



## **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**

**Danisa María Luján Ferrero**

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Alberto Álvaro Iglesias; co-directora: Dra. Claudia Vanesa Piattoni

Lugar de realización: Laboratorio de Enzimología Molecular, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral

Fecha de la defensa: 13 de mayo de 2020

ferrerodanisa@gmail.com

### Resumen

En las plantas superiores, el flujo del carbono y la energía metabólica difieren según las características tróficas del tejido y también varían entre especies y etapas del desarrollo. En las semillas, el metabolismo es principalmente heterotrófico y depende de la sacarosa que proviene de los tejidos fotosintéticos para suplir sus necesidades metabólicas. Se ha demostrado que durante el desarrollo de las semillas el flujo del carbono varía: al inicio, está principalmente destinado a solventar la formación del nuevo tejido, pero, una vez desarrollado el embrión y las estructuras celulares fundamentales, está destinado a la acumulación de compuestos de reserva que permitirán en el futuro la germinación y el establecimiento de una nueva planta. Todo este desarrollo está genéticamente programado y numerosas señales inducen cambios en el metabolismo. Dentro de las señales involucradas, las quinasas de proteínas de las familias SnRK1 y CDPK juegan un rol fundamental en la partición de los hidratos de carbono y en la transición hacia la fase de acumulación de reservas, actuando como integradoras globales frente a señales energéticas y del desarrollo. Éstas se encargan de regular postraduccionalmente por fosforilación diferentes actores de metabolismo.

Con el objetivo de contribuir al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición del carbono en plantas, este trabajo de Tesis se focalizó en evaluar la regulación alostérica y la ocurrencia de la modificación postraduccionale de enzimas claves del metabolismo. Particularmente, estudiamos la ADP-glucosa pirofosforilasa (ADPGlcPPasa) de endosperma de trigo (TaeADPGlcPPasa). Esta enzima cataliza el paso clave y más regulado de la síntesis del almidón en plantas, generando los dadores glucosídicos necesarios para la elongación del polímero de reserva. Estructuralmente, está compuesta de dos

subunidades (S y L) formando un heterotetrámero ( $S_2L_2$ ). Se ha demostrado que las subunidades L funcionan como reguladoras de la actividad enzimática, mientras que las subunidades S tienen un rol catalítico además de regulatorio. Se conoce que esta enzima está altamente regulada, no sólo a nivel transcripcional, sino también alostéricamente por metabolitos y por modulación redox.

Obtuvimos a la TaeADPGlcPPasa en forma recombinante y la caracterizamos bioquímicamente, condicionándose los resultados obtenidos para la misma enzima purificada de fuente. Además, evidenciamos que la subunidad L contribuye a la formación del heterotetrámero, aumentando su eficiencia catalítica y generándole insensibilidad a activadores alostéricos. El rol de las subunidades fue puesto en evidencia mediante la construcción de híbridos con las subunidades de la enzima de tubérculo de papa. Así, determinamos que la subunidad L es la que confiere sensibilidad o insensibilidad a los reguladores alostéricos. Mientras que la subunidad S, confiere afinidad a la unión de fosfato inorgánico, siendo crítica para la estabilidad térmica de la enzima.

Realizamos un análisis comparativo a lo largo del desarrollo de semillas de trigo y de ricino. La ADPGlcPPasa está presente en ambas semillas con diferentes patrones de ocurrencia, y se recupera fosforilada únicamente en semillas de trigo, y no de ricino. Esta modificación ocurre desde la etapa de transición hacia la fase de acumulación de reservas. Realizamos estudios de fosforilación *in vitro*, observando que la TaeADPGlcPPasa es fosforilada tanto por quinasas provenientes de extractos crudos de semillas de trigo como por quinasas recombinantes de plantas (SOS2 y CDPK1), específicamente en condiciones que involucran a quinasas independientes de  $Ca^{2+}$ . Además, observamos que particularmente la subunidad regulatoria TaeL es la que se fosforila.

Este trabajo es la primera evidencia *in vivo* e *in vitro* de la modificación por fosforilación de una ADPGlcPPasa. Aunque los fines de la regulación por fosforilación de la TaeADPGlcPPasa no se encuentran completamente dilucidados, la suma de todos los antecedentes permite especular que las SnRK (específicamente las de la familia SnRK3, como la SOS2) y las CDPK podrían estar involucradas en la regulación de la vía glucolítica y la de síntesis de almidón en semillas durante la fase de acumulación de reservas, donde estas quinasas tienen un rol fundamental.

Esta Tesis contribuye al conocimiento de la regulación global del metabolismo y la partición del carbono en plantas, particularmente en tejidos heterotróficos, abriendo líneas de investigación para alcanzar una mejor comprensión (a nivel molecular) de la síntesis de almidón en el endosperma de trigo y de otros cereales que producen el polisacárido como reserva principal. Estos estudios serán importantes para el diseño de estrategias y herramientas biotecnológicas para mejorar los rendimientos de cultivos de interés agronómico e incluso considerar la aplicación del almidón en fuentes renovables como los biocombustibles y bioplásticos.

## Abstract

### **ON THE METABOLISM OF CARBON IN AUTOTROPHIC AND HETEROTROPHIC CELLS OF PLANTS. CHARACTERIZATION OF REGULATORY MECHANISMS OF KEY ENZYMES FOR THE PARTITIONING OF PHOTOASSIMILATED CARBON**

Seed metabolism is mainly heterotrophic and depends on the sucrose synthesized from photosynthetic tissues to supply its metabolic needs. Seed development is characterized by variations in the carbon flux, destined, firstly, to solve the formation of the new tissue, and later, to accumulate reserve compounds. This development is genetically programmed and numerous signals induce changes in metabolism, where protein kinases play a fundamental role, post-translationally regulating different metabolism actors by phosphorylation. To contribute to the knowledge in global regulation of metabolism and carbon partitioning in heterotrophic tissues of plants, we focused on evaluating allosteric regulation and the occurrence of phosphorylation of key enzymes. Furthermore, we studied the protein kinases involved. We obtained novel results for wheat endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase, a key enzyme in the biosynthesis of starch. The biochemical characterization of the recombinant enzyme was consistent with the results for purified enzyme from endosperm. In a comparative analysis throughout the development of wheat and castor beans seeds, we determined that this enzyme is only phosphorylated in wheat seeds, specifically by calcium-dependent kinases. The information obtained opens lines of research to understand the synthesis of starch in cereal seeds. These studies will be important for the design of biotechnological strategies and tools to improve the yields of crops and consider the application of starch in biofuels and bioplastics.