificadas, se midió actividad empleando [$^{32}\gamma$]-ATP y el péptido AMARA (AMARAASAAALARRR), un sustrato específico para estas ProtKasas [283]. Los parámetros cinéticos obtenidos para ambas ProtKasas se muestran en la Tabla 8. Como puede observarse, se determinó una mayor V_{max} y un menor K_M para el ATP para *AthAKIN10-T198D*. En el caso del péptido AMARA, no se llegó a saturación a concentraciones menores a 1000 μM , por lo que en todos los ensayos posteriores se empleó una concentración de 90 μM del péptido AMARA, en concordancia con lo realizado por otros autores [191]. Dado que las ProtKasas homólogas en mamíferos y levaduras son reguladas alostéricamente [276, 277, 279, 291, 301], se midió actividad en presencia de diferentes metabolitos para evaluar si ejercían algún efecto en la actividad de las enzimas de Arabidopsis. Se observó una reducción en la actividad con Glc-1P, Glc-6P, Fru-6P y 3-PGA. La mayor inhibición se dio con los inhibidores competitivos AMP y ADP (Figura 58). En general, la inhibición de *AthAKIN11-T176D* fue mayor que la de *AthAKIN10-T198D*.

Tabla 8. Parámetros cinéticos de las ProtKasas SnRK1. Las reacciones se realizaron con la reacción estándar descrita en Materiales y Métodos y las constantes se calcularon empleando la ecuación de Hill. Los valores reportados corresponden a la media \pm SE de los parámetros del ajuste.

ProtKasa	ATP K_M (μM)	V_{max} ($\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$)
<i>AthAKIN10-T198D</i>	62 ± 5	$2,7 \pm 0,2$
<i>AthAKIN11-T176D</i>	372 ± 83	$0,6 \pm 0,1$

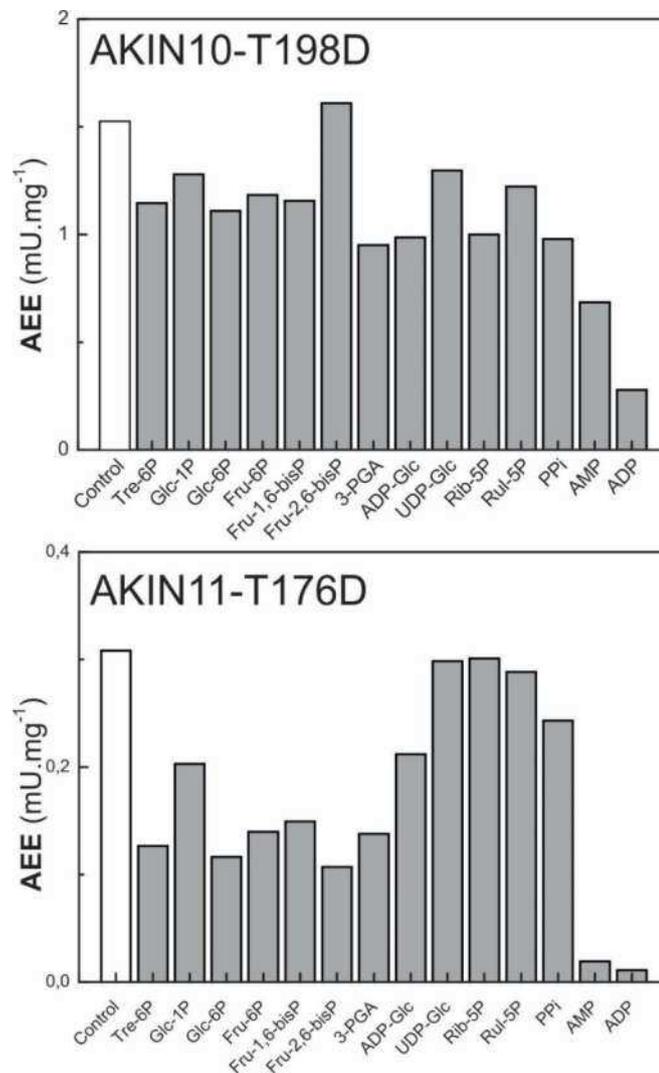


Figura 58. Ensayo de diferentes metabolitos como efectores alostéricos de las *AthSnRK1*. La actividad se midió de acuerdo con la condición estándar descrita en la sección de Materiales y Métodos en condición control (barras blancas) o bien suplementada con 1 mM de los efectores que se presentan en la Figura, a excepción de la Fru-2,6-bisP que se ensayó en una concentración de 2 μ M (barras grises). Los valores que se muestran corresponden a la media de dos réplicas.

4.7.2 Caracterización de la ProtKasa *MdoSOS2*.

La cascada de señalización SOS (acrónimo derivado de *Salt Overly Sensitive*) fue descubierta al realizar una búsqueda de mutantes de *Arabidopsis* para encontrar aquellas que mostraban hipersensibilidad al NaCl en sus raíces [302]. Este trabajo llevó a la identificación de los genes *SOS1*, *SOS2* y *SOS3*, los

componentes principales del mecanismo de extrusión del Na^+ en el citosol celular en *Arabidopsis*. Luego de la percepción del estrés salino por la raíz, se generan pulsos de Ca^{2+} en la célula que activan a la cascada de señalización SOS para protegerlas del daño provocado por una excesiva acumulación de iones. *SOS3* codifica para una proteína de unión a Ca^{2+} , que funciona como sensor en las raíces. De forma alternativa, la proteína S CaBP8 (*SOS3-like Calcium Binding Protein 8*) sería el sensor funcional en la parte aérea de la planta. Luego de unir al Ca^{2+} , *SOS3* interacciona con y activa a *SOS2*, la cual es una ProtKasa perteneciente a la familia SnRK3. Dado que *SOS3* se encuentra miristoilada, además de activar a *SOS2*, también lo recluta a la membrana plasmática, donde puede activar por fosforilación a *SOS1*, un transportador de Na^+/H^+ que elimina el exceso de Na^+ del citosol celular [303]. La mutación de alguno de estos genes genera hipersensibilidad al NaCl , siendo la mutante *sos1* la que presenta el fenotipo más severo [304].

Las vías de activación de la ProtKasa *SOS2* son múltiples y aún no está del todo claro cuál es la contribución de cada uno de los mecanismos a la vía señalización general. Por un lado, se encuentra la activación dada por *SOS3* unida al Ca^{2+} , en ausencia de estos la fosforilación de sustratos peptídicos por *SOS2* es mínima [305]. Además, al igual que el resto de las ProtKasas de la familia SnRK, esta enzima posee un bucle de activación altamente conservado que puede ser fosforilado por otras ProtKasas. Al mutar en la enzima de *Arabidopsis* una Thr altamente conservada ubicada en este bucle de activación (Thr-168) a Asp, se genera una ProtKasa activa de forma constitutiva, cuya actividad es independiente de *SOS3* y del Ca^{2+} [306]. Además, esta ProKasa es capaz de autofosforilarse en varios sitios, siendo la Ser-228 el más importante. Si bien la autofosforilación no es clave en la activación de la ProtKasa, sí posee un rol en la señalización ante el estrés salino, puesto que al mutar este residuo a Ala para evitar la autofosforilación y expresar el gen resultante en la mutante *sos2*, el fenotipo no puede recuperarse completamente [307]. Por último, las proteínas del tipo 14-3-3 inhiben la actividad de transfosforilación pero no la autofosforilación en *SOS2*. Ante la situación de estrés salino, la interacción de *SOS2* con la 14-3-3 disminuye, liberando la primera para que cumpla con su función en la cascada de señalización [308].

Resultados preliminares de nuestro grupo de trabajo demostraron que la *PpeAld6PRasa* era fosforilada *in vitro* por extractos crudos y preparaciones de ProtKasas parcialmente purificadas de hojas de duraznero bajo condiciones de reacción específicas para las *SOS2* y las CDPK [177]. Por esto, nos propusimos estudiar a esta ProtKasa en plantas de la familia de las rosáceas. Si bien nuestro modelo de estudio era el duraznero, al momento en el cual se encararon estos experimentos no se encontraba disponible su genoma, por lo que se eligió estudiar a la *SOS2* de manzano (*MdoSOS2*).

Se realizó la síntesis *de novo* del gen putativo para la *MdoSOS2*, optimizando sus codones para expresarlo de forma recombinante en *E. coli* y con la Thr-168 mutada a Asp, de forma de obtener una ProtKasa constitutivamente activa. Esta ProtKasa se produjo de forma recombinante por expresión heteróloga del gen en *E. coli* y se la purificó por IMAC- Ni^{2+} (Figura 59). Para comprobar su actividad de

ProtKasa, se realizaron medidas de actividad empleando las mismas condiciones reportadas para la enzima de Arabidopsis, a excepción de que como sustrato se utilizó el péptido AMARA (secuencia: AMARAASAAALARRR) en lugar del p3 (secuencia: ALARAASAAALARRR). De esta forma, pudimos confirmar la actividad ProtKasa de este gen, siendo la primera vez que se caracteriza una ProtKasa de este tipo en plantas de la familia de las rosáceas y la segunda luego de la enzima de Arabidopsis.

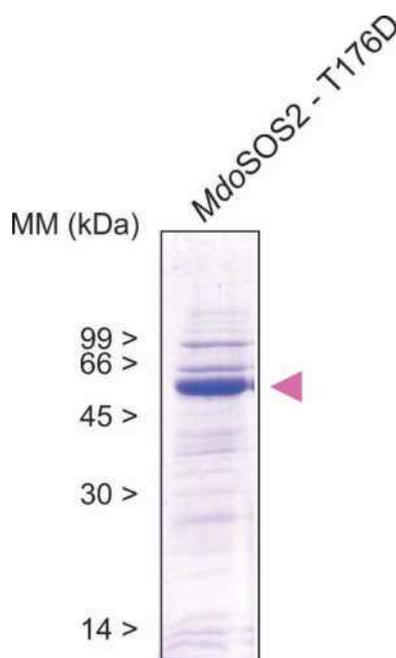


Figura 59. Purificación de la ProtKasa *MdoSOS2*. En la imagen se muestra la preparación de la ProtKasa *MdoSOS2*-T168D empleada en los ensayos posteriores. La muestra se resolvió en un SDS-PAGE al 12%. MM: marcador de masa molecular. La flecha señala la banda proteica correspondiente a las ProtKasa en estudio.

En los experimentos en los cuales analizamos la linealidad de la medida de actividad en función del tiempo, notamos que esta ProtKasa se autofosforilaba, provocando desviaciones en la linealidad (Figura 60 A). Cabe aclarar que la autofosforilación de la ProtKasa luego de la activación ha sido descrita para la enzima de Arabidopsis, aunque la función de esta modificación no está del todo clara [192, 307]. La actividad de autofosforilación fue de $0,35 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ y tardó aproximadamente 15 min en completarse bajo las condiciones ensayadas. Por esto, para realizar la caracterización cinética primero se incubaron las reacciones por 15 min en el medio reacción y luego se iniciaron por el agregado del sustrato peptídico (Figura 60 B). De esta forma, pudimos determinar una actividad de transfosforilación de $8,2 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ y un K_M para el ATP de $5,5 \pm 0,5 \mu\text{M}$. Con respecto al péptido AMARA, no se logró saturación a concentraciones

de hasta 1000 μM . Además, analizamos diferentes metabolitos como posibles efectores, observándose una reducción en su actividad solamente con ADP-Glc, ADP y AMP (Figura 61).

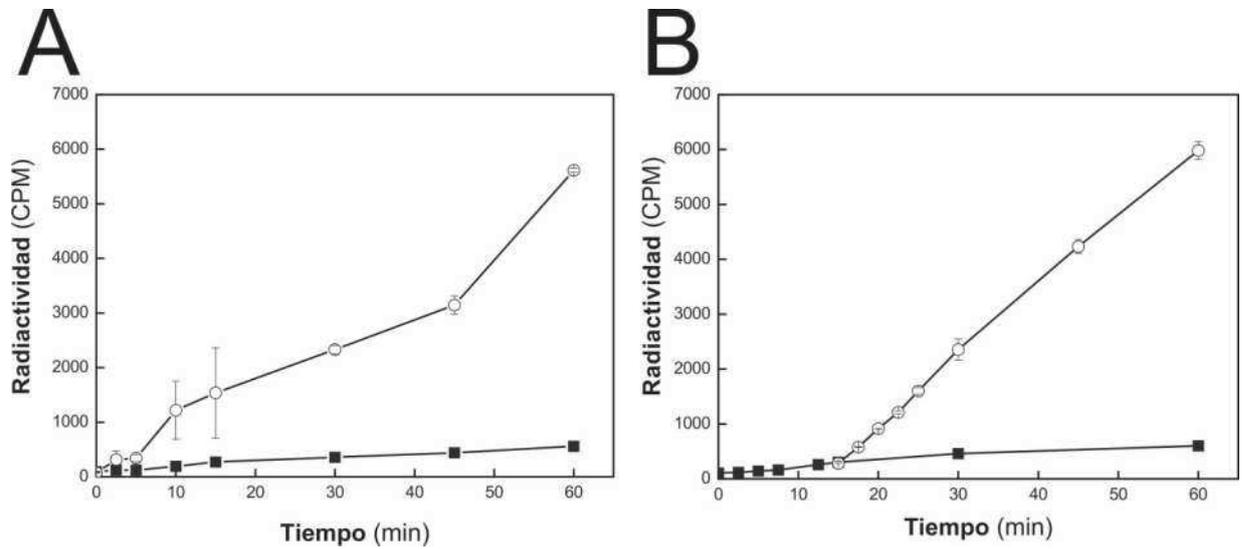


Figura 60. Puesta a punto del ensayo de actividad para la ProtKasa MdoSOS2. Las reacciones se realizaron de acuerdo con la condición estándar descrita en la sección de Materiales y Métodos, ya sea en ausencia (cuadrados grises) o en presencia del péptido AMARA 100 μM (círculos blancos). En el panel (A) ambas reacciones se realizaron en paralelo, mientras que en el panel (B), antes del agregado del péptido AMARA se incubó a la ProtKasa por 15 min en el medio de reacción de forma de completar la autofosforilación.

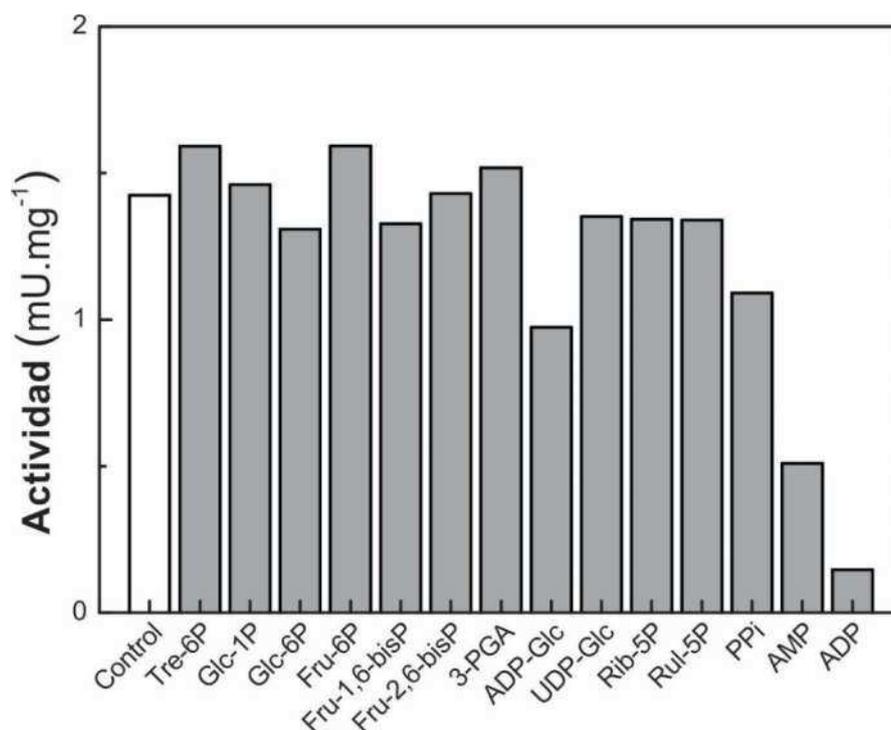


Figura 61. Efectores alostéricos de la ProtKasa MdoSOS2. La actividad se midió de acuerdo con la condición estándar descrita en Materiales y Métodos en condición control (barra blanca) o en presencia de 1 mM de los metabolitos que se indican en la Figura, a excepción de la Fru-2,6-bisP que se ensayó en una concentración de 2 μ M (barras grises). Los valores que se muestran corresponden a la media de dos replicas.

4.7.3 Análisis de la fosforilación de la *PpeAldPRasa* y la *TaeADP-Glc PPasa*.

Retomando lo expuesto en la Introducción, los azúcares alcoholes son los fotosintatos primarios en las plantas de la familia de las rosáceas. La modulación del metabolismo del Gol ocurre a nivel transcripcional y por mecanismos postraduccionales, tanto por regulación alostérica como por óxido-reducción [177]. Además, mediante el análisis de bases de datos de fosfoproteómica encontramos que los homólogos a la *PpeAldPRasa* en Arabidopsis (At2g21250 y At2g21260) se encuentran fosforilados en la Thr-256 [220]. Esto nos llevó a investigar la ocurrencia de la fosforilación de la *PpeAld6Prasa*, con el objetivo de profundizar el estudio de la regulación del metabolismo del Gol. Además, en experimentos previos encontramos que la *PpeAld6PRasa* era fosforilada *in vitro* por extractos de hojas de duraznero, como así también por preparaciones de ProtKasas parcialmente purificadas a partir de hojas empleando condiciones de reacción características de las ProtKasas SOS2 y CDPK [177].

Para comprobar los resultados anteriores, empleamos a las ProtKasas recombinantes para fosforilar *in vitro* a la *PpeAld6PRasa*. Realizamos las reacciones con una concentración fija (0,4 mU) de las ProtKasas

AthAKIN10-T198D (familia SnRK1), *MdoSOS2* (familia SnRK3) y *StuCDPK1* (familia CDPK). La *PpeAld6PRasa* fue escasamente fosforilada por *AthAKIN10-T198D* (Figura 62 A). Por el contrario, fue altamente fosforilada por la *MdoSOS2* y en menor medida por la *StuCDPK1* (Figura 62 A). La incubación de la *PpeAld6PRasa* con *MdoSOS2* y *StuCDPK1* generó una cantidad de enzima fosforilada que representa una acumulación de los eventos individuales (Figura 62 B).

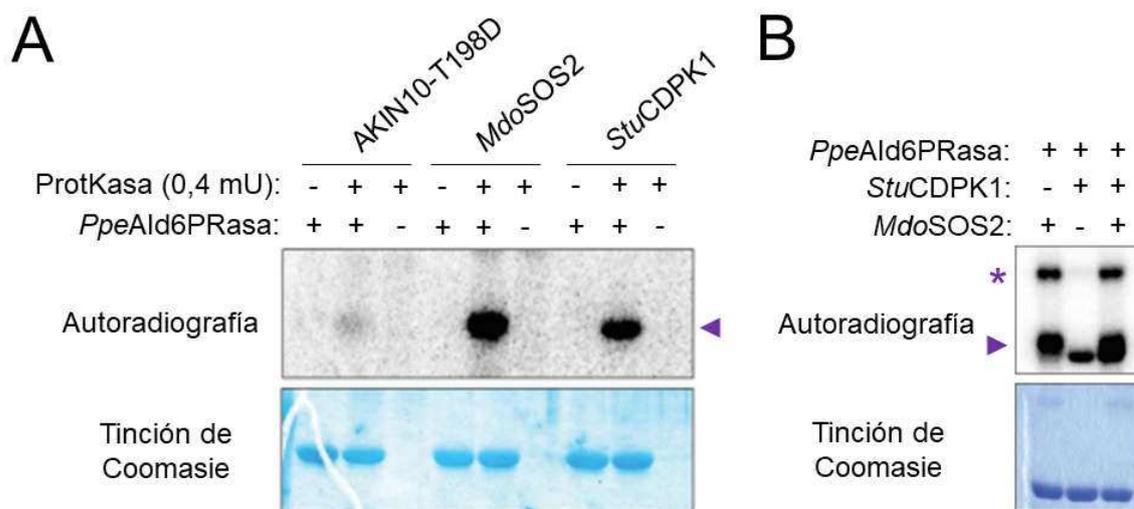


Figura 62. Fosforilación *in vitro* de la *PpeAld6PRasa*. (A) La *PpeAld6PRasa* fue fosforilada *in vitro* empleando [³²P]γ-ATP y las ProtKasas que se muestran en la Figura utilizando condiciones de reacción específicas para cada una (las cuales se detallan en Materiales y Métodos). El gel fue revelado para detectar la radiactividad incorporada (panel superior) y, una vez decaída la radiactividad, se lo escaneó para controlar la carga (panel inferior). (B) Se repitió el mismo experimento que en el panel (A) pero empleando una combinación de las ProtKasas *StuCDPK1* y *MdoSOS2*. La flecha (►) señala a la *PpeAld6PRasa* fosforilada y el asterisco (*) a la *MdoSOS2* autofosforilada.

La ADP-GlcPPasa de plantas tiene una estructura heterotetramérica del tipo S₂L₂ (constituida por subunidad *Small* and *Large*) y es la enzima limitante en la vía de síntesis del almidón [23, 37, 44]. En nuestro laboratorio se realizaron estudios detallados sobre la regulación de la ADP-GlcPPasa de *Triticum aestivum* (*TaeADP-GlcPPasa*) [309]. Distintos aportes experimentales insinuaban que la vía de síntesis de almidón se regulaba por la acción combinada de diferentes modificaciones postraduccionales como modificaciones redox, fosforilación y formación de complejos proteicos [44]. Es por esto que se realizaron ensayos para analizar la fosforilación de esta enzima con las ProtKasas recombinantes antes descritas y se

observó que tanto la *Stu*CDPK1 como la *Mdo*SOS2 también podían fosforilar la subunidad L de la *Tae*ADP-GlcPPasa [44, 309]. Cabe aclarar que esta subunidad L ejerce una función principalmente regulatoria de la actividad catalítica de la subunidad S [310], por lo cual la modificación por fosforilación refuerza este rol diferencial.

4.7.4 Desarrollo de un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa.

La fosforilación de proteínas es una de las modificaciones postraduccionales más estudiadas dado que regula prácticamente todos los aspectos de la función celular [311, 312]. En los eucariotas, las ProtKasas (EC 2.7.11.-) transfieren un grupo fosfato desde la posición γ del ATP a los grupos hidroxilos de Ser, Thr y Tyr en los sustratos proteicos [313]. Las ProtKasas son intensamente estudiadas en los experimentos de descubrimiento de fármacos, debido a que la fosforilación anormal de proteínas ha sido relacionada con numerosas enfermedades [314]. La principal dificultad al ensayar una ProtKasa radica en su relativamente baja actividad (10^{-2} - 10^{-5} s⁻¹) [315]. Se han desarrollado numerosos métodos de medida de actividad ProtKasa (los cuales se basan en el empleo de sustratos específicos), pero solamente aquellos que se basan en la cuantificación del ADP pueden ser aplicados a todas las combinaciones de ProtKasas con diferentes sustratos [316]. Por esto, en este objetivo de Tesis nos propusimos adaptar un método fluorométrico para medir esta actividad enzimática. Este método, el cual es explicado en detalle en la sección de Materiales y Métodos, se basa en dos propiedades de los dinucleótidos de nicotinamida y adenina: *i*) la estabilidad diferencial del NAD(P)⁺ y del NAD(P)H a diferentes valores de pH, y *ii*) la formación de derivados fluorescentes al tratar al NAD(P)⁺ con álcali fuerte [317–319].

Dado que el método radiactivo detecta la formación de fosfopéptido en el rango nanomolar, optimizamos las condiciones para cuantificar el ADP por el método fluorométrico en tal escala. Las curvas de calibrado se realizaron en un volumen final de 20 μ l con cantidades crecientes de ADP (0-0,5 mM; 0-10 nmol). Las curvas eran lineales con una pendiente de 420 ± 7 RFU.mM⁻¹ (R^2 ajustado = 1,00, $P < 0,001$; Figura 63). Obtuvimos resultados idénticos cuando las curvas de calibrado se realizaron con NAD⁺, lo que corresponde a una completa conversión del ADP en NAD⁺ con el sistema PyrKasa/LDHasa. Bajo las condiciones de nuestros ensayos, los límites de detección y cuantificación para el ADP fueron 0,05 y 0,15 nmol, respectivamente (Figura 63). La buena reproducibilidad se demostró por el coeficiente de variación en la curva de calibrado (promedio <5%) y en las medidas enzimáticas de la *Stu*CDPK1 (promedio < 15%). También obtuvimos una buena relación señal/ruido y un factor Z >0,5 a concentraciones de ADP mayores a 15 μ M, por lo que nuestro ensayo tiene potencial para ser empleado en muestreos de alta eficiencia.

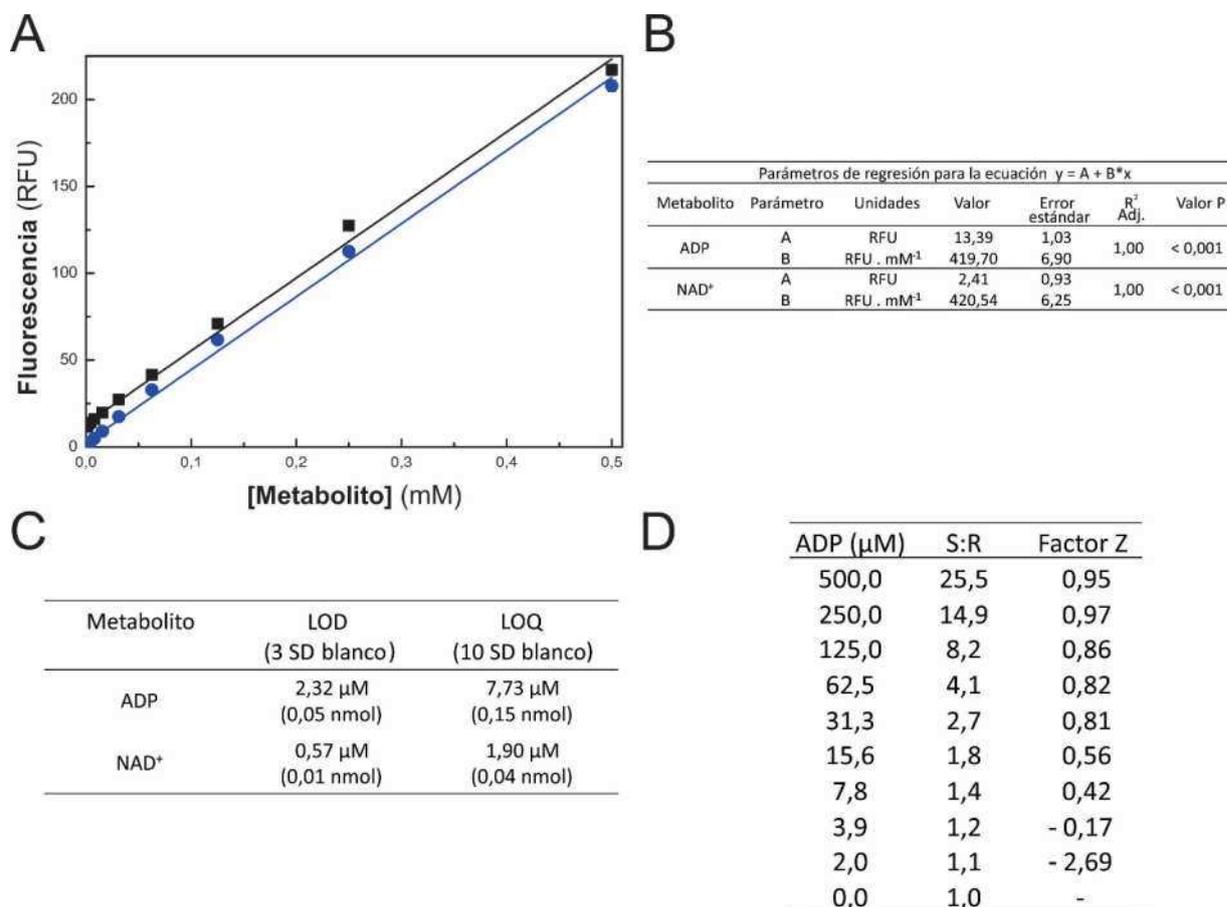


Figura 63. Optimización del método de medida del método fluorométrico. A) Curva de calibrado para el ADP (cuadrados negros) y NAD⁺ (círculos azules) obtenidos luego del tratamiento alcalino de las muestras. Cada punto representa la media ± SE de tres experimentos. Las barras de error son menores que el tamaño de los símbolos. B) Parámetros de regresión obtenidos para los gráficos del panel A. C) Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) calculado para cada metabolito en las condiciones empleadas en nuestros ensayos. Los cálculos se realizaron usando las ecuaciones descriptas en la sección de Materiales y Métodos. D) Factor Z y relación señal a ruido (S:R) obtenidos para los ensayos bajo las condiciones empleadas en este Trabajo. Los cálculos se realizaron con los valores obtenidos en tres experimentos y con las ecuaciones descriptas en la sección de Materiales y Métodos.

Para validar este método, empleamos a la *StuCDPK1*, una ProtKasa que ya había sido caracterizada previamente por Santin y col. [320]. Luego, realizamos la caracterización cinética por tres métodos diferentes: *i*) el método radiactivo, que es considerado el patrón oro para medir actividad ProtKasa; *ii*) un método luminiscente desarrollado por PROMEGA; y *iii*) el método fluorométrico adaptado por nosotros. Los parámetros cinéticos obtenidos para la *StuCDPK1* determinados por el método fluorométrico fueron similares a los obtenidos en paralelo con el método radiactivo y el reactivo ADP-Glo (Tabla 9 y Figura 64); sin embargo, los mismos fueron levemente diferentes a los reportados por Grandellis y col. [321]. También obtuvimos resultados idénticos con el método fluorométrico y el radiactivo cuando la *StuCDPK1* se ensayó con la proteína básica de mielina como sustrato ($1,5 \pm 0,3$ y $1,6 \pm 0,3$ mU.mg⁻¹, respectivamente).

Tabla 9. Parámetros cinéticos de la *StuCDPK1* determinados por tres métodos diferentes. Los parámetros cinéticos se calcularon ajustando los datos de actividad de las curvas de la Figura 60 a la ecuación de Hill descrita en la sección de Materiales y Métodos.

Parámetro	Radioactivo	ADP-Glo	Fluorométrico
V_{\max} (U.mg ⁻¹)	$1,21 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,1$	$1,23 \pm 0,06$
ATP $S_{0,5}$ (μM)	63 ± 6	54 ± 17	78 ± 11
n_H	$1,5 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$
R ² ajustado	0,99	0,98	0,99

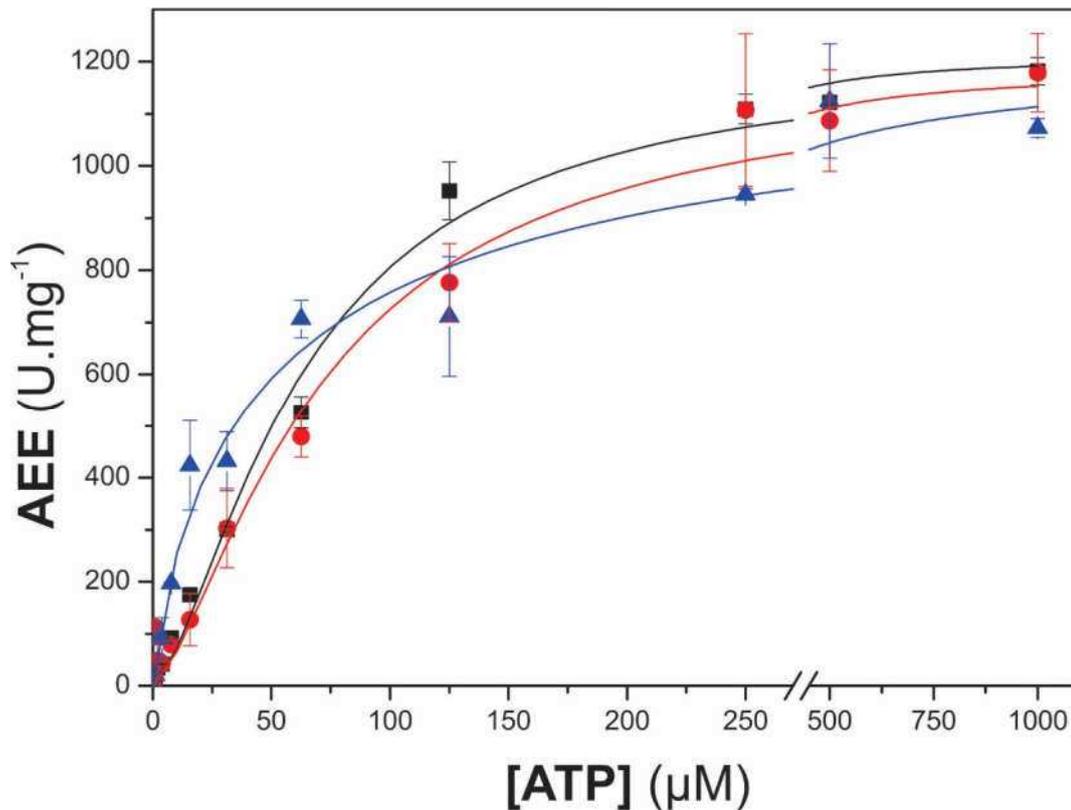


Figura 64. Curvas de ATP para la *StuCDPK1*. Las curvas se realizaron con el método radiactivo (cuadrados negros), el reactivo ADP-Glo (círculos rojos) y el método fluorométrico (triángulos azules). Cada punto representa la media \pm SE de al menos dos experimentos.

Al comparar las mediciones entre los diferentes métodos, observamos una correlación lineal (en el rango analizado de formación del producto, 0-1 nmol) entre el método fluorométrico y el radiactivo (Pendiente = $1,04 \pm 0,03$, $R^2 = 0,99$, $P < 0,001$; Figura 65 A). Resultados similares se obtuvieron entre el método fluorométrico y el reactivo ADP-Glo (Pendiente = $0,98 \pm 0,07$, $R^2 = 0,95$, $P < 0,001$; Figura 65 B).

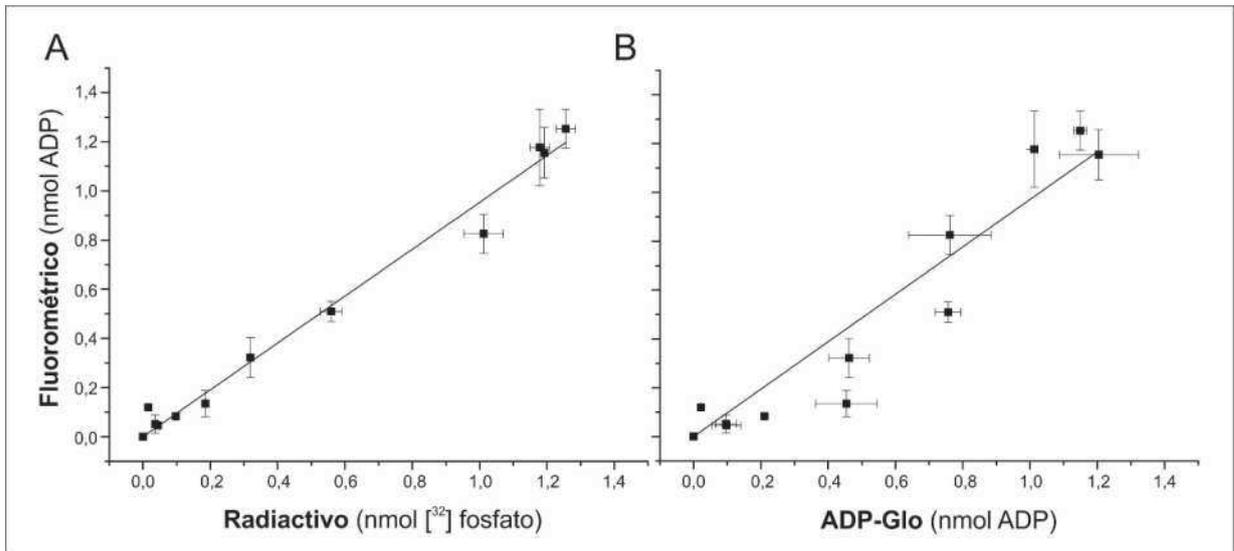


Figura 65. Validación del método fluorométrico para medir actividad ProtKasa. Los datos de ADP liberado (método fluorométrico en el eje y de los paneles A y B) se graficaron contra el [³²P] incorporado (método radiactivo, eje x del panel A) o ADP liberado (reactivo ADP-Glo, eje x del panel B). Los datos representan la media ± SE de dos experimentos independientes.

5. Discusión.

5.1 Caracterización cinética, estructural y regulatoria de las *Ath*PEPCKasas.

En el presente trabajo de Tesis, se encaró el estudio detallado de las *Ath*PEPCKasas. La inspiración inicial para realizar este trabajo provino del rol clave que tienen las PEPCKasas en todos los organismos [85, 104, 152]. Además, hasta el momento de inicio de este trabajo de Tesis la información disponible acerca de las propiedades bioquímicas de las PEPCKasas de plantas era escasa, particularmente si se la compara con los detallados estudios realizados en otros organismos. De esta manera, era nuestro interés generar nuevos conocimientos que permitan comprender mejor el nodo metabólico en el cual participan estas enzimas.

Mediante el análisis filogenético de las *Ath*PEPCKasas de plantas, pudimos determinar que los dos polipéptidos presentes en *Arabidopsis* se agrupan en clados diferentes, lo cual nos dio una primera visión de las diferencias existentes entre ambas enzimas (Figura 9). Cabe aclarar que en la construcción del árbol solamente se consideraron las regiones conservadas de las proteínas, dejándose de lado los extremos N que son divergentes. Por otra parte, al realizar una comparación *in silico* de los niveles de expresión de los genes *PEPCK1* y *PEPCK2* (Figura 10), se observa una desigualdad. El gen *PEPCK1* se expresa a lo largo de toda la planta (aunque con mayor prominencia durante la estratificación y germinación de las semillas) y en niveles sensiblemente mayores que *PEPCK2*, mientras que la expresión del gen *PEPCK2* ocurre en las semillas y los órganos florales, aunque en niveles inferiores que los de *PEPCK1*. Esto lleva a suponer que la *Ath*PEPCKasa1 es la principal isoforma en *Arabidopsis*, similar a lo concluido por otros autores [73]. Sin embargo, la presencia de potenciales variantes de *splicing* de la *Ath*PEPCKasa2 en las bases de datos (Figura 11), invita a pensar que podría existir una regulación génica compleja de esta isoforma.

Al iniciar este trabajo de Tesis la totalidad de las PEPCKasas de organismos fotosintéticos estudiadas correspondían a enzimas purificadas a partir de su fuente natural y se observaba una gran diferencia entre los parámetros cinéticos determinados (Tabla 10). Las discrepancias podrían deberse a las propiedades intrínsecas de las enzimas entre las diferentes especies vegetales, en las cuales operan metabolismos diferentes. Alternativamente, las diferencias podrían deberse a que las propiedades bioquímicas de las enzimas purificadas de fuente reflejan la respuesta de una mezcla de diferentes poblaciones estructurales de la enzima. Dado que las PEPCKasas son susceptibles a las modificaciones postraduccionales [95, 132, 165], las preparaciones podrían tener diferentes composiciones de enzima fosforilada o proteolizada. En línea con lo expuesto, pueden observarse grandes diferencias en los parámetros cinéticos determinados por los diferentes autores para el mismo organismo. Por ejemplo, se informaron diferencias de ~6 y ~9 veces en el K_M para el OAA para la enzima de *Panicum maximum* y la de *Anana comosus*, respectivamente [95, 97, 144, 233, 322]. Es por esto que, en este proyecto de Tesis, nos

propusimos desarrollar un sistema de expresión heteróloga de genes para la producción recombinante y purificación a homogeneidad electroforética de las *Ath*PEPCKasas. Esto representa una herramienta fundamental para el estudio detallado de las enzimas, puesto que permite obtener preparaciones de las proteínas homogéneas sin ninguna modificación postraduccional y en gran cantidad, estrategia que ha sido utilizada ampliamente en nuestro laboratorio [20, 176, 230, 323]. Además, las técnicas de biología molecular representan una herramienta valiosa para luego emular las diferentes modificaciones postraduccionales con el objetivo de entender con fino detalle los mecanismos moleculares subyacentes.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de las PEPCKasas de diferentes especies vegetales. La tabla está coloreada de acuerdo con el tipo de fotosíntesis que realiza el organismo de origen; C₃ (verde), C₄ (naranja) y CAM (azul).

Especie	Sustrato	K_M (μ M)	V_{max} (U.mg ⁻¹)	[Metal]	Referencia bibliográfica
<i>Cucurbita pepo</i>	OAA	56	5	1 mM MnCl ₂	[129]
	ATP	119			
<i>Panicum maximum</i>	OAA	156 ± 20	~30	10 μ M Mn ²⁺ 4 mM Mg ²⁺	[144]
	ATP	25,7 ± 3,5			
	PEP	2100 ± 250	~15	0,5 mM MnCl ₂	[97]
	ADP	36 ± 3,3			
<i>Panicum maximum</i>	OAA	25	51	0,5 mM MnCl ₂	[97]
	ATP	25			
	OAA	130	-	2,5 mM MnCl ₂ 2,5 mM MgCl ₂	[322]
	ATP	22			
PEP	380				
ADP	49				
<i>Chloris gayana</i>	OAA	12	36	0,5 mM MnCl ₂	[97]
	ATP	16			
<i>Urochloa panicoides</i>	OAA	15	42	0,5 mM MnCl ₂	[97]
	ATP	25			
<i>Ascophyllum nodosum</i>	PEP	77	-	1 mM MnCl ₂	[324]
	ADP	35			
<i>Chloris gayana</i>	PEP	780	-	2,5 mM MnCl ₂ 2,5 mM MgCl ₂	[325]
	ADP	25			
<i>Ananas comosus</i>	OAA	400	-	5 mM MnCl ₂ 5 mM MgCl ₂	[233]
	ATP	20			
	PEP	5000			
	ADP	130			
<i>Ananas comosus</i> (short version)	OAA	42	17	1 mM MnCl ₂	[95]
	ATP	120			
	PEP	560	8	2 mM MgCl ₂	
	ADP	47			

Como se expuso en los Resultados, pudimos expresar ambas *AthPEPCK*asas de forma recombinante y purificarlas a homogeneidad electroforética. Este representó el paso inicial y necesario para encarar la caracterización bioquímica exhaustiva de estas enzimas. Cabe aclarar que los estudios realizados en esta Tesis son los primeros que se han realizado con una *AthPEPCK*asa de plantas producida en forma recombinante. Al analizar la estructura cuaternaria de estas enzimas por cromatografía de exclusión molecular, determinamos que las *AthPEPCK*asas son homohexámeros (Figura 12). Esta estructura está de acuerdo con la descrita para las enzimas de especies C_4 (*Urochloa panicoides*, *Chloris gayana* y *Panicum maximum*) [97], pero es diferente a la estructura tetramérica reportada para la *PEPCK*asa de *Cucurbita pepo* [96, 158] y una versión corta de la enzima presente en *Ananas comosus* [95]. Esta estructura hexamérica ha sido recientemente confirmada *in vivo* en un trabajo publicado por Veyel y col. [240]. En este trabajo, los autores fraccionaron extractos crudos de *Arabidopsis* mediante una columna de exclusión molecular e identificaron las proteínas en las distintas fracciones por espectrometría de masas, determinándose para la *AthPEPCK*asa1 una masa nativa de ~447 kDa, similar a los 440 kDa que determinamos nosotros.

Además, para profundizar el análisis estructural de las *AthPEPCK*asas, realizamos el modelado molecular de ambas proteínas. Para esto empleamos el servidor ITASSER, que construye modelos moleculares de proteínas empleando la técnica de alineamientos estructurales múltiples acoplado a simulaciones iterativas [217]. Este servidor empleó como molde los homólogos bacterianos cuyas estructuras se encuentran cristalizadas puesto que, hasta el momento de escritura de esta Tesis, no se han resuelto estructuras cristalinas de *PEPCK*asas de plantas. Gracias a este análisis pudimos modelar el núcleo de estas enzimas, junto con los sustratos correspondientes (Figuras 20-21). Dichos modelos mostraron una gran calidad a excepción del dominio N-terminal de ambas enzimas. Esto se debe a que, por un lado, las extensiones N de las enzimas de plantas no están presentes en las bacterianas, por lo cual no es posible extrapolar la estructura. Por otra parte, las predicciones de estructura secundaria muestran que estos extremos N corresponden a un dominio intrínsecamente desordenado, los cuales evolucionaron para no adoptar una estructura estable bajo condiciones fisiológicas [250]. Estas regiones desordenadas fluctúan rápidamente entre diferentes conformaciones, por lo que suelen participar en las vías de señalización celular, puesto que la misma secuencia aminoacídica puede emplearse de forma diferente en diferentes contextos [251]. En general, estos dominios suelen estar involucrados en los módulos de interacción proteína-proteína, en regulaciones alostéricas complejas, suelen ser blanco de modificaciones postraduccionales, o bien actúan como módulos autoinhibitorios [251]. Esto no hace más que resaltar la importancia de los dominios N-terminales de las *ATP-PEPCK*asas, los cuales han sido adquiridos por las plantas a lo largo de la evolución. Además, otra característica que observamos es que la mayor diferencia estructural entre las *AthPEPCK*asas está localizada en este dominio en la proteína (Figura 21).

Con respecto al pH óptimo de reacción, se determinó que el mismo era igual a 7, un comportamiento similar al descrito para otras PEPCKasas [96, 97, 135, 233, 322], lo que también concuerda con las condiciones de pH existentes en el citosol de una célula vegetal (pH de $7,3 \pm 0,1$) [326–328]. Por otra parte, debido a la importancia que tienen los iones metálicos para la actividad de la PEPCKasa, para encarar la caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes de *Arabidopsis* debimos elegir la concentración y combinación adecuada de iones metálicos a emplear. Tradicionalmente, la actividad PEPCKasa se ensayaba con concentraciones relativamente elevadas de Mn^{2+} (0,5-5 mM, observar la Tabla 10), una condición en la cual se obtiene la máxima actividad (Figura 14). Sin embargo, se ha determinado que la concentración de Mn^{2+} en las células vegetales se mantiene en el rango micromolar [144, 237, 238, 329]. Por el contrario, la concentración de Mg^{2+} en las células vegetales varía de 15 a 25 mM [330, 331], aunque su concentración como ion libre es 0,25-0,4 mM [332–334]. Es por esto que en este trabajo decidimos realizar la caracterización empleando una concentración fisiológica de Mn^{2+} , para así obtener conclusiones fisiológicamente relevantes. Utilizamos una condición de medida que consistía en 4 mM $MgCl_2$ y 10 μM $MnCl_2$, la cual fue inicialmente propuesta por Chen y col. [144].

Los parámetros cinéticos determinados bajo la condición fisiológica de medida están de acuerdo con aquellas reportadas para otras especies de plantas (comparar las Tablas 3 y 10). Considerando que la reacción catalizada por la PEPCKasa es completamente reversible *in vitro*, la afinidad aparente más alta para el OAA y el ATP que exhiben ambas enzimas recombinantes de *Arabidopsis* (Tabla 4) concuerda con la visión de que operarían principalmente en la dirección de descarboxilación (vía gluconeogénica) *in vivo*. Además, determinamos que la *AthPEPCKasa2* es ~2 veces más activa que la *AthPEPCKasa1* en ambos sentidos de reacción, un resultado similar a lo observado por Shen y col. [335]. Sin embargo, la *AthPEPCKasa1* es la principal isoforma expresada *in vivo* y la que impactaría en las funciones fisiológicas [73–75, 142]. Marcadamente, las PEPCKasas de plantas C_3 son relativamente menos activas que aquellas de plantas C_4 y CAM (Tablas 4 y 10). Las actividades de las *AthPEPCKasas* son similares a las de *Cucurbita pepo*, una especie con un metabolismo C_3 (Tabla 4). De forma contraria, las PEPCKasas de especies que realizan fotosíntesis C_4 , muestran ~10 veces mayor actividad que las *AthPEPCKasas* (Tabla 10). Estas diferencias en la acción catalítica podrían estar estrechamente relacionadas al rol clave que tienen las PEPCKasas en los mecanismos de concentración del CO_2 en las especies C_4 .

Para analizar la capacidad de las *AthPEPCKasas* de unir potenciales efectores empleamos ensayos de desnaturalización de proteínas acoplados al escaneo diferencial de la fluorescencia [200, 241–244]. De esta forma, identificamos varios metabolitos como potenciales interactores de las *AthPEPCKasas*. Sin embargo, es importante remarcar que no existió una relación directa entre el aumento en la temperatura de desnaturalización y el efecto ejercido por el ligando. Por ejemplo, el PPi era el inhibidor más potente de ambas *AthPEPCKasas*, pero sólo aumentó la T_m de la *AthPEPCKasa1* y la *AthPEPCKasa2* en 0,7 y 0,8 °C,

respectivamente (Figuras 18 y 19). De forma inversa, el succinato generó el mayor aumento en la T_m (5 °C para la *AthPEPCKasa1* y 14 °C para la *AthPEPCKasa2*), pero sólo ejerció una pequeña inhibición (Figura 18 y 19). Estos resultados podrían ser producto de las características técnicas propias de este ensayo, el cual puede ser empleado para detectar la unión de moléculas pequeñas a las proteínas pero tiene importantes limitaciones a la hora de estimar las constantes de unión [241].

La respuesta de las *AthPEPCKasas* a los reguladores alostéricos fue diferencial (Tabla 4 y Figura 19). En general, la *AthPEPCKasa1* fue más sensible a los efectores que la *AthPEPCKasa2*. Por ejemplo, la *AthPEPCKasa1* fue inhibida por la Glc-6P y, en menor medida, por la Glc-1P y la Fru-6P. Sin embargo, la *AthPEPCKasa2* no respondió a estos azúcares fosfatos. De forma similar, el shikimato inhibió a la *AthPEPCKasa1*, mientras que no afectó a la *AthPEPCKasa2*. La respuesta a los ácidos orgánicos fue similar para ambas enzimas, a excepción de la activación por malato, que sólo ocurrió con la *AthPEPCKasa1*. Esto muestra que las dos proteínas estarían reguladas de manera diferencial. Si bien la principal isoforma expresada sería la *AthPEPCKasa1* (Figuras 10, 29 y 33), no puede descartarse la importancia de la *AthPEPCKasa2* en determinados tejidos y situaciones fisiológicas (Figuras 10 y 29). De forma similar a lo que encontramos en este trabajo de Tesis, estudios realizados por otros autores han demostrado una regulación alostérica diferencial entre las diferentes isoformas de una enzima. En *Arabidopsis*, existen cuatro isoformas de la Suc-6-fosfato sintasa que responden de forma diferente al activador Glc-6P y al inhibidor Pi [336]. Por otra parte, en endosperma de ricino se identificaron dos isoformas de la PEPCKasa, una que es sensible a la Glc-6P y el malato y otra que es insensible a estos metabolitos [337].

Al contrastar nuestros resultados con lo informado en la bibliografía, encontramos que las PEPCKasas de las plantas C_4 *Urochloa panicoides* y *Chloris gayana* son inhibidas por 3-PGA, Fru-6P y Fru-1,6-bisP [97], de la misma forma que lo observado para la *AthPEPCKasa1* (Tabla 3). Por el contrario, las enzimas de estas plantas C_4 fueron insensibles al Glu y el malato [97, 156], un inhibidor y un activador de la *AthPEPCKasa1*, respectivamente. En el caso de la enzima de *Cucurbita pepo* (una planta C_3), no se observó efecto con el succinato, el malato ni la Fru-1,6-bisP [129], pero esto podría deberse a la degradación de la enzima como una consecuencia de las condiciones empleadas en la purificación a partir de la fuente natural [158]. Una versión corta de la PEPCKasa presente en la planta CAM *Ananas comosus* [95] también es inhibida por 3-PGA y Fru-1,6-bisP, pero el succinato activa a la enzima de ananá, mientras que inhibe a las *AthPEPCKasas*. Además, el malato no tuvo efecto en la enzima de *Ananas comosus*, pero sí activó a la *AthPEPCKasa1* (Tabla 3).

5.1.1 La regulación alostérica en el contexto metabólico.

El PEP es un metabolito que representa un nodo clave en la compleja red metabólica, puesto que participa de forma activa en la regulación del metabolismo (por ejemplo la regulación “de abajo hacia arriba” de la glucólisis [29]) y su metabolismo es regulado mediante retroalimentación positiva o negativa por intermediarios de las diferentes vías en las que interviene [77]. Además, durante la germinación de las semillas oleaginosas la actividad PEPCasa es crítica [73–75, 130, 131] y la mutación del gen *PEPCK1* afecta negativamente el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis* [73, 74]. Considerando este escenario, proponemos que la activación de la *AthPEPCKasa1* por el malato podría ser un mecanismo para estimular el flujo de carbono liberado de la degradación de los AGs hacia la gluconeogénesis (Figura 66). Se estima que la concentración de malato en plántulas de *Arabidopsis* es ~11 mM [338, 339], un valor considerablemente más alto que el $A_{0.5}$ determinado para la *AthPEPCKasa1* (Tabla 3). De esta forma, esta activación estimularía la síntesis de azúcares para alimentar a la plántula hasta que el aparato fotosintético esté completamente desarrollado.

Por lo general, las enzimas que catalizan reacciones opuestas y funcionan en el mismo compartimiento subcelular suelen estar reguladas de forma recíproca para evitar la ocurrencia de ciclos fútiles [77, 340]. Estos ciclos podrían ocurrir mediante la operación simultánea de la PEPCasa y la PEPCasa las cuales, si no estuvieran reguladas, causarían la hidrólisis neta de ATP a ADP y Pi [95, 152, 341] (Figura 66). El malato activa a la *AthPEPCKasa1* en la dirección de la síntesis de PEP (Tabla 3) y, al mismo tiempo, inhibe a la PEPCasa, la cual emplea el PEP [342–348], dando la regulación necesaria (Figura 66). Otra capa de regulación opuesta podría darse mediante la fosforilación, la cual se discutirá más adelante. Un segundo ciclo fútil podría ocurrir entre la PEPCasa y la PyrKasa, causando la descarboxilación neta del OAA a Pyr y CO₂ [77]. Durante la germinación de las semillas oleaginosas, la actividad PyrKasa es esencial principalmente al comienzo, para generar los intermediarios iniciales del ciclo del glioxilato y de los ácidos tricarbónicos [349]. En este estadio se expresan dos isoenzimas de la PyrKasa, una en los plástidos y otra en el citosol, la cual representa un 85% del total de la actividad total [350, 351]. De la misma manera que para la PEPCasa, la inhibición por malato de la PyrKasa [352] también evitaría un ciclo fútil entre estas enzimas (Figura 66).

Con respecto al PPI, su función en el metabolismo vegetal se ha mantenido difuso por muchos años [353, 354]. Si bien las plantas poseen la capacidad de emplear a este compuesto en sus reacciones metabólicas, lo cual representa una ventaja ante las condiciones de déficit energético [354], nunca se había pensado en un rol regulatorio del mismo. Recientemente, Ferjani y col. [355] propusieron un rol regulatorio del PPI en la gluconeogénesis durante la germinación de las semillas. Estos autores encontraron que mutantes nulas en el gen codificante para la pirofosfatasa vacuolar translocante de H⁺ (mutantes *fugu5*)

acumulan altos niveles de PPi en el citosol, inhibiendo la vía gluconeogénica y deteniendo el desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* [353]. La inhibición de la gluconeogénesis se ha relacionado a la inhibición por producto de la UDP-GlcPPasa [355], que es fuertemente inhibida por PPi a concentraciones menores a 10 mM [356]. Dado que las *Ath*PEPCKasas son fuertemente inhibidas por PPi (Figura 19 y Tabla 4), la inhibición de la gluconeogénesis también podría ser consecuencia de la inhibición de las *Ath*PEPCKasas (Figura 66).

En los tejidos no fotosintéticos, como los frutos, el control enzimático por metabolitos podría ser de importancia. Tanto los niveles de malato y la actividad PEPCKasa tienen un pico durante la maduración en tomate y en frutilla [134–138]. Además, la supresión del gen *PEPCK* por RNA de interferencia en *Solanum tuberosum* llevó a un contenido reducido de azúcares, acompañado por un aumento en los niveles de malato [139, 140]. El efecto opuesto se observó cuando se aumentó la expresión de este gen con el promotor constitutivo *35S* o con el promotor específico de frutos *E8* [141]. De esta forma, la activación de la *Ath*PEPCKasa1 por malato podría ser parte de un mecanismo para canalizar el malato hacia la gluconeogénesis. Además, la relación entre la *Ath*PEPCKasa1 y el malato podrían ser de importancia durante las condiciones de estrés. Las mutantes nulas de *Arabidopsis* en el gen *PEPCK1* son más sensibles a la sequía que las plantas salvajes. Estas mutantes no son capaces de cerrar completamente sus estomas en la oscuridad [142], mecanismo que está íntimamente relacionado al metabolismo del malato [357]. Recientemente [355], esta relación ha sido establecida claramente dado que las mutantes *pepck1* poseen niveles aumentados de malato, succinato y citrato, y niveles reducidos de Glc-1P, Glc-6P y Fru-6P.

El desarrollo del aparato fotosintético reconfigura el perfil metabólico de la célula vegetal [358]. La principal fuente de carbono en las hojas iluminadas proviene de las triosas-P sintetizadas por el CBCB [18, 30]. Bajo este escenario metabólico, existe un crecimiento exponencial en los niveles de triosas-P y hexosas-P (Figura 66). Se estima que la concentración de hexosas-P en hojas iluminadas están dentro del rango de valores de $I_{0.5}$ determinados para las *Ath*PEPCKasas (Tabla 4) [338, 358], las cuales se expresan en este tejido [227]. Por esto, las hexosas-P podrían inhibir a las PEPCKasas y estimular la actividad PEPCKasa, la cual es activada por Glc-6P [342–348] y, de esta forma, se inhibiría la gluconeogénesis y se estimularía la respiración del carbono fijado mediante la fotosíntesis (Figura 66).

Otra función de las *Ath*PEPCKasas en las hojas es en la respuesta metabólica al estrés. El metabolismo del shikimato en plantas es una red intrincada de reacciones enzimáticas dedicadas a la síntesis de aminoácidos aromáticos y una serie de compuestos metabólicos, algunos de los cuales están relacionados a la respuesta al estrés biótico, como el ácido salicílico [359]. Esta vía ocurre principalmente en los plástidos y comienza con la condensación del PEP (proveniente de la glucólisis) con la E4P (derivada de la vía de las pentosas fosfato) para formar el shikimato, el precursor de los aminoácidos aromáticos en los plástidos y

5.2 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por dipéptidos.

La unión no covalente de ligandos a las enzimas permite regular la funcionalidad de las mismas, de forma de ajustar el metabolismo de acuerdo con las respuestas ambientales y del desarrollo [30]. Veyel y col [240] encontraron la potencial interacción de la *AthPEPCKasa1* con los dipéptidos H-P. Nosotros realizamos la síntesis por fase sólida de estos dipéptidos y analizamos *in vitro* su efecto sobre la *AthPEPCKasa1*. De esa forma, determinamos que los mismos inhibían a la enzima recombinante en ambos sentidos de reacción (Figura 24). Los valores de $I_{0,5}$ calculados se encontraron en el orden micromolar, por lo que son inhibidores más potentes que los metabolitos efectores anteriormente descritos. También, se analizaron algunos aminoácidos individuales que conforman a los dipéptidos ensayados y no observamos un patrón de inhibición marcado, por lo que el efecto observado era específico de los dipéptidos. Por otra parte, probamos el dipéptido Tyr-Asp, el cual se ha demostrado que interacciona con la Ga3PDHase de *Arabidopsis* [240], y no observamos efecto sobre la *AthPEPCKasa1*, lo que sugiere especificidad en la interacción. También medimos la actividad en extractos crudos de hojas de *Arabidopsis* en presencia de los dipéptidos y observamos una inhibición significativa (Figura 27).

Actualmente, es poco lo que se conoce sobre el origen y la función de los dipéptidos proteogénicos. Con respecto a su origen, en mamíferos y levaduras, se han descrito mecanismos de importación a partir del medio extracelular, para luego incorporarlos al metabolismo como fuente de aminoácidos [362–364]. Sin embargo, se considera que la principal vía de producción es por proteólisis de proteínas endógenas, siendo los dipéptidos intermediarios de vida media corta en estos procesos [365]. Los genomas de plantas codifican para múltiples exopeptidasas, las cuales actúan como aminopeptidasas y carboxipeptidasas de las proteínas para liberar aminoácidos individuales. Sin embargo, algunas exopeptidasas pueden liberar dipéptidos [365], y se han descubierto algunas con patrones de corte específicos. Por ejemplo, una dipeptidil peptidasa purificada a partir de riñón de cerdo puede cortar dipéptidos de X-Pro y X-Ala a partir del extremo N de las proteínas sustrato [366]. Además, los dipéptidos pueden ser escindidos a sus aminoácidos individuales por enzimas con actividad dipeptidasa, para las cuales también se ha encontrado especificidad para sus sustratos [367]. La acción combinada de enzimas con capacidad de producir y de degradar dipéptidos podrían ser las responsables de generar patrones de acumulación particulares para cada grupo de dipéptidos frente a diferentes situaciones fisiológicas [365].

Con respecto a las funciones de los dipéptidos, hasta el momento se han encontrado de forma aislada diversas acciones de señalización. El dipéptido Tyr-Arg, conocido como *kyotorphin*, fue aislado a partir de cerebro bovino y funciona como un potente analgésico en ratones [368]. También, el dipéptido Tyr-Leu actúa como un ansiolítico y, ni el dipéptido inverso Leu-Tyr, ni una mezcla de Tyr y Leu ejercen tal efecto [369, 370]. De esta forma, en lo que respecta a la función, estos dipéptidos tienen propiedades específicas

y son más que la suma de sus aminoácidos individuales. En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, se ha descrito que el dipéptido Tyr-Ala aumenta la vida media, con un efecto pronunciado bajo condiciones de estrés por calor y oxidativo [371]. En plantas, los trabajos realizados hasta el momento han unido a los dipéptidos con la señalización ante diferentes situaciones de estrés. Mediante estudios de perfilado de metabolitos en *Arabidopsis*, se observó que los niveles de dipéptidos varían ante las condiciones de estrés abiótico, teniendo cada uno de ellos un patrón de acumulación particular [365, 372]. Además, se encontraron estas moléculas en exudados de raíces de *Arabidopsis*, corriente abajo de la vía de señalización de las ProtKasas MPK3 y 6, sugiriendo un rol en las vías de comunicación planta-microbio y planta-planta [373].

Recientemente [365], se demostró que la autofagia impacta en los niveles de determinados grupos de dipéptidos ante el estrés por choque térmico. Mutantes de *Arabidopsis* simples (*atg18* y *nbr1-2*) y dobles [*atg4(4a/4b)* y *nbr1-2/atg5*] en componentes de la autofagia tratadas con calor mostraron niveles reducidos de dipéptidos en comparación con las plantas salvajes. Este resultado no fue sorprendente dado el rol de la autofagia en el reciclaje de las macromoléculas ante situaciones de déficit energético [366]. Cuando se dispara el proceso de autofagia, las proteínas son capturadas por los autofagosomas y transportadas a las vacuolas, donde son degradadas a sus aminoácidos constituyentes, los cuales luego se transportan nuevamente al citosol por transportadores de aminoácidos situados en la membrana vacuolar [365, 366]. Es por esto que la disminución de los niveles de dipéptidos en mutantes en componentes del sistema de autofagia tiene mucho sentido. Cabe aclarar que se han descrito exopeptidasas con actividad dipeptidil peptidasa [374, 375] y transportadores de dipéptidos [374, 376] en las vacuolas.

Retomando lo expuesto en la Introducción, durante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas no hay asimilación del carbono porque las semillas poseen en sus tejidos de reserva los nutrientes necesarios para alimentar a la plántula naciente [19, 73, 377]. Debido a las funciones de la autofagia en la degradación de las macromoléculas para movilizar los nutrientes, es esperable que la misma tenga algún rol en este estadio de crecimiento. De hecho, mediante el estudio de las mutantes *atg*, las cuales son mutantes nulas en los genes involucrados en la autofagia (denominados genes *ATG*), se determinó un rol importante de la autofagia en la germinación de las semillas [19]. Estas mutantes exhiben hipersensibilidad al hambreado por carbono y nitrógeno [378], como así también un crecimiento retrasado en comparación con las plantas salvajes, lo cual puede ser eliminado al alimentar a las plántulas con una fuente exógena de carbono. Además, estas plantas muestran niveles disminuidos de aminoácidos libres, mientras que los niveles de las proteínas estaban incrementados [19]. Entre las proteínas aumentadas se encontraba a la cruciferina 3, que es la proteína de reserva más abundante en las semillas de *Arabidopsis* [379, 380]. Estas mutantes también tienen niveles aumentados de TAGs y AGs [19]. En definitiva, un

bloqueo en la autofagia genera un impedimento en la movilización de los compuestos de reserva necesarios para el crecimiento de las plántulas.

La PEPCKasa es otro elemento importante para la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas, canalizando el carbono liberado de las reservas de AGs para sintetizar azúcares hasta que se da el desarrollo del aparato fotosintético [20, 74]. En cambio, la PDKasa es la encargada de canalizar el carbono derivado del Pyr proveniente del catabolismo de los aminoácidos generado por la degradación de las proteínas de reserva [75]. Si bien el conocimiento acerca del metabolismo de las proteínas de reserva durante la germinación de las semillas no está del todo claro, una alteración en su metabolismo afecta negativamente el crecimiento heterotrófico de plántulas de *Arabidopsis* [53]. Problemas similares ocurren al mutar al gen *PEPCK1* [73, 74], al gen *PPDK* [75] o a los genes *ATG* involucrados en la autofagia [19], lo cual resalta la importancia de la acción coordinada de estos componentes durante el crecimiento heterotrófico de las plántulas posterior a la germinación.

Con estos antecedentes, proponemos que la inhibición de la *AthPEPCKasa1* por los dipéptidos H-P podrían servir como un mecanismo para estimular la canalización del carbono por la vía de la PDKasa, puesto que esta última no interacciona con los dipéptidos H-P (Figura 67) [240]. El análisis de las proteínas de reserva mayoritarias en las semillas de *Arabidopsis* revela en su secuencia primaria combinaciones de aminoácidos que podrían generar a los dipéptidos H-P. De esta forma, los niveles de estos dipéptidos podrían proveer información directa sobre la tasa de proteólisis, regulando la incorporación de carbono a la gluconeogénesis proveniente de la degradación de lípidos y proteínas. En este sentido, la sobreexpresión del factor de transcripción *WRKY10* de girasol en plantas de *Arabidopsis*, generó semillas que al germinar mostraban una tasa incrementada de gluconeogénesis [190]. Al analizar el consumo de compuestos de reserva en estas semillas 48 HPI se encontró que las mismas consumían un 7% más de lípidos que las plantas salvajes, mientras que el consumo de proteína era un 15% menor [190]. En estas plantas, la actividad PEPCKasa estaba aumentada [190], sugiriendo un mayor flujo de carbono a través de esta vía, encargada de canalizar el carbono proveniente de la degradación de los lípidos de reserva [75].

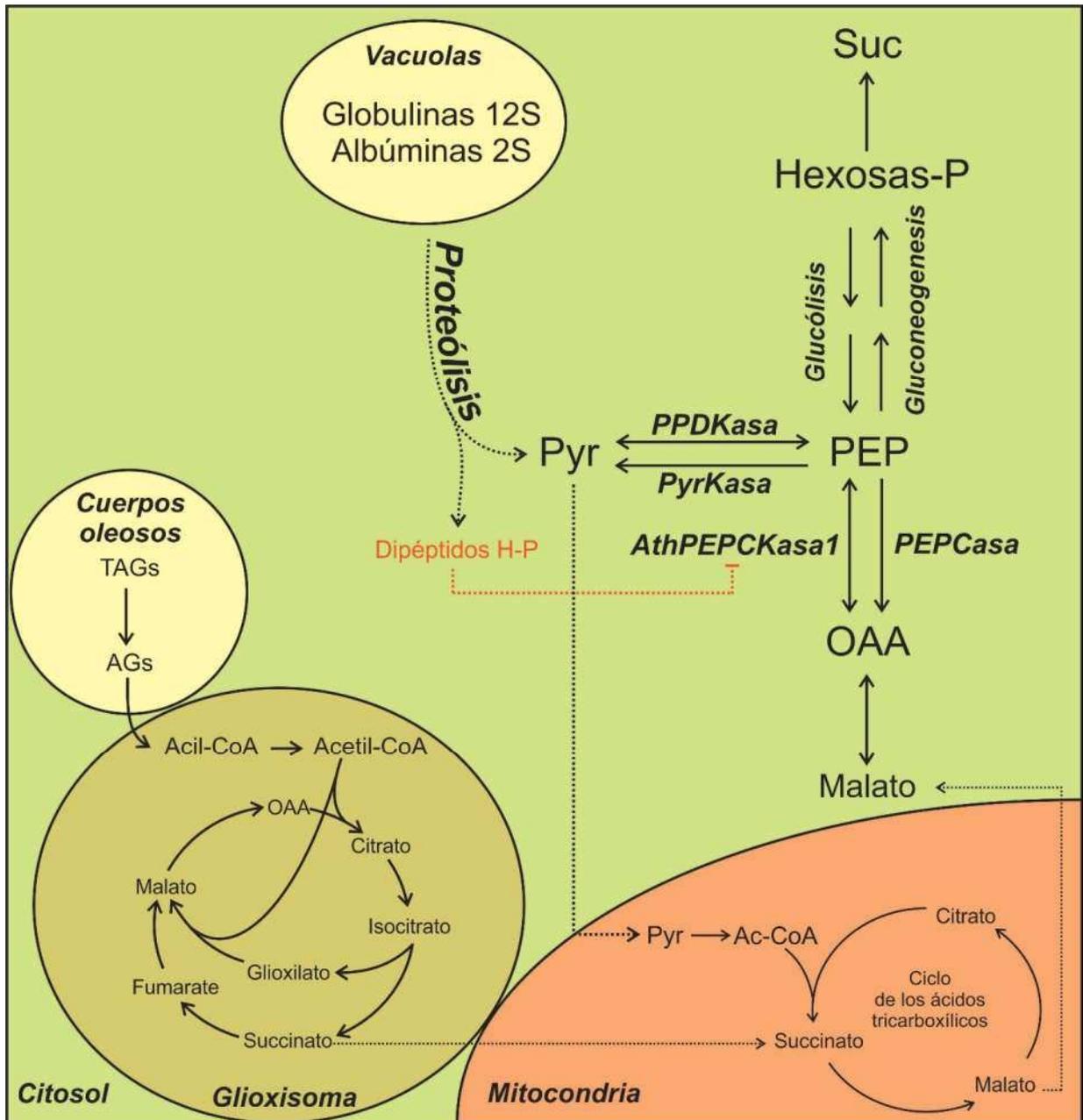


Figura 67. Mecanismo regulatorio de los dipéptidos H-P en el contexto metabólico. Los productos de degradación de los compuestos de reserva son incorporados a la gluconeogénesis a través de los pasos enzimáticos catalizados por la *AthPEPCKasa1* (carbono proveniente de la degradación de los lípidos de reserva) y la *PPDKasa* (carbono proveniente de la degradación de las proteínas de reserva) [75]. Como subproducto del proceso de proteólisis, se generan los dipéptidos H-P que inhiben a la *PEPCKasa*, pudiendo estimular el flujo a través de la *PPDKasa*.

5.3 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por corte proteolítico.

La regulación de las enzimas por proteólisis es un área emergente de la bioquímica vegetal, siendo el estudio del rol de las proteasas en la modulación funcional de proteínas un campo de estudio de relevancia [381]. El genoma de *Arabidopsis* codifica para más de 800 proteasas con diferentes perfiles de expresión temporal y de tejidos [382, 383] pero, hasta el momento, el conocimiento sobre las cascadas proteolíticas en las plantas está fragmentado [381]. Dada la importancia que tiene el gen *PEPCK1* para el crecimiento posterior a la germinación [73–75] y debido a que este gen es el que se expresa principalmente en este estadio (Figuras 10,29 y 33), en esta sección nos focalizamos en estudiar la regulación de la *AthPEPCKasa1* durante la germinación de las semillas. Nos pareció de sumo interés indagar acerca de los mecanismos regulatorios que operan en el estadio de germinación, dada la importancia que tiene el correcto desarrollo de las plántulas en la productividad futura de las plantas [25].

La regulación de proteínas por cortes proteolíticos es un proceso de suma importancia en una variedad de procesos celulares, como el control de vías metabólicas, la degradación de proteínas para eliminar aquellas con plegamiento anormal o dañadas, o bien para reciclar aminoácidos bajo determinadas condiciones fisiológicas. También participa en la percepción y transducción de señales durante el crecimiento, la división y la muerte celular [384]. La proteólisis selectiva de proteínas es un proceso complejo que involucra una variedad de vías de señalización que evolucionaron para seleccionar y degradar, de forma selectiva, determinadas proteínas blanco. Esta modificación postraduccional puede involucrar desde cortes simples en la cadena polipeptídica a la total digestión del polipéptido. La gran velocidad con la que ocurre este proceso y su irreversibilidad ofrecen una ventaja ausente en otros tipos de regulaciones [384].

La proteólisis permite controlar a las enzimas de diferentes maneras. Es posible controlar su actividad, ya sea la activación del zimógeno a su forma activa o bien cambios más sutiles en los parámetros cinéticos. También puede controlarse la estructura de un complejo enzimático, ya sea la remoción de péptidos señales que dirijan proteínas a una determinada organela o degradar determinadas subunidades de un complejo para permitir su recambio. Además, puede regularse el tiempo de vida media y la tasa de recambio de las proteínas, ya sea exponiendo o eliminando dominios proteicos que funcionen como señales para la degradación [384]. Algunos autores han sugerido que al comparar a las enzimas de plantas con sus contrapartes de bacterias y cianobacterias, suelen tener extensiones en sus dominios N y C [96, 157, 385, 386]. Estas extensiones peptídicas podrían representar módulos regulatorios adquiridos durante la evolución, para cumplimentar regulaciones complejas en las plantas, las cuales deben responder constantemente a los cambios del ambiente. Un claro ejemplo de la adquisición de nuevos dominios son los extremos N de las *AthPEPCKasas*, los cuales no están presentes en sus contrapartes bacterianas y habrían evolucionado para participar en mecanismos regulatorios complejos.

La primera descripción de un corte proteolítico discreto en el dominio N-terminal de la PEPCKasa fue para la enzima de pepino por Walker y col. [158]. En este trabajo, los autores demostraron que extractos crudos de cotiledones de pepino y de hojas de *Urochloa panicoides* y *Nidularium fulgens* realizados a pH neutro, se producía el corte proteolítico de la PEPCKasa, el cual solamente podía ser evitado al realizar las extracciones a pH alcalino. Nosotros encontramos resultados similares en Arabidopsis, dado que las extracciones nativas realizadas a pH alcalino prevenían la degradación de la PEPCKasa (Figura 36). El corte del dominio N-terminal de la PEPCKasa de pepino no alteró significativamente su actividad, que resultó ser de 41 y 48 U.mg⁻¹ para la enzima completa y trunca, respectivamente [96]. Es por esto, que los autores hipotizaron que la extensión N-terminal podría conferirle propiedades regulatorias especiales a la proteína. Un apoyo a este modelo proviene del hecho de que las PEPCKasas de plantas se fosforilan en sus dominios N-terminales [96, 114, 152, 165–167, 234, 335].

En nuestros estudios realizados con plántulas en germinación de Arabidopsis, encontramos que la *AthPEPCKasa1* es proteolizada alrededor de las 24-48 HPI, un estadio en el cual los niveles de proteína llegan a un máximo (Figuras 32-33). Para descartar la posibilidad de que la proteólisis fuera producto del proceso de extracción, empleamos extracciones proteicas ultra-desnaturalizantes para confirmar que la degradación ocurría *in vivo* (Figura 31). Estos resultados estuvieron en línea con las versiones cortas de la PEPCKasa encontradas por Martin y col. [95] en hojas de *Ananas comosus* extraídas con 10% TCA. Además, ensayamos la capacidad catalítica de la PEPCKasa en esas muestras, pero no encontramos el pico de actividad descrito por Malone y col. (2007). En cambio, encontramos un aumento secuencial en la actividad (~2 veces), el cual era coincidente con el pico de expresión proteica (Figura 35). Estas diferencias podrían originarse en los diferentes métodos de extracción de proteínas, los cuales podrían llevar a diferentes poblaciones de enzimas.

Un estudio a gran escala realizado por Tsiatsiani y col. [99] identificó a la *AthPEPCKasa1* como un sustrato de la *AthMC9*. Estos autores determinaron que los extractos crudos de mutantes nulas *mc9* y de líneas sobreexpresantes *35S::AthMC9*, poseen niveles disminuidos y aumentados de la actividad PEPCKasa en el sentido de carboxilación, respectivamente [99]. Sin embargo, en la mutante *mc9*, la proteólisis de la *AthPEPCKasa1* también ocurre, probablemente debido a la presencia de otras metacaspasas en este tejido [99]. Nuestros resultados concluyen que las mutantes truncas de la *AthPEPCKasa1* ($\Delta 19$ y $\Delta 101$) mostraron actividad descarboxilasa similar a la enzima WT, mientras que la actividad en el sentido de carboxilación estaba moderadamente incrementada en ambas mutantes truncas al compararla con la enzima completa (Tabla 6). Los valores de K_M para los sustratos de las mutantes truncas estaban en el rango de los determinados para las versiones cortas de la PEPCKasa de ananá, la cual también poseía una afinidad por el OAA, el ATP y el ADP en el rango micromolar, mientras que la afinidad por el PEP estaba en el rango milimolar [95]. Con respecto al PEP, encontramos que la mutante $\Delta 19$ tenía 2-veces menor K_M para el PEP

al compararlo con la enzima completa, esto también puede verse al comparar este parámetro entre la versión pequeña y larga de la PEPCKasa de ananá, la cual posee un K_M 10 veces menor para el PEP [95, 233].

Otra característica de las mutantes truncas de la *Ath*PEPCKasa1 es que la regulación alostérica por metabolitos es diferente a la enzima no proteolizada. En particular, la Glc-6P es un inhibidor de la enzima completa pero un activador suave de la mutante $\Delta 101$, mientras que el malato activa a la enzima completa y no tiene efecto en la mutante $\Delta 101$ (Figura 42). Esto refuerza la hipótesis de que las extensiones N-terminales confieren propiedades regulatorias a la *Ath*PEPCKasa1. Resultados similares fueron obtenidos por Furumoto y col. [157] al tratar a la PEPCKasa de maíz con enteroquinasa en una condición que llevó al corte controlado de su extremo N, generando la enzima con el doble de actividad, la cual era inhibida por 3-PGA, mientras que la proteína completa era levemente afectada por este metabolito. Martin y col. [95] encontraron que la versión pequeña de la PEPCKasa de ananá no era afectada por Glc-6P ni malato en el sentido de descarboxilación, lo cual se asemeja a nuestros hallazgos. Sin embargo, en este trabajo los autores no pudieron purificar la versión completa de la enzima, para comparar si estos metabolitos también la regulaban [95].

La modulación funcional por proteólisis de la *Ath*PEPCKasa1 podría ser parte de un mecanismo para regular sus niveles durante la transición del tejido de su condición de fuente a sumidero. Durante la germinación, cuando el carbono se obtiene de los lípidos y los aminoácidos de reserva, los niveles de malato aumentan, activando a la *Ath*PEPCKasa1 y el flujo hacia la gluconeogénesis (Figura 68). Una vez que el aparato fotosintético se desarrolla, la gluconeogénesis es reemplazada por la glucólisis. En este estadio, el carbono reducido proviene del CBCB, los niveles de hexosas-fosfato aumentan, y la actividad PEPCKasa disminuye de $\sim 0.5 \text{ U.g PF}^{-1}$ en plántulas en germinación a $\sim 0.05 \text{ U.g PF}^{-1}$ en hojas maduras (Figura 35 y [227]). En este punto, *Ath*MC9 genera las versiones más cortas de la *Ath*PEPCKasa1 necesarias para el nuevo escenario metabólico, por ejemplo, tomar intermediarios al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (Figura 68).

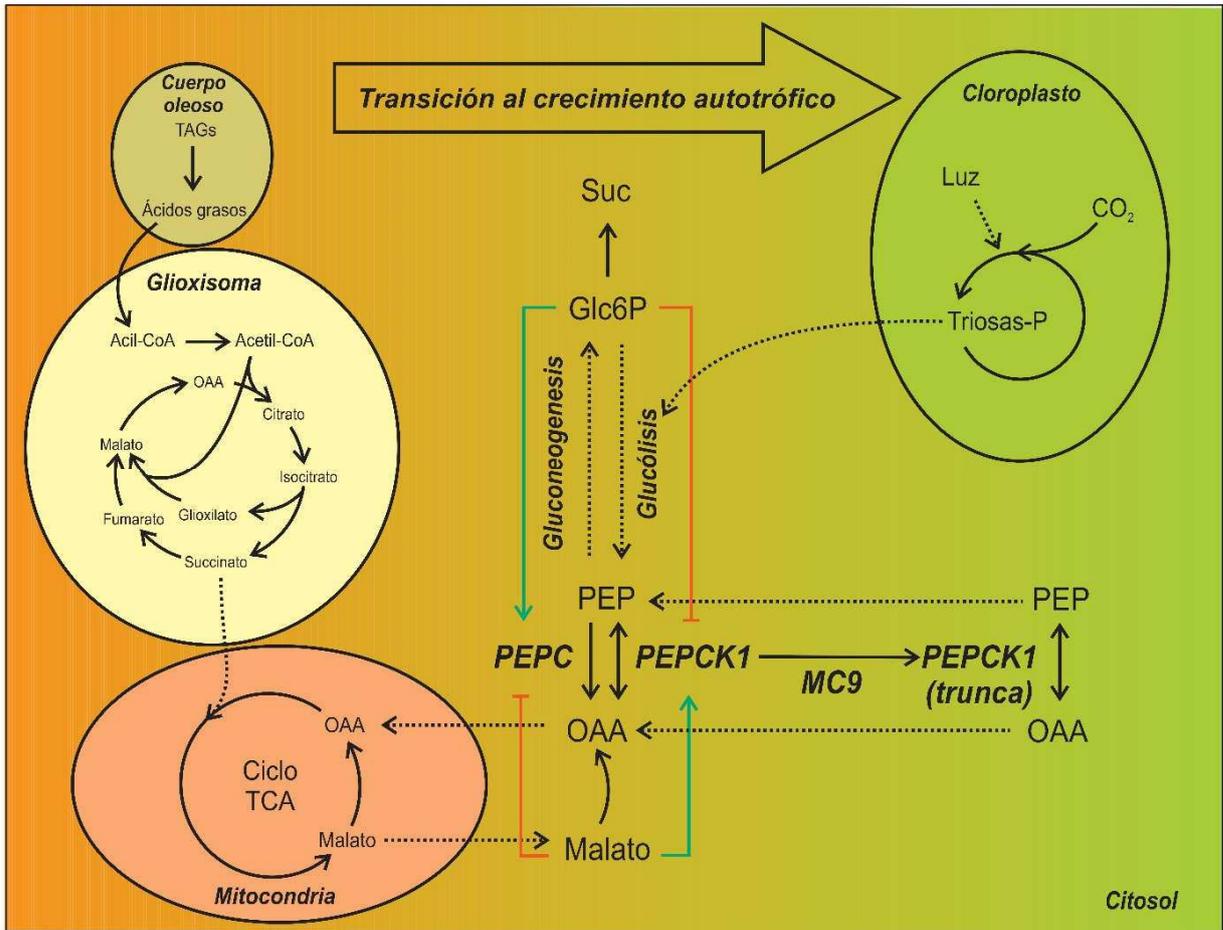


Figura 68. Regulación de la *AthPEPCKasa1* por corte proteolítico en el contexto metabólico. Durante la transición de la plántula de un crecimiento heterótrofo (naranja) a uno autótrofo (verde), la *AthPEPCKasa1* es cortada en su extremo N por la *AthMC9*, generando versiones más pequeñas de la enzima que son catalíticamente competentes pero insensibles a la regulación por malato y Glc-6P.

5.4 Ubiquitinilación y degradación proteolítica de la *AthPEPCKasa1*.

La proteólisis es un mecanismo de regulación irreversible, por lo cual debe ser altamente selectivo para funcionar de forma correcta. Por esto, en la célula existen numerosos factores que seleccionan y marcan a las proteínas blanco, los cuales pueden ser dependientes o independientes de la ubiquitina [384, 387]. En los mecanismos dependientes de ubiquitina, primero se marcan las proteínas con ubiquitina y luego se degradan mediante el complejo enzimático del proteasoma 26S. Como su nombre lo indica, la ubiquitina es una proteína ubicua en todas las especies y es, por lejos, la proteína más conservada en su secuencia aminoacídica que se conozca [384]. Otras modificaciones postraduccionales como la fosforilación o la metilación pueden también gatillar la degradación de proteínas [384, 387]. En este trabajo hallamos que la

AthPEPCKasa1 se encuentra ubiquitinilada durante la germinación de las semillas (Figura 46), estadio en el cual también ocurre la proteólisis de la enzima. Este resultado está en línea con lo encontrado en trabajos de proteómica realizados a gran escala [265, 266] y sugeriría que el recambio de esta enzima estaría mediado por el proteasoma 26S. De hecho, en nuestros resultados determinamos que la acumulación de la *AthPEPCKasa1* se da mediante el tratamiento con MG132 (Figura 44-45), de la misma forma que lo informado por Kim y col. [265] al analizar la estabilidad de diferentes proteínas conjugadas a ubiquitina en *Arabidopsis*. Mediante el análisis de la información disponible en la base de datos del *Plant PTM viewer* [221], encontramos en el grupo de proteínas ubiquitiniladas generado por Walton y col. [266], que la Lys-488 sería el residuo de tal forma modificado en la *AthPEPCKasa1*.

Por otra parte, también encontramos que la *AthPEPCKasa1* está fosforilada en los mismos estadios en los cuales se da la degradación proteolítica. La fosforilación de esta enzima se condice tanto con la información disponible en las bases de datos, como con los informes de fosforilación de las PEPCKasas en diferentes especies vegetales [96, 114, 152, 165, 166]. La coincidencia de ambas modificaciones postraduccionales en la *AthPEPCKasa1* podría indicar algún tipo de interacción entre ambas modificaciones. La interacción entre la fosforilación y la proteólisis se ha informado para otras enzimas del metabolismo primario, como la nitrato reductasa de hojas de espinaca [388–391], la Suc sintasa de hojas de maíz [392] y la PyrKasa de semillas de soja [393], entre otras.

En *Saccharomyces cerevisiae* las enzimas gluconeogénicas son sustratos de la vía de degradación del N-terminal. Cuando estas proteínas no son necesarias, debido a un cambio en el medio de cultivo, son removidas por degradación proteolítica [125]. De forma similar, en mamíferos se ha descrito que en condiciones de bajo contenido energético, la fosforilación de la PEPCKasa disminuye la acetilación y aumenta la ubiquitinilación, gatillando el recambio proteolítico de la enzima [127]. A pesar de que un mecanismo de este tipo aún no ha sido descrito en plantas, realizamos un análisis detallado del conjunto de datos de proteínas ubiquitiniladas realizado por Kim y col. [265] y determinamos que prácticamente todas las enzimas involucradas en la gluconeogenesis experimentan tal modificación (Figura 69), lo cual sugiere que un mecanismo similar también podría ocurrir en plantas.

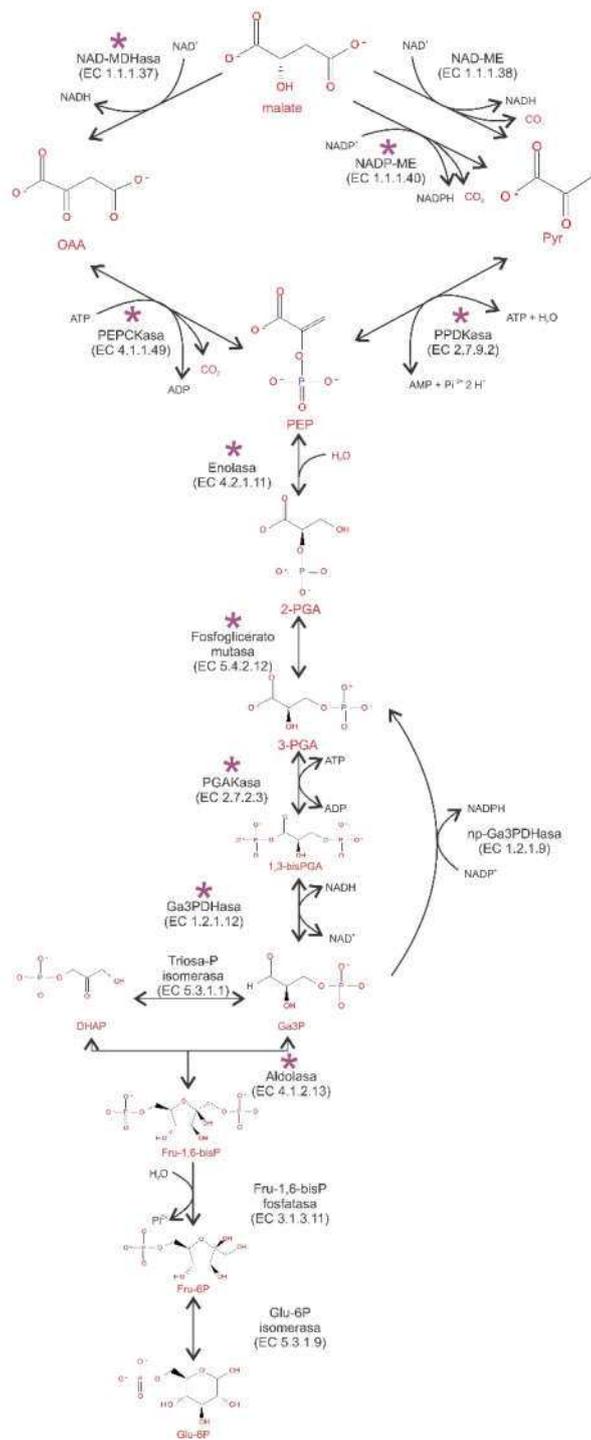


Figura 69. Análisis de enzimas involucradas en la gluconeogénesis que serían ubiquitiniladas en *Arabidopsis*. La información fue obtenida del conjunto de datos generado por Kim y col. [265] y filtrado por su implicancia en la gluconeogénesis mediante el servidor KEGG. Las enzimas que serían ubiquitiniladas se marcan con un asterisco (*) púrpura.

5.5 Regulación de la *AthPEPCKasa1* por fosforilación.

Previamente se mencionó que las PEPCKasas de plantas son fosforiladas [96, 114, 152, 165–167, 234]. Los trabajos iniciales realizados por Leegood y Walker [152] propusieron que este mecanismo serviría para coordinar de forma recíproca las actividades de la PEPCasa y la PEPCKasa, de forma que no se produzcan ciclos ineficientes de fosforilación y desfosforilación. Los autores propusieron que en las hojas de las plantas C₄ y CAM, la luz promueve la desfosforilación de la PEPCasa (reduciendo su actividad y haciéndola menos sensible a los activadores y más sensible a los inhibidores) y de la PEPCKasa (lo cual aumenta su actividad).

En los últimos años, se desarrollaron y refinaron las técnicas de espectrometría de masas, lo cual, en combinación con la capacidad de procesamiento de grandes volúmenes de datos, llevó a que se disponga de una abundante cantidad de datos de fosfoproteómica. Además, estos desarrollos permitieron detectar y analizar aquellas modificaciones que ocurren en baja estequiometría y que previamente se consideraban poco relevantes [394]. Esto nos brindó información detallada sobre la fosforilación de las *AthPEPCKasas*. Mediante el análisis de las bases de datos *PhosPhat* y *Plant PTM viewer* [220, 221], pudimos establecer que la *AthPEPCKasa1* se fosforila en numerosos residuos en su secuencia primaria, los cuales se localizan en su mayoría en el dominio N-terminal. Al analizar de forma manual la información disponible en las bases de datos, junto con las referencias bibliográficas asociadas, concluimos que las *AthPEPCKasas* se fosforilan en variadas condiciones experimentales, las cuales se agrupan en la Tabla 11. Además, este análisis muestra que las ProtKasas que fosforilarían a estas enzimas serían varias: GSK3, SnRK2, MPK6 y TOR.

Tabla 11. Análisis de los sitios de fosforilación de las *AthPEPCK*asas. Los datos de fosfoproteómica fueron obtenidos de las bases de datos *PhosPhat* y *Plant PTM viewer* [220, 221].

Enzima	Aminoácido	Tratamiento	Referencia
<i>AthPEPCK</i> asa1	Ser-62, Thr-65, Thr-66	Triple mutante <i>snrk2.2/2.3/2.6</i> crecidas en medio MS líquido en agitación, con luz continua a 22°C. Plántulas de 12 días se trataron por 30 min con 50 µM de ABA. Los péptidos fosforilados disminuyeron en la triple mutante tratada con ABA, pero no se indujeron en la salvaje tratada con ABA.	[395]
	Ser-62, Thr-65, Thr-66	Cultivo celular de <i>Arabidopsis</i> ecotipo <i>Landsberg erecta</i> crecidas por 7 días en medio MS suplementado con 3% Suc.	[396]
	Ser-62, Thr-65	Raíces de <i>Arabidopsis</i> .	[397]
	Ser-62, Thr-66, Thr-122	<i>Arabidopsis</i> crecidas en medio MS por 1 mes a 25°C y tratadas o no con 1 µM de flg22 (péptido conservado de 22 aminoácidos derivado de la flagelina de <i>Pseudomonas syringae</i>). Ante el tratamiento aumentó Thr-122 y disminuyó Ser-62 y Thr-66.	[398]
	Ser-62, Thr-65, Thr-66, Thr-122, Ser-135	<i>Arabidopsis</i> WT y mutante <i>mpk6</i> crecidas en medio MS por 1 mes a 25 °C y tratadas o no con 1 µM de flg22 (péptido conservado de 22 aminoácidos derivado de la flagelina de <i>Pseudomonas syringae</i>). Ser-62, Thr-65 y Thr-66 ausentes en la mutante <i>mpk6</i> . Thr-122 y Ser-135 aumentados ante el tratamiento con flg22.	[399]
	Tyr-407	Cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> ecotipo <i>Landsberg Erecta</i> .	[400]
Ser-62, Thr-66	Cultivos celulares de raíces de <i>Arabidopsis</i> . Los autores proponen un motivo fosforilado por GSK3.	[401]	
<i>AthPEPCK</i> asa2	Thr-131	Plantas de <i>Arabidopsis</i> hambreadas y realimentadas con Suc suplementada o no con inhibidores de la ProtKasa TOR. Thr-131 es sustrato de la ProtKasa TOR.	[402]

Para estudiar en detalle el efecto de la fosforilación en la *AthPEPCKasa1*, empleamos el sistema de expresión recombinante que habíamos desarrollado. Construimos mutantes en las cuales se hicieron mímicas de la fosforilación mutando los residuos fosforilables (Ser-62 y Thr-66) a Asp, de forma de imitar la carga negativa que genera la fosforilación en las proteínas [273]. Realizamos la caracterización de estas mutantes y observamos que ambas mutaciones tenían un efecto activador en la actividad de la enzima (Tabla 7). Observamos que en el caso de la mutante en la Ser-62, hubo un aumento de ~2 veces en la actividad carboxilasa y descarboxilasa. Con respecto al valor de K_M , no hubo cambios significativos para esta mutante al compararlos con los de la enzima salvaje (Tabla 7). Al analizar a la mutante Thr-66, hubo un aumento de ~2,5 veces en la actividad carboxilasa, y no se generaron cambios significativos en la actividad descarboxilasa (Tabla 7). Con respecto al valor de K_M , disminuyó ~2 veces la afinidad para el PEP al mismo tiempo que aumentó en el mismo orden la afinidad por el ADP. Por otra parte, la afinidad para el OAA y el ATP aumentó en ~6 veces (Tabla 7). Estos resultados difieren de los obtenidos por Walker y col. [166] para la PEPCKasa de *Panicum maximum*. Estos autores purificaron la enzima a partir de hojas cosechadas en oscuridad (condición en la cual se encuentra fosforilada) y, mediante una cromatografía de exclusión molecular, separaron dos formas de la proteína: una de baja masa molecular levemente fosforilada y una de alta masa molecular fosforilada. Al comparar estas preparaciones encontraron que la actividad de la preparación fosforilada era levemente inferior que la de preparación pobremente fosforilada y que los valores de K_M para los sustratos eran similares, a excepción del K_M para el PEP que se duplicaba [166]. Sin embargo, al tratarse de enzimas purificadas a partir de fuente, las diferencias observadas podrían deberse a que las preparaciones obtenidas por los autores corresponden a una mezcla de la enzima fosforilada y no fosforilada, o bien que se encuentre fosforilada en residuos diferentes a los que analizamos en esta Tesis.

Al analizar la respuesta a los efectores alostéricos, encontramos que ambas mutantes fosfomiméticas de la *AthPEPCKasa1* eran incapaces de responder a los mismos, a excepción de la inhibición por PPi (Figura 49). En el caso de la Glc-6P se observa un patrón de inhibición; sin embargo, el valor de $I_{0,5}$ se encontraría por fuera del rango de concentraciones analizados y sería muy superior al determinado para la enzima salvaje. Este resultado estaría en línea con lo encontrado para la PEPCKasa, para la cual la fosforilación disminuye la sensibilidad a los efectores alostéricos, mientras que aumenta la afinidad para el PEP y la sensibilidad a los activadores [341]. La gran cantidad de sitios en los cuales se fosforila la *AthPEPCKasa* demuestra que la regulación es altamente compleja y, probablemente, funcione de forma cruzada con los distintos mecanismos que regulan a estas enzimas. De hecho, para la PEPCKasa de maíz, se estudiaron *in vivo* por espectrometría de masas la cinética de fosforilación de 4 sitios ante diferentes condiciones de iluminación. De esta forma, se observó que el patrón de fosforilación se modificaba al mover a las plantas de la luz a la oscuridad [234]. Un resultado similar se obtuvo en estudios de fosfoproteómica de Arabidopsis tratadas con flg22, en la cual se observó que aumentó la fosforilación de Thr-122 y disminuyó la de Ser-62

y Thr-66 [398, 399]. Esto indicaría que los diferentes residuos que se fosforilan en la enzima responderían a las necesidades momentáneas de la célula, lo cual estaría relacionado con las diferentes funciones en las cuales intervienen las *Ath*PEPCKasas. Además, la fosforilación probablemente regule la degradación proteolítica o la interacción de las *Ath*PEPCKasas con proteínas del tipo 14-3-3.

5.6 Regulación de la *Ath*PEPCKasa1 por óxido-reducción.

Las especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}), tienen un rol esencial en varias funciones fisiológicas y procesos del desarrollo. En plantas, las ROS se producen en bajos niveles como un subproducto del metabolismo. Sin embargo, ante determinadas condiciones de estrés biótico y abiótico se genera una rápida producción de ROS, lo que se conoce como estallido oxidativo [403]. La modificación oxidativa de las proteínas es una de las formas por las cuales se puede modificar la respuesta de las plantas al estrés oxidativo. Estas modificaciones pueden ocurrir por la formación de puentes disulfuros, la glutationilación y la nitrosilación [66, 403].

La sospecha de que la PEPCKasa podría estar sometida a mecanismos de regulación por óxido-reducción surgió de que, en estudios previos, se determinó la necesidad de esta enzima de agentes reductores en el medio de reacción y conservación para mantener la actividad tanto en extractos crudos como en la enzima purificada de fuente [97, 114, 158, 322]. Esta pérdida de la actividad era reversible, puesto que al incubar a la enzima oxidada con DTT se recuperaba nuevamente la actividad [97, 322]. Al realizar curvas de H_2O_2 en función del tiempo y de la concentración de agente, calculamos un valor de la constante de segundo orden de $5,87 M^{-1}.s^{-1}$ para la *Ath*PEPCKasa1. Este valor es intermedio de aquellos informados para otras enzimas reguladas por procesos de óxido-reducción. Es marcadamente inferior al valor de $115 M^{-1}.s^{-1}$ determinado para la Ga3PDHasa de trigo, una enzima extremadamente sensible a la oxidación [226]. Sin embargo, el parámetro determinado para la *Ath*PEPCKasa1 es mayor que los $0,033 M^{-1}.s^{-1}$ y $1,9 M^{-1}.s^{-1}$ determinados para la Ald6PRasa de durazno y la np-Ga3PDHasa de trigo, respectivamente [176, 203]. Esto nos estaría indicando que la *Ath*PEPCKasa1 sería una enzima con una sensibilidad intermedia a los agentes oxidantes.

Por otra parte, encontramos que el tratamiento por H_2O_2 gatilla la formación de un puente disulfuro entre dos subunidades, un mecanismo de regulación descrito para las enzimas del CBCB [66, 404–406] y las ADP-GlcPPasas localizadas en los tejidos fotosintéticos [37, 297, 407, 408]. Además, estos resultados estuvieron en línea con lo determinado por Liu y col. [403] los cuales analizaron con una técnica de espectrometría de masas denominada OxiTRAQ, el repertorio de proteínas sensibles a los cambios redox en cultivos de células de *Arabidopsis* tratadas o no con H_2O_2 . En este trabajo se determinó que la *Ath*PEPCKasa1 sería levemente sensible al tratamiento con H_2O_2 [403]. Cabe aclarar que, hasta el momento

no se ha descrito la regulación de las PEPCKasas de plantas por mecanismos de óxido-reducción. En la bibliografía existe el antecedente de regulación por óxido-reducción de las ATP-PEPCKasa de *S. cerevisiae* [409, 410] y de las GTP-PEPCKasas rata [410, 411] y de *Mycobacterium tuberculosis* [123]. Sin embargo, existe baja identidad de secuencias entre estas proteínas y los residuos de Cys responsables de la regulación no están presentes en la *Ath*PEPCKasa1. Esta sería una línea de investigación relevante, dada la importancia que tienen la modificación por óxido-reducción para las enzimas involucradas en la glucólisis y el metabolismo respiratorio [274, 412].

5.7 Caracterización de las ProtKasas involucradas en la fosforilación de las enzimas en estudio.

5.7.1 Caracterización de las ProtKasas *Ath*SnRK1 y *Mdo*SOS2.

La regulación alostérica de las ProtKasas de la familia SnRK1 sigue siendo una materia sujeta a intensos debates en la literatura [280, 296, 299, 413–415]. En el presente trabajo de Tesis decidimos utilizar la estrategia recombinante para producir las diferentes subunidades de estas enzimas en *E. coli*, de forma de obtener diferentes combinaciones oligoméricas y estudiar la regulación de cada una por separado. Si bien las subunidades regulatorias β y γ de estas ProtKasas se expresaron de forma insoluble, logramos expresar y purificar las subunidades catalíticas α de forma activa. Otros autores también emplearon la estrategia de expresión recombinante de las subunidades α catalíticas de estas ProtKasas en *E. coli* fusionadas a MBP y obtuvieron niveles de expresión y pureza similares a los obtenidos por nosotros [191]. La única estrategia que hasta el momento ha permitido producir y purificar oligómeros de estas ProtKasas es la llevada a cabo por Shane y col. [416], que emplearon cultivos de células animales. De esta manera los autores determinaron que la subunidad γ no formaría parte de los trímeros de las SnRK1, lo cual resultaría en la formación de seis isoenzimas diferentes ($\alpha_x\beta_y\beta\gamma$, donde $x = 1$ o 2 , $y = 1, 2$ o 3).

Los valores de actividad obtenidos para *Ath*AKIN10-T198D estuvieron de acuerdo con el valor de $2,5 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ para esta misma ProtKasa fusionada a MBP [191], pero menor que los $7,21 \text{ mU}\cdot\text{mg}^{-1}$ obtenidos en extractos crudos de *Arabidopsis* [294]. Esta diferencia podría deberse a un aumento en la actividad debido a la formación del oligómero, o bien a la presencia de otras ProtKasas con similar preferencia de sustrato en el extracto. Cabe aclarar que, en plantas, la familia de ProtKasas homólogas a las AMPK se ha expandido en la familia SnRK1, SnRK2 y SnRK3, con numerosos miembros dentro de cada familia [278]. Con respecto al K_M obtenido para el ATP, el valor que determinamos estaba de acuerdo con el valor de $139 \mu\text{M}$ obtenido en extractos de *Arabidopsis* [294]. Por otra parte, la menor actividad observada para *Ath*AKIN11-T176D, también fue observada por otros autores [191]. Al analizar diferentes metabolitos como efectores de estas ProtKasas, observamos que ambas eran inhibidas fuertemente por AMP y ADP, probablemente debido a la

competencia con el sustrato ATP [416]. En general, *AthAKIN11-T176D* respondió más a los efectores que *AthAKIN10-T198D*, en especial a la Tre-6P, Glc-6P, Fru-6P, y el 3-PGA.

Con respecto a la *MdoSOS2-T168D*, la misma también pudo ser expresada en *E. coli* y obtenida de forma activa. La función de esta proteína en la cascada de señalización frente al estrés salino había sido determinada mediante la complementación de las mutantes *sos2* de *Arabidopsis* [417]. Además, al expresar este gen de forma constitutiva en callos de manzano se adquirió tolerancia al estrés salino [417]. Sin embargo, hasta el momento no se había analizado su actividad ProtKasa y se desconocen sus blancos moleculares. Esta ProtKasa al poseer una mutación fosfomimética en el sitio de activación Thr-168, fue constitutivamente activa e independiente de la proteína SOS3 para su actividad. Además, esta enzima presentó actividad de autofosforilación, en un residuo hasta el momento desconocido, y de transfosforilación, hacia el péptido AMARA (Figura 60). La actividad determinada para esta ProtKasa está de acuerdo con lo descrito para la mutante fosfomimética de *Arabidopsis*, la cual presentó un valor de 4,5 mU.mg⁻¹ al ser caracterizada en las mismas condiciones empleadas en esta tesis, pero empleando un péptido levemente diferente [306]. Con respecto al valor de K_M para el ATP, el mismo fue similar al determinado para la enzima de *Arabidopsis* de 3 μ M. Al analizar la posible regulación alostérica de esta ProtKasa, no observamos ningún efecto con los metabolitos analizados. Solamente encontramos una inhibición fuerte con el ADP y el AMP, probablemente debido a la competencia con el ATP.

Las ProtKasas analizadas, nos sirvieron para determinar la fosforilación *in vitro* de dos enzimas estudiadas en nuestro grupo de trabajo. En el caso de la *PpeA6PRasa*, observamos que podría ser fosforilada por las ProtKasas *StuCDPK1* y *MdoSOS2*, probablemente en sitios diferentes debido al efecto sinérgico observado al fosforilarla con ambas ProtKasas. Debido a una serie de limitaciones técnicas, aún no hemos podido determinar por espectrometría de masas los sitios en los cuales ocurre la fosforilación. La fosforilación de esta enzima por la *MdoSOS2* podría estar relacionada a la respuesta frente al estrés oxidativo, debido a la importancia que tienen los azúcares alcoholes en esta situación [176]. Además de la función descrita ante situaciones de estrés salino, se ha sugerido que la SOS2 podrían tener funciones en las cascadas de señalización por especies reactivas del oxígeno. Esto se debe a que en *Arabidopsis* esta ProtKasa interacciona con las catalasas 2 y 3 (CAT2 y 3) y con la nucleósido difosfato quinasa, las cuales son efectores relacionados al combate del estrés oxidativo [418]. Por otra parte, también observamos que tanto la *StuCDPK1* como la *MdoSOS2* pueden fosforilar la subunidad L de la *TaeADP-GlcPPasa* [44, 309], subunidad que tiene una función regulatoria de la actividad catalítica de la subunidad S de la enzima.

5.7.2 Desarrollo de un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa.

La fosforilación de proteínas es una modificación postraduccional que regula prácticamente todos los aspectos de la función celular [311, 312], por lo cual son intensamente estudiadas [314]. El ensayo

radiactivo fue el primer método empleado para medir la actividad ProtKasa y es considerado el patrón de oro debido a su alta sensibilidad y robustez [204–206, 419]. Como desventaja, consume mucho tiempo y genera desechos radiactivos. Además, es poco preciso cuando se emplean proteínas nativas como sustratos [420] y es inadecuado para estudiar la fosforilación de Tyr [421, 422]. Los métodos no radiactivos para medir actividad ProtKasa pueden ser ampliamente clasificados en aquellos que dependen de un sustrato peptídico particular [293, 423, 424] y aquellos que cuantifican el ADP directamente o indirectamente con un sistema acoplado [207, 419, 425, 426]. Entre los métodos para cuantificar el ADP, el único lo que detecta directamente es el inmunoensayo *Transcreener® ADP² Kinase Assay* (Bell Brook Labs), el cual es altamente sensible pero también muy costoso. Los métodos acoplados se basan en el uso de enzimas para detectar los productos de la reacción de fosforilación, siendo el ADP-Glo (Promega) el principal ensayo de este tipo disponible en el mercado. El mismo cuantifica el ADP liberado empleando un tándem enzimático para generar una reacción luminiscente. Este reactivo es altamente sensible pero también es costoso y sensible a los compuestos que inhiben la reacción de la luciferasa [207, 427].

Nosotros adaptamos el tándem enzimático PyrKasa/LDHasa para ensayar la actividad ProtKasa [419]. El ADP liberado es convertido en NAD⁺, el cual podría ser cuantificado mediante una disminución en la absorbancia a 340 nm [419, 428]. Sin embargo, la sensibilidad de este método no era la adecuada debido a la relativamente baja actividad que presentan, por lo general, las ProtKasas [315]. Es por esto que, para aumentar la sensibilidad de la detección del NAD⁺, empleamos la propiedad que tienen los dinucleótidos de adenina de formar compuestos fluorescentes luego del tratamiento con álcali fuerte, lo cual aumenta exponencialmente la sensibilidad de detección. El proceso de formación de estos derivados alcalinos fue inicialmente descrito por Kaplan y col. [317] y luego adoptado por otros autores para diferentes usos [318, 319].

Para evaluar el funcionamiento de este método, caracterizamos a la *Stu*CDPK1 empleando en paralelo tres métodos de medida diferentes, uno radiactivo, otro luminiscente y el fluorescente. De esta forma, obtuvimos parámetros cinéticos que estuvieron de acuerdo entre los tres métodos y con los reportados en la literatura para otras CDPKs [429–434]. Estos resultados muestran que el método puede ser empleado en el ensayo de ProtKasas sin el uso de ATP radiactivo y con cualquier tipo de sustrato, teniendo la ventaja adicional de ser de bajo costo e inocuo para el medio ambiente. Además, la alta sensibilidad permite realizar las reacciones en pequeños volúmenes, ya sea con péptidos o proteínas como sustratos. Esto último es de gran interés puesto que se ha descrito que las ProtKasas fosforilan a las proteínas de forma más eficiente que los péptidos artificiales [313]. Otra ventaja de colocar a la PyrKasa en el medio de reacción es que el ADP liberado es reciclado nuevamente a ATP, manteniendo constante la concentración de este sustrato [435], lo cual asegura mantener condiciones de velocidad inicial a lo largo de la reacción y evita la

acumulación de ADP, que puede inhibir a la ProtKasa [435, 436]. La principal desventaja de nuestro método es que no puede ser empleado para medir de forma segura la actividad ProtKasa en extractos crudos. Esto se debe a la presencia de ATPasas y fosfatasas no específicas, las cuales liberan ADP y por lo tanto aumentan los blancos de reacción [15]. Tampoco podría utilizarse para analizar ProtKasas que tengan constantes de Michaelis que estén por debajo del límite de detección [437]. Sin embargo, este método podría ser de gran ayuda en la caracterización de ProtKasas a un costo significativamente menor que el método radiactivo y el ADP-Glo. También, este método puede aplicarse a otras enzimas que liberen ADP o GDP, de forma de ampliar el espectro de reacciones a analizar, de forma similar a lo que hicimos para medir la actividad PEPCKasa.

6. Conclusiones.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis nos han permitido arribar a las siguientes conclusiones:

- Realizamos el clonado, la expresión heteróloga en *E. coli* y la purificación a homogeneidad electroforética de las *AthPEPCK*asas. Este primer paso fue muy importante para llevar a cabo un estudio detallado de estas enzimas involucradas en el metabolismo del PEP y que tienen abundantes roles fisiológicos en las plantas.
- La reacción catalizada por las *AthPEPCK*asas es totalmente reversible *in vitro*, sin embargo, catalizan preferentemente la descarboxilación del OAA a PEP. Este resultado está de acuerdo con el rol de esta enzima en la gluconeogénesis, canalizando el carbono proveniente de la degradación de los AGs de reserva para la síntesis de azúcares que alimentarán a la plántula hasta el desarrollo del aparato fotosintético.
- Las *AthPEPCK*asas se expresan en numerosos tejidos, especialmente durante la estratificación y germinación de las semillas y en órganos florales, donde la actividad gluconeogénica es esencial. Al medir la actividad de ambas proteínas, determinamos que la *AthPEPCK*asa2 es más activa que la *AthPEPCK*asa1. Sin embargo, la *AthPEPCK*asa1 es la principal isoforma expresada *in vivo* y sobre la que se han centrado la mayoría de los estudios previos y los realizados en este trabajo de Tesis. Esto se debe principalmente al defecto que genera su mutación en la germinación y el posterior crecimiento de las plántulas.
- Ambas enzimas requieren de los iones metálicos para su óptima actividad, el Mn^{2+} activa fuertemente a la enzima mientras que el Mg^{2+} lo hace de forma discreta, estando este último involucrado en la activación del sustrato nucleotídico. Si bien tradicionalmente esta enzima era ensayada con concentraciones milimolares de Mn^{2+} en el medio de reacción, en este trabajo de Tesis propusimos una condición fisiológica de medida en la cual este metal se mantuvo en el rango micromolar, en línea con lo realizado previamente por otros autores.
- Las *AthPEPCK*asas poseen una estructura homohexamérica y el extremo N de cada monómero comprende un dominio intrínsecamente desordenado, que sería clave en la regulación de la enzima por mecanismos postraduccionales.

- Ambas enzimas son reguladas alostéricamente por intermediarios claves del metabolismo primario. En general, la *AthPEPCKasa1* es más sensible a los efectores que la *AthPEPCKasa2*. Algunos de los efectores, como la Glc-6P y el malato participarían en la regulación cruzada de esta enzima con la PEPKasa y la PyrKasa de forma de evitar *in vivo* la ocurrencia de ciclos fútiles. Además, la inhibición por el 3-PGA, podría regular a la enzima ante la transición hacia el metabolismo autotrófico.
- La *AthPEPCKasa1* interacciona *in vivo* con una serie de dipéptidos H-P, que son intermediarios de los procesos de proteólisis. Estos dipéptidos inhiben *in vitro* a la *AthPEPCKasa1* recombinante como así también a la actividad PEPCKasa en extractos crudos de *Arabidopsis*. Esta inhibición podría actuar como un mecanismo de señalización de la tasa de proteólisis durante la germinación de las semillas, de forma de canalizar el flujo a través de la PPDKasa.
- Para estudiar *in vivo* a la *AthPEPCKasa1*, produjimos un antisuero policlonal específico contra esta enzima. Con esta herramienta, y mediante el empleo de extracciones desnaturalizantes de proteínas, determinamos que la *AthPEPCKasa1* es la principal isoforma detectada durante la germinación de las semillas. Además, encontramos que la misma es proteolizada durante la germinación, generándose isoformas de menor masa molecular. El pico de proteólisis coincidía con el de mayor expresión y actividad de la enzima.
- Estudios previos demostraron que el corte del extremo N de la *AthPEPCKasa1* por *AthMC9* genera dos formas truncas ($\Delta 19$ y $\Delta 101$). Construimos estas mutantes cortas por mutagénesis y las expresamos de forma recombinante de la misma manera que lo realizado para la enzima completa. Estas isoformas fueron activas y mantuvieron la estructura homohexamérica. Sin embargo, mostraron un aumento en la actividad carboxilasa y una respuesta alterada a los efectores alostéricos, perdiendo la inhibición por Glc-6P y la activación por malato. Proponemos que las isoformas de menor masa generadas podrían participar en otras funciones no relacionadas con la gluconeogénesis, por ejemplo, las reacciones catapleróticas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos.
- El tratamiento de semillas en germinación con el inhibidor de proteasoma MG132 provoca una acumulación de la *AthPEPCKasa1*, lo cual sugiere un mecanismo de proteólisis mediado por el complejo del proteasoma 26S. Además, en este estadio, la *AthPEPCKasa1* es fosforilada y ubiquitinilada.

- El agente oxidante H₂O₂ inactiva a la *AthPEPCK*_{Kas1}. Determinamos una constante de segundo orden que se correspondería con una regulación *in vivo* por mecanismos de óxido-reducción. Además, el tratamiento con H₂O₂ genera la formación de un puente disulfuro entre dos subunidades.
- La *AthPEPCK*_{Kas1} es fosforilada en múltiples residuos de Ser y Thr, probablemente por varias ProtKasas. Mutantes fosfomiméticas en los residuos Ser-62 y Thr-66 generaron enzimas más activas, que no responden a los inhibidores de la misma manera que la enzima no fosforilada.
- Realizamos el clonado, la expresión recombinante y la purificación de a las ProtKasas *AthSnRK1*, *StuCDPK1* y *MdoSOS2*. Ambas fueron activas y se pudieron caracterizar respecto a sus parámetros cinéticos. Estas ProtKasas se emplearon para fosforilar *in vitro* a la *PpeAld6PR*_{asa} y la *TaeADP-GlcPP*_{asa}, de forma de descubrir nuevos mecanismos regulatorios sobre estas enzimas.
- Se desarrolló un método fluorométrico para medir actividad ProtKasa, el cual es económico y no depende del empleo de sustancias radioactivas. Con este método, realizamos la caracterización de la *StuCDPK1*, determinando una buena equivalencia con el método radiactivo tradicional y con un reactivo luminiscente comercial.

En su conjunto, consideramos que los resultados de esta Tesis proporcionan un aporte al entendimiento de la relación estructura/función y la regulación de enzimas que participan en la gluconeogénesis y en la síntesis de los azúcares alcoholes. En particular, en lo que respecta a los mecanismos de regulación postraduccionales del metabolismo primario, donde analizamos no solo las enzimas que llevan a cabo la modificación, sino también los efectos de la modificación sobre las proteínas blanco.

7. Referencias.

- [1] DL Nelson, MM Cox (2013) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th ed. Freeman.
- [2] CM Figueroa, C V Piattoni, KEJ Tripodi, FE Podestá, AA Iglesias (2016) Carbon Photoassimilation and photosynthate partitioning in plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, 3rd ed., (Ed.: M Pessaraki) Taylor and Francis Group.
- [3] C V Piattoni, CM Figueroa, VE Perotti, FE Podestá, AA Iglesias (2014) Biochemistry and physiology of carbon partitioning in crop plants, En: *Handbook of Plant and Crop Physiology*, 3rd ed., (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, p. 193–216.
- [4] K Biel, I Fomina (2015) Benson-Bassham-Calvin cycle contribution to the organic life on our planet. *Photosynthetica* 53 (2) p. 161–167.
- [5] J Bryce, S Hill (1999) Energy Production in Plant Cells, En: *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd ed., (Ed.: P Lea, RC Leegood) Wiley, p. 384.
- [6] L Taiz, E Zeiger (2010) *Plant physiology*, 5th ed. 15 (3). Sinauer Associates.
- [7] JA Bassham, AA Benson, LD Kay, AZ Harris, AT Wilson, M Calvin (1954) The Path of Carbon in Photosynthesis. XXI. The Cyclic Regeneration of Carbon Dioxide Acceptor. *J. Am. Chem. Soc.* 76 (7) p. 1760–1770.
- [8] TD Sharkey (2019) Discovery of the canonical Calvin–Benson cycle. *Photosynth. Res.* 140 (2) p. 235–252.
- [9] O Fernandez, H Ishihara, GM George, V Mengin, A Flis, D Sumner, S Arrivault, R Feil, JE Lunn, SC Zeeman, AM Smith, M Stitt (2017) Foliar starch turnover occurs in long days and in falling light at the end of the day. *Plant Physiol.* 174 (4) p. 2199–2212.
- [10] A Scialdone, ST Mugford, D Feike, A Skeffington, P Borrill, A Graf, AM Smith, M Howard (2013) Arabidopsis plants perform arithmetic division to prevent starvation at night. *Elife* 2 p. e00669.
- [11] AA Iglesias (1990) On the metabolism of triose-phosphates in photosynthetic cells. Their involvement on the traffic of ATP and NADPH. *Biochem. Educ.* 18 (1) p. 2–5.
- [12] RG Walters, DG Ibrahim, P Horton, NJ Kruger (2004) A mutant of Arabidopsis lacking the triose-phosphate/phosphate translocator reveals metabolic regulation of starch breakdown in the light. *Plant Physiol.* 135 (2) p. 891–906.
- [13] RE Häusler, NH Schlieben, B Schulz, UI Flügge (1998) Compensation of decreased triose phosphate/phosphate translocator activity by accelerated starch turnover and glucose transport in transgenic tobacco. *Planta* 204 (3) p. 366–376.
- [14] GJ Kelly, M Gibbs (1973) Nonreversible d-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase of Plant Tissues. *Plant Physiol.* 52 (2) p. 111–118.
- [15] GJ Kelly, M Gibbs (1973) A mechanism for the indirect transfer of photosynthetically reduced

- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate from chloroplasts to the cytoplasm. *Plant Physiol.* 52 (6) p. 674–676.
- [16] T Robert (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40 p. 119–138.
- [17] S Lalonde, D Wipf, WB Frommer (2004) Transport Mechanisms for Organic Forms of Carbon and Nitrogen Between Source and Sink. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (1) p. 341–372.
- [18] AA Iglesias, FE Podestá (2005) Photosynthate formation and partitioning in crop plants, En: *Handbook of Photosynthesis*, 2nd ed., (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, p. 525–546.
- [19] T Avin-Wittenberg, K Bajdzienko, G Wittenberg, S Alseekh, T Tohge, R Bock, P Giavalisco, AR Fernie (2015) Global analysis of the role of autophagy in cellular metabolism and energy homeostasis in arabidopsis seedlings under carbon starvation. *Plant Cell* 27 (2) p. 306–322.
- [20] BE Rojas, MD Hartman, CM Figueroa, L Leaden, FE Podestá, AA Iglesias (2019) Biochemical characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 476 p. 2939–2952.
- [21] JE Lunn (2016) Sucrose metabolism., En: *eLS*, John Wiley & Sons, Ltd.
- [22] S Sengupta, S Mukherjee, P Basak, AL Majumder (2015) Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. *Front. Plant Sci.* 6 p. 656.
- [23] BE Rojas, CM Figueroa, AA Iglesias (2020) Carbon Assimilation and Partitioning in Crop Plants: A biochemical and physiological view, En: *Handbook of plant and crop physiology*, 4th ed., (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, Taylor & Francis Publishing Group. In press.
- [24] C Zhang, R Turgeon (2018) Mechanisms of phloem loading. *Curr. Opin. Plant Biol.* 43 p. 71–75.
- [25] IA Graham (2008) Seed Storage Oil Mobilization. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (1) p. 115–142.
- [26] AL Quettier, PJ Eastmond (2009) Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiol. Biochem.* 47 (6) p. 485–490.
- [27] WC Plaxton (1996) The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1) p. 185–214.
- [28] C Givan (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol. Rev.* 74 p. 277–309.
- [29] WC Plaxton (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 p. 185–214.
- [30] WC Plaxton, FE Podestá (2006) The Functional Organization and Control of Plant Respiration. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 25 (2) p. 159–198.
- [31] SC Hardin, GQ Tang, A Scholz, D Holtgraewe, H Winter, SC Huber (2003) Phosphorylation of sucrose synthase at serine 170: Occurrence and possible role as a signal for proteolysis. *Plant J.* 35

- (5) p. 588–603.
- [32] SC Huber, JL Huber (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47 (1) p. 431–444.
- [33] RJ Muchut, C V Piattoni, E Margarit, KEJ Tripodi, FE Podestá, AA Iglesias (2019) Heterologous expression and kinetic characterization of the α β and $\alpha\beta$ blend of the PPI-dependent phosphofructokinase from *Citrus sinensis*. *Plant Sci.* 280 p. 348–354.
- [34] ME Theodorou, WC Plaxton (1993) Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101 (2) p. 339–344.
- [35] M Tegeder, APM Weber (2006) Metabolite Transporters in the Control of Plant Primary Metabolism, En: *Annual Plant Reviews*, 22, (Ed.: JA Roberts) p. 85–120.
- [36] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2003) ADP-Glucose Pyrophosphorylase, a Regulatory Enzyme for Bacterial Glycogen Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2) p. 213–225.
- [37] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2004) ADP-glucose pyrophosphorylase: A regulatory enzyme for plant starch synthesis. *Photosynth. Res.* 79 (1) p. 1–24.
- [38] FM Gutiérrez-Luna, EE Hernández-Domínguez, LG Valencia-Turcotte, R Rodríguez-Sotres (2018) Review: “Pyrophosphate and pyrophosphatases in plants, their involvement in stress responses and their possible relationship to secondary metabolism.” *Plant Sci.* 267 (November 2017) p. 11–19.
- [39] GJ MacNeill, S Mehrpouyan, MAA Minow, JA Patterson, IJ Tetlow, MJ Emes (2017) Starch as a source, starch as a sink: The bifunctional role of starch in carbon allocation. *J. Exp. Bot.* 68 (16) p. 4433–4453.
- [40] MA Ballicora, AA Iglesias, J Preiss (2003) ADP-Glucose Pyrophosphorylase, a Regulatory Enzyme for Bacterial Glycogen Synthesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67 (2) p. 213–225.
- [41] A Goren, D Ashlock, IJ Tetlow (2018) Starch formation inside plastids of higher plants. *Protoplasma* 255 (6) p. 1855–1876.
- [42] MA Ballicora, JB Frueauf, Y Fu, P Schürmann, J Preiss (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *J. Biol. Chem.* 275 (2) p. 1315–1320.
- [43] JE Lunn, R Feil, JHM Hendriks, Y Gibon, R Morcuende, D Osuna, WR Scheible, P Carillo, MR Hajirezaei, M Stitt (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 397 (1) p. 139–148.
- [44] DML Ferrero, C V Piattoni, MD Asencion Diez, BE Rojas, MD Hartman, MA Ballicora, AA Iglesias (2020) Phosphorylation of ADP-Glucose Pyrophosphorylase During Wheat Seeds Development. *Front. Plant Sci.* 11 (July) p. 1–11.
- [45] FL Theodoulou, PJ Eastmond (2012) Seed storage oil catabolism: A story of give and take. *Curr.*

- Opin. Plant Biol.* 15 (3) p. 322–328.
- [46] S Baud, L Lepiniec (2010) Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Prog. Lipid Res.* 49 (3) p. 235–249.
- [47] DJ Murphy (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Prog. Lipid Res.* 32 (3) p. 247–280.
- [48] JT Ting, K Lee, C Ratnayake, KA Platt, RA Balsamo, AH Huang (1996) Oleosin genes in maize kernels having diverse oil contents are constitutively expressed independent of oil contents. Size and shape of intracellular oil bodies are determined by the oleosins/oils ratio. *Planta* 199 (1) p. 158–165.
- [49] JTC Tzen, Y Cao, P Laurent, C Ratnayake, AHC Huang (1993) Lipids, Proteins, and Structure of Seed Oil Bodies from Diverse Species. *Plant Physiol.* 101 (1) p. 267–276.
- [50] JT Tzen, GC Lie, AH Huang (1992) Characterization of the charged components and their topology on the surface of plant seed oil bodies. *J. Biol. Chem.* 267 (22) p. 15626–15634.
- [51] I Cummins, MJ Hills, JH Ross, DH Hobbs, MD Watson, DJ Murphy (1993) Differential, temporal and spatial expression of genes involved in storage oil and oleosin accumulation in developing rapeseed embryos: implications for the role of oleosins and the mechanisms of oil-body formation. *Plant Mol. Biol.* 23 (5) p. 1015–1027.
- [52] O Leprince, AC Van Aelst, HW Pritchard, DJ Murphy (1997) Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low-temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and-sensitive oilseeds. *Planta* 204 (1) p. 109–119.
- [53] H Zhang, L Gannon, KL Hassall, MJ Deery, DJ Gibbs, MJ Holdsworth, RAL van der Hoorn, KS Lilley, FL Theodoulou (2018) N-terminomics reveals control of Arabidopsis seed storage proteins and proteases by the Arg/N-end rule pathway. *New Phytol.* 218 (3) p. 1106–1126.
- [54] FL Theodoulou, PJ Eastmond (2012) Seed storage oil catabolism: A story of give and take. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15 p. 322–328.
- [55] PJ Eastmond (2006) SUGAR-DEPENDENT1 encodes a patatin domain triacylglycerol lipase that initiates storage oil breakdown in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 18 (3) p. 665–675.
- [56] AA Kelly, A-L Quettier, E Shaw, PJ Eastmond (2011) Seed storage oil mobilization is important but not essential for germination or seedling establishment in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157 (2) p. 866–875.
- [57] PK Stumpf (1955) Fat Metabolism in Higher Plants. III. Enzymatic Oxidation of Glycerol. *Plant Physiol.* 30 (1) p. 55–58.
- [58] H Beevers (1956) Utilization of Glycerol in the Tissues of the Castor Bean Seedling. *Plant Physiol.* 31 (6) p. 440–445.
- [59] PJ Eastmond (2004) Glycerol-insensitive Arabidopsis mutants : gli1 seedlings lack glycerol kinase ,

- accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *Plant J.* 37 p. 617–625.
- [60] W Shen, Y Wei, M Dauk, Z Zheng, J Zou (2003) Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: Evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants. *FEBS Lett.* 536 (1–3) p. 92–96.
- [61] A Baker, IA Graham, M Holdsworth, SM Smith, FL Theodoulou (2006) Chewing the fat: β -oxidation in signalling and development. *Trends Plant Sci.* 11 (3) p. 124–132.
- [62] M Fulda, J Schnurr, A Abbadi, E Heinz, J Browse (2004) Peroxisomal Acyl-CoA Synthetase Activity Is Essential for Seedling Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 16 (2) p. 393–405.
- [63] MA Hooks, F Kellas, IA Graham (1999) Long-chain acyl-CoA oxidases of *Arabidopsis*. *Plant J.* 20 (1) p. 1–13.
- [64] BE Froman, PC Edwards, AG Bursch, K Dehesh (2000) ACX3, a novel medium-chain acyl-coenzyme A oxidase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 123 (2) p. 733–741.
- [65] S Arent, CE Christensen, VE Pye, A Nørgaard, A Henriksen (2010) The multifunctional protein in peroxisomal β -oxidation: Structure and substrate specificity of the *Arabidopsis thaliana* protein MFP2. *J. Biol. Chem.* 285 (31) p. 24066–24077.
- [66] DG Arias, C V Piattoni, SA Guerrero, AA Iglesias (2011) Biochemical Mechanisms for the Maintenance of Oxidative Stress under Control in Plants, En: *Handbook of Plant and Crop Stress*, 3rd ed., (Ed.: M Pessarakli) CRC Taylor & Francis Group, p. 157–190.
- [67] VD Antonenkov, RT Sormunen, JK Hiltunen (2004) The rat liver peroxisomal membrane forms a permeability barrier for cofactors but not for small metabolites *in vitro*. *J. Cell Sci.* 117 (23) p. 5633–5642.
- [68] S Reumann, APM Weber (2006) Plant peroxisomes respire in the light: Some gaps of the photorespiratory C_2 cycle have become filled-Others remain. *Biochim. Biophys. Acta* 1763 (12) p. 1496–1510.
- [69] CW van Roermund, Y Elgersma, N Singh, RJ Wanders, HF Tabak (1995) The membrane of peroxisomes in *Saccharomyces cerevisiae* is impermeable to NAD(H) and acetyl-CoA under *in vivo* conditions. *EMBO J.* 14 (14) p. 3480–3486.
- [70] IJ Mettler, H Beevers (1980) Oxidation of NADH in Glyoxysomes by a Malate-Aspartate Shuttle. *Plant Physiol.* 66 (4) p. 555–560.
- [71] HL Kornberg, H Beevers (1957) A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* 180 p. 35–36.
- [72] PJ Eastmond, IA Graham (2001) Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6 (2) p. 72–78.

- [73] S Penfield, EL Rylott, AD Gilday, S Graham, R Tony, S Penfield, L Rylott, AD Gilday, S Graham, TR Larson, A Graham (2004) Reserve Mobilization in the Arabidopsis Endosperm Fuels Hypocotyl Elongation in the Dark , Is Independent of Abscisic Acid , and Requires PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE1. *Plant Cell* 16 (10) p. 2705–2718.
- [74] EL Rylott, AD Gilday, I a Graham (2003) The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment. *Plant Physiol.* 131 (4) p. 1834–1842.
- [75] PJ Eastmond, HM Astley, K Parsley, S Aubry, BP Williams, GN Menard, CP Craddock, A Nunes-Nesi, AR Fernie, JM Hibberd (2015) Arabidopsis uses two gluconeogenic gateways for organic acids to fuel seedling establishment. *Nat. Commun.* 6 p. 6659.
- [76] Y Chiba, R Kamikawa, K Nakada-Tsukui, Y Saito-Nakano, T Nozaki (2015) Discovery of PPi-type Phosphoenolpyruvate Carboxykinase genes in Eukaryotes and Bacteria. *J. Biol. Chem.* 290 (39) p. 23960–23970.
- [77] DD Davies (1979) The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 30 p. 131–158.
- [78] WC Plaxton, B O’Leary (2012) The central role of phosphoenolpyruvate metabolism in developing oil seeds, En: *Seed development: OMICS technologies toward improvement of seed quality and crop yield*, (Ed.: G Agrawal, R Rakwal) Springer, p. 1–576.
- [79] RE Häusler, JA Holtum, E Latzko (1989) Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves. I. Purification, characteristics, and regulation. *Plant Physiol.* 90 (4) p. 1498–1505.
- [80] GBG Moorhead, WC Plaxton (1990) Purification and characterization of cytosolic aldolase from carrot storage root. *Biochem. J.* 269 (1) p. 133–139.
- [81] FC Botha, MM O’Kennedy (1989) Characterization of the Cytosolic Aldolase from Germinating *Phaseolus vulgaris* Seeds. *J. Plant Physiol.* 135 (4) p. 433–438.
- [82] KR Hanson (1966) Applications of the Sequence Rule. I. Naming the Paired Ligands g,g at a Tetrahedral Atom Xggij. II. Naming the Two Faces of a Trigonal Atom Yghi. *J. Am. Chem. Soc.* 88 (12) p. 2731–2742.
- [83] RS Cahn, C Ingold, V Prelog (1966) Specification of Molecular Chirality. *Angew. Chemie Int. Ed. English* 5 (4) p. 385–415.
- [84] RA Irwin, HR Kenneth (1972) Enzyme reaction stereospecificity: a critical review. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 1 (1) p. 33–57.
- [85] A Matte, LW Tari, H Goldie, LTJ Delbaere (1997) Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J. Biol. Chem.* 272 (13) p. 8105–8108.
- [86] TA Johnson, MJ McLeod, T Holyoak (2016) Utilization of Substrate Intrinsic Binding Energy for

- Conformational Change and Catalytic Function in Phosphoenolpyruvate Carboxykinase. *Biochemistry* 55 (3) p. 575–587.
- [87] T Holyoak, SM Sullivan, T Nowak (2006) Structural insights into the mechanism of PEPCK catalysis. *Biochemistry* 45 (27) p. 8254–8263.
- [88] M O'Leary (1992) Catalytic strategies in enzymic carboxylation and decarboxylation. *Enzym.* 20 p. 235–269.
- [89] MV Encinas, LR Olsen, JF Díaz, JM Andreu, H Goldie, E Cardemil (1995) Circular dichroism and fourier transform infrared spectroscopic studies on the secondary structure of *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate carboxykinases. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1252 (1) p. 23–27.
- [90] AM Jabalquinto, E Cardemil (1993) The kinetic mechanism of yeast phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1161 (1) p. 85–90.
- [91] W Fukuda, T Fukui, H Atomi, T Imanaka (2004) First characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol.* 186 (14) p. 4620–4627.
- [92] S Aich, LTJ Delbaere (2007) Phylogenetic study of the evolution of PEP-carboxykinase. *Evol. Bioinforma.* 3 (306) p. 333–40.
- [93] PML Siu, HG Wood, RL Stjernholm (1961) Fixation of CO₂ by Phosphoenolpyruvic Carboxytransphosphorylase. *J. Biol. Chem.* 236 (4) p. 21–22.
- [94] Y Chiba, T Miyakawa, Y Shimane, K Takai, M Tanokura, T Nozaki (2019) Structural Comparisons of Phosphoenolpyruvate Carboxykinases Reveal the Evolutionary Trajectories of These Phosphodiester Energy Conversion Enzymes. *J Biol Chem.* 8 (5) p. 19269–19278.
- [95] M Martín, SP Rius, FE Podestá (2011) Two phosphoenolpyruvate carboxykinases coexist in the Crassulacean Acid Metabolism plant *Ananas comosus*. Isolation and characterization of the smaller 65kDa form. *Plant Physiol. Biochem.* 49 (6) p. 646–653.
- [96] RP Walker, RC Leegood (1995) Purification, and phosphorylation *in vivo* and *in vitro*, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Lett.* 362 (1) p. 70–74.
- [97] JN Burnell (1986) Purification and Properties of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from C₄ Plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 13 (5) p. 577–587.
- [98] J Ito, TS Bath, CJ Petzold, AM Redding-Johanson, A Mukhopadhyay, R Verboom, EH Meyer, AH Millar, JL Heazlewood (2011) Analysis of the Arabidopsis cytosolic proteome highlights subcellular partitioning of central plant metabolism. *J. Proteome Res.* 10 (4) p. 1571–1582.
- [99] L Tsiatsiani, E Timmerman, P De Bock, D Vercammen, S Stael, A Staes, M Goethals, T Beunens, P Van Damme, K Gevaert, F Van Breusegem (2013) The Arabidopsis METACASPASE9

- Degradome. *Plant Cell* 25 (August) p. 2831–2847.
- [100] JB Reiskind, G Bowes (1991) The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C₄-like photosynthetic characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (7) p. 2883–2887.
- [101] A Cabello-Pasini, H Swift, GJ Smith, RS Alberte (2001) Phosphoenolpyruvate carboxykinase from the marine diatom *Skeletonema costatum* and the phaeophyte *Laminaria setchellii*. II. Immunological characterization and subcellular localization. *Bot. Mar.* 44 (3) p. 199–207.
- [102] E Pönsgen-Schmidt, T Schneider, U Hammer, A Betz (1988) Comparison of Phosphoenolpyruvate-Carboxykinase from Autotrophically and Heterotrophically Grown Euglena and Its Role during Dark Anaerobiosis. *Plant Physiol.* 86 (2) p. 457–462.
- [103] D Xu, Z Wang, Y Xia, F Shao, W Xia, Y Wei, X Li, X Qian, JH Lee, L Du, Y Zheng, G Lv, J shiun Leu, H Wang, D Xing, T Liang, MC Hung, Z Lu (2020) The gluconeogenic enzyme PCK1 phosphorylates INSIG1/2 for lipogenesis. *Nature* 580 (7804) p. 530–535.
- [104] Z Wang, C Dong (2019) Gluconeogenesis in Cancer: Function and Regulation of PEPCK, FBPase, and G6Pase. *Trends in Cancer* 5 (1) p. 30–45.
- [105] RF Sage (2004) The evolution of C₄ photosynthesis. *New Phytol.* 161 (2) p. 341–370.
- [106] CR John, RD Smith-Unna, H Woodfield, S Covshoff, JM Hibberd (2014) Evolutionary convergence of cell-specific gene expression in independent lineages of C₄ grasses. *Plant Physiol.* 165 (1) p. 62–75.
- [107] IN Forseth (2010) The Ecology of Photosynthetic Pathways. *Nat. Educ. Knowl.* 3 (10) p. 4.
- [108] BP Williams, IG Johnston, S Covshoff, JM Hibberd (2013) Phenotypic landscape inference reveals multiple evolutionary paths to C₄ photosynthesis. *Elife* 2 p. 1–19.
- [109] Y Wang, A Bräutigam, APM Weber, XG Zhu (2014) Three distinct biochemical subtypes of C₄ photosynthesis? A modelling analysis. *J. Exp. Bot.* 65 (13) p. 3567–3578.
- [110] MD Hatch, T Kagawa, S Craig (1975) Subdivision of C₄-Pathway Species Based on Differing C₄ Acid Decarboxylating Systems and Ultrastructural Features. *Funct. Plant Biol.* 2 (2) p. 111–128.
- [111] A Maier, MB Zell, VG Maurino (2011) Malate decarboxylases: Evolution and roles of NAD(P)-ME isoforms in species performing C₄ and C₃ photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 62 (9) p. 3061–3069.
- [112] MD Hatch (1971) The C₄ -pathway of photosynthesis. Evidence for an intermediate pool of carbon dioxide and the identity of the donor C₄ -dicarboxylic acid. *Biochem. J.* 125 (2) p. 425–432.
- [113] S Arrivault, T Obata, M Szcwotka, V Mengin, M Guenther, M Hoehne, AR Fernie, M Stitt (2017) Metabolite pools and carbon flow during C₄ photosynthesis in maize: ¹³CO₂ labeling kinetics and cell type fractionation. *J Exp Bot* 68 (2) p. 283–298.
- [114] RP Walker, RM Acheson, LI Tecsí, RC Leegood (1997) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in C₄

- plants: its role and regulation. *Aust. J. Plant Physiol.* 24 p. 459–468.
- [115] KSR Chapman, MD Hatch (1981) Aspartate Decarboxylation in Bundle Sheath Cells of *Zea mays* and Its Possible Contribution to C₃ Photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* 8 (2) p. 237–248.
- [116] KEJ Trípodí, BE Rojas, AA Iglesias, FE Podestá (2020) CAM Plants as Crops: metabolically flexible, hardy plants for a changing world. En: *Handbook of plant and crop physiology*, 4th ed., (Ed.: M Pessaraki). In press.
- [117] KEJ Trípodí, FE Podestá, CM Figueroa, C V Piattoni, AA Iglesias, VE Perotti (2014) CAM Plants as Crops and Highly Productive Cultivars, En: *Handbook of Plant and Crop Physiology*, 3rd ed., (Ed.: M Pessaraki) CRC Press, Taylor & Francis Group, p. 831–845.
- [118] P Dittrich, WH Campbell, CC Black (1973) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants exhibiting Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Physiol.* 52 (4) p. 357–361.
- [119] H De Vries (1884) Über die periodische Säurebildung der Fettpflanzen. *Bot. Zeitung* 42 (23) p. 354–358.
- [120] J Holtum, C Osmond (1981) The Gluconeogenic Metabolism of Pyruvate During Deacidification in Plants With Crassulacean Acid Metabolism. *Funct. Plant Biol.* 8 (1) p. 31–44.
- [121] M Giordano, J Beardall, JA Raven (2005) CO₂ Concentrating Mechanisms in Algae: Mechanisms, Environmental Modulation, and Evolution. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 (1) p. 99–131.
- [122] JR Reinfelder, AJ Milligan, FMM Morel (2004) The role of the C₄ pathway in carbon accumulation and fixation in a marine diatom. *Plant Physiol.* 135 (4) p. 2106–2111.
- [123] I Machová, M Hubálek, M Lepšík, L Bednářová, M Pazderková, V Kopecký, J Snášel, J Dostál, I Pichová (2017) The role of cysteine residues in catalysis of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* p. 1–12.
- [124] T Yano, N Yoshida, F Yu, M Wakamatsu, H Takagi (2015) The glyoxylate shunt is essential for CO₂-requiring oligotrophic growth of *Rhodococcus erythropolis* N9T-4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (13) p. 5627–5637.
- [125] S-J Chen, X Wu, B Wadas, J-H Oh, A Varshavsky (2017) An N-end rule pathway that recognizes proline and destroys gluconeogenic enzymes. *Science* (80-.). 355 p. eaal3655.
- [126] R Menssen, K Bui, DH Wolf (2018) Regulation of the Gid ubiquitin ligase recognition subunit Gid4. *FEBS Lett.* 592 (19) p. 3286–3294.
- [127] P Latorre-Muro, J Baeza, EA Armstrong, R Hurtado-Guerrero, F Corzana, LE Wu, DA Sinclair, P López-Buesa, JA Carrodeguas, JM Denu (2018) Dynamic Acetylation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Toggles Enzyme Activity between Gluconeogenic and Anaplerotic Reactions. *Mol. Cell* 71 (5) p. 718–732.
- [128] RC Leegood, T Ap Rees (1978) Identification of the regulatory steps in gluconeogenesis in

- cotyledons of *Cucurbita pepo*. *BBA - Gen. Subj.* 542 (1) p. 1–11.
- [129] RC Leegood, T Ap Rees (1978) Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cotyledons of *Cucurbita pepo*. *Biochim. Biophys. Acta - Enzymol.* 524 (1) p. 207–218.
- [130] DJ Kim, SM Smith (1994) Molecular cloning of cucumber phosphoenolpyruvate carboxykinase and developmental regulation of gene expression. *Plant Mol Biol* 26 (1) p. 423–434.
- [131] EL Rylott, M a Hooks, I a Graham (2001) Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Soc. Trans.* 29 p. 283–287.
- [132] M Martín, WC Plaxton, FE Podestá (2007) Activity and concentration of non-proteolyzed phosphoenolpyruvate carboxykinase in the endosperm of germinating castor oil seeds: Effects of anoxia on its activity. *Physiol. Plant.* 130 (4) p. 484–494.
- [133] S Penfield, EL Rylott, AD Gilday, S Graham, TR Larson, IA Graham (2004) Reserve mobilization in the Arabidopsis endosperm fuels hypocotyl elongation in the dark, is independent of abscisic acid, and requires phosphoenolpyruvate carboxykinase1. *Plant Cell* 16 (10) p. 2705–2718.
- [134] C Sweetman, LG Deluc, GR Cramer, CM Ford, KL Soole (2009) Regulation of malate metabolism in grape berry and other developing fruits. *Phytochemistry* 70 (11–12) p. 1329–1344.
- [135] HP Ruffner, WM Kliewer (1975) Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant Physiol.* 56 (1) p. 67–71.
- [136] F Famiani, D Farinelli, A Palliotti, S Moscatello, A Battistelli, RP Walker (2014) Is stored malate the quantitatively most important substrate utilised by respiration and ethanolic fermentation in grape berry pericarp during ripening? *Plant Physiol. Biochem.* 76 p. 52–57.
- [137] FF Robert P. Walker, Andrea Paoletti, Richard C. Leegood (2016) Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in the flesh of fruits. *Plant Physiol. Biochem.* 108 p. 323–327.
- [138] F Famiani, D Farinelli, S Moscatello, A Battistelli, RC Leegood, RP Walker (2016) The contribution of stored malate and citrate to the substrate requirements of metabolism of ripening peach (*Prunus persica* L. Batsch) flesh is negligible. Implications for the occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* 101 p. 33–42.
- [139] YX Huang, YG Yin, A Sanuki, N Fukuda, H Ezura, C Matsukura (2015) Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) deficiency affects the germination, growth and fruit sugar content in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Physiol. Biochem.* 96 p. 417–425.
- [140] S Osorio, JG Vallarino, M Szecowka, S Ufaz, V Tzin, R Angelovici, G Galili, AR Fernie (2013) Alteration of the Interconversion of Pyruvate and Malate in the Plastid or Cytosol of Ripening Tomato Fruit Invokes Diverse Consequences on Sugar But Similar Effects on Cellular Organic Acid, Metabolism, and Transitory Starch Accumulation. *Plant Physiol.* 161 (2) p. 628–643.

- [141] YX Huang, Y Goto, S Nonaka, N Fukuda, H Ezura, C Matsukura (2015) Overexpression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (*S/PEPCK*) promotes soluble sugar accumulation in fruit and post-germination growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant Biotechnol.* 32 (4) p. 281–289.
- [142] S Penfield, S Clements, KJ Bailey, AD Gilday, RC Leegood, JE Gray, IA Graham (2012) Expression and manipulation of PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYKINASE 1 identifies a role for malate metabolism in stomatal closure. *Plant J.* 69 (4) p. 679–688.
- [143] Z-H Chen, RP Walker, RM Acheson, LI Técsi, A Wingler, PJ Lea, RC Leegood (2000) Are Isocitrate Lyase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Involved in Gluconeogenesis during Senescence of Barley Leaves and Cucumber Cotyledons? *Plant Cell Physiol.* 41 (8) p. 960–967.
- [144] ZH Chen, RP Walker, RM Acheson, RC Leegood (2002) Phosphoenolpyruvate carboxykinase assayed at physiological concentrations of metal ions has a high affinity for CO₂. *Plant Physiol.* 128 (1) p. 160–164.
- [145] DS Choi, NH Kim, BK Hwang (2015) The pepper phosphoenolpyruvate carboxykinase *CaPEPCK1* is involved in plant immunity against bacterial and oomycete pathogens. *Plant Mol. Biol.* 89 (1–2) p. 99–111.
- [146] DM Daloso, DB Medeiros, L dos Anjos, T Yoshida, WL Araújo, AR Fernie (2017) Metabolism within the specialized guard cells of plants. *New Phytol.* 216 (4) p. 1018–1033.
- [147] S Robaina-Estévez, DM Daloso, Y Zhang, AR Fernie, Z Nikoloski (2017) Resolving the central metabolism of Arabidopsis guard cells. *Sci. Rep.* 7 (1) p. 1–13.
- [148] EAC MacRobbie, S Kurup (2007) Signalling mechanisms in the regulation of vacuolar ion release in guard cells. *New Phytol.* 175 (4) p. 630–640.
- [149] T Saito, C Matsukura, Y Ban, K Shoji, M Sugiyama, N Fukuda, S Nishimura (2008) Salinity Stress Affects Assimilate Metabolism at the Gene-expression Level during Fruit Development and Improves Fruit Quality in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 77 (1) p. 61–68.
- [150] J Saez-Vasquez, M Raynal, M Delseny (1995) A rapeseed cold-inducible transcript encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Plant Physiol.* 109 (2) p. 611–618.
- [151] OE Owen, SC Kalhan, RW Hanson (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* 277 (34) p. 30409–30412.
- [152] RC Leegood, RP Walker (2003) Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 414 (2) p. 204–210.
- [153] CR Stewart, H Beevers (1967) Gluconeogenesis from Amino Acids in Germinating Castor Bean Endosperm and its Role in Transport to the Embryo. *Plant Physiol.* 42 p. 1587–1595.

- [154] LA Larson, H Beevers (1965) Amino Acid Metabolism in Young Pea Seedlings. *Plant Physiol.* 40 (3) p. 424–432.
- [155] G Lohaus, M Burba, HW Heldt (1994) Comparison of the contents of sucrose and amino acids in the leaves, phloem sap and taproots of high and low sugar-producing hybrids of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *J. Exp. Bot.* 45 (8) p. 1097–1101.
- [156] MD Hatch, S Mau (1977) Properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase operative in C₄ pathway photosynthesis. *Funct. Plant Biol.* 4 (2) p. 207–216.
- [157] T Furumoto, S Hata, K Izui (1999) cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath cell-specific enzyme. *Plant Mol. Biol.* 41 (3) p. 301–311.
- [158] RP Walker, SJ Trevanion, RC Leegood (1995) Phosphoenolpyruvate carboxykinase from higher plants: purification from cucumber and evidence of rapid proteolytic cleavage in extracts from a range of plant tissues. *Planta* 196 (1) p. 58–63.
- [159] D Vercammen, B Belenghi, B van de Cotte, T Beunens, JA Gavigan, R De Rycke, A Brackenier, D Inzé, JL Harris, F Van Breusegem (2006) Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a Suicide Inhibitor for Metacaspase 9. *J. Mol. Biol.* 364 (4) p. 625–636.
- [160] S Il Kwon, DJ Hwang (2013) Expression analysis of the metacaspase gene family in Arabidopsis. *J. Plant Biol.* 56 (6) p. 391–398.
- [161] W Shen, J Liu, JF Li (2019) Type-II Metacaspases Mediate the Processing of Plant Elicitor Peptides in Arabidopsis. *Mol. Plant* 12 (11) p. 1524–1533.
- [162] SM Kim, C Bae, SK Oh, D Choi (2013) A pepper (*Capsicum annuum* L.) metacaspase 9 (Camc9) plays a role in pathogen-induced cell death in plants. *Mol. Plant Pathol.* 14 (6) p. 557–566.
- [163] S Escamez, S Stael, JP Vainonen, P Willems, H Jin, S Kimura, F Van Breusegem, K Gevaert, M Wrzaczek, H Tuominen (2019) Extracellular peptide Kratos restricts cell death during vascular development and stress in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 70 (7) p. 2199–2210.
- [164] S Escamez, D Andre, B Zhang, B Bollho ner, E Pesquet, H Tuominen (2016) METACASPASE9 modulates autophagy to confine cell death to the target cells during Arabidopsis vascular xylem differentiation. *Biol. Open* 5 p. 122–129.
- [165] RC Leegood, RP Walker (1996) Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. Studies in plants with C₄ photosynthesis and Crassulacean acid metabolism and in germinating seeds. *Biochem. J.* 317 (3) p. 653–658.
- [166] RP Walker, Z Chen, RM Acheson, RC Leegood (2002) Effects of Phosphorylation on Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from the C₄ Plant Guinea Grass. *Plant Physiol.* 128 (1) p. 165–172.
- [167] KJ Bailey, JE Gray, RP Walker, RC Leegood (2007) Coordinate Regulation of Phosphoenolpyruvate

Carboxylase and Phosphoenolpyruvate Carboxykinase by Light and CO₂ during C₄ Photosynthesis. *Plant Physiol.* 144 (1) p. 479–486.

- [168] WH Loescher, JD Everard (2000) Regulation of Sugar Alcohol Biosynthesis, En: *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*, 9, (Ed.: R Leegood, T Sharkey, S Caemmerer) Springer Netherlands, p. 275–299.
- [169] CR Grant, Tap Rees (1981) Sorbitol metabolism by apple seedlings. *Phytochemistry* 20 (7) p. 1505–1511.
- [170] WH Loescher, R Huw Tyson, JD Everard, RJ Redgwell, RL Bielecki (1992) Mannitol synthesis in higher plants: Evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannose 6-phosphate reductase. *Plant Physiol.* 98 (4) p. 1396–1402.
- [171] R Zhou, RC Sicher, L Cheng, B Quebedeaux (2003) Regulation of apple leaf aldose-6-phosphate reductase activity by inorganic phosphate and divalent cations. *Funct. Plant Biol.* 30 (10) p. 1037–1043.
- [172] R Zhou, L Cheng, R Wayne (2003) Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Sci.* 165 (1) p. 227–232.
- [173] DF Gómez Casati, JI Sesma, AA Iglesias (2000) Structural and kinetic characterization of NADP-dependent, non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from celery leaves. *Plant Sci.* 154 (2) p. 107–115.
- [174] Z Gao, WH Loescher (2000) NADPH supply and mannitol biosynthesis. Characterization, cloning, and regulation of the non-reversible glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in celery leaves. *Plant Physiol.* 124 (1) p. 321–330.
- [175] MD Hartman, CM Figueroa, C V Piattoni, AA Iglesias (2014) Glucitol dehydrogenase from peach (*Prunus persica*) fruits is regulated by thioredoxin h. *Plant Cell Physiol* 55 (6) p. 1157–1168.
- [176] MD Hartman, CM Figueroa, DG Arias, AA Iglesias (2017) Inhibition of recombinant aldose-6-phosphate reductase from peach leaves by hexose-phosphates, inorganic phosphate and oxidants. *Plant Cell Physiol.* 58 (1) p. 145–155.
- [177] MD Hartman (2016) Sobre el almacenamiento del carbono en células autótrofas y heterótrofas. Caracterización cinética y estructural de enzimas del metabolismo de azúcares y azúcares-alcoholes, Universidad Nacional del Litoral.
- [178] D Hyndman, DR Bauman, V V. Heredia, TM Penning (2003) The aldo-keto reductase superfamily homepage. *Chem. Biol. Interact.* 143–144 p. 621–631.
- [179] M Hirai (1981) Purification and Characteristics of Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase from Loquat Leaves. *Plant Physiol.* 67 (2) p. 221–224.
- [180] Y Kanayama, S Yamaki (1993) Purification and properties of NADP-dependent sorbitol-6-

- phosphate dehydrogenase from apple seedlings. *Plant Cell Physiol.* 34 (6) p. 819–823.
- [181] FB Negm, WH Loescher (1981) Characterization and Partial Purification of Aldose-6-phosphate Reductase (Alditol-6-Phosphate:NADP 1-Oxidoreductase) from Apple Leaves. *Plant Physiol.* 67 (1) p. 139–142.
- [182] Y Kanayama, H Mori, H Imaseki, S Yamaki (1992) Nucleotide Sequence of a cDNA Encoding NADP-Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase from Apple. *Plant Physiol.* 100 (3) p. 1607–1608.
- [183] Y Kanayama, K Sakanishi, H Mori, S Yamaki (1995) Expression of the gene for NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase in apple seedlings. *Plant Cell Physiol.* 36 (6) p. 1139–1141.
- [184] K Yamada, Y Suzue, S Hatano, M Tsukuda, Y Kanayama, K Shiratake, S Yamaki (2006) Changes in the activity and gene expression of sorbitol- and sucrose-related Enzymes associated with development of “La France” pear fruit. *J. Japanese Soc. Hortic. Sci.* 75 (1) p. 38–44.
- [185] N Kanamaru, Y Ito, S Komori, M Saito, H Kato, S Takahashi, M Omura, J Soejima, K Shiratake, K Yamada, S Yamaki (2004) Transgenic apple transformed by sorbitol-6-phosphate dehydrogenase cDNA: Switch between sorbitol and sucrose supply due to its gene expression. *Plant Sci.* 167 (1) p. 55–61.
- [186] G Teo, Y Suzuki, SL Uratsu, B Lampinen, N Ormonde, WK Hu, TM DeJong, AM Dandekar (2006) Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (49) p. 18842–18847.
- [187] MD Hartman, CM Figueroa, DG Arias, AA Iglesias (2017) Inhibition of recombinant aldose-6-phosphate reductase from peach leaves by hexose-phosphates, inorganic phosphate and oxidants. *Plant Cell Physiol.* 58 (1) p. 145–155.
- [188] T Murashige, F Skoog (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15 (3) p. 473–497.
- [189] DR Hoagland, DI Arnon (1950) The water-culture method for growing plants without soil. *Circ. Calif. Agric. Exp. Stn.* 347 (2^o edition).
- [190] J Raineri, MD Hartman, RL Chan, AA Iglesias, KF Ribichich (2016) A sunflower WRKY transcription factor stimulates the mobilization of seed-stored reserves during germination and post-germination growth. *Plant Cell Rep.* 35 (9) p. 1875–1890.
- [191] P Crozet, F Jammes, B Valot, F Ambard-Bretteville, S Nessler, M Hodges, J Vidal, M Thomas (2010) Cross-phosphorylation between *Arabidopsis thaliana* sucrose nonfermenting 1-related protein kinase 1 (*AtSnRK1*) and its activating kinase (*AtSnAK*) determines their catalytic activities. *J. Biol. Chem.* 285 (16) p. 12071–12077.
- [192] D Gong, Y Guo, AT Jagendorf, J-K Zhu (2002) Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol.* 130 (1) p. 256–264.

- [193] SN Cohen, AC Chang, L Hsu (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 69 (8) p. 2110–2114.
- [194] BE Rojas, F Santin, RM Ulloa, AA Iglesias, CM Figueroa (2018) A fluorometric method for the assay of protein kinase activity. *Anal. Biochem.* 557 p. 120–122.
- [195] MM Bradford (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 p. 248–254.
- [196] U Laemmli (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 p. 680–685.
- [197] L Fang (2012) Antibody Purification from Western Blotting. *Bio-protocol* 2 (6) p. e133.
- [198] C V Piattoni, DML Ferrero, I Dellafrera, A Vegetti, AA Iglesias (2017) Cytosolic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Phosphorylated during Seed Development. *Front. Plant Sci.* 8 (April) p. 1–16.
- [199] UB Ericsson, BM Hallberg, GT DeTitta, N Dekker, P Nordlund (2006) Thermofluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Anal. Biochem.* 357 (2) p. 289–298.
- [200] FH Niesen, H Berglund, M Vedadi (2007) The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nat. Protoc.* 2 (9) p. 2212–2221.
- [201] D Vercammen, B Van De Cotte, G De Jaeger, D Eeckhout, P Casteels, K Vandepoele, I Vandenberghe, J Van Beeumen, D Inzé, F Van Breusegem (2004) Type II metacaspases *Atmc4* and *Atmc9* of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *J. Biol. Chem.* 279 (44) p. 45329–45336.
- [202] R Kitz, IB Wilson (1962) Esters of Methanesulfonic Acid as Irreversible Inhibitors of Acetylcholinesterase. *J. Biol. Chem.* 237 (10) p. 3245–3249.
- [203] C V Piattoni, SA Guerrero, AA Iglesias (2013) A differential redox regulation of the pathways metabolizing glyceraldehyde-3-phosphate tunes the production of reducing power in the cytosol of plant cells. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (4) p. 8073–8092.
- [204] CJ Hastie, HJ Mclauchlan, P Cohen (2006) Assay of protein kinases using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat. Protoc.* 1 (2) p. 968–971.
- [205] DB Glass, RA Masaracchia, JR Feramisco, BE Kemp (1978) Isolation of phosphorylated peptides and proteins on ion exchange papers. *Anal. Biochem.* 87 (2) p. 566–575.
- [206] JJ Witt, R Roskoski (1975) Rapid protein kinase assay using phosphocellulose-paper absorption. *Anal. Biochem.* 66 (1) p. 253–258.
- [207] H Zegzouti, M Zdanovskaia, K Hsiao, SA Goueli (2009) ADP-Glo: A Bioluminescent and

- Homogeneous ADP Monitoring Assay for Kinases. *Assay Drug Dev. Technol.* 7 (6) p. 560–572.
- [208] F-S Wu, M-Y Wan (1984) Extraction of Proteins for Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Electrophoresis from Protease-Rich Plant Tissues. *Anal. Biochem.* 139 (1) p. 100–103.
- [209] T Isaacson, CMB Damasceno, RS Saravanan, Y He, C Catalá, M Saladié, JKC Rose (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat. Protoc.* 1 (2) p. 769–774.
- [210] S Bekesová, G Komis, P Krenek, P Vyplelová, M Ovecka, I Luptovciak, P Illés, A Kucharová, J Samaj (2015) Monitoring protein phosphorylation by acrylamide pendant Phos-Tag in various plants. *Front. Plant Sci.* 6 (May) p. 1–13.
- [211] AV Hill (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of hæmoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40 p. 4–6.
- [212] KA Johnson, RS Goody (2011) The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry* 50 (39) p. 8264–8269.
- [213] H Motulsky, A Christopoulos (2003) *Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression: A Practical Guide to Curve Fitting*. GraphPad Software Inc.
- [214] DA Hall, CJ Langmead (2010) Matching models to data: A receptor pharmacologist's guide. *Br. J. Pharmacol.* 161 (6) p. 1276–1290.
- [215] WJ. Long L. Gary (1983) Limit of detection. A closer look at the IUPAC Definition. *Anal. Chem.* 55 (7) p. 712A-724A.
- [216] CT and OK Zhang Ji-Hu (1999) A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* 4 (2) p. 67–73.
- [217] A Roy, A Kucukural, Y Zhang (2010) I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat. Protoc.* 5 (4) p. 725–738.
- [218] JU Bowie, L Roland, D Eisenberg (1991) A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. *Science (80-.)*. 253 (5016) p. 164–170.
- [219] E Roberts, J Eargle, D Wright, Z Luthey-Schulten (2006) MultiSeq: Unifying sequence and structure data for evolutionary analysis. *BMC Bioinformatics* 7 p. 1–11.
- [220] P Durek, R Schmidt, JL Heazlewood, A Jones, D MacLean, A Nagel, B Kersten, WX Schulze (2009) PhosPhAt: The *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* 38 (Database issue) p. 828–834.
- [221] P Willems, A Horne, T Van Parys, S Goormachtig, I De Smet, A Botzki, F Van Breusegem, K Gevaert (2019) The Plant PTM Viewer, a central resource for exploring plant protein modifications. *Plant J.* 99 (4) p. 752–762.
- [222] Barry G. Hall (2004) *Phylogenetic Trees Made Easy*, 2nd ed. Sinauer Associates, Inc.

- [223] F Sievers, A Wilm, D Dineen, TJ Gibson, K Karplus, W Li, R Lopez, H McWilliam, M Remmert, J Söding, JD Thompson, DG Higgins (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7 (1) p. 539.
- [224] G Talavera, J Castresana (2007) Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst. Biol.* 56 (4) p. 564–577.
- [225] O Gascuel (1997) BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14 (7) p. 685–695.
- [226] N Saitou, M Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 (4) p. 406–425.
- [227] S Malone, Z-H Chen, AR Bahrami, RP Walker, JE Gray, RC Leegood (2007) Phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis*: changes in gene expression, protein and activity during vegetative and reproductive development. *Plant Cell Physiol.* 48 (3) p. 441–450.
- [228] D Winter, B Vinegar, H Nahal, R Ammar, G V Wilson, NJ Provart (2007) An “Electronic Fluorescent Pictograph” browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2 (8) p. e718.
- [229] A V. Klepikova, AS Kasianov, ES Gerasimov, MD Logacheva, AA Penin (2016) A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *Plant J.* 88 (6) p. 1058–1070.
- [230] C V Piattoni, SP Rius, DF Gomez-Casati, SA Guerrero, AA Iglesias (2010) Heterologous expression of non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Triticum aestivum* and *Arabidopsis thaliana*. *Biochimie* 92 (7) p. 909–913.
- [231] E Huala, AW Dickerman, M Garcia-Hernandez, D Weems, L Reiser, F LaFond, D Hanley, D Kiphart, M Zhuang, W Huang, LA Mueller, D Bhattacharyya, D Bhaya, BW Sobral, W Beavis, DW Meinke, CD Town, C Somerville, SY Rhee (2001) The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. *Nucleic Acids Res.* 29 (1) p. 102–105.
- [232] RP Walker, ZH Chen, LI Técsi, F Famiani, PJ Lea, RC Leegood (1999) Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta* 210 (1) p. 9–18.
- [233] LS Daley, TB Ray, HM Vines, CC Black (1977) Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from pineapple leaves *Ananas comosus* (L.) Merr. *Plant Physiol.* 59 (4) p. 618–622.
- [234] Q Chao, XY Liu, YC Mei, ZF Gao, YB Chen, CR Qian, YB Hao, BC Wang (2014) Light-regulated phosphorylation of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a vital role in its activity. *Plant Mol. Biol.* 85 (1–2) p. 95–105.

- [235] CMH Ferreira, ISS Pinto, E V. Soares, HMVM Soares (2015) (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions-a review. *RSC Adv.* 5 (39) p. 30989–31003.
- [236] RK Gupta, RM Oesterling, AS Mildvan (1976) Dual divalent cation requirement for activation of pyruvate kinase: essential roles of both enzyme- and nucleotide-bound metal ions. *Biochemistry* 15 (13) p. 2881–2887.
- [237] H Quiquampoix, BC Loughman, RG Ratcliffe (1993) A ³¹P-NMR study of the uptake and compartmentation of manganese by maize roots. *J. Exp. Bot.* 44 (12) p. 1819–1827.
- [238] JK Pittman, JK Pittman (2005) Managing the manganese: molecular mechanisms of manganese transport and homeostasis. *New Phytol.* 167 p. 733–742.
- [239] TH Nielsen, JH Rung, D Villadsen (2004) Fructose-2,6-biphosphatase: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 9 (11) p. 1360–1385.
- [240] D Veyel, EM Sokolowska, JC Moreno, S Kierszniowska, J Cichon, I Wojciechowska, M Luzarowski, M Kosmacz, J Szlachetko, M Gorka, M Méret, A Graf, EH Meyer, L Willmitzer, A Skirycz (2018) PROMIS, global analysis of PROtein-metabolite interactions using size separation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 293 (32) p. 12440–12453.
- [241] MC Lo, A Aulabaugh, G Jin, R Cowling, J Bard, M Malamas, G Ellestad (2004) Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery. *Anal. Biochem.* 332 (1) p. 153–159.
- [242] O Fedorov, FH Niesen, S Knapp (2012) Kinase Inhibitor Selectivity Profiling Using Differential Scanning Fluorimetry BT - Kinase Inhibitors: Methods and Protocols, Humana Press, p. 109–118.
- [243] AF Rudolf, T Skovgaard, S Knapp, LJ Jensen, J Berthelsen (2014) A comparison of protein kinases inhibitor screening methods using both enzymatic activity and binding affinity determination. *PLoS One* 9 (6) p. 2–6.
- [244] MW Pantoliano, EC Petrella, JD Kwasnoski, VS Lobanov, J Myslik, E Graf, T Carver, E Asel, BA Springer, P Lane, FR Salemme (2001) High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *J. Biomol. Screen.* 6 (6) p. 429–440.
- [245] O Fedorov, FH Niesen, S Knapp (2012) Kinase inhibitor selectivity profiling using differential scanning fluorimetry. *Methods Mol. Biol.* 795 p. 109–118.
- [246] AJW Orry, R Abagyan, Eds. (2012) *Homology Modelling. Methods and Protocols*. Humana Press.
- [247] DWA Buchan, DT Jones (2019) The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res.* 47 (W1) p. W402–W407.
- [248] D Eisenberg, R Lüthy, JUBT-M in E Bowie (1997) [20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles, En: *Macromolecular Crystallography Part B*, 277, Academic Press,

p. 396–404.

- [249] MP Eastwood, C Hardin, Z Luthey-Schulten, PG Wolynes (2001) Evaluating protein structure-prediction schemes using energy landscape theory. *IBM J. Res. Dev.* 45 (3–4) p. 475–497.
- [250] LX Peterson, A Roy, C Christoffer, G Terashi, D Kihara (2017) Modeling disordered protein interactions from biophysical principles. *PLoS Comput. Biol.* 13 (4) p. 1–28.
- [251] PE Wright, JH Dyson (2014) Intrinsically disordered proteins in cellular signaling and regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 16 p. 18–29.
- [252] D Veyel, S Kierszniowska, M Kosmacz, EM Sokolowska, A Michaelis, M Luzarowski, J Szlachetko, L Willmitzer, A Skirycz (2017) System-wide detection of protein-small molecule complexes suggests extensive metabolite regulation in plants. *Sci. Rep.* 7 (July 2016) p. 1–8.
- [253] D Osorio, P Rondón-Villarreal, R Torres (2015) Peptides: A package for data mining of antimicrobial peptides. *R J.* 7 (1) p. 4–14.
- [254] A Radzicka, R Wolfenden (1988) Comparing the polarities of the amino acids: side-chain distribution coefficients between the vapor phase, cyclohexane, 1-octanol, and neutral aqueous solution. *Biochemistry* 27 (5) p. 1664–1670.
- [255] HG Boman (2003) Antibacterial peptides: Basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254 (3) p. 197–215.
- [256] J Kyte, RF Doolittle (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157 (1) p. 105–132.
- [257] SX Ge, D Jung, R Yao (2020) ShinyGO: a graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics.*
- [258] SD Ray, FF Farris, AC Hartmann (2014) Hormesis, En: *Encyclopedia of Toxicology*, 3rd ed. 2, p. 944–948.
- [259] EJ Calabrese (2008) Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (7) p. 1451–1474.
- [260] R Narsai, SR Law, C Carrie, L Xu, J Whelan (2011) In-depth temporal transcriptome profiling reveals a crucial developmental switch with roles for RNA processing and organelle metabolism that are essential for germination in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 157 (3) p. 1342–1362.
- [261] RJ Beynon, S Oliver (1996) Avoidance of proteolysis in extracts. *Methods Mol. Biol.* 59 p. 81–93.
- [262] WC Plaxton (2019) Avoiding proteolysis during the extraction and purification of active plant enzymes. *Plant Cell Physiol.* 60 (4) p. 715–724.
- [263] L Tsiatsiani, F Van Breusegem, P Gallois, A Zavalov, E Lam, P V Bozhkov (2011) Metacaspases. *Cell Death Differ.* 18 (8) p. 1279–1288.
- [264] A Miricescu, K Goslin, E Graciet (2018) Ubiquitylation in plants: Signaling hub for the integration

- of environmental signals. *J. Exp. Bot.* 69 (19) p. 4511–4527.
- [265] D-Y Kim, M Scalf, LM Smith, RD Vierstra (2013) Advanced Proteomic Analyses Yield a Deep Catalog of Ubiquitylation Targets in Arabidopsis. *Plant Cell* 25 (5) p. 1523–1540.
- [266] A Walton, E Stes, N Cybulski, M Bel, S Iñigo, AN Durand, E Timmerman, J Heyman, L Pauwels, L De Veylder, A Goossens, I De Smet, F Coppens, SF Goormachtig, K Gevaert (2016) It's time for some "site"-seeing: Novel tools to monitor the ubiquitin landscape in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28 (1) p. 6–16.
- [267] A Bachmair, D Finley, A Varshavsky (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* (80-.). 234 (4773) p. 179–186.
- [268] T Tasaki, SM Sriram, KS Park, YT Kwon (2012) The N-End Rule Pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 81 (1) p. 261–289.
- [269] N Dissmeyer, S Rivas, E Graciet (2018) Life and death of proteins after protease cleavage: protein degradation by the N-end rule pathway. *New Phytol.* 218 (3) p. 929–935.
- [270] DJ Gibbs, M Bailey, HM Tedds, MJ Holdsworth (2016) From start to finish: amino-terminal protein modifications as degradation signals in plants. *New Phytol.* 211 (4) p. 1188–1194.
- [271] Z Nagy, S Comer, A Smolenski (2018) Analysis of Protein Phosphorylation Using Phos-Tag Gels. *Curr. Protoc. protein Sci.* 93 (1) p. e64.
- [272] E Kinoshita, E Kinoshita-Kikuta, T Koike (2009) Separation and detection of large phosphoproteins using Phos-tag SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* 4 (10) p. 1513–1521.
- [273] SM Pearlman, Z Serber, JE Ferrell (2011) A mechanism for the evolution of phosphorylation sites. *Cell* 147 (4) p. 934–946.
- [274] P Geigenberger, AR Fernie (2014) Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxid. Redox Signal.* 21 (9) p. 1389–421.
- [275] DG Hardie (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (10) p. 774–785.
- [276] DG Hardie, F a. Ross, S a. Hawley (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13 (4) p. 251–262.
- [277] C Polge, M Thomas (2007) SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* 12 (1) p. 20–28.
- [278] NG Halford, SJ Hey (2009) Snf1-related protein kinases (SnRKs) act within an intricate network that links metabolic and stress signalling in plants. *Biochem. J.* 419 (2) p. 247–259.
- [279] R Ghillebert, E Swinnen, J Wen, L Vandesteene, M Ramon, K Norga, F Rolland, J Winderickx (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J.* 278 (21) p. 3978–90.

- [280] C V Piattoni, DM Bustos, SA Guerrero, AÁ Iglesias (2011) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is phosphorylated in wheat endosperm at serine-404 by an SNF1-related protein kinase allosterically inhibited by ribose-5-phosphate. *Plant Physiol.* 156 (3) p. 1337–50.
- [281] A Kulma, D Villadsen, DG Campbell, SEM Meek, JE Harthill, TH Nielsen, C MacKintosh (2004) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis 6-phosphofructo-2-kinase/ fructose-2,6-bisphosphatase. *Plant J.* 37 (5) p. 654–667.
- [282] JE Harthill, SEM Meek, N Morrice, MW Pegg, J Borch, BHC Wong, C MacKintosh (2006) Phosphorylation and 14-3-3 binding of Arabidopsis trehalose-phosphate synthase 5 in response to 2-deoxyglucose. *Plant J.* 47 (2) p. 211–223.
- [283] C Sugden, PG Donaghy, NG Halford, DG Hardie (1999) Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase *in vitro*. *Plant Physiol* 120 (1) p. 257–274.
- [284] D Toroser, SC Huber (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase in spinach leaves. *Plant Physiol.* 114 (3) p. 947–955.
- [285] J Robertlee, K Kobayashi, M Suzuki, T Muranaka (2017) AKIN10, a representative Arabidopsis SNF1-related protein kinase 1 (SnRK1), phosphorylates and downregulates plant HMG-CoA reductase. *FEBS Lett.* 591 p. 1159–1166.
- [286] AYL Tsai, S Gazzarrini (2012) AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. *Plant J.* 69 (5) p. 809–821.
- [287] Z Zhai, H Liu, J Shanklin (2017) Phosphorylation of WRINKLED1 by KIN10 Results in Its Proteasomal Degradation, Providing a Link between Energy Homeostasis and Lipid Biosynthesis. *Plant Cell* 29 (4) p. 871–889.
- [288] E Baena-González, F Rolland, JM Thevelein, J Sheen (2007) A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448 (7156) p. 938–942.
- [289] W Shen, L Hanley-Bowdoin (2006) Geminivirus infection up-regulates the expression of two Arabidopsis protein kinases related to yeast SNF1- and mammalian AMPK-activating kinases. *Plant Physiol.* 142 (4) p. 1642–55.
- [290] S Hey, H Mayerhofer, NG Halford, JR Dickinson (2007) DNA sequences from Arabidopsis, which encode protein kinases and function as upstream regulators of Snf1 in yeast. *J. Biol. Chem.* 282 (14) p. 10472–10479.
- [291] P Crozet, L Margalha, A Confraria, A Rodrigues, C Martinho, M Adamo, CA Elias, E Baena-González (2014) Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Front. Plant Sci.* 5 (May) p. 1–17.
- [292] C Sugden, RM Crawford, NG Halford, DG Hardie (1999) Regulation of spinach SNF1-related

- (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP. *Plant J.* 19 (4) p. 433–439.
- [293] D Toroser, Z Plaut, SC Huber (2000) Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 123 (1) p. 403–412.
- [294] Y Zhang, LF Primavesi, D Jhurrea, PJ Andralojc, RAC Mitchell, SJ Powers, H Schluepmann, T Delatte, A Wingler, MJ Paul (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149 (4) p. 1860–1871.
- [295] MC Martins, M Hejazi, J Fettke, M Steup, R Feil, U Krause, S Arrivault, D Vosloh, CM Figueroa, A Ivakov, UP Yadav, M Piques, D Metzner, M Stitt, JE Lunn (2013) Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol.* 163 (3) p. 1142–1163.
- [296] CM Figueroa, JE Lunn (2016) A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiol.* 172 (1) p. 7–27.
- [297] JE Lunn, R Feil, JH Hendriks, Y Gibon, R Morcuende, D Osuna, WR Scheible, P Carillo, MR Hajirezaei, M Stitt (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J.* 397 (1) p. 139–148.
- [298] UP Yadav, A Ivakov, R Feil, GY Duan, D Walther, P Giavalisco, M Piques, P Carillo, HM Hubberten, M Stitt, JE Lunn (2014) The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *J. Exp. Bot.* 65 (4) p. 1051–1068.
- [299] Z Zhai, J Keereetaweep, H Liu, R Feil, JE Lunn, J Shanklin (2018) Trehalose 6-phosphate positively regulates fatty acid synthesis by stabilizing wrinkled1. *Plant Cell* 30 (10) p. 2616–2627.
- [300] CV Piattoni (2012) Metabolismo energético y del poder reductor en células autótrofas y heterótrofas, Universidad Nacional del Litoral.
- [301] X Jin, R Townley, L Shapiro (2007) Structural Insight into AMPK Regulation: ADP Comes into Play. *Structure* 15 (10) p. 1285–1295.
- [302] J-K Zhu, J Liu, L Xiong (1998) Genetic Analysis of Salt Tolerance in Arabidopsis: Evidence for a Critical Role of Potassium Nutrition. *Plant Cell* 10 (7) p. 1181–1192.
- [303] H Ji, JM Pardo, G Batelli, MJ Van Oosten, RA Bressan, X Li (2013) The salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Mol. Plant* 6 (2) p. 275–286.
- [304] S Wu, L Ding, J Zhu (1996) SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *Plant Cell* 8 (April) p. 617–627.
- [305] U Halfter, M Ishitani, JK Zhu (2000) The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci* 97 (7) p. 3735–3740.

- [306] ZJ-K Guo Yan, Halfter Ursula, Ishitani Manabu (2001) Molecular Characterization of Functional Domains in the Protein Kinase SOS2 That Is Required for Plant Salt Tolerance. *Plant Cell* 13 (6) p. 1383–1400.
- [307] H Fujii, JK Zhu (2009) An autophosphorylation site of the protein kinase SOS2 is important for salt tolerance in Arabidopsis. *Mol. Plant* 2 (1) p. 183–190.
- [308] H Zhou, H Lin, S Chen, K Becker, Y Yang, J Zhao, J Kudla, KS Schumaker, Y Guo (2014) Inhibition of the Arabidopsis salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins. *Plant Cell* 26 (3) p. 1166–82.
- [309] DML Ferrero (2020) Sobre el metabolismo del carbono en células autótrofas y heterótrofas de plantas. Caracterización de mecanismos de regulación de enzimas claves para la partición del carbono fotoasimilado, Universidad Nacional del Litoral.
- [310] DML Ferrero, MD Asencion Diez, ML Kuhn, CA Falaschetti, C V Piattoni, AA Iglesias, MA Ballicora (2018) On the roles of wheat endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits. *Front. Plant Sci.* 871 p. 1498.
- [311] G Manning (2002) The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* (80-.). 298 (5600) p. 1912–1934.
- [312] P Cohen (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nat. Cell Biol.* 4 (5) p. E127–E130.
- [313] JA Adams (2001) Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chem. Rev.* 101 (8) p. 2271–2290.
- [314] P Cohen (2002) Protein kinases - the major drug targets of the twenty-first century? *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (April) p. 309–315.
- [315] TW Traut (2008) The limits for life define the limits for enzymes, En: *Allosteric Regulatory Enzymes*, Springer, Boston, MA, p. 29–49.
- [316] Y Jia, CM Quinn, S Kwak, R V Talanian (2008) Current *in vitro* kinase assay technologies: the quest for a universal format. *Curr. Drug Discov. Technol.* 5 (1) p. 59–69.
- [317] NO Kaplan, SP Colowick, C Carr Barnes (1951) Effect of alkali on diphosphopyridine nucleotide. *J. Biol. Chem.* 191 (2) p. 461–472.
- [318] OH Lowry, NR Roberts, JI Kaphan (1957) The fluorometric measurement of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 224 (2) p. 1047–1064.
- [319] GE Tsotsou, A Edward, G Cass, G Gilardi (2002) High throughput assay for cytochrome P450 BM3 for screening libraries of substrates and combinatorial mutants. *Biosens. Bioelectron.* 17 (1–2) p. 119–131.
- [320] M Raíces, JM Chico, MT Téllez-Iñón, RM Ulloa (2001) Molecular characterization of *St*CDPK1, a calcium-dependent protein kinase from *Solanum tuberosum* that is induced at the onset of tuber development. *Plant Mol. Biol.* 46 (5) p. 591–601.

- [321] C Grandellis, V Giammaria, M Bialer, F Santin, T Lin, DJ Hannapel, RM Ulloa (2012) The novel *Solanum tuberosum* calcium dependent protein kinase, *StCDPK3*, is expressed in actively growing organs. *Planta* 236 (6) p. 1831–1848.
- [322] TB Ray, CC Black (1976) Characterization of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase from *Panicum maximum*. *Plant Physiol.* 58 (5) p. 603–607.
- [323] RI Minen, MP Martinez, AA Iglesias, CM Figueroa (2020) Biochemical characterization of recombinant UDP-sugar pyrophosphorylase and galactinol synthase from *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiol. Biochem.* 155 (August) p. 780–788.
- [324] AM Johnston, JA Raven (1989) Extraction, partial purification, and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Ascophyllum nodosum*. *J. Phycol.* 25 p. 568–576.
- [325] DR Arnelle, MH O'leary (1992) Binding of Carbon Dioxide to Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Deduced from Carbon Kinetic Isotope Effects. *Biochemistry* 31 (17) p. 4363–4368.
- [326] JA Raven (1985) pH regulation in plants. *Sci. Progress, Oxford* 69 (276) p. 495–509.
- [327] DD Davies (1986) The fine control of cytosolic pH. *Physiol. Plant.* 67 (4) p. 702–706.
- [328] J Shen, Y Zeng, X Zhuang, L Sun, X Yao, P Pimpl, L Jiang (2013) Organelle pH in the Arabidopsis endomembrane system. *Mol. Plant* 6 (5) p. 1419–1437.
- [329] Z Wu, F Liang, B Hong, JC Young, MR Sussman, JF Harper, H Sze (2002) An endoplasmic reticulum-bound $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ pump, ECA1, supports plant growth and confers tolerance to Mn^{2+} stress. *Plant Physiol.* 130 (1) p. 128–137.
- [330] AS Moomaw, ME Maguire (2008) The Unique Nature of Mg^{2+} Channels. *Physiology* 23 (5) p. 275–285.
- [331] BM Waters (2011) Moving magnesium in plant cells. *New Phytol.* 190 (3) p. 510–513.
- [332] Y Yazaki, N Asukagawa, Y Ishikawa, E Ohta, M Sakata (1988) Estimation of cytoplasmic free Mg^{2+} levels and phosphorylation potentials in mung bean root tips by *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy. *Plant Cell Physiol.* 29 (6) p. 919–924.
- [333] AU Igamberdiev, LA Kleczkowski (2006) Equilibration of adenylates in the mitochondrial intermembrane space maintains respiration and regulates cytosolic metabolism. *J. Exp. Bot.* 57 (10) p. 2133–2141.
- [334] R Bligny, E Gout (2017) Regulation of Respiration by Cellular Key Parameters: Energy Demand, ADP, and Mg^{2+} BT - Plant Respiration: Metabolic Fluxes and Carbon Balance, (Ed.: G Tcherkez, J Ghashghaie) Springer International Publishing, p. 19–41.
- [335] Z Shen, XM Dong, ZF Gao, Q Chao, BC Wang (2017) Phylogenetic and phosphorylation regulation difference of phosphoenolpyruvate carboxykinase of C_3 and C_4 plants. *J. Plant Physiol.* 213 p. 16–22.

- [336] K Volkert, S Debast, LM Voll, H Voll, I Schiebl, J Hofmann, S Schneider, F Börnke (2014) Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 65 (18) p. 5217–5229.
- [337] JD Blonde, WC Plaxton (2003) Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oilseeds. *J. Biol. Chem.* 278 (14) p. 11867–11873.
- [338] BE Koffler, E Bloem, G Zellnig, B Zechmann (2013) High resolution imaging of subcellular glutathione concentrations by quantitative immunoelectron microscopy in different leaf areas of *Arabidopsis*. *Micron* 45 p. 119–128.
- [339] A Fait, R Angelovici, H Less, I Ohad, E Urbanczyk-Wochniak, AR Fernie, G Galili (2006) *Arabidopsis* Seed Development and Germination Is Associated with Temporally Distinct Metabolic Switches. *Plant Physiol.* 142 (3) p. 839–854.
- [340] J Presiss, T Kosuge (1976) Regulation of Enzyme Activity in Metabolic Pathways, En: *Plant Biochemistry*, 3rd ed., (Ed.: J Bonner, J Varner) Academic Press, p. 277–336.
- [341] B O’Leary, J Park, WC Plaxton (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. *Biochem. J.* 436 (1) p. 15–34.
- [342] DH Gonzalez, AA Iglesias, CS Andreo (1984) On the Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity from Maize Leaves by L-malate. Effect of pH. *J. Plant Physiol.* 116 (5) p. 425–434.
- [343] CS Andreo, DH Gonzalez, AA Iglesias (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. Structure and regulation. *FEBS Lett.* 213 (1) p. 1–8.
- [344] GAL McNaughton, CA Fewson, MB Wilkins, HG Nimmo (1989) Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 261 p. 349–355.
- [345] RT Wedding, MK Black, CR Meyer (1990) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant Physiol.* 92 (2) p. 456–61.
- [346] N Bakrim, M Nhiri, JN Pierre, J Vidal (1998) Metabolite control of Sorghum C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase catalytic activity and phosphorylation state. *Photosynth. Res.* 58 (2) p. 153–162.
- [347] M Nhiri, N Bakrim, N Bakrim, Z El Hachimi-Messouak, C Echevarria, J Vidal (2000) Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase during germination of Sorghum seeds: Influence of NaCl and L-malate. *Plant Sci.* 151 (1) p. 29–37.
- [348] A-B Feria, R Alvarez, L Cochereau, J Vidal, S Garcia-Maurino, C Echevarria (2008) Regulation of

- Phosphoenolpyruvate Carboxylase Phosphorylation by Metabolites and Abscisic Acid during the Development and Germination of Barley Seeds. *Plant Physiol.* 148 (2) p. 761–774.
- [349] FE Podestá, WC Plaxton (1994) Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. *Planta* 194 (3) p. 374–380.
- [350] WC Plaxton (1988) Purification of pyruvate kinase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 86 (4) p. 1064–9.
- [351] WC Plaxton (1989) Molecular and immunological characterization of plastid and cytosolic pyruvate kinase isozymes from castor-oil-plant endosperm and leaf. *Eur. J. Biochem.* 181 (2) p. 443–51.
- [352] FE Podesta, WC Plaxton (1991) Kinetic and regulatory properties of cytosolic pyruvate kinase from germinating castor oil seeds. *Biochem J.* 279 p. 495–501.
- [353] A Ferjani, S Segami, G Horiguchi, Y Muto, M Maeshima, H Tsukaya (2011) Keep an Eye on PPi : The Vacuolar-Type H⁺-Pyrophosphatase Regulates Postgerminative Development in Arabidopsis. *Plant Cell* 23 (August) p. 2895–2908.
- [354] JK Heinonem (2001) *Biological Role of Inorganic Phosphate*. Springer Science+Business Media, LLC.
- [355] A Ferjani, K Kawade, M Asaoka, A Oikawa, T Okada, A Mochizuki, M Maeshima, MY Hirai, K Saito, H Tsukaya (2018) Pyrophosphate inhibits gluconeogenesis by restricting UDP-glucose formation *in vivo*. *Sci. Rep.* 8 (1) p. 1–10.
- [356] Y Okazaki, M Shimojima, Y Sawada, K Toyooka, T Narisawa, K Mochida, H Tanaka, F Matsuda, A Hirai, MY Hirai, H Ohta, K Saito (2009) A Chloroplastic UDP-Glucose Pyrophosphorylase from Arabidopsis Is the Committed Enzyme for the First Step of Sulfolipid Biosynthesis. *Plant Cell* 21 (3) p. 892–909.
- [357] T Azoulay-Shemer, A Bagheri, C Wang, A Palomares, AB Stephan, H-H Kunz, JI Schroeder (2016) Starch biosynthesis in guard cells but not in mesophyll cells is involved in CO₂-induced stomatal closing. *Plant Physiol.* 171 (2) p. 788–98.
- [358] M Szczowka, R Heise, T Tohge, A Nunes-Nesi, D Vosloh, J Huege, R Feil, J Lunn, Z Nikoloski, M Stitt, AR Fernie, S Arrivault (2013) Metabolic Fluxes in an Illuminated Arabidopsis Rosette. *Plant Cell* 25 (2) p. 694–714.
- [359] H Maeda, N Dudareva (2012) The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63 p. 73–105.
- [360] DA Dempsey, AC Vlot, MC Wildermuth, DF Klessig (2012) Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism, En: *The Arabidopsis Book*, 9, p. e0156.
- [361] JR Widhalm, M Gutensohn, H Yoo, F Adebessin, Y Qian, L Guo, R Jaini, JH Lynch, RM McCoy, JT Shreve, J Thimmapuram, D Rhodes, JA Morgan, N Dudareva (2015) Identification of a plastidial

phenylalanine exporter that influences flux distribution through the phenylalanine biosynthetic network. *Nat. Commun.* 6 p. 1–11.

- [362] K Naka, Y Jomen, K Ishihara, J Kim, T Ishimoto, E Bae, RP Mohny, SM Stirdivant, H Oshima, M Oshima, D Kim, H Nakauchi, Y Takihara, Y Kato, A Ooshima, S Kim (2015) Dipeptide species regulate p38MAPK-Smad3 signalling to maintain chronic myelogenous leukaemia stem cells. *Nat. Commun.* 6 p. 1–14.
- [363] C Wojcik (2000) Dipeptides : rulers of the N-end rule. *Trends Cell Biol.* 10 (9) p. 2000.
- [364] GC Turner, F Du, A Varshavsky (2000) Peptides accelerate their uptake by activating a ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *Nature* 2 p. 579–583.
- [365] VP Thirumalaikumar, M Wagner, S Balazadeh, A Skiryecz (2020) Autophagy is responsible for the accumulation of proteogenic dipeptides in response to heat stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS J.* Online preview.
- [366] AJ Kenny, AG Booth, SG George, J Ingram, D Kershaw, EJ Wood, AR Young (1976) Dipeptidyl peptidase IV, a kidney brush border serine peptidase. *Biochem. J.* 157 (1) p. 169–182.
- [367] S Kumar, A Kaur, B Chattopadhyay, AK Bachhawat (2015) Defining the cytosolic pathway of glutathione degradation in *Arabidopsis thaliana*: Role of the ChaC/GCG family of γ -glutamyl cyclotransferases as glutathione-degrading enzymes and AtLAP1 as the Cys-Gly peptidase. *Biochem. J.* 468 (1) p. 73–85.
- [368] H Takagi, H Shiomi, H Ueda, H Amano (1979) Morphine-like analgesia by a new dipeptide, L-Tyrosyl-L-Arginine (kyotorphin) and its analogue. *Eur. J. Pharmacol.* 55 (1) p. 109–111.
- [369] T Mizushige, N Kanegawa, A Yamada, A Ota, R Kanamoto, K Ohinata (2013) Aromatic amino acid-leucine dipeptides exhibit anxiolytic-like activity in young mice. *Neurosci. Lett.* 543 p. 126–129.
- [370] N Kanegawa, C Suzuki, K Ohinata (2010) Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT_{1A}, dopamine D₁ and GABAA receptors in mice. *FEBS Lett.* 584 (3) p. 599–604.
- [371] Z Zhang, Y Zhao, X Wang, R Lin, Y Zhang, H Ma, Y Guo, L Xu, B Zhao (2016) The novel dipeptide Tyr-Ala (TA) significantly enhances the lifespan and healthspan of *Caenorhabditis elegans*. *Food Funct.* 7 (4) p. 1975–1984.
- [372] M Doppler, B Kluger, C Bueschl, B Steiner, H Buerstmayr, M Lemmens, R Krska, G Adam, R Schuhmacher (2019) Stable Isotope-Assisted Plant Metabolomics: Investigation of Phenylalanine-Related Metabolic Response in Wheat Upon Treatment With the Fusarium Virulence Factor Deoxynivalenol. *Front. Plant Sci.* 10 (October) p. 1–18.
- [373] N Strehmel, W Hoehenwarter, S Mönchgesang, P Majovsky, S Krüger, D Scheel, J Lee (2017)

Stress-Related Mitogen-Activated Protein Kinases Stimulate the Accumulation of Small Molecules and Proteins in *Arabidopsis thaliana* Root Exudates. *Front. Plant Sci.* 8 (July) p. 1–13.

- [374] C Carter, S Pan, J Zouhar, EL Avila, T Girke, N V. Raikhel (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16 (12) p. 3285–3303.
- [375] A Porodko, A Cirnski, D Petrov, T Raab, M Paireder, B Mayer, D Maresch, L Nika, ML Binossek, P Gallois, O Schilling, C Oostenbrink, M Novinec, L Mach (2018) The two cathepsin B-like proteases of *Arabidopsis thaliana* are closely related enzymes with discrete endopeptidase and carboxydipeptidase activities. *Biol. Chem.* 399 (10) p. 1223–1235.
- [376] CS Chiang, G Stacey, YF Tsay (2004) Mechanisms and functional properties of two peptide transporters, AtPTR2 and fPTR2. *J. Biol. Chem.* 279 (29) p. 30150–30157.
- [377] A Fait, R Angelovici, H Less, I Ohad, E Urbanczyk-Wochniak, AR Fernie, G Galili (2006) *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. *Plant Physiol.* 142 (3) p. 839–854.
- [378] DC Bassham (2009) Function and regulation of macroautophagy in plants. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1793 (9) p. 1397–1403.
- [379] L Wan, ARS Ross, J Yang, DD Hegedus, AR Kermode (2007) Phosphorylation of the 12 S globulin cruciferin in wild-type and *abi1-1* mutant *Arabidopsis thaliana* (thale cress) seeds. *Biochem. J.* 404 (2) p. 247–256.
- [380] EM Herman, BA Larkins (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11 (4) p. 601–613.
- [381] JK Paulus, RAL Van der Hoorn (2019) Do proteolytic cascades exist in plants? *J. Exp. Bot.* 70 (7) p. 1997–2002.
- [382] L Tsiatsiani, K Gevaert, F Van Breusegem (2012) Natural substrates of plant proteases: How can protease degradomics extend our knowledge? *Physiol. Plant.* 145 (1) p. 28–40.
- [383] RAL van der Hoorn (2008) Plant Proteases: From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 (1) p. 191–223.
- [384] RD Vierstra (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Mol. Biol.* 32 (1–2) p. 275–302.
- [385] O Ocheretina, J Harnecker, T Rother, R Schmid, R Scheibe (1993) Effects of N-terminal truncations upon chloroplast NADP-malate dehydrogenases from pea and spinach. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol.* 1163 (1) p. 10–16.
- [386] L Lepiniec, E Keryer, H Philippe, P Gadal, C Crépin (1993) Sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. *Plant Mol. Biol.* 21 (3) p. 487–502.
- [387] EK Schrader, KG Harstad, A Matouschek (2009) Targeting proteins for degradation. *Nat. Chem.*

Biol. 5 (11) p. 815–22.

- [388] WM Kaiser, SC Huber (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *J. Exp. Bot.* 52 (363) p. 1981–1989.
- [389] C MacKintosh, SEM Meek (2001) Regulation of plant NR activity by reversible phosphorylation, 14-3-3 proteins and proteolysis. *Cell. Mol. Life Sci.* 58 (2) p. 205–214.
- [390] H Weiner, WM Kaiser (1999) 14-3-3 Proteins Control Proteolysis of Nitrate Reductase in Spinach Leaves. *FEBS Lett.* 455 (1–2) p. 75–78.
- [391] V Cotellet, SE Meek, F Provan, FC Milne, N Morrice, C MacKintosh (2000) 14-3-3s regulate global cleavage of their diverse binding partners in sugar-starved Arabidopsis cells. *EMBO J.* 19 (12) p. 2869–76.
- [392] SC Hardin, SC Huber (2004) Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 42 (3) p. 197–208.
- [393] GQ Tang, SC Hardin, R Dewey, SC Huber (2003) A novel C-terminal proteolytic processing of cytosolic pyruvate kinase, its phosphorylation and degradation by the proteasome in developing soybean seeds. *Plant J.* 34 (1) p. 77–93.
- [394] G Prus, A Hoegl, BT Weinert, C Choudhary (2019) Analysis and Interpretation of Protein Post-Translational Modification Site Stoichiometry. *Trends Biochem. Sci.* 44 (11) p. 943–960.
- [395] P Wang, L Xue, G Batelli, S Lee, YJ Hou, MJ Van Oosten, H Zhang, WA Tao, JK Zhu (2013) Quantitative phosphoproteomics identifies SnRK2 protein kinase substrates and reveals the effectors of abscisic acid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (27) p. 11205–11210.
- [396] H Nakagami, N Sugiyama, K Mochida, A Daudi, Y Yoshida, T Toyoda, M Tomita, Y Ishihama, K Shirasu (2010) Large-scale comparative phosphoproteomics identifies conserved phosphorylation sites in plants. *Plant Physiol.* 153 (3) p. 1161–1174.
- [397] H Zhang, H Zhou, L Berke, AJR Heck, S Mohammed, B Scheres, FLH Menke (2013) Quantitative phosphoproteomics after auxin-stimulated lateral root induction identifies an SNX1 protein phosphorylation site required for growth. *Mol. Cell. Proteomics* 12 (5) p. 1158–1169.
- [398] N Rayapuram, L Bonhomme, J Bigeard, K Haddadou, C Przybylski, H Hirt, D Pflieger (2014) Identification of novel PAMP-triggered phosphorylation and dephosphorylation events in *Arabidopsis thaliana* by quantitative phosphoproteomic analysis. *J. Proteome Res.* 13 (4) p. 2137–2151.
- [399] N Rayapuram, J Bigeard, H Alhoraibi, L Bonhomme, AM Hesse, J Vinh, H Hirt, D Pflieger (2018) Quantitative phosphoproteomic analysis reveals shared and specific targets of Arabidopsis mitogen-activated protein kinases (MAPKs) MPK3, MPK4, and MPK6. *Mol. Cell. Proteomics* 17 (1) p. 61–80.

- [400] LL Lin, CL Hsu, CW Hu, SY Ko, HL Hsieh, HC Huang, HF Juan (2015) Integrating Phosphoproteomics and Bioinformatics to Study Brassinosteroid-Regulated Phosphorylation Dynamics in Arabidopsis. *BMC Genomics* 16 (1) p. 1–17.
- [401] S De La Fuente Van Bentem, D Anrather, I Dohnal, E Roitinger, E Csaszar, J Joore, J Buijnink, A Carreri, C Forzani, ZJ Lorkovic, A Barta, D Lecourieux, A Verhounig, C Jonak, H Hirt (2008) Site-specific phosphorylation profiling of Arabidopsis proteins by mass spectrometry and peptide chip analysis. *J. Proteome Res.* 7 (6) p. 2458–2470.
- [402] J Van Leene, C Han, A Gadeyne, D Eeckhout, C Matthijs, B Cannoot, N De Winne, G Persiau, E Van De Slijke, B Van de Cotte, E Stes, M Van Bel, V Storme, F Impens, K Gevaert, K Vandepoele, I De Smet, G De Jaeger (2019) Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat. Plants* 5 (3) p. 316–327.
- [403] P Liu, H Zhang, H Wang, Y Xia (2014) Identification of redox-sensitive cysteines in the Arabidopsis proteome using OxiTRAQ, a quantitative redox proteomics method. *Proteomics* 14 (6) p. 750–762.
- [404] R Scheibe (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes: A common principle for individual control. *Plant Physiol.* 96 (1) p. 1–3.
- [405] BB Buchanan (1980) Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31 (1) p. 341–374.
- [406] BB Buchanan, Y Balmer (2005) Redox regulation: A broadening horizon. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56 p. 187–220.
- [407] N Hädrich, JHM Hendriks, O Kötting, S Arrivault, R Feil, SC Zeeman, Y Gibon, WX Schulze, M Stitt, JE Lunn (2012) Mutagenesis of cysteine 81 prevents dimerization of the APS1 subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase and alters diurnal starch turnover in *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant J.* 70 (2) p. 231–242.
- [408] A Kolbe, A Tiessen, H Schluempmann, M Paul, S Ulrich, P Geigenberger (2005) Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (31) p. 11118–11123.
- [409] E Cardemil, MV Encinas, AM Jabalquinto (1990) Reactive sulfhydryl groups in *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1040 (1) p. 71–76.
- [410] M Cecilia Rojas, M Victoria Encinas, RG Kemp, SP Latshaw, E Cardemil (1993) Identification of reactive vicinal cysteines in *Saccharomyces cerevisiae* (ATP) and cytosolic rat liver (GTP) phosphoenolpyruvate carboxykinases. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Protein Struct. Mol.* 1164 (2) p. 143–151.
- [411] GM Carlson, G Colombo, HA Lardy (1978) A Vicinal Dithiol Containing an Essential Cysteine in

Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (Guanosine Triphosphate) from Cytosol of Rat Liver. *Biochemistry* 17 (25) p. 5329–5338.

- [412] S Dumont, J Rivoal (2019) Consequences of oxidative stress on plant glycolytic and respiratory metabolism. *Front. Plant Sci.* 10 (February) p. 1–16.
- [413] E Baena-González, JE Lunn (2020) SnRK1 and trehalose 6-phosphate – two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 55 p. 52–59.
- [414] S Emanuelle, MS Doblin, DI Stapleton, A Bacic, PR Gooley (2016) Molecular Insights into the Enigmatic Metabolic. *Trends Plant Sci.* 21 (4) p. 341–353.
- [415] C Nunes, LF Primavesi, MK Patel, E Martinez-Barajas, SJ Powers, R Sagar, PS Fevereiro, BG Davis, MJ Paul (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol. Biochem.* 63 p. 89–98.
- [416] S Emanuelle, MI Hossain, IE Moller, HL Pedersen, AML Van De Meene, MS Doblin, A Koay, JS Oakhill, JW Scott, WGT Willats, BE Kemp, A Bacic, PR Gooley, DI Stapleton (2015) SnRK1 from *Arabidopsis thaliana* is an atypical AMPK. *Plant J.* 82 (2) p. 183–192.
- [417] DG Hu, M Li, H Luo, QL Dong, YX Yao, CX You, YJ Hao (2012) Molecular cloning and functional characterization of *MdSOS2* reveals its involvement in salt tolerance in apple callus and *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 31 (4) p. 713–722.
- [418] PE Verslues, G Batelli, S Grillo, F Agius, Y-S Kim, J Zhu, M Agarwal, S Katiyar-Agarwal, JJ-K Zhu (2007) Interaction of SOS2 with nucleoside diphosphate kinase 2 and catalases reveals a point of connection between salt stress and H₂O₂ signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 27 (22) p. 7771–7780.
- [419] R Roskoski (1983) Assays of protein kinase. *Methods Enzymol.* 99 (1978) p. 3–6.
- [420] J Casnellie (1991) [9] Assay of protein kinases using peptides with basic residues for phosphocellulose binding. 200 (1975) p. 115–120.
- [421] YF Wei, HR Matthews (1990) A filter-based protein kinase assay selective for alkali-stable protein phosphorylation and suitable for acid-labile protein phosphorylation. *Anal. Biochem.* 190 (2) p. 188–192.
- [422] E Tan, XL Zu, GC Yeoh, PG Besant, P V. Attwood (2003) Detection of histidine kinases via a filter-based assay and reverse-phase thin-layer chromatographic phosphoamino acid analysis. *Anal. Biochem.* 323 (1) p. 122–126.
- [423] Life technologies (2013) Z' -LYTE ® Screening Protocol and Assay Conditions, 2013. [Online]. Available: http://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/files/drug-discovery/pdfs.par.60256.file.dat/20130430_ssbk_customer_protocol_and_assay_conditions.pdf.

[Accessed: 01-May-2018].

- [424] Promega (2015) PepTag[®] Assay for Non-Radioactive Detection of Protein Kinase C or cAMP-Dependent Protein Kinase. [Online]. Available: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/peptag-assay-for-non-radioactive-detection-of-protein-kinase-c-protocol.pdf?la=en>. [Accessed: 01-May-2018].
- [425] DiscoverX ADP Accumulation Assays. [Online]. Available: <https://www.discoverx.com/technologies-platforms/fluorescence-intensity-technology/adp-accumulation-assay-platform>. [Accessed: 01-May-2018].
- [426] ZL Wu (2011) Phosphatase-coupled universal kinase assay and kinetics for first-order-rate coupling reaction. *PLoS One* 6 (8) p. e23172.
- [427] H Zegzouti, SA Goueli (2010) ADP detection based luminiscent phosphotransferase or ATP hydrolase assay, US 2010/0075350 A1, 2010.
- [428] Z Technikova-Dobrova, AM Sardanelli, S Papa (1991) Spectrophotometric determination of functional characteristics of protein kinases with coupled enzymatic assay. *FEBS Lett.* 292 (1–2) p. 69–72.
- [429] CL Putnam-evans, AC Harmon, MJ Cormier (1990) Purification and Characterization of a Novel Calcium-Dependent Protein Kinase. *Biochemistry* 29 p. 2488–2495.
- [430] JY Lee, BC Yoo, AC Harmon (1998) Kinetic and calcium-binding properties of three calcium-dependent protein kinase isoenzymes from soybean. *Biochemistry* 37 (19) p. 6801–6809.
- [431] M Zhang, S Liang, YT Lu (2005) Cloning and functional characterization of *NtCPK4*, a new tobacco calcium-dependent protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* 1729 (3) p. 174–185.
- [432] Y Wang, M Zhang, K Ke, YT Lu (2005) Cellular localization and biochemical characterization of a novel calcium-dependent protein kinase from tobacco. *Cell Res.* 15 (8) p. 604–612.
- [433] V Giammaria, C Grandellis, S Bachmann, PR Gargantini, SE Feingold, G Bryan, RM Ulloa (2011) *StCDPK2* expression and activity reveal a highly responsive potato calcium-dependent protein kinase involved in light signalling. *Planta* 233 (3) p. 593–609.
- [434] W Chang, G Fu, X Chen, J Zhu, Z Zhang (2011) Biochemical characterization of a calcium-sensitive protein kinase *LeCPK2* from tomato. *Indian J. Biochem. Biophys.* 48 (June) p. 148–153.
- [435] PF Cook, ME Neville, KE Vrana, F Thomas Hartl, R Roskoski, PF Cook (1982) Adenosine Cyclic 3',5'-Monophosphate Dependent Protein Kinase: Kinetic Mechanism for the Bovine Skeletal Muscle Catalytic Subunit. *Biochemistry* 21 (23) p. 5794–5799.
- [436] DW Bolen, J Stingelin, HN Bramson, ET Kaiser (1980) Stereochemical and Kinetic Studies on the Action of the Catalytic Subunit of Bovine Cardiac Muscle Adenosine 3' 5'-Monophosphate Dependent Protein Kinase Using Metal Ion Complexes of ATPBS. *Biochemistry* 19 (6) p. 1176–

1182.

- [437] ZA Knight, KM Shokat (2005) Features of selective kinase inhibitors, *Chemistry and Biology*, 12 (6). p. 621–637, 2005.

8. Material suplementario.

Organismo	Nombre	Identificador
<i>Escherichia coli</i>	<i>Eco</i> PEPCK	P22259
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Sce</i> PEPCK	AJS53594.1
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>Cre</i> PEPCK	XP_001694964.1
<i>Chlorella variabilis</i>	<i>Cva</i> PEPCK	XP_005851829.1
<i>Volvox carteri</i>	<i>Vca</i> PEPCK1	XP_002954405.1
	<i>Vca</i> PEPCK2	XP_002951381.1
	<i>Vca</i> PEPCK3	XP_002951380.1
<i>Marchantia polymorpha</i>	<i>Mpo</i> PEPCK1	Mapoly0012s0010.1
	<i>Mpo</i> PEPCK2	Mapoly0012s0074.1
	<i>Mpo</i> PEPCK3	Mapoly0049s0126.1
<i>Selaginella moellendorffii</i>	<i>Smo</i> PEPCK	XP_002964254.1
<i>Physcomitrella patens</i>	<i>Ppa</i> PEPCK1	Pp3c3_5810V3.1
	<i>Ppa</i> PEPCK2	Pp3c4_25090V3.1
	<i>Ppa</i> PEPCK3	Pp3c26_4630V3.1
	<i>Ppa</i> PEPCK4	Pp3c13_4250V3.1
<i>Populus trichocarpa</i>	<i>Ptr</i> PEPCK1	XP_002310867.1
	<i>Ptr</i> PEPCK2	XP_002302349.1
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>Bdi</i> PEPCK	XP_003558320.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Ath</i> PEPCK1	Q9T074
	<i>Ath</i> PEPCK2	B5X574
<i>Zea Mays</i>	<i>Zma</i> PEPCK1	A0A1D6JWH6
	<i>Zma</i> PEPCK2	K7VNE0
<i>Brassica napus</i>	<i>Bna</i> PEPCK1	XP_013733417.1
	<i>Bna</i> PEPCK2	XP_013643326.1
	<i>Bna</i> PEPCK3	XP_013722409.1
<i>Brassica rapa</i>	<i>Bra</i> PEPCK1	XP_009138534.1
	<i>Bra</i> PEPCK2	XP_009132424.1
	<i>Bra</i> PEPCK3	XP_009150658.1
	<i>Bra</i> PEPCK4	XP_009130525.1
<i>Oryza sativa</i>	<i>Osa</i> PEPCK1	LOC_Os03g15050.1
	<i>Osa</i> PEPCK2	LOC_Os10g13700.2
<i>Flaveria trinervia</i>	<i>Ftr</i> PEPCK2	BAB43908.1
<i>Sorghum bicolor</i>	<i>Sbi</i> PEPCK	KXG39751.1
<i>Megathyrus maximus</i>	<i>Mma</i> PEPCK	AAQ10076.1
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Nta</i> PEPCK	XP_016485256.1
<i>Glycine max</i>	<i>Gma</i> PEPCK1	XP_003516278.1
	<i>Gma</i> PEPCK2	XP_003522736.1
	<i>Gma</i> PEPCK3	XP_003517125.1
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Csa</i> PEPCK1	KGN60291.1
	<i>Csa</i> PEPCK2	XP_004143427.1
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Tae</i> PEPCK	A0A3B6JJ78
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Stu</i> PEPCK1	XP_006367987.1
	<i>Stu</i> PEPCK2	XP_006364971.1

<i>Solanum lycopersium</i>	<i>SlyPEPCK1</i>	XP_004252729.2
	<i>SlyPEPCK2</i>	AAG01894.2
<i>Urochloa panicoides</i>	<i>UpaPEPCK1</i>	P49292.1
	<i>UpaPEPCK2</i>	Q9XFA2.1
<i>Musa acuminata</i>	<i>MacPEPCK1</i>	XP_009413708.1
	<i>MacPEPCK2</i>	XP_009398433.1
<i>Anana comosus</i>	<i>AcoPEPCK</i>	XP_020088255.1
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MesPEPCK1</i>	OAY33537.1
	<i>MesPEPCK2</i>	OAY35667.1
	<i>MesPEPCK3</i>	OAY35667.1
<i>Setaria viridis</i>	<i>SviPEPCK</i>	Sevir.9G469000.1
<i>Amborella trichopoda</i>	<i>AtrPEPCK1</i>	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00033.2
	<i>AtrPEPCK2</i>	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00184.4
	<i>AtrPEPCK3</i>	evm_27.model.AmTr_v1.0_scaffold00184.9