

# REGULATIONS OF PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE FROM SEEDS OF MAIZE AND THEIR POSSIBLE ROLES IN GERMINATION

## REGULACE FOSFOENOLPYRUVÁTKARBOXYLASY ZE SEMEN KUKUŘICE A JEJICH MOŽNÝ VÝZNAM PŘI KLÍČENÍ

**Černý M., Ryšlavá H.**

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Albertov 6, 128 43 Praha 2, Česká republika.

E-mail: [cerny@mendelu.cz](mailto:cerny@mendelu.cz)

---

### ABSTRACT

The purpose of this research was to determine missing information about non-photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) from seeds and provide new data regarding the regulatory phosphorylation of this enzyme. The C<sub>4</sub> plant's maize seeds were chosen because there has been no study of PEPC phosphorylation in seeds of plants of this type, and also because its photosynthetic counterpart is one of the best characterized forms so far. The project was carried out in several steps. The enzyme was purified and identified using MS-MALDI as root-form PEPC. The phosphorylation status was determined using alkaline phosphatase and protein kinase A. Enzyme was found to be stored fully phosphorylated in developed seeds and its phosphorylation status was not affected by imbibition. The native (phosphorylated) and fully dephosphorylated form of the enzyme were kinetically characterized with ordinary plant inhibitors (L-aspartate and L-malate) and activators (glycine, glucose-6-phosphate). Dephosphorylation in vitro resulted in increase in enzyme sensitivity to inhibitors and also change in its reaction rate dependency on substrate PEP from hyperbolic to sigmoid. This change in kinetics was even more pronounced at high temperature and suboptimal pH. Effects of dephosphorylation were countered by free phosphate.

**Key words:** Phosphoenolpyruvate carboxylase, phosphorylation, seed PEPC, enzyme regulations

## ÚVOD

Fosfoenolpyruvátkarboxylasa (PEPC; E.C. 4.1.1.31) je velmi rozšířený a vysoce regulovaný enzym cytozolu, který se vyskytuje v organismech od bakterií po vyšší rostliny. Hraje klíčovou roli v asimilaci CO<sub>2</sub> v rostlinách typu C<sub>4</sub> a CAM, ale je i velmi významný v nefotosyntetických pletivech. Zde slouží k doplnění oxaloacetátu pro citrátový cyklus i další syntézy, zachytává respirované CO<sub>2</sub>, či například regeneruje NAD<sup>+</sup> v tzv. malátovém kvašení, což je proces důležitý při klíčení semen. Nejvýznamnější regulací PEPC je PEPC-kinasa dependentní fosforylace (Chollet et al. 1996; Izui et al. 2004; Nimmo 2003).

## MATERIÁL A METODIKA

V experimentu bylo použito semen kukuřice (*Zea mays* var. 2013 Čejč 2002). PEPC byla purifikována klasickým způsobem pro izolaci rostlinných enzymů: homogenizace, extrakce, srážení síranem amonným, ionexové chromatografie, chromatografie na hydroxylapatitu a HPLC na koloně Superdex 200. Při izolaci bylo s úspěchem využito centrikonů Amicon Ultra-15 s membránou o velikosti pórů 100 kDa. PEPC byla identifikována pomocí MS-MALDI (Petr Pompach, Ph.D, Mikrobiologický ústav AV, Praha). Fosforylace byla detekována pomocí enzymů alkalické fosfatasy a proteinkinasy A. Aktivita PEPC byla stanovena pomocí spřažené reakce s malát dehydrogenasou jako změna absorbance při 340 nm. Pro výpočet kinetických parametrů byla užitá metoda nelineární regrese. Vliv imbibice na PEPC byl studován po dobu 6 dnů při 10°C a 3 dnů při 30°C.

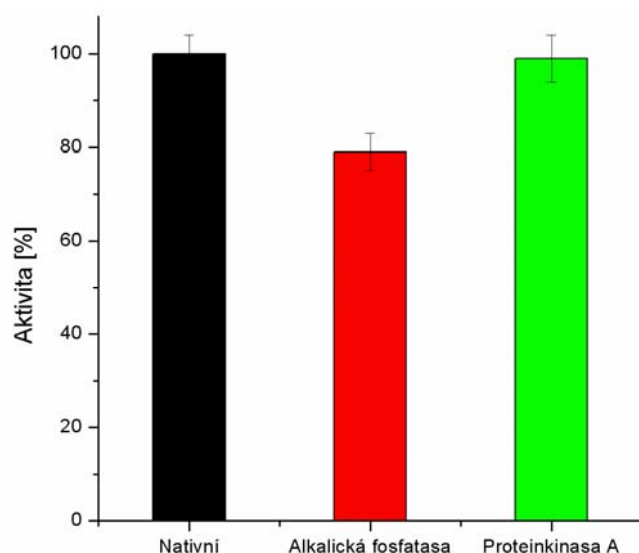
## VÝSLEDKY A DISKUZE

PEPC ze semen kukuřice byla izolována (Tab. 1) a identifikována pomocí MS-MALDI jako kořenová forma s Mascot skóre 137 a 1e-07, M<sub>r</sub> 109987, pokrytí sekvence 24%.

100g semen	Obsah proteinu [mg]	Specifická aktivita [U.mg <sup>-1</sup> ]	Výtěžek [%]
Crude extract	211.5	0.09	100
0-60% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78.1	0.14	55
DEAE-Cellulose	11.3	0.75	43
Hydroxylapatite	0.9	3.66	16
Superdex 200	0.2	13.29	16

Tab. 1 Purifikace PEPC ze semen kukuřice

Sledováním změn v aktivitě PEPC vyvolaných působením alkalické fosfatasy a proteinkinasy A bylo zjištěno, že PEPC v semenech kukuřice je skladována ve fosforylované formě a pravděpodobně zcela fosforylované (Graf 1). Jedná se o první dokumentovaný případ fosforylované PEPC v suchých semenech rostlin (Osuna et al. 1996, 1999; Tripodi et al. 2005).



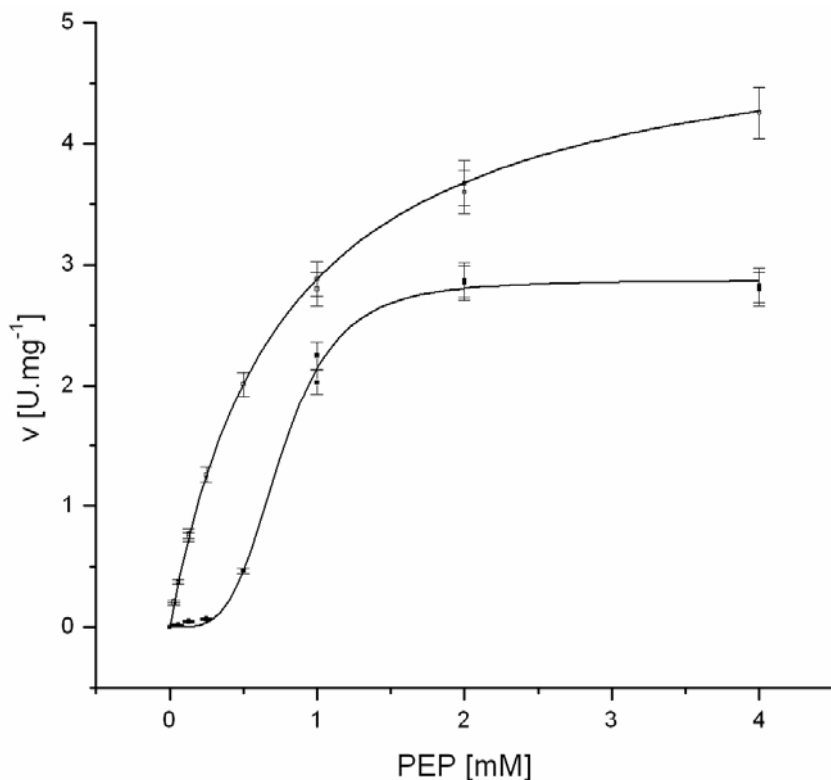
Graf 1 Studium fosforylace PEPC ze semen kukuřice: Aktivita nativního enzymu, enzymu po inkubaci s alkalickou fosfatasou a defosforylovaného enzym inkubovaného s proteinkinasou A

Důvodem může být to, že fosforylovaná forma PEPC ze semen kukuřice je velmi málo citlivá k inhibici L-malátem a L-aspartátem, která při pH optimu a laboratorní teplotě není vůbec pozorována (Tab. 2). To může být výhodné v raných fázích klíčení semen, kdy je hladina malátu zvýšená díky malátovému kvašení, ale také při dozrávání semen, jelikož bylo prokázáno, že zvýšená hladina malátu kladně působí na syntézu mastných kyselin (Sangwan et al. 1992).

	20°C, pH 8.1	20°C, pH 7.3	34°C, pH 8.1	34°C, pH 7.3
<b>V<sub>max</sub></b>	(50±3) %	(39±2) %	(100±5) %	(95±5) %
<b>K<sub>m</sub></b>	(0.3±0.02)mM	(0.2±0.01)mM	(0.4±0.02)mM	(0.4±0.04)mM
<b>L-Malát</b>	žádná	<b>Smíšená</b> K <sub>ic</sub> : (0.2±0.01)mM K <sub>iu</sub> : (8.1±0.4)mM	<b>Smíšená</b> K <sub>ic</sub> : (2.9±0.01)mM K <sub>iu</sub> : (14.8±0.01)mM	4 mM – 65% aktivity (PEP 2 mM) Změna kinetiky na sigmoidní
<b>L-Aspartát</b>	žádná	žádná	4 mM – 80% z aktivity (PEP 2 mM)	<b>Kompetitivní</b> K <sub>ic</sub> : (0.2±0.01)mM

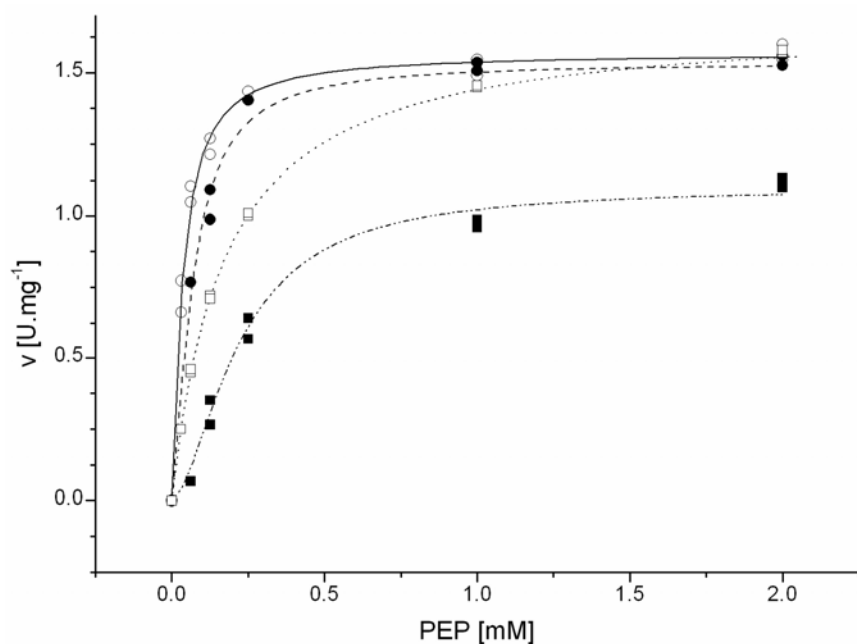
Tab. 2 Vliv L-malátu a L-aspartátu na aktivitu nativní (fosforylované) PEPC ze semen kukuřice

Dalším důvodem, proč je PEPC v semenech kukuřice skladována fosforylovaná, může být závislost reakční rychlosti enzymu na koncentraci substrátu PEP. Ta je u fosforylované formy hyperbolická (Hillův koeficient  $h$  1,0), ale defosforylací se mění na sigmoidní ( $h$  vyšší než 1,0) a při nízkých koncentracích substrátu je tak enzym v podstatě inaktivován (Graf 2).



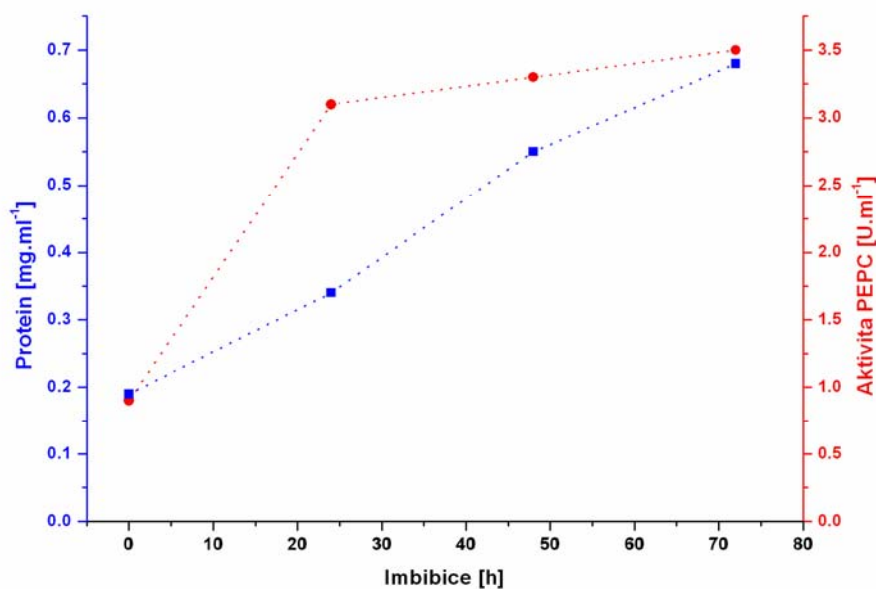
*Graf 2 Změna závislosti reakční rychlosti PEPC ze semen kukuřice z hyperbolické (nativní fosforylovaná forma, Hillův koeficient 1,0) na sigmoidní (defosforylovaná forma, Hillův koeficient 4,0) při pH 7,3 a 34°C.*

Běžný aktivátor PEPC glukosa-6-fosfát měl při nasycení enzymu substrátem PEP pouze malý vliv na rychlost enzymové reakce. Při nízkých koncentracích substrátu však silně stimuloval enzym a snižoval inhibiční účinky malátu. Glycin, který velmi silně aktivuje C<sub>4</sub> isoformu PEPC kukuřice neměl na PEPC ze semen žádný patrný vliv. Velmi zajímavý byl účinek volného fosfátu na PEPC ze semen kukuřice. Na nativní fosforylovanou formu neměl při nízkých koncentracích téměř žádný vliv, ale u defosforylované formy kompletně překryl účinky defosforylace již v 5 mM koncentraci (Graf 4). Fosfátem aktivovaná defosforylovaná PEPC pak měla více jak dvakrát zvýšenou afinitu k substrátu PEP. I toto by mohlo být důvodem, proč je PEPC v semenech kukuřice fosforylovaná.



Graf 3 Fosfát překrývá účinky defosforylace PEPC ze semen kukuřice při pH 7,3 a 20°C: ■ defosforylovaná PEPC ( $K': 0,2 \text{ mM}$ ;  $h: 1,9$ ;  $V_{\text{max}}: 1,2 \text{ U.mg}^{-1}/70\%$ ) □ nativní forma ( $K_m: 0,2 \text{ mM}$ ;  $h: 1,0$ ;  $V_{\text{max}}: 1,6 \text{ U.mg}^{-1}/100\%$ ), ● defosforylovaná PEPC aktivovaná 5 mM fosfátem ( $K_m: 0,07 \text{ mM}$ ;  $h: 1,0$ ;  $V_{\text{max}}: 1,6 \text{ U.mg}^{-1}/100\%$ ), ○ nativní PEPC plně aktivovaná fosfátem (uchovávána v 100 mM fosfátovém pufru) ( $K_m: 0,03 \text{ mM}$ ;  $h: 1,0$ ;  $V_{\text{max}}: 1,6 \text{ U.mg}^{-1}/100\%$ ).

Z Grafu 4 je patrné, že aktivita PEPC ze semen kukuřice působením imbibice vzrostla. Pomocí HPLC na koloně Superdex 200 a následných kinetických experimentů bylo prokázáno, že se jedná o identickou PEPC, která je po celou dobu přítomna ve své fosforylované formě (hodnota Hillova koeficientu  $h$  byla ve všech případech 1,0). Přítomnost jiné isoformy PEPC byla detekována až v posledním stádiu (70 hodin imbibice při 30°C).



Graf 4 Účinky imbibice na PEPC ze semen kukuřice

## ZÁVĚR

Byla izolována PEPC ze semen kukuřice a identifikována pomocí MS-MALDI jako kořenová isoforma. Bylo zjištěno, že PEPC ze semen kukuřice je v suchých semenech skladována fosforylovaná a že imbibice nemá vliv na úroveň její fosforylace. Fosforylovaná forma je odolná vůči účinkům inhibitorů (L-malát, L-aspartát). Defosforylací se mění závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu PEP této PEPC z hyperbolické na sigmoidní. Volný fosfát zcela překrývá účinky regulace PEPC defosforylací.

## PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla podpořena grantovou agenturou UK (projekt č. 7809/2007). Autoři také děkují Petru Pompachovi (Mikrobiologický ústav AV) za identifikaci proteinu pomocí MALDI-MS.

## LITERATURA

Chollet R., Vidal J., O'Leary M. (1996): Phosphoenolpyruvate Carboxylase: A Ubiquitous, Highly Regulated Enzyme in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:273-298

Izui K., Matsumura H., Furumoto T., Kai Y. (2004): Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. *Annu Rev Plant Biol* 55:69-84

Nimmo H. G. (2003): Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. *Arch Biochem Biophys* 414:189-96

Osuna L., Gonzalez M., Cejudo F., Vidal J., Echevarria C. (1996): In Vivo and in Vitro Phosphorylation of the Phosphoenolpyruvate Carboxylase from Wheat Seeds during Germination. *Plant Physiol* 111:551-558

Osuna L., Pierre J., Gonzalez M., Alvarez R., Cejudo F., Echevarria C., Vidal J. (1999): Evidence for a slow-turnover form of the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone-endosperm tissue of germinating barley seeds. *Plant Physiol* 119:511-20

Tripodi K. E., Turner W. L., Gennidakis S., Plaxton W. C. (2005): In vivo regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. *Plant Physiol* 139:969-78

Sangwan R., Singh N., Plaxton W. (1992): Phosphoenolpyruvate Carboxylase Activity and Concentration in the Endosperm of Developing and Germinating Castor Oil Seeds. *Plant Physiol* 99:445-449