

## EFFECTO DEL ABA EN LA FOSFORILACIÓN DE LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN CONDICIONES DE ESTRÉS SALINO Y DURANTE LA FORMACIÓN DE LA SEMILLA

Ana Belén Feria<sup>1</sup>, Ludivine Cochereau<sup>1</sup>, Rosario Alvarez<sup>1</sup>, Jean Vidal<sup>2</sup>, Sofía García-Mauriño<sup>1</sup>, Cristina Echevarría<sup>1</sup>.

<sup>(1)</sup>Dpto Biología Vegetal y Ecología (Unidad de Fisiología Vegetal). Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla. Tlf. 954-557073.

E-mail: echeva@us.es

<sup>(2)</sup>Institut de Biotechnologie des Plantes, bât. 630, ERS CNRS 569. Université de Paris-Sud, Centre d'Orsay, 91405 ORSAY Cedex, France.

E-mail: Jean.Vidal@ibp.u-psud.fr

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (E:C: 4.1.1.31, PEPC) es una enzima ampliamente distribuida en plantas, algas y microorganismos, pero no está presente en animales. Cataliza la  $\beta$ -carboxilación del PEP, en presencia de  $Mg^{2+}$ , rindiendo oxalacetato (OAA) que es rápidamente transformado en aspartato o L-malato.

La PEPC está regulada por un mecanismo de fosforilación reversible que amplifica la regulación metabólica de sus efectores L-malato y glucosa-6P y la respuesta al pH (Echevarría et al. 1995, Chollet et al. 1996). En concreto, la PEPC fosforilada es menos sensible a la inhibición por L-malato. La determinación de la  $IC_{50}$  para este inhibidor se utiliza como índice del nivel de fosforilación de la PEPC.

La quinasa implicada (PEPC quinasa) fosforila una única Ser situada en el extremo N-terminal de la PEPC (Jiao et al. 1991b). En plantas  $C_4$  la fosforilación de la PEPC es dependiente de la intensidad de luz mientras que en plantas CAM ocurre durante la noche y parece estar mediada por los niveles de L-malato (Nimmo 2000). A nivel celular la ruta de señalización descrita es la siguiente: una alcalinización del pH citosólico (pHc); se estimula una fosfolipasa C y la producción de inositol trifosfato; se



abren canales de calcio situados en el tonoplasto (sensibles a TMB8) activándose una quinasa  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente (inhibida por W7). Como consecuencia de esto, la PEPC quinasa se activa en un proceso dependiente de una síntesis proteica (Jiao et al 1991a), dando como resultado la fosforilación de la PEPC (Vidal and Chollet, 1997, Coursol et al., 2000).

Además de en hojas de plantas  $\text{C}_4$  y CAM, la fosforilación reversible de la PEPC ha sido descrita en nódulos, hojas de plantas  $\text{C}_3$ , estomas y raíces.

Nuestro grupo de investigación ha descrito la fosforilación reversible de la PEPC en respuesta al estrés salino (Echevarría et al. 2001) y en la germinación y desarrollo de la semilla de trigo y cebada (Osuna et al. 1996, 1999).

Nuestros resultados han puesto de manifiesto que el estrés salino produce un espectacular incremento de la actividad PEPC quinasa y de la fosforilación *in vivo* de la PEPC. La posibilidad de que este efecto estuviera mediado por ABA se estudió en plantas con diferentes tratamientos, bien suministrando ABA (60  $\mu\text{M}$ ) a los cultivos hidropónicos durante 2 semanas o pulverizándolo sobre las hojas (3 veces por semana, dos semanas). La eficacia de los tratamientos con ABA se evidenció por una disminución del crecimiento de la planta y una disminución en la velocidad de fotosíntesis, respecto del control. Sin embargo, las plantas tratadas con ABA, si bien estimulan ligeramente la actividad PEPC quinasa, no reproducen en ningún caso la magnitud de la respuesta provocada por el estrés salino en la fosforilación *in vivo* de la PEPC y en los niveles de actividad *in vitro* de la PEPC quinasa, concluyendo por tanto que esta respuesta es independiente de ABA (Echevarría et al. 2001).

También hemos estudiado la fosforilación de la PEPC durante la germinación de la semilla (Osuna et al. 1996 y 1999). En este trabajo se muestra que la PEPC de capas de aleurona de trigo se fosforila en un 80% durante las primeras 48 h de imbibición completándose el proceso a los 4 días. A diferencia de otros contextos fisiológicos donde se produce una síntesis de la PEPC quinasa concomitante con el proceso de fosforilación, nuestros resultados pusieron en evidencia que la PEPC quinasa se encuentra ya en la semilla seca y no es activada durante la germinación por la vía de transducción de señales descritas hasta la fecha que culmina con la síntesis de la proteína (Osuna et al. 1999). Estos resultados sugirieron que la síntesis de la PEPC quinasa se tenía que realizar durante la fase de desarrollo o maduración de la semilla quedando acumulada en la semilla seca. El trabajo que realizamos actualmente muestra que, en efecto, hay un aumento considerable de la actividad PEPC quinasa durante la formación de la semilla.

Resultados previos de otros autores han puesto de manifiesto que la imbibición de capas de aleurona en presencia de ABA provoca un aumento del pH citosólico así como un incremento del nivel intracelular de L-malato y su liberación hacia el exterior



celular (Heimovaara-Dijkstra et al., 1994). En plantas  $C_4$  la basificación del citosol es un requisito indispensable para el inicio de la cadena de traducción de señales que promueve la fosforilación de la PEPC.

La posibilidad de que el ABA induzca la síntesis/activación de la PEPC quinasa durante la formación de la semilla se ha estudiado de una forma indirecta, utilizando semillas secas y desembrionadas, incubadas con ABA (40  $\mu$ M). Nuestros resultados indican que la imbibición con ABA y con  $^{32}$ P durante 48 h incrementa la fosforilación *in vivo* de la PEPC (medida como incorporación *in vivo* de  $^{32}$ P) así como la actividad *in vitro* de la PEPC quinasa (determinada en ensayos de fosforilación *in vitro* con  $\gamma^{32}$ P-ATP. Estos resultados sugieren que el aumento de ABA durante el desarrollo y maduración de la semilla podría ser la señal que desencadene la síntesis de la PEPC quinasa y la fosforilación de la PEPC. Durante la maduración, a partir de los 25 dpa los niveles de PEPC quinasa son altos y están establecidos pero la enzima *in vivo* es inactiva. La posibilidad de que la enzima se encuentre inactiva coincidiendo con una disminución del ABA durante la fase de maduración y desecación de la semilla esta siendo estudiada. La participación de factores como la hipoxia o la deshidratación de la semilla, en la regulación de la PEPC por fosforilación reversible en la aleurona de trigo, son también contempladas en este trabajo.



## Bibliografía

- Chollet, R., Vidal, J., O'Leary, M.H.** (1996). *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 273-298.
- Coursol, S., Giglioli-Guivarc'h, Vidal, J., Pierre, J.N.** *The Plant Journal* 23: 497-506
- Echevarría, C., Pacquit, V., Bakrim, N., Osuna, L., Delgado, B., Arrio-Dupont, M., Vidal, J.** (1994). *Arch. Biochem. Biophys.*, 315 (2): 425-430.
- Echevarría, C., García-Mauriño, S., Alvarez, R., Soler, A., Vidal, J.** (2001) *Planta* 214: 283-287.
- Heimovaara-Dijkstra, S., Heistek, J.C., Wang, M.** (1994). *Plant Physiol.*, 106: 359-365.
- Jiao, J., Echevarría, C., Vidal, J., Chollet, R.** (1991a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2712-2715.
- Jiao, J., Vidal, J., Echevarría, C., Chollet, R.** (1991b). *Plant Physiol.*, 96: 297-301.
- Nimmo, H.G.** (2000) *Trens Plant Sci* 5:75-80.
- Osuna, L., Gonzales, M.C., Cejudo, F.J., Vidal, J., Echevarría, C.** (1996) *Plant Physiol* 111: 551-558
- Osuna, L., Pierre, J-N., Gonzalez, M-C., Alvarez, R., Cejudo, J.F., Echevarría C., Vidal J.** (1999) *Plant Physiol.* 119:511-520
- Vidal J., Chollet R.** (1997). *Trends Plant Sci.*, 2(6): 230-237.