

La fosfoeno/piruvato carboxilasa (PEPC): enzima clave de los metabolismos fotosintéticos C₄ y CAM

CRISTINA ECHEVARRÍA*, JOSÉ ANTONIO MONREAL,
ANA BELÉN FERIA, EDUARDO TERCIO JIMÉNEZ,
ARANCHA LEÓN, ROSARIO ÁLVAREZ
y SOFÍA GARCÍA-MAURIÑO

Resumen

La fosfoeno/piruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) cataliza la β -carboxilación del fosfoeno/piruvato (PEP) en presencia de HCO_3^- y Mg^{2+} , para producir oxaloacetato (OAA) y Pi (Chollet *et al.*, 1996). La PEPC está ampliamente distribuida en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet *et al.*, 1996). En plantas vasculares su papel estelar está relacionado con la fotosíntesis C₄ y CAM («Crassulacean acid metabolism»), sin embargo desempeña otras funciones como la anaplerótica, en relación a la síntesis de proteínas, homeostasis del pH citosólico, electro-neutralidad y osmolaridad. Está formada por una pequeña familia multigénica algunos de cuyos representantes están regulados a nivel transcripcional por factores como luz, hormonas y metabolitos (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). La naturaleza alostérica de la enzima permite una regulación fina en relación a diferentes ambientes metabólicos. La PEPC está regulada por fosforilación reversible, proceso ligado a una cascada de transducción de señales de alta complejidad. En la actualidad es uno de los mejores modelos de señalización descritos en plantas. Este capítulo se centra en los eventos relacionados con este proceso en plantas C₄ y CAM, los dos sistemas mejor estudiados en la actualidad (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004; Nimmo, 2000; Vidal y Chollet, 1997).

Summary

Phosphoenolpyruvate carboxylase (EC 4.1.1.31, PEPC) catalyzes the β -carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) by HCO_3^- in the presence of Mg^{2+} to yield oxaloacetate and Pi (Chollet *et al.*, 1996). PEPC is a widely distributed enzyme in plants, green algae and micro-organisms but absent in yeast and animals (Chollet *et al.*, 1996). In higher plants, it catalyses a pivotal reaction related to such important processes as C₄ and Crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis, the anaplerotic pathway linked to amino acid synthesis, homeostasis of cytosolic pH, electroneutrality and osmolarity. PEPC belongs to a small multigenic family (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). At the transcriptional level, some PEPC genes respond to external and internal factors (light, hormones and metabolites), while at the

protein level, the allosteric nature of the enzyme allows its activity to be fine-tuned in relation to a varying metabolic environment. PEPC undergoes a posttranslational control by a phosphorylation process linked to a highly complex signal transduction cascade. Today, it is one of the best-described models of plant signaling. This chapter will focus on what is known about these processes in leaves of C₄ and CAM plants, the two systems that have been studied in detail so far (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004; Nimmo, 2000; Vidal y Chollet, 1997).

Características generales

Las plantas de tipo C₄ poseen características anatómicas y bioquímicas que confieren lo que se conoce como el síndrome C₄. Cabe destacar como hecho característico la inducción de la maquinaria fotosintética en la vaina vascular, un tipo de tejido que en las plantas C₃ no es fotosintético. La vaina vascular en las plantas C₄ desarrolla cloroplastos atípicos ricos en fotosistema I y que contienen la maquinaria necesaria para la asimilación del CO₂, a saber, el ciclo de Calvin-Benson o ciclo C₃. En contrapartida las células del mesófilo fotosintético pierden alguna de sus funciones fotosintéticas y desarrollan cloroplastos ricos en fotosistema II pero deficientes en Rubisco. Estas células se distribuyen formando una corona alrededor de la vaina dando lugar a la anatomía Kranz, típica de este tipo de plantas. El ciclo C₄ se desarrolla como vía de comunicación entre ambas células, y su fin último consiste en concentrar el CO₂ en las inmediaciones de la Rubisco para minimizar las pérdidas ocasionadas por la fotorrespiración (Hatch y Slack, 1970). A este hecho contribuye además la fuerte impermeabilización de la vaina a la difusión del CO₂. Como consecuencia las concentraciones de CO₂ que se consiguen en la vaina están muy por encima (2000 ppm) de las concentraciones de CO₂ atmosféricas (360 ppm). Los metabolitos principales

* Departamento de Biología Vegetal y Ecología (Área de Fisiología Vegetal). Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. de la Reina Mercedes nº 6. 41012, Sevilla, España.

que transportan carbono y poder reductor desde las células del mesófilo a las de la vaina son el malato o el aspartato según la modalidad de planta C_4 (Hatch y Slack, 1970). En este contexto fotosintético basado en la separación física de las enzimas y que implica un intenso tráfico intercelular de metabolitos, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) inicia la primera reacción de la vía metabólica C_4 en las células del mesófilo (la carboxilación del PEP) y es objeto de un alto grado de regulación. La figura 1 recoge estos conceptos mostrando la anatomía Kranz de una hoja de sorgo (una planta C_4 del tipo NADP-ME) y un esquema, marcado en rojo, de las reacciones que comportan la vía C_4 en este subtipo fotosintético.

Otra variante fotosintética en la que interviene el ciclo C_4 es la que se da en las plantas CAM. En las plantas CAM se reproduce el mismo ciclo C_4 ; sin embargo, la separación de las dos carboxilaciones es temporal. El málico producido vía PEPC se acumula en la vacuola durante la noche. Durante el día es descarboxilado. El CO_2 desprendido provoca el cierre estomático, minimizando la pérdida de agua, y un aumento de la concentración de CO_2 en las inmediaciones de la Rubisco eliminando la fotorrespiración. Finalmente, el CO_2 es asimilado en el ciclo de Calvin-Benson. La eficiencia hídrica de las plantas CAM es aún mayor que la de las C_4 (Smith y Winter, 1996).

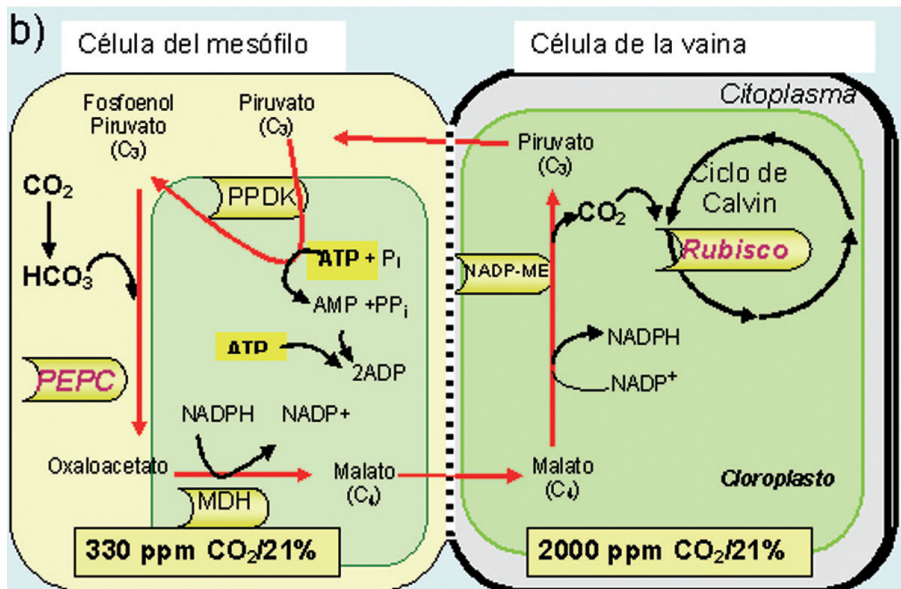
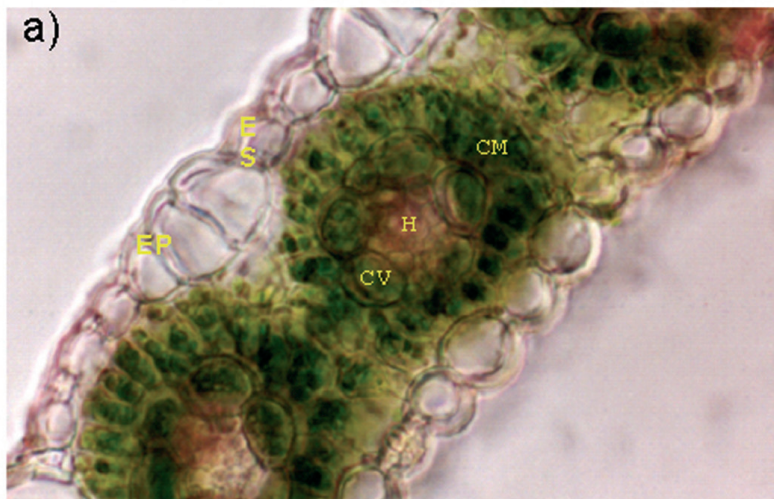


FIGURA 1: a) Corte transversal de una hoja de sorgo mostrando la anatomía Kranz; CM, célula del mesófilo; CV, célula de la vaina; H, haces vasculares; EP, epidermis, ES, estoma. b) Ciclo C_4 en una planta del tipo NADP-enzima málico (NADP-ME). Línea gruesa gris, pared celular gruesa e impermeable que impide la difusión de CO_2 en las células de la vaina. PEPC, fosfoenolpiruvato carboxilasa; MDH, malato deshidrogenasa; PPKK, piruvato fosfato diquinasa. Los datos de concentración de CO_2 son los estimados para cada tipo de célula.

Las plantas C₄ y CAM constituyen una de las adaptaciones más complejas y representativas de los vegetales a condiciones de estrés (Sheen, 1999). Además, aquellas que son facultativas cambiando de metabolismo fotosintético C₃ a CAM o a C₄ en presencia de un factor ambiental estresante (baja concentración de CO₂, altas temperaturas, salinidad, fotoperiodo o condiciones nutritivas adversas), representan unos de los más singulares y mejor conocidos ejemplos de aclimatación (Hasegawa *et al.*, 2000; Lüttge, 2004).

En este capítulo profundizaremos en los aspectos relacionados con la regulación de la fosfoenolpiruvato carboxilasa fotosintética (PEPC) y en concreto en su regulación postraduccional por fosforilación reversible.

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC)

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) cataliza la β -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO₃⁻ y Mg²⁺, para producir oxaloacetato (OAA) y Pi (Chollet *et al.*, 1996). La PEPC fue caracterizada por primera vez en hojas de espinaca en 1953, considerándose durante mucho tiempo como una carboxilasa de plantas con función secundaria con respecto a la Rubisco (Bandurski y Greiner, 1953). Sin embargo, el descubrimiento de la fotosíntesis C₄ y la implicación de una isoenzima específica de PEPC en esta ruta, aumentaron considerablemente el interés por esta enzima. Además de su implicación en este contexto fotosintético, la PEPC tiene una multiplicidad de funciones en la célula. Debido a la baja Km por el sustrato bicarbonato (en el rango de μ molar) esta enzima interviene, como función general, en la economía del carbono de la célula recapturando el CO₂ respiratorio. Como funciones específicas se le asignan una función anaplerótica, la regulación del pH celular, interviene en la fijación de nitrógeno en leguminosas, en la absorción y transporte de cationes, en el movimiento estomático y en la interacción del tubo polínico y el estilo (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui, 2004). También ha sido implicada en la maduración y germinación de la semilla (Osuna *et al.*, 1996, 1999; González *et al.*, 1998, Izui, 2004) y en la maduración del fruto (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui, 2004).

Para satisfacer esta multiplicidad de funciones la PEPC está formada por una familia multigénica que codifica diferentes isoenzimas. En *Sorghum vulgare*, por

ejemplo, está representada por *SvC3*, PEPC constitutiva de Tipo-C₃; *SvC4*, PEPC fotosintética de Tipo C₄; y *SvC3RI*, PEPC de raíz, inducible de Tipo C₃ (Crétin *et al.*, 1991). Recientemente se ha descrito la existencia de una PEPC de tipo bacteriano en *Arabidopsis thaliana* y arroz (Sánchez y Cejudo, 2003).

La PEPC es una enzima citosólica ampliamente distribuida en plantas, algas verdes y microorganismos pero ausente en levaduras y animales (Chollet *et al.*, 1996). Se organiza como un homotetrámero con subunidades de aproximadamente 110 kDa (Chollet *et al.*, 1996). La estructura tridimensional de la PEPC de *E. coli* y maíz muestra que las cuatro subunidades se organizan en un dímero de dímeros y que todos los determinantes estructurales importantes son semejantes entre las dos enzimas (Matsumura *et al.*, 2002), con la notable diferencia de la adquisición de un dominio de fosforilación en las PEPC eucariotas que está ausente en la PEPC bacteriana (Sánchez y Cejudo 2003; Vidal y Chollet, 1997). Esta adquisición ha resultado ser de gran importancia ya que las PEPC de plantas están fuertemente reguladas por fosforilación reversible (Bakrim *et al.*, 1993; Echevarría y Vidal, 2003). También existen diferencias importantes entre la isoenzima fotosintética (tipo C₄) y las isoenzimas de tipo C₃. Uno de los requerimientos básicos que están en la base de las diferencias cinéticas de estas isoenzimas es poseer una Ser situada en la posición 774 en la PEPC-C₄, que en la PEPC-C₃ es una Ala (Bläsing *et al.*, 2000). Además, el segmento 296-437 (301-442 en maíz) es también un determinante crítico que caracteriza a las PEPC C₄ (Izui *et al.*, 2004).

Regulación postraduccional de la PEPC

La coordinación entre el ciclo C₄ y el ciclo de Calvin-Benson (ciclo C₃) exige una fuerte regulación de la actividad de sus enzimas carboxiladoras. La PEPC está regulada a nivel transcripcional por diferentes factores entre los que destacan la luz, factores de estrés (salinidad, estrés hídrico, nutricional), hormonas (ABA y citoquininas) y fotoperiodo (revisado en Echevarría *et al.*, 2004). Sin embargo, en este capítulo nos centraremos en la regulación postraduccional de la PEPC profundizando en su mecanismo de regulación por fosforilación reversible y en algunos de los aspectos novedosos que conciernen a la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PPCK), así como a los elementos de

la cadena de transducción de señales que opera para la síntesis/activación de esta enzima.

La PEPC está sujeta a regulación alostérica. En plantas dicotiledóneas, la PEPC se activa por glucosa 6-fosfato (G6P) y se inhibe por L-Malato o Aspartato (Asp). En plantas monocotiledóneas, además de éstos, la Glicina o la Alanina son activadores (Chollet *et al.*, 1996; Izui *et al.*, 2004). El L-malato interacciona con la enzima en diferentes puntos, produciendo una inhibición competitiva, no competitiva o mixta dependiendo del pH, de la concentración y del estado de fosforilación de la PEPC (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994). La G6P incrementa la V_{\max} de la PEPC produciendo una bajada de la K_m para el PEP y disminuye el efecto inhibitor del malato (Chollet *et al.*, 1996). Tanto la actividad catalítica como el control metabólico son altamente dependientes del pH, especialmente cuando se ensaya a valores subóptimos de 7,1 a 7,3 (Echevarría *et al.*, 1994); así, la afinidad de la enzima por PEP y Mg^{2+} aumenta fuertemente entre pH 7 y 8. El pH óptimo de la actividad de la enzima ensayada in vitro es de 8.

La PEPC C_4 evolucionó a partir de isoenzimas ancestrales C_3 durante la evolución de las angiospermas, adquiriendo propiedades cinéticas y de regulación distintas a las de las isoenzimas C_3 . Así, para la isoenzima fotosintética C_4 de maíz encontramos valores de K_m para PEP, Mg^{2+} , y HCO_3^- a pH 7,3 de 30, 10 y 2 veces superiores a los de la forma C_3 , respectivamente (Dong *et al.*, 1998).

La regulación de la actividad de la PEPC está influenciada por el estado oligomérico de la enzima, siendo el tetrámero la conformación óptima, seguida del dímero, y con un monómero inactivo. Los cambios en el estado de oligomerización están propiciados por factores como dilución de la enzima, concentración de sales en el medio de ensayo, concentración de L-Malato o baja temperatura (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, la contribución real de esta regulación a la actividad de la enzima in vivo no está clara en plantas C_4 . Por el contrario, en plantas CAM hay evidencias de que el tetrámero actuaría durante la fase nocturna asociado a la fase activa de fijación de CO_2 (Chollet *et al.*, 1996).

La abundancia de cisteínas en la PEPC (7, en posiciones altamente conservadas) hace pensar que la actividad de la PEPC podría estar influenciada por el estado redox de la enzima (Chollet *et al.*, 1996). Sin embargo, hasta la fecha no se ha descrito ninguna cascada de óxido/reducción tipo ferredoxina/tiorredo-

xina implicada en la regulación de la PEPC (Chollet *et al.*, 1996). En otro sentido, recientemente se ha descrito que productos como DTT, mercaptoetanol, o glutatión reducido, cambian débilmente la sensibilidad de la PEPC C_4 al malato in situ (Pierre *et al.*, 2004). Sin embargo, ninguno de estos componentes tiene efecto in vitro. El efecto observado no se debe a ningún proceso mediado por tiorredoxina o dependiente de fosforilación; sin embargo, debido a que el glutatión es un compuesto fisiológico que se encuentra en el citosol principalmente en estado reducido, los autores proponen una posible contribución de este compuesto tiólico a la protección de la enzima frente al málico (Pierre *et al.*, 2004).

Regulación de la PEPC por fosforilación reversible

La fosforilación reversible de la PEPC fotosintética se puso de manifiesto en *Bryophyllum* y maíz, plantas CAM y C_4 respectivamente (Chollet *et al.*, 1996). Estudios posteriores pusieron de manifiesto que la fosforilación de la PEPC depende de luz en plantas C_4 (Echevarría *et al.*, 1990) y de un oscilador circadiano aún sin identificar en plantas CAM (Nimmo, 2000). En cualquiera de estos casos la fosforilación de la PEPC está asociada a la etapa activa de fijación de CO_2 . Es un mecanismo sinérgico que altera la regulación metabólica de sus efectores negativos, L-Malato, y positivo, G6P, y la respuesta al pH (Echevarría *et al.*, 1994). La PEPC fosforilada es menos sensible a málico, responde mejor a G6P y es más eficaz a pH subóptimo pero fisiológico de 7 y 7,3 (Echevarría y Vidal, 2003).

La fosforilación de la PEPC se produce en un único residuo de serina (Ser), localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La Ser fosforilable reside en el motivo E/DR/KxxS*IDAQL/MR, común a todas las enzimas de plantas secuenciadas hasta la fecha, pero ausente en las PEPC de cianobacterias y en la PEPC de tipo bacteriano de plantas (Chollet *et al.*, 1996; Sánchez *et al.*, 2003). Este hecho sugiere que la regulación de la enzima por fosforilación ocurre en los múltiples y diversos contextos fisiológicos donde la PEPC está involucrada.

Los estudios de mutagénesis dirigida sobre una PEPC C_4 recombinante de sorgo, pusieron de manifiesto que el efecto de la fosforilación puede ser simulado por la introducción de una carga negativa, sustituyendo

el residuo de serina por aspartato (S8D) en el extremo N-terminal de la proteína. La incorporación de una carga negativa en dicho dominio se traduce en un aumento de la velocidad catalítica y una disminución de la sensibilidad al L-Malato (Chollet *et al.*, 1996). La modificación de las propiedades funcionales de la PEPC también se consigue por la unión a la PEPC de anticuerpos específicos dirigidos contra el péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo N-terminal, que contiene la secuencia del sitio de fosforilación de la enzima C₄ de hojas de sorgo, denominados APS-IgG (Pacquit *et al.*, 1995). Estos anticuerpos imprimen una distorsión en la molécula que simula la fosforilación (Pacquit *et al.*, 1995). Otros tratamientos como la sustitución de un residuo básico situado tres aminoácidos antes de la Ser por Asn, o la eliminación del péptido N-terminal de la PEPC-C₄ de maíz con enteroquinasa mimetizan parcialmente el efecto de la fosforilación (Izui *et al.*, 2004).

La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PPCK)

La fosforilación de la PEPC la realiza una proteína quinasa llamada PEPC-quinasa (PPCK). La PPCK es altamente específica, pertenece a la familia de las quinasas Ca²⁺/calmodulina dependientes (CDPK) aunque no posee ninguna extensión N-terminal ni C-terminal que contenga motivos de regulación como sitios de unión a Ca²⁺ o secuencia autoinhibidora; también carece de motivos de fosforilación. Su actividad es independiente de Ca²⁺, y es la proteína quinasa más pequeña conocida hasta la fecha con un peso molecular de 32 kDa (Hartwell *et al.*, 1999). Es la primera quinasa descrita cuya regulación se produce por cambios rápidos en su velocidad de síntesis, con una velocidad de recambio de 2 h (Hartwell *et al.*, 1999; Jiao *et al.*, 1991). Las PEPC-quinasa de *Flaveria* y de *M. crystallinum* contienen una secuencia específica (GAA, ATAGAT y elementos GTA) en la región 3' no codificante, determinantes para los ARNm de vida corta, por lo que se les supone una tasa de recambio rápida para el ARNm (Tsuchida *et al.*, 2001).

Las primeras PEPC-quinasas se clonaron a partir de *Kalanchoe fedtschenkoi* y *Arabidopsis* en 1999 (Hartwell *et al.*, 1999). En la actualidad se sabe que la PEPC-quinasa está codificada por una pequeña familia de genes (Hartwell *et al.*, 1999; Nimmo, 2003; Shenton *et*

al., 2006). El genoma de *Arabidopsis* posee dos genes de PEPC-quinasa, *PPCK1* y *PPCK2*, siendo *PPCK1* el que se expresa de forma más abundante en las hojas de la roseta (Fontaine *et al.*, 2002; Nimmo, 2003). En tomate, la expresión de *PPCK2* aumenta considerablemente durante la maduración del fruto (Marsh *et al.*, 2003). También se han encontrado representantes de estas dos isoenzimas en berenjena y tabaco (Marsh *et al.*, 2003) y en *F. trinervia* (Nimmo *et al.*, 2003; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004). En soja se han identificado cuatro representantes de *PPCK* (Sullivan *et al.*, 2004). Dos de las isoformas (*GmPPCK2* y *GmPPCK3*) se expresan preferentemente en el nódulo dependiendo del aporte de fotosintatos desde la raíz (Sullivan *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2003, 2007).

Los productos de la traducción de los ADNc de los genes *PPCK* constan de 274-307 residuos de aminoácidos, y poseen una masa molecular de 31-33 kDa. Al alinear secuencias de PEPC-quinasa, se observa que los subdominios IV, V y VIA son muy variables mientras que los X y XI están muy conservados y son característicos de esta enzima (Izui *et al.*, 2004).

En especies C₄ se han identificado varios representantes de PEPC-quinasa. En *F. trinervia* se ha identificado un gen *PPCK* que se expresa fuertemente en hojas en respuesta a la luz (Tsuchida *et al.*, 2001), mientras que su expresión en otros tejidos es muy escasa, por lo que se cree que este gen codifica la PPCK C₄ que fosforila a la PEPC fotosintética (Shenton *et al.*, 2006). En maíz se han identificado cuatro genes que codifican para PPCK, denominados *ZmPPCK1-4* (Shenton *et al.*, 2006). *ZmPPCK1* se expresa preferentemente en respuesta a luz en las células del mesófilo de hojas, mientras que *ZmPPCK2* se expresa en luz y oscuridad en células de la vaina y no parece estar sometido a regulación circadiana. Los otros dos genes de *PPCK* de maíz se expresan en menor nivel y en otros tejidos de la planta (Shenton *et al.*, 2006). En sorgo, se han descrito *SbPPCK1* y *SbPPCK2*, equivalentes a *ZmPPCK1* y *ZmPPCK2*. Las proteínas PPCK1 y PPCK2 de sorgo poseen un 92 % y un 90% de identidad de aminoácidos con las quinasas 1 y 2 de maíz respectivamente. Además, la expresión de *SbPPCK1* aumenta de forma drástica en respuesta a luz, mientras que la respuesta de *SbPPCK2* a los cambios luz/oscuridad es menor. Estos resultados muestran que los genes *ZmPPCK1* y *SbPPCK1* codificarían para la PPCK1, que estaría considerada como la PPCK fotosintética que opera en el ciclo C₄ (Shenton *et al.*, 2006). Las proteínas PPCK2

y 3 de maíz y la 2 de sorgo son muy parecidas entre sí, y se diferencian del resto de miembros de la familia PEPC-quinasa en que contienen una inserción ácida de longitud variable entre el dominio VIb y VII del dominio catalítico quinasa (Shenton *et al.*, 2006).

Cadena de transducción de señales que conduce a la síntesis/activación de la PEPC-quinasa

La PEPC-quinasa está regulada principalmente a nivel transcripcional (Hartwell *et al.*, 1999). En plantas C_4 , la PEPC-quinasa se activa durante el día en respuesta a una alta intensidad luminosa, a través de una cadena de transducción de señales de la que se conocen numerosos componentes (Coursol *et al.*, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). En plantas CAM, la síntesis de la PEPC-quinasa depende de un oscilador circadiano que actúa en conjunción con el malato (Nimmo, 2000). En el caso de las plantas CAM, el L-Malato se libera de la vacuola al citosol durante el día, disminuyendo la expresión del gen *PPCK*, la actividad PEPC-quinasa y el estado de fosforilación de la PEPC, proceso que se revierte en oscuridad (Bakrim *et al.*, 2001) siguiendo un ritmo circadiano (Nimmo, 2000 y 2003).

La cinética de aparición de la actividad *PPCK* en la hoja de maíz (planta C_4) es relativamente lenta, con un máximo de actividad después de 90 min de iluminación (Echevarría *et al.*, 1990). La inhibición de este proceso por CHX sugiere la implicación de una neosíntesis de la enzima como elemento de la cadena de transducción que conduce a la fosforilación de la PEPC *in vivo* (Hartwell *et al.*, 1999; Jiao *et al.*, 1991) o *in situ*, en los protoplastos de células del mesófilo de *Digitaria* (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996).

La fotoactivación de la PEPC-quinasa C_4 está mediada por la fotosíntesis, ya que se inhibe en presencia de inhibidores del flujo fotosintético de electrones (DCMU), de desacoplantes y también de inhibidores del ciclo de Calvin (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003 Vidal y Chollet, 1997). Resultados obtenidos en protoplastos de células del mesófilo ponen de manifiesto que la basificación del pH y la presencia de Ca^{2+} son elementos indispensables para la fotoinducción de la actividad PEPC-quinasa, así como para la fosforilación *in situ* de la PEPC. En este sentido, se ha sugerido que el ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) es el

metabolito mensajero que produce la regulación positiva de la quinasa en plantas C_4 (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). En las hojas C_4 iluminadas, este metabolito es producido en el ciclo de Calvin en los cloroplastos de las células de la vaina y difunde a las células vecinas del mesófilo, donde se transporta al cloroplasto en su forma parcialmente protonada. Existen evidencias que apoyan que este proceso de bombeo de protones, y la consecuente alcalinización del citosol es, de hecho, lo que dispara la transducción de señales para la síntesis de la quinasa en las células del mesófilo C_4 (Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996). La secuencia de acontecimientos de esta cadena de transducción de señales en hojas C_4 implicaría los siguientes elementos: i) la luz, a una intensidad luminosa superior a $200 \mu E m^{-2} s^{-1}$; ii) el 3-PGA, producido en el ciclo de Calvin y que es transportado al mesófilo actuando como mensajero intercelular; iii) la basificación del pH citosólico; iv) la participación de una fosfolipasa C dependiente de inositol (PI-PLC) (Coursol *et al.*, 2000) y producción de inositol trifosfato (IP_3); v) apertura de canales de Ca^{2+} del tonoplasto (sensibles a TMB8) y activación de una quinasa Ca^{2+} -dependiente (inhibida por W7), con características de proteína quinasa C (PKC) (Coursol *et al.*, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 2004); vi) síntesis de la PEPC-quinasa; vii) fosforilación de la PEPC, hecho a su vez modulado por una regulación metabólica (L-malato y G6P) y por el pH (Echevarría *et al.*, 1994). Además, resultados recientes de nuestro grupo han mostrado que en la cadena de transducción de señales hay otra fosfatasa implicada (datos no publicados). Esta fosfatasa sería de tipo 2B o 2C, ya que no es sensible al ácido okadáico ni a la microcistina-LR (inhibidores específicos de PP2A).

Según estudios realizados en protoplastos y hojas de *M. crystallinum*, existe una cascada de transducción similar a la de plantas C_4 en plantas CAM (Bakrim *et al.*, 2001; Taybi *et al.*, 1999). En ellas, el incremento de pH desencadenante de la señalización, que permitiría la expresión del gen *PPCK*, sería el resultado del transporte de ácido málico a la vacuola durante la noche. Cuando el malato se libera de la vacuola al citosol durante el día, la expresión y actividad de la quinasa y el estado de fosforilación de la PEPC disminuyen (Coursol *et al.*, 2000; Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997). En las plantas CAM, el malato producido por la PEPC citosólica durante la noche se transporta activamente a la vacuola. Este transporte se

realiza por ATP-*asas* de H⁺ del tonoplasto que establecen un gradiente electroquímico de H⁺ a través de la membrana cuando los protones son bombeados a la vacuola (Cushman y Bohnert, 1999). Puede ser que este proceso produzca la alcalinización del citosol en las células del mesófilo de hojas CAM. Apoyando esto, se ha visto que el pH citosólico del mesófilo en la planta CAM *Kalanchoe daigremontiana* aumenta aproximadamente en 0,3 unidades durante la última fase día/principio de oscuridad.

Los metabolitos, además de regular la síntesis en plantas CAM (Nimmo, 2003), también tienen efectos en algunas plantas C₃ y C₄. Por ejemplo, plantas de tabaco a las que se les suministra malato por corriente transpiratoria, reducen los niveles de actividad y de transcritos de la nitrato reductasa, que a su vez están coordinados con los de PEPC y PEPC-quinasa (Nimmo, 2003). En nódulos, el gen de *PPCK* se expresa en función de los fotosintatos translocados por la hoja, siendo la PEPC fosforilada durante el ciclo de luz, coincidiendo con el mayor aporte de fotosintatos (Nimmo, 2003; Xu *et al.*, 2003).

Numerosos estudios realizados en hojas de plantas C₃ y en órganos no fotosintéticos indican que en estas plantas y órganos C₃, la activación de la *PPCK* también ocurre por síntesis proteica a través de una cadena de señalización que comparte numerosos elementos con la descrita en las plantas C₄ y CAM, con la notable excepción de la activación de la *PPCK* de semillas de trigo y cebada durante la germinación (Osuna *et al.*, 1999). Así, en protoplastos de células del mesófilo de *Arabidopsis* se ha comprobado que la expresión de *PPCK1* (la *PPCK* específica de la roseta) se activa por luz e implica el ciclo de los fosfoinosítidos, flujos de calcio desde la vacuola al citosol, y la regulación positiva de la PEPC-quinasa mediante el aumento en la tasa de renovación (Gousset-Dupont *et al.*, 2005). Además, esta cascada es dependiente de fotosíntesis. Sin embargo, en plantas y órganos C₃ se han descrito algunas variantes. Por ejemplo, en hojas cortadas de tabaco, el aumento de actividad PEPC-quinasa se bloquea por inhibidores de la fotosíntesis y por CHX, pero también por inhibidores de la glutamina sintetasa (Li *et al.*, 1996). Esta inhibición se revierte parcial y específicamente al aplicar glutamina exógena a las hojas, lo que induce a los autores a concluir que la *PPCK* se activa por luz en plantas C₃ mediante una ruta similar, pero no idéntica, a la que ocurre en maíz. En protoplastos del mesófilo de cebada, se ha observa-

do que la fosforilación de la PEPC dependiente de luz se modula por síntesis proteica y por calcio, sin embargo, esto ocurre sin una fluctuación asociada de los niveles de PEPC-quinasa, que se detecta siempre (Smith *et al.*, 1996). Otra variante importante es la definida por nuestro grupo. En trabajos realizados con semillas de trigo y cebada hemos puesto de manifiesto la fosforilación de la PEPC durante la germinación. Sin embargo la activación de la *PPCK*, inactiva en la semilla seca, no se produce por síntesis proteica (Osuna *et al.*, 1996 y 1999) sino por un aumento en la relación G6P/malato que se produce en las primeras horas de la germinación (Feria *et al.*, 2005).

Recientemente, los trabajos de Sullivan *et al.* (2004) describen un gen de *PPCK* de soja (*PPCK4*), una planta C₃, que se regula de forma circadiana en hojas pero no en raíces. Comprueban que el gen del reloj circadiano *LHY/CCA1* se expresa tanto en hojas como en raíces siguiendo el ciclo normal, lo que indica que el reloj funciona en ambos órganos, pero sólo está conectado a la expresión del gen *PPCK4* en las hojas. En este trabajo se describe por primera vez la expresión de un gen *PPCK* bajo un control circadiano en una planta que no es CAM y, además, ese control es dependiente del órgano de la planta (Sullivan *et al.*, 2004 y 2005).

Finalmente, en arroz, se ha descrito recientemente un nuevo mecanismo en el control de la expresión de uno de los genes de *PPCK*, en concreto *OsPPCK2*. Este mecanismo se ha llamado iniciación alternativa de la transcripción, y consiste en la expresión de dos transcritos distintos a partir del mismo gen (Fukayama *et al.*, 2006), uno más corto y otro más largo (*OsPPCK2-S* y *OsPPCK2-L* respectivamente). La expresión diferencial de este gen en respuesta a la nutrición por fosfato y nitrógeno sugiere que la iniciación alternativa es un mecanismo de regulación de la *PPCK2* con significación fisiológica (Fukayama *et al.*, 2006).

Otros mecanismos de regulación de la *PPCK*

Aunque la síntesis/degradación de la PEPC-quinasa representa el mecanismo principal de regulación, existen otros factores que pueden regular la actividad de la enzima. En este sentido, la PEPC-quinasa está regulada por el pH, siendo su óptimo *in vitro* de 8 (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994). Además, la fosforilación de la PEPC en ensayos reconstituidos con PEPC-quinasa está regulada por metabolitos

(Echevarría *et al.*, 1994). La fosforilación es inhibida por L-Malato (Echevarría *et al.*, 1994). Esta inhibición por L-Malato es revertida en presencia de G6P (Echevarría *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003). La base de este mecanismo sería un cambio de conformación de la PEPC en presencia de estos metabolitos y no una acción directa de ellos sobre la actividad PEPC-quinasa (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría *et al.*, 1994; Echevarría y Vidal, 2003). Esta regulación por metabolitos de la fosforilación de la PEPC también ocurre durante el desarrollo, maduración y germinación de semillas de cebada y de sorgo (Feria *et al.*, 2005; Osuna *et al.*, 1999).

Recientemente se ha aislado un inhibidor de la PEPC-quinasa de hojas de plantas C_4 (en maíz) y CAM (en *K. fedtschenkoi*). Su naturaleza es proteica (100 kDa), y se une por interacción directa inhibiendo el nivel basal de PEPC-quinasa existente en condiciones bajo las cuales no se requiere un flujo rápido de carbono a través de la PEPC (Nimmo *et al.*, 2001). Por el momento no parece estar directamente implicado, como elemento esencial, en la regulación luz/oscuridad de la actividad PEPC-quinasa C_4 o de la regulación circadiana de la PEPC-quinasa de plantas CAM.

Por otra parte, los trabajos de Saze *et al.* (2001) muestran que la PPCK de maíz se inactiva *in vitro* en condiciones semi-oxidativas, y se reactiva eficientemente por una reducción mediada por tiorredoxina. Además, observan el mismo fenómeno con la PPCK de *F. trinervia* (Saze *et al.*, 2001). Sin embargo, no han obtenido evidencias de que el mecanismo sea operativo *in vivo* o que esté implicado en la regulación circadiana de la PPCK, ni en plantas C_4 ni en CAM.

Otro mecanismo implicado en la regulación de la PPCK podría provenir de la interacción con su sustrato, la PEPC. En este sentido, se ha constatado que cuando se utiliza como sustrato de la fosforilación un péptido sintético de 20 aminoácidos que contiene el dominio de fosforilación de la PEPC, la eficiencia de la fosforilación por la PPCK es muy baja. Estos resultados sugirieron la existencia de un sitio secundario de interacción con la PPCK. Este segundo sitio de interacción es, al menos *in vitro*, el extremo C-terminal de la PEPC (Álvarez *et al.*, 2003). Resultados recientes obtenidos por nuestro grupo mostraron que un péptido sintético que contiene los últimos 19 aminoácidos del extremo C-terminal de la PEPC, inhibe *in vitro* la fosforilación de la PEPC por la PPCK, aportando la primera evidencia de que la alta especificidad de la

PEPC-quinasa por la PEPC, podría provenir de la interacción con el dominio C-terminal hidrofóbico de su sustrato (Álvarez *et al.*, 2003).

Regulación de la PPCK en condiciones de estrés

Las plantas C_4 y CAM son conocidas por tener una eficiencia hídrica superior a la de las plantas C_3 (Smith y Winter, 1996). Además, son plantas muy competitivas en ambientes salinos (Echevarría *et al.*, 1988; Hasegawa, 2000). La contribución de la PEPC a esta respuesta al estrés salino se demostró en algunas especies C_4 como el sorgo (Amzallag *et al.*, 1990), y también en especies C_3 (Popova *et al.*, 1995), con un aumento de la actividad PEPC. También se ha mostrado un aumento de la actividad PEPC en nódulos tratados con diferentes concentraciones de sal (Soussi *et al.*, 1998). En la planta halófila *Mesembryanthemum crystallinum* la salinidad induce la transcripción y la actividad de la PEPC y del metabolismo CAM. Sin embargo, curiosamente, el promotor de la PEPC de *Mesembryanthemum crystallinum* expresado en plantas transgénicas de tabaco no es inducible por sal (Cushman *et al.*, 1993).

En la actualidad se sabe que el estrés salino conlleva un incremento de PEPC y paralelamente un aumento de actividad nocturna de la PPCK Ca^{2+} -independiente, en plantas CAM (Chollet *et al.*, 1996). Estudios realizados en la planta *Clusia*, con patrones fotosintéticos entre C_3 y CAM constitutivo, han podido demostrar que la expresión de la PEPC es el factor primario determinado por la capacidad genotípica del CAM y que la abundancia de transcritos de PPCK regulados durante el día y la noche (alto durante la noche) es más bien la consecuencia del funcionamiento del CAM y de la fluctuación diurna de metabolitos (Taybi *et al.*, 2004). Si bien se sabe que la expresión de la PEPC en la inducción del CAM por salinidad u otros factores de estrés es también producida por ABA (Taybi *et al.*, 2002), no existen datos sobre la participación de esta hormona en la expresión de la PPCK.

La inducción de la PEPC y de la PPCK en el metabolismo CAM está bien documentada (Taybi *et al.*, 2002; Nimmo, 2003); sin embargo, existen pocos trabajos sobre la contribución del mecanismo de fosforilación de la PEPC a la adaptación o tolerancia a la salinidad, y en general a otros estreses, en plantas C_4 . Este concepto es tanto más importante cuanto que es

conocido que en la planta C₄ la fosforilación de la PEPC responde del 85% de la eficacia fotosintética (Bakrim *et al.*, 1993; Nimmo, 2000).

Los primeros resultados publicados sobre el efecto de la salinidad en la PPCK y en la fosforilación de la PEPC en una planta C₄ fueron obtenidos por nuestro grupo y derivan del hallazgo de un espectacular aumento de la actividad de la PPCK en extractos crudos de plantas de sorgo aclimatadas a concentraciones crecientes de NaCl (172 y 258 mM NaCl). Este aumento de PPCK repercute en un incremento de la fosforilación in vivo de la PEPC, sin embargo los niveles de PEPC no se ven alterados (Echevarría *et al.*, 2001). El efecto sobre la PPCK es independiente del estrés osmótico; se debe a la toxicidad iónica siendo también promovido por Li⁺ (García-Mauriño *et al.*, 2003), y no es promovido por la aplicación de ABA exógeno bien a cultivos hidropónicos o por pulverización foliar (Echevarría *et al.*, 2001). Por último, el tratamiento con NaCl aumenta la actividad PPCK de hojas de sorgo en oscuridad en un proceso que depende de síntesis proteica. Este es el primer contexto metabólico en el que se induce la síntesis de la PPCK en oscuridad, en una hoja de planta C₄. La consecuencia de este hecho es un considerable aumento de la concentración de malato en oscuridad además de un incremento de malato en luz respecto de las plantas controles. La ausencia de fijación nocturna de CO₂ parece indicar que la planta C₄ en condiciones de estrés severo, al igual que algunas C₃, podría manifestar un CAM-latente con un aumento de los niveles de malato tanto nocturnos como diurnos (García-Mauriño *et al.*, 2003). Además del estrés salino se han descrito resultados sobre un aumento de la PPCK en aire libre de CO₂, en plantas CAM (Nimmo, 2000) y en estrés oxidativo (Izui *et al.*, 2004).

En conjunto estos resultados indican que la participación de la PEPC en situaciones de desecación, salinidad, o CO₂ limitante, se puede establecer por una regulación del nivel de fosforilación de la enzima destacando el papel de la PPCK como enzima implicada en mecanismos de tolerancia al estrés.

Regulación de la degradación de la PEPC-quinasa

El protagonismo en los estudios de la PPCK ha estado centrado en la regulación de la síntesis de la enzima y de la cadena de transducción de señales que

conduce a la síntesis/activación tanto en plantas C₄ como CAM. Este hecho está justificado porque la síntesis de la PPCK es el elemento principal de la regulación circadiana de la actividad PPCK en estas plantas. En este sentido se le ha prestado muy poca atención a la regulación de la degradación y a los mecanismos implicados. Los resultados obtenidos por el grupo de Izui (Agetsuma *et al.*, 2005), utilizando una PEPC-quinasa recombinante de *F. trinervia* expresada transitoriamente en protoplastos de células de mesófilo de maíz, sugieren que la PEPC-quinasa puede ser degradada vía ubiquitina-proteasoma. Sin embargo, los experimentos realizados con anticuerpos anti ubiquitina en los que utiliza extractos crudos o PPCK purificada de hojas de maíz no le han permitido mostrar que la PPCK de la planta esté ubiquitinada, sugiriendo que pueda ser debido a una falta de afinidad del anticuerpo o a la poca abundancia de esta proteína. Resultados recientes obtenidos por nuestro grupo muestran que en hojas de sorgo la degradación de la PPCK está regulada por ABA en un proceso que podría estar mediado por el proteosoma. Tanto el ABA como el inhibidor MG132, infiltrados a hojas o a discos de hojas inhiben la degradación de la PPCK. Estas son la primeras evidencias mostradas en plantas de que la degradación de la PPCK podría regularse por un mecanismo en el que estaría implicado el ABA y el proteosoma (Monreal *et al.*, 2007a). La regulación de la degradación de la PPCK podría tomar relevancia en contextos específicos como plantas sometidas a estrés. En este sentido, hemos obtenido evidencias de que en plantas tratados con Li⁺ el aumento espectacular de PPCK que se mantiene a partir de 30 min de iluminación es independiente de la transcripción de la PPCK vía PLC, y se debe, en parte, a la inhibición de la degradación (Monreal *et al.*, 2007b).

Otras vías alternativas de señalización para la síntesis/activación de la PPCK

Los trabajos realizados por nuestro grupo sobre la cadena de señalización que conduce a la síntesis/activación de la PPCK en condiciones de estrés salino o Li⁺ han aportado una nueva visión de esta señalización y han abierto nuevas alternativas de gran importancia. El hecho clave ha sido trabajar con discos de hojas en contraposición a los estudios clásicos de señalización realizados en protoplastos de hojas. En este sistema, la

fosforilación de la PEPC no se inhibe en presencia de TMB8 o verapamil (inhibidores de los canales de Ca^{2+} de los compartimentos endógenos como la vacuola) sino que necesita la presencia de EGTA en el medio de incubación de los discos de hojas. Este experimento ha puesto en evidencia por primera vez que la ruta de señalización de la PPCK puede utilizar tanto el Ca^{2+} endógeno como el exógeno. Además, en discos de hojas y en hojas infiltradas, el inhibidor de la ruta de la PI-PLC, el U73123, no inhibe por completo la activación de la PPCK como ocurre en protoplastos (Coursol *et al.*, 2000), indicando que la activación de la PPCK puede ocurrir por vías alternativas a la descrita hasta la fecha en la que la señalización se produce por la vía de la PI-PLC. Estos resultados sugieren además que los canales de Ca^{2+} del plasmalema, poco activos en los protoplastos, son funcionales en el sistema íntegro de las hojas con una importante repercusión en los recursos de utilización de Ca^{2+} y en la versatilidad de la respuesta de activación de la PPCK. También hemos puesto en evidencia que el n-butanol (inhibidor de la ruta de la fosfolipasa D) inhibe la síntesis de la PPCK

sugiriendo que la ruta de la fosfolipasa D (PLD) podría representar una ruta alternativa o adicional de señalización. Otro mensajero de esta ruta como el ácido fosfatídico (PA) también parece intervenir; sin embargo serán necesarios más experimentos para consolidar estas alternativas. Una hipótesis que pudiera integrar estas posibilidades podría ser que la enzima de la cadena de transducción que es regulada por Ca^{2+} (inhibida por W7) estuviera también regulada por PA, lo que podría llevarnos a una quinasa del tipo proteína quinasa C (PKC). En plantas no existen PKC como tal pero sí CDPK que responden a estos criterios de regulación, las PKC-like (Hrabak *et al.*, 2003). Una enzima de estas características ha sido recientemente caracterizada en hojas de sorgo (Osuna *et al.*, 2004). Estudios realizados en colaboración con el Dr. Vidal muestran que esta enzima está presente en las hojas de plantas C_4 y que es activada por Ca^{2+} y por PA. La figura 2 ilustra un esquema hipotético de la organización de los diferentes elementos nuevos que podría intervenir en la señalización de la síntesis de la PPCK en las células del mesófilo incidiendo en los puntos de regulación del Ca^{2+} .

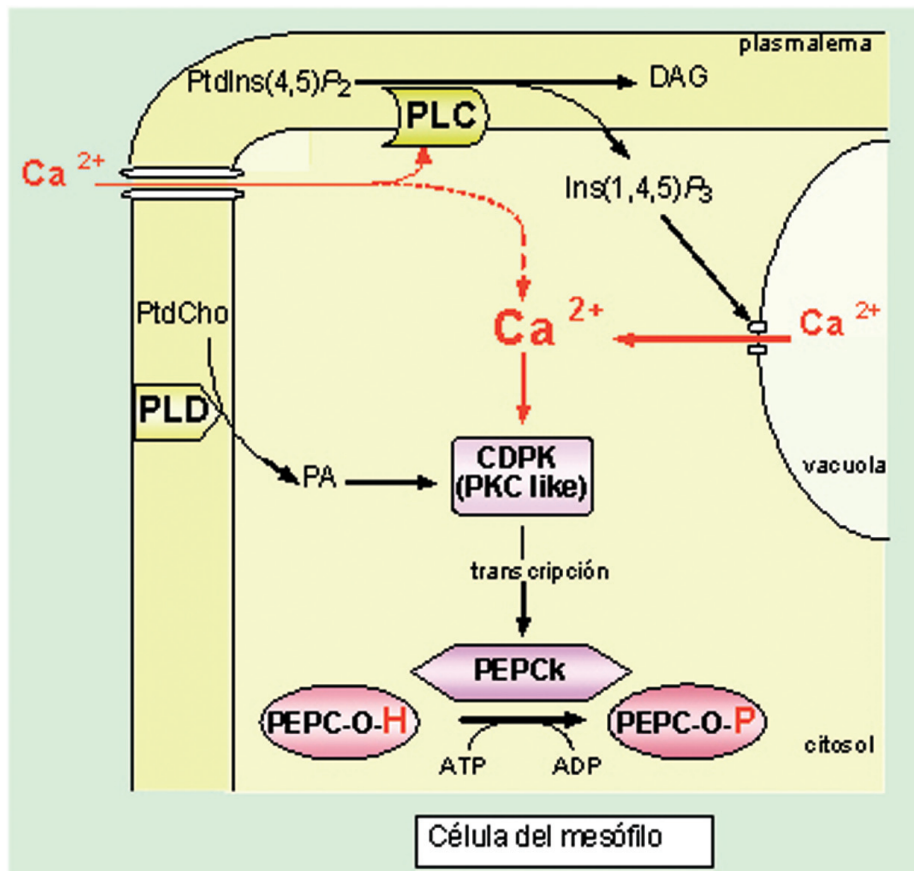


FIGURA 2: Posible papel del Ca^{2+} en la señalización que controla la síntesis de la PPCK en las células del mesófilo. Posible implicación de la PLD y de una PKC-like. CDPK, quinasa Ca^{2+} dependiente calmodulina independiente; DAG, diacilglicerol; PLC, fosfolipasa C, PLD, fosfolipasa D; $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$, inositol 1,4,5 trisfosfato; PA, ácido fosfatídico; $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, fosfatidylinositol - 4,5- bifosfato; PtdCho , fosfatidilcolina; PEPC-OH y PEPC-OP, PEPC en su forma desfosforilada y fosforilada respectivamente. PEPCk, fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa. (Esquema adaptado de Vidal *et al.*, 2007. Calcium and the control of C_4 photosynthesis. *Med. Sci.* 23, 18-20).

Referencias bibliográficas

- AGETSUMA, M.; FURUMOTO, T.; YANAGISAWA, S. e IZUI, K., 2005. «The ubiquitin-proteasome pathway is involved in rapid degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase for C₄ photosynthesis». *Plant Cell Physiol.* 46, 389-398.
- ÁLVAREZ, R.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; FERIA, A.B.; VIDAL, J. y ECHEVARRÍA, C., 2003. «A conserved 19 amino acid synthetic peptide from the carboxy-terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the in vitro phosphorylation of the enzyme by the Ca²⁺-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase». *Plant Physiol.* 132, 1097-1106.
- AMZALLAG, G.N.; LERNER, H.R. y POLJAKOFF-MAYBER, A., 1990. «Exogenous ABA as a modulator of the response of sorghum to high salinity». *Journal Exp. Botany* 41 (233), 1529-1534.
- BAKRIM, N.; PRIOUL, J.L.; DELEENS, E.; ROCHER, J.P.; ARRIODUPONT, M.; PIERRE, J.N.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1993. «Regulatory phosphorylation of C₄ PEPC, a cardinal event influencing the photosynthesis rate in *Sorghum* and maize». *Plant Physiol.* 101, 891-897.
- BAKRIM, N.; BRULFERT, J.; VIDAL, J. y CHOLLET, R., 2001. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is controlled by a similar signaling cascade in CAM and C₄ plants». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 1158-1162.
- BANDURSKI, R.S. y GREINER, C.M., 1953. «The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphorylenolpyruvate and carbon dioxide». *J. Biol. Chem.* 204, 781-786.
- BLÄSING, O.E.; WESTHOFF, P. y SVENSSON, P., 2000. «Evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Flaveria*, a conserved serine residue in the carboxy-terminal part of the enzyme is a major determinant for C₄-specific characteristics». *J. Biol. Chem.* 275, 27917-27923.
- CHOLLET, R.; VIDAL, J. y O'LEARY, M., 1996. «Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous highly regulated enzyme in plants». *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 273-298.
- CRÉTIN, C.; SANTI, S.; KERYER, E.; LEPINIEC, L.; TAGU, D.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1991. «The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in *Sorghum*: promoter structure, aminoacid sequences and expression of genes». *Gene.* 99, 87-94.
- CUSHMAN, J.C.; MEINERS, M.S. y BOHNERT, H.J., 1993. «Expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase promoter from *Mesembryanthemum crystallinum* is not salt-inducible in mature transgenic tobacco». *Plant. Mol. Biol.* 21, 561-566.
- CUSHMAN, J.C. y BOHNERT, H.J., 1999. «Crassulacean acid metabolism: molecular genetics». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 305-332.
- COURSOL, S.; GIGLIOLI-GUIVARCH, N.; VIDAL, J. y PIERRE, J.N., 2000. «An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in illuminated and NH₄Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*». *Plant J.* 23, 497-506.
- DONG, L.Y.; MASUDA, T.; KAWAMURA, T.; HATA, S. y IZUI, K., 1998. «Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C₄-form enzyme». *Plant Cell Physiol.* 39, 865-873.
- ECHEVARRÍA, C.; VAQUERO, I. y GIL, F., 1988. «Aportación al conocimiento del metabolismo fotosintético utilizado por cormofitas del Parque Natural de las Marismas del Odiel». *Lagascalia*, 15 (extra), 509-526.
- ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J.; JIAO, J. y CHOLLET, R., 1990. «Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves». *FEBS Lett.* 275, 25-28.
- ECHEVARRÍA, C.; PACQUIT, V.; BAKRIM, N.; OSUNA, L.; DELGADO, B.; ARRIODUPONT, M. y VIDAL, J., 1994. «The effect of pH on the covalent and metabolic control of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf». *Arch. Biochem. Biophys.* 315(2), 425-430.
- ECHEVARRÍA, C.; GARCÍA-MAURIÑO, S.; ÁLVAREZ, R.; SOLER, A. y VIDAL, J., 2001. «Salt stress increases the Ca²⁺-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in *Sorghum* plants». *Planta.* 214, 283-287.
- ECHEVARRÍA, C. y VIDAL, J., 2003. «The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase». *Plant Physiol. Biochem.* 41, 541-547.
- ECHEVARRÍA, C.; FERIA, A.B.; MONREAL, J.A.; JIMÉNEZ, E.T.; ÁLVAREZ, R. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2004. «Regulación transcripcional y posttraduccional de la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK) por factores abióticos, estrés y hormonas». En *Metabolismo y modo de acción de fitohormonas*. Ediciones Universidad de Salamanca, 211-229. Salamanca (España).
- FERIA, A.B.; ÁLVAREZ, R.; COCHEREAU, L.; VIDAL, J.; GARCÍA-MAURIÑO, S. y ECHEVARRÍA, C., 2008. «Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and ABA during the development and germination of Barley seed». *Plant Physiology*, 148, 761-774.
- FONTAINE, V.; HARTWEL, G.; JENKINS, H.G. y NIMMO, H.G., 2002. «Arabidopsis thaliana contains two phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes with different expression pattern». *Plant Cell Environ.* 25, 115-122.
- FUKAYAMA, H.; TAMAY, T.; TANIGUCHI, Y.; SULLIVAN, S.; MIYAO, M. y NIMMO, H.G., 2006. «Characterization and functional analysis of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in rice». *Plant J.* 47, 258-268.
- GARCÍA-MAURIÑO, S.; MONREAL, J.A.; ÁLVAREZ, R.; VIDAL, J. y ECHEVARRÍA, C., 2003. «Characterization of a salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence of osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation». *Planta.* 216, 648-655.
- GONZÁLEZ, M.C.; OSUNA, L.; ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J. y CEJUDO, F.J., 1997. «Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains». *Plant Physiol.* 116, 1249-1258.
- GOUSSET-DUPONT, A.; LÉBOUTEILLER, B.; MONREAL, J.A.; ECHEVARRÍA, C.; PIERRE, J.N.; HODGES, M. y VIDAL, J., 2005. «Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*». *Plant Sci.* 169, 096-1101.
- GIGLIOLI-GUIVARCH, N.; PIERRE, J.N.; BROWN, S.; CHOLLET, R.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1996. «The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C₄ phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*». *The Plant Cell.* 8, 573-586.
- HARTWELL, J.; GILL, A.; NIMMO, G.A.; WILKINS, M.B.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 1999. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression». *Plant J.* 20, 333-342.

- HASEGAWA, P.M.; BRESSAN, R.A.; ZHU, J.K. y BOHNERT, H., 2000. «Plant cellular and Molecular Responses to High Salinity». *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 463-99.
- HATCH, M.D., y SLACK, C.R., 1970. «Photosynthetic CO₂ fixation pathway». *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 21, 141-162.
- HRABAK, E.M.; CHAN, C.W.; GRIBSKOV, M.; HARPER, J.E.; CHOI, J.H.; HALFORD, N.; KUDLA, J.; LUAN, S.; NIMMO, H.G.; SUSSMAN, M.R.; THOMAS, M.; WALKER-SIMMONS, K.; ZHU, J.K. y HARMON, A.C., 2003. «The Arabidopsis CDPK-SnRK superfamily of protein kinases». *Plant Physiol.*, 132, 666-680.
- IZUI, K.; MATSUMURA, H.; FURUMOTO, T. y KAI, Y., 2004. «Phosphoenolpyruvate carboxylase: A new Era of Structural Biology». *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 55, 69-84.
- JIAO, J.A.; ECHEVARRÍA, C.; VIDAL, J. y CHOLLET, R., 1991. «Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C₄ plants». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 2712-2715.
- LI, B.; ZHANG, X.Q. y CHOLLET, R., 1996. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize». *Plant Physiol.*, 111, 497-505.
- LÜTTGE, U., 2004. «Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM)». *Annals of Botany* 93, 629-652.
- MARSH, J.T.; SULLIVAN, S.; HARTWELL, J. y NIMMO, H.G., 2003. «Structure and expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in solanaceae. A novel gene exhibits alternative splicing». *Plant Physiol.*, 133, 2021-2028.
- MATSUMURA, H.; XIE, Y.; SHIRAKATA, S.; INOUE, T.; YOSHINAGA, T.; UENO, Y.; IZUI, K. y KAY, Y., 2002. «Crystal structures of C₄ form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylase». *Structure*, 10, 1721-1730.
- MONREAL, J.A.; FERIA, A.B.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2007a. «ABA modulates the degradation of PEPC-kinase in sorghum leaves». *FEBS letter*, (en prensa).
- MONREAL, J.A.; LÓPEZ-BAENA, F.J.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C. y GARCÍA-MAURIÑO, S., 2007b. «Effect of Li on phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf disks and leaves of *Sorghum vulgare*». *Planta*, DOI 10.1007/s00425-006-0391-0.
- NIMMO, H.G., 2000. «The regulation of PEPC in CAM plants». *Trends in Plants Sci.*, 5, 75-80.
- 2003. «Control of phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants». *Arch. Biochem. Biophys.*, 414, 189-196.
- OSUNA, L.; GONZÁLEZ, M.C.; CEJUDO, J.; VIDAL, J.; ECHEVARRÍA, C., 1996. «In vivo and in vitro phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination». *Plant Physiol.* 111, 551-558.
- OSUNA, L.; PIERRE, J.N.; GONZÁLEZ, M.C.; ÁLVAREZ, R.; CEJUDO, F.J. y ECHEVARRÍA, C., 1999. «Evidence for a slow-turnover form of the, calcio-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone endosperme of germinating barley seeds». *Plant Physiol.*, 119, 511-520.
- OSUNA, L.; COURSO, S.; PIERRE, J.N. y VIDAL, J., 2004. «A Ca²⁺-dependent protein kinase with characteristics of protein kinase C in leaves and mesophyll cell protoplasts from *Digitaria sanguinalis*: possible involvement in the C₄-phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation cascade». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 314, 428-433.
- PACQUIT, V.; SANTI, S.; CRETIN, C.; BUI, V.L.; VIDAL, J. y GADAL, P., 1993. «Production and properties of recombinant C₃-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: in vitro phosphorylation by leaf and root PyrPC protein serine kinases». *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 197, 1415-1423.
- PIERRE, J.N.; PRIETO, J.L.; GADAL, P. y VIDAL, J., 2004. «In situ c(4) phosphoenolpyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *digitaria sanguinalis* mesophyll cells». *Photosynthesis Res.*, 79(3), 349-55.
- POPOVA, L.P.; STOINOVA, Z.G. y MASLENKOVA, L.T., 1995. «Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress». *J. Plant Growth Regul.*, 14(4), 211-218.
- SÁNCHEZ, R. y CEJUDO, F.J., 2003. «Identification and analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from Arabidopsis and rice». *Plant Physiol.*, 132, 949-957.
- SAZE, H.; UENO, T.; HISABORI, H.; HAYASHI, H. y IZUI, K., 2001. «Thioredoxin-mediated reductive action of a protein kinase for the regulatory phosphorylation of C₄-form phosphoenolpyruvate carboxylase from maize». *Plant Cell Physiol.*, 42, 1295-1302.
- SHEEN, J., 1999. «C₄ gene expression». *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.*, 50, 187-217.
- SHENTON, M.; FONTAINE, V.; HARTWELL, J.; MARSH, J.T.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 2006. «Distinct patterns of control and expression amongst members of PEP carboxylase kinase gene family in C₄ plants». *The Plant Journal*, 48, 45-53.
- SMITH, L.H.; LILLO, C.; NIMMO, H.G. y WILKINS, M.B., 1996. «Light regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in barley mesophyll protoplasts is modulated by protein synthesis and calcium, and not necessarily correlated with phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity». *Planta* 200, 174-180.
- SMITH, J.A.C. y WINTER, K., 1996. «Taxonomic distribution of crassulacean acid metabolism». En WINTER, K.; SMITH, J.A.C. *Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution*. Editado por Springer-Verlag, Berlin, 114, 427-436.
- SOUSSI, M.; OCAÑA, A. y LLUCH, C., 1998. «Effects of salt stress on growth, photosynthesis and nitrogen fixation in chick pea (*Cicer arietinum* L.)». *J. Exp. Botany.*, 49(325), 1329-1337.
- SULLIVAN, S.; JENKINS, G.I. y NIMMO, H.G., 2004. «Roots, cycles and leaves. Expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase kinase gene family in soybean». *Plant Physiol.*, 135, 2078-2087.
- SULLIVAN, S.; SHENTON, M. y NIMMO, H.G., 2005. «Organ specificity in the circadian control of plant gene expression». *Biochem. Soc. Trans.* 33, 943-944.
- TAYBI, T. y CUSHMAN, J.C., 1999. «Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant». *Plant Physiol.*, 121, 545-556.
- 2002. «Abscisic acid signalling and protein synthesis requirements for phosphoenolpyruvate carboxylase transcript induction in the common ice plant». *J. Plant Physiol.*, 159, 1235-1243.
- TAYBI, T.; NIMMO, H.G. y BORLAND, A.M., 2004. «Expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes. Implications for genotypic capacity and phenotypic plasticity in the expression of crassulacean acid metabolism». *Plant Physiol.*, 135, 587-598.
- TSUCHIDA, Y.; FURUMOTO, T.; IZUMIDA, A.; HATA, S. y IZUI, K.,

2001. «Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase involved in C₄ photosynthesis in *Flaveria trinervia*: cDNA cloning and characterization». *FEBS Lett.*, 507, 318-322.
- VIDAL, J. y CHOLLET, R., 1997. «Regulatory phosphorylation of C₄ PEP carboxylase». *Trend Plant Sci.* 2, 230-237.
- XU, W.; ZHOU, Y. y CHOLLET, R., 2003. «Identification and expression of a soybean nodule-enhanced PEP-carboxylase kinase gene (NE-PpcK) that shows striking up-/down-regulation *in vivo*». *Plant J.* 34, 441-452.
- XU, W.; SATO, S.J.; CLEMENTE, T.E. y CHOLLET, R. 2007. «The PEP-carboxylase kinase gene family in *Glycine max* (*Gm-PpcK1-4*): an in-depth molecular analysis with nodulated, non-transgenic and transgenic plants». *Plant J.*, DOI: 10.1111/j.1365-313X.2006.03006.x.