

163



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN DEL SIMPORTADOR  
SACAROSA/H<sup>+</sup> EN LA GERMINACIÓN DEL MAÍZ:  
PATRÓN DE LA PROTEÍNA Y DE LA ACTIVIDAD.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A :

SYLVIA ZAVALA ZENDEJAS

299061



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

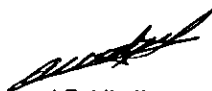
Jurado asignado:

Presidente	Dr. Blas Lotina Hennesen
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dr. Sobeida Sánchez Nieto
1er. Suplente	M en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares
2do. Suplente	M en C. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 101 en el Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química UNAM.



Dra. Sobeida Sánchez Nieto  
ASESOR



Q. Laurel Fabila Ibarra  
SUPERVISOR TÉCNICO



Sylvia Zavala Zendejas  
SUSTENTANTE

Jurado asignado:

Presidente	Dr. Blas Lotina Hennesen
Vocal	Dr. Rogelio Rodríguez Sotres
Secretario	Dr. Sobeida Sánchez Nieto
1er. Suplente	M en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares
2do. Suplente	M en C. Nora Andrea Gutiérrez Nájera

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio 101 en el Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química UNAM.

**Dra. Sobeida Sánchez Nieto**  
**ASESOR**

**Q. Laurel Fabila Ibarra**  
**SUPERVISOR TÉCNICO**

**Sylvia Zavala Zendejas**  
**SUSTENTANTE**

**AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su dirección, apoyo y confianza que siempre me ofreció.

Al Dr. Diego González - Halphen por su valiosa ayuda en el diseño del péptido para la obtención del anticuerpo contra el transportador Sacarosa / H<sup>+</sup> de maíz.

Agradezco ampliamente la ayuda técnica prestada en la realización de este trabajo a la Q.F.B. Ma. Consuelo Enríquez Arredondo.

Al M.V.Z. Atonatihu Hernández por su valiosa ayuda en la inmunización y obtención del suero de los conejos.

Al Dr. Mark West jefe de la unidad de Microscopía del Instituto de Fisiología Celular, por su experiencia en la obtención de las densitometrías.

A la Dra. Marina Gavilanes y al Dr. Javier Plasencia por todas las facilidades prestadas en el laboratorio.

A Nahieli y Luis Alberto, por su ayuda en la realización de los esquemas del transportador y en el diseño del póster.

A mis compañeros del laboratorio 101

Proyecto financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico DGAPA, con el número 1N224098 y por el apoyo a proyectos de investigación Facultad de Química PAIP 6290-12.

**DEDICATORIAS**

A mis papás y hermanos, por todo el amor y apoyo incondicional.

A la familia González Hernández, por todo el apoyo y cariño que me han brindado siempre.

A mis tíos y primos, por el interés y cariño que siempre me han dado.

A todos mis amigos, por la amistad que me han brindado y aguantarme tanto tiempo.

## ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
1.1. La membrana plasmática de la célula.....	4
1.1.1. Estructura y composición de la membrana plasmática.....	4
1.2. Transporte a través de la membrana celular.....	8
1.2.1. Difusión simple.....	10
1.2.2. Difusión facilitada.....	11
1.2.3. Transporte activo.....	14
1.3. Transporte de sacarosa a larga distancia.....	17
1.3.1. Transporte simplástico.....	19
1.3.2. Transporte apoplástico.....	20
1.4. Simportador Sacarosa/H <sup>+</sup> .....	20
1.4.1. Clonación, secuenciación y estructura del simportador en la membrana.....	20
1.4.2. Análisis funcional y propiedades cinéticas.....	23
1.4.3. Propiedades fisiológicas.....	26
2. HIPÓTESIS.....	30
3. OBJETIVO GENERAL.....	31
3.1. Objetivos Particulares.....	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
4.1. Material biológico.....	33
4.2. Imbibición de embriones y ejes.....	33
4.3. Medición del porcentaje de germinación en embriones y ejes.....	33
4.4. Acumulación de peso húmedo en embriones y ejes.....	33
4.5. Obtención de la fracción microsomal.....	34
4.6. Determinación de proteína.....	34
4.7. Obtención de protoplastos de ejes embrionarios.....	35
4.8. Determinación de fosfatos.....	36

4.9. Determinación de la actividad de ATPasa por hidrólisis de ATP.....	37
4.10. Medición de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz.....	37
4.11. Separación de proteínas por electroforesis en poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS).....	38
4.11.1. Tinción del gel con azul de Coomasie.....	40
4.12. Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa.....	41
4.13. Procedimiento para revelado de fosfatasa alcalina.....	42
4.14. Obtención del anticuerpo contra el transportador de sacarosa de membrana plasmática de maíz.....	43
4.14.1. Diseño de la secuencia.....	43
4.14.2. Obtención del suero inmune y titulación del anticuerpo.....	46
4.14.3. Obtención de los perfiles densitométricos de las inmunorréplicas.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1. Determinación del porcentaje de germinación y determinación de la acumulación de agua en ejes y embriones de maíz.....	47
5.2. Caracterización de la actividad de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos.....	49
5.2.1. Sensibilidad del transporte de sacarosa a cambios en el pH extracelular.....	50
5.2.2. Efecto de Valinomicina y $K^+$ en el transporte de sacarosa....	52
5.2.3. Efecto de dos inhibidores del transporte de sacarosa, sobre la actividad de transporte de sacarosa de protoplastos de ejes embrionarios.....	54
5.2.4. Obtención de los parámetros cinéticos para el simportador..	56
5.3. Transporte de sacarosa y actividad de la ATPasa de protones a lo largo de la germinación.....	57
5.4. Patrón de expresión del cotransportador sacarosa/ $H^+$ durante la germinación.....	60
6. DISCUSIÓN.....	67
6.1. Parámetros fisiológicos de ejes y embriones de maíz.....	67



6.2. Características del transporte de sacarosa en los ejes embrionarios de maíz.....	68
6.2.1. El transportador de sacarosa en ejes embrionarios es el simportador sacarosa/H <sup>+</sup> .....	69
6.3. Actividad del transportador sacarosa/H <sup>+</sup> en la germinación.....	70
6.4. Niveles del transportador a lo largo de la germinación.....	72
7. CONCLUSIONES.....	74
BIBLIOGRAFÍA.....	76

**ÍNDICE DE FIGURAS**

	Página
1. Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática.....	4
2. Clasificación del transporte a través de las membranas biológicas.....	11
3. Transporte espontáneo de solutos mediado por acarreadores y canales.....	13
4. Esquema de los sistemas de transporte que han sido clonados y cuya probable localización es la membrana plasmática .....	16
5. Transporte a larga distancia de azúcares entre tejidos fuente y demanda.....	18
6. Modelo topológico del transportador de sacarosa de apio.....	22
7. Protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 18 horas.....	36
8. Curva de separación de estándares de peso molecular en un gel de Shäger y Von-Jagow al 10%.....	40
9. Esquema del transportador de sacarosa, mostrando las secuencias antigénicas.....	43
10. Haptenización del péptido antigénico a hemocianina.....	45
11. Curvas de germinación (A) y toma de agua (B) de ejes embrionarios y embriones de maíz.....	48
12. Curso temporal del transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 24 horas.....	50
13. Dependencia de la actividad de transporte de sacarosa de los protoplastos de ejes embrionarios de maíz, al pH del medio de ensayo.....	51
14. Efecto de la Valinomicina y el potasio sobre la actividad de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz.....	53
15. Efecto de diferentes concentraciones de PCMBs y DEPC en la actividad de transporte de sacarosa.....	55
16. Cinética de actividad del simportador sacarosa/H <sup>+</sup> en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 24 h.....	57
17. Cinética de la actividad del transportador de sacarosa a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz.....	58
18. Perfil de la actividad específica de la ATPasa de membrana plasmática en microsomas obtenidos de ejes embrionarios de maíz.....	60

19. Detección del simportador sacarosa/H <sup>+</sup> a lo largo de la germinación	
A. Proteínas teñidas en el gel con azul de Coomassie.....	62
B. Proteínas transferidas a papel de nitrocelulosa teñidas con rojo de Ponceau.....	62
C. Reacción del anticuerpo con las bandas de proteína de la fracción microsomal de ejes embrionarios de maíz.....	63
20. Niveles de proteína (simportador sacarosa/H <sup>+</sup> ) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz.....	64
21. Curva de actividad específica del simportador sacarosa/H <sup>+</sup> a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz.....	65

**ÍNDICE DE TABLAS**

	Página
1. Valor de Km aparente para el transporte de sacarosa, por el simportador sacarosa / H <sup>+</sup> .....	24
2. Familia de genes descritos para los transportadores de sacarosa.....	27
3. Preparación de un minigel (con 0.75 mm de grosor) según la técnica de Shäger y Von-Jagow (1987).....	39

ABREVIATURAS

ATP.	Adenosin 5' - trifosfato.
BCIP.	5 - Bromo-4-cloro-3 indolil fosfato.
Brij 58.	Polioxietilien 20 cetil éter.
BSA.	Albúmina de suero bovino.
BTP.	Bis-Tris propano ( 1,3-bis [tris(hidroximetil)metilamino] propano).
CCCP.	Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona.
CPM.	Cuentas por minuto.
CTC.	Solución de Carbonato - Tartrato- Cobre.
DEPC.	Dietilpirocarbonato.
DOC.	Desoxicolato de sodio.
$\Delta$ pH.	Gradiente de pH.
$\Delta\psi$ .	Gradiente electroquímico.
DTE o DTT.	Ditioeritrol o Ditiotreitrol.
EDTA.	Ácido etilendiaminotetraacético.
HEPES.	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2 - ácido etanosulfónico]).
Km	Constante de Michaelis.
MES.	(2 - [N- morfolino] ácido etanosulfónico).
NBT.	Nitro azul de tetrazolio.
PCMBS.	Ácido p-Cloro mercuribencensulfónico.
PPO.	2,5-Difenil-oxazol.
SDS.	Dodecil sulfato de sodio.
TBS.	Solución salina amortiguada con Tris.
TCA.	Ácido tricloro acético.
TEMED.	N,N,N',N' - Tetrametiltilendiamina.
Tritón X - 100	(t - Octilfenoxipolietoxietanol).
TRIZMA.	Tris (hidroxi metil) amino metano.
TTBS.	Solución salina amortiguada con Tris y adicionada con Tween 20.
Tween 20 .	Polioxietilen sorbitán (monolaurato).
$V_{max}$ .	Velocidad máxima

## RESUMEN

El abasto de sacarosa debe ser muy importante durante la germinación de semillas, sobre todo en aquellas que principalmente almacenan carbohidratos como reservas para utilizarlas durante este período. Éstos van a ser hidrolizados y transportados desde los tejidos de almacenamiento hacia los tejidos en crecimiento. Un transportador de azúcares ampliamente distribuido en las plantas es el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, el cual de manera simultánea transporta sacarosa y protones, el primero es transportado en contra del potencial químico impuesto por su gradiente de concentración, mientras que el segundo entra por difusión. Por lo anterior, el evento primario que debe ocurrir para que el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> esté activo, es la salida activa de protones al apoplasto de las células, actividad que realiza la ATPasa de protones de la membrana plasmática, la cual se ha encontrado es muy activa durante el período de germinación de una semilla.

En este trabajo se obtuvieron los perfiles de actividad de transporte y de proteína del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en ejes embrionarios de maíz en el período germinativo y en el período posgerminativo inmediato.

Se caracterizó el transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz, encontrándose que es dependiente de pH, sensible a la adición de 10 $\mu$ M del protonóforo CCCP, se inhibe 82.9% con 1mM DEPC y 77.9% con 1mM PCMBBS y se activa con la adición de Valinomicina. La Km obtenida para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz fue de 1.5 mM y la V<sub>max</sub> de 0.834 pmol Sac min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>.

El perfil de la actividad del transportador a lo largo de la germinación mostró que a las 8 y 24 horas se encuentra activo, sin embargo disminuye su actividad a las 30 horas para aumentar de manera constante de las 36 hasta las 72 horas de la germinación. Se midió la actividad de la ATPasa de protones que se encontró que ésta es constante a lo largo de la germinación en el período estudiado.

En cambio, cuando se detectaron los niveles de proteína usando un anticuerpo específico para el simportador y se observó una disminución en el nivel de proteína de las 8 a las 24 horas.

Sin embargo se presenta un aumento en la cantidad de proteína y en la actividad precisamente en los tiempos en que se da la elongación del eje embrionario, es decir, que el aumento en la cantidad de proteína es cercano al período de protusión de la radícula.

Los resultados sugieren que el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> de los ejes embrionarios es más importante en los tiempos finales y posteriores a la germinación que en la propia germinación. Es posible que el aporte de energía a tiempos cortos de la germinación provenga de los productos de la hidrólisis de la sacarosa, la glucosa y fructosa y por lo tanto, el transportador de monosacáridos podría ser indispensable en esta etapa.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. La Membrana plasmática de la célula

#### 1.1.1. Estructura y composición de la membrana plasmática

Las membranas son distintas en estructura y función de organelo a organelo y de tejido a tejido, sin embargo, tienen en común cierto número de propiedades importantes que a continuación se mencionan y que son compatibles con el modelo más aceptado de la estructura de la membrana, el de Singer y Nicolson propuesto en 1972 (Figura 1) y conocido como el modelo del mosaico fluido. En él se muestra la disposición de los diferentes componentes de la membrana (Stryer, 1990).

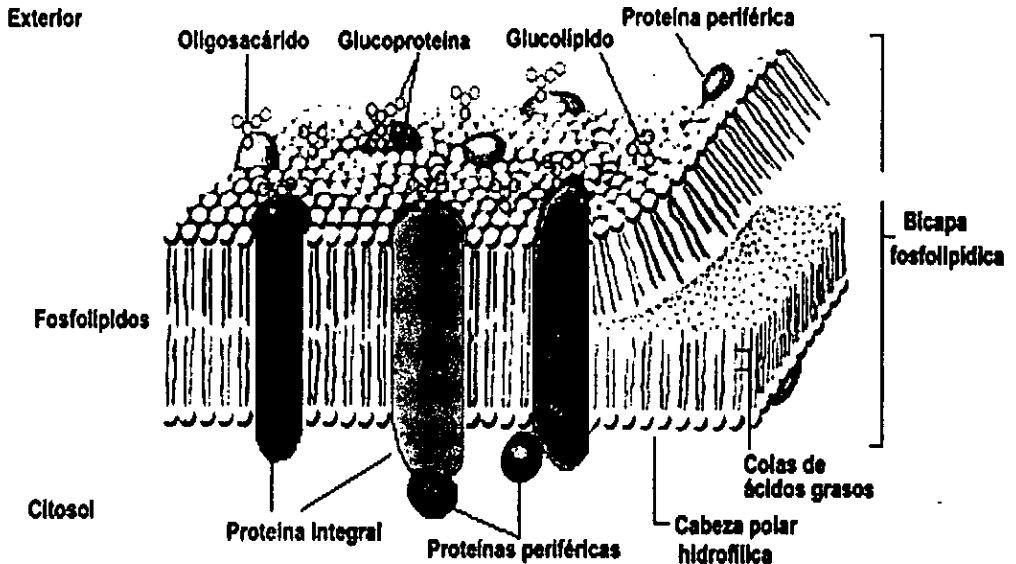


Figura 1. Modelo del mosaico fluido de la membrana plasmática (Damell *et al.*, 1993).



Aproximadamente el 75% de los lípidos de la membrana plasmática son fosfolípidos como la fosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, compuestos que participan en la fluidez membranal. En menores proporciones (aproximadamente 20%) se encuentran los esteroides, el colesterol en células animales y en células vegetales se encuentran el estigmasterol, campesterol y el sitosterol, los cuales difieren del colesterol sólo en la cadena alifática que se encuentra unida al carbono 17 de la estructura del ciclohexano perhidrofenantreno. Todos ellos, compuestos que se han propuesto como altamente modificadores de la fluidez membranal ya que presentan una estructura plana con poca movilidad.

Las moléculas de lípido se asocian espontáneamente cuando están rodeadas de agua. Los fosfolípidos son el tipo de lípidos más abundantes en las membranas celulares y presentan una parte hidrofílica (cabeza) constituida por residuos de azúcares o alcoholes fosforilados (generalmente, fosfoserina, fosfoetanolamina, fosfocolina, fosfoglicerol o fosfoinositol) y otra hidrofóbica (cola) conformada por ácidos grasos de diferente longitud y grado de esterificación, que se encuentran esterificados en las posiciones 1 y 2 del glicerol o bien en los esteroides. En medios acuosos, estos lípidos forman espontáneamente láminas bimoleculares cerradas y constituyen barreras al flujo de moléculas polares (Figura 1). El grosor de la mayoría de las membranas está comprendido entre los 60 y 100 Å (Stryer, 1990).

Otras moléculas anfipáticas que se encuentran en las membranas son las proteínas. La relación de pesos de proteína a lípido en la mayoría de las membranas biológicas abarca desde 1:4 a 4:1, siendo las membranas mitocondriales las que contienen la mayor concentración de proteínas. Las membranas también contienen hidratos de carbono enlazados a lípidos y a proteínas (Figura 1). Los glicolípidos (aproximadamente 5%), mantienen la adhesión entre las células y tejidos y pueden contribuir a la comunicación y reconocimiento celular.

Las proteínas de membrana presentan un amplio rango de funciones. Transportan moléculas de dentro hacia fuera y en sentido opuesto, es decir, funcionan como bombas,

compuertas, receptores, transductores de energía y enzimas. Reciben señales de hormonas y otros químicos en el fluido que los rodea y transmiten esas señales al interior de la célula.

De acuerdo a su localización en la membrana se clasifican en proteínas integrales y periféricas. Las **proteínas integrales** o **intrínsecas**, son aquellas que tienen uno ó más segmentos interactuando directamente con el centro hidrofóbico de la bicapa lipídica. Contienen residuos aminoacídicos con cadenas laterales hidrofóbicas que interactúan con los grupos de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana a través de fuerzas de Van der Waals. Estas proteínas pueden extraerse sólo por la acción de detergentes, los cuales desplazan los lípidos unidos a las cadenas laterales hidrofóbicas anclando las proteínas de membrana (Darnell *et al.*, 1993). Por otro lado, las **proteínas periféricas** o **extrínsecas** generalmente están unidas a la membrana por interacciones iónicas con los grupos polares de los lípidos de membrana, estas interacciones pueden romperse por adición de sales o cambio de pH (Darnell *et al.*, 1993).

Las moléculas proteicas y lipídicas de la membrana se mantienen unidas por interacciones no covalentes y se encuentran distribuidas de manera asimétrica, es decir, la cara interna y externa presentan diferente composición y una orientación específica en la membrana, característica clave en el modelo del mosaico fluido (Figura 1).

Las moléculas de lípidos, difunden rápidamente en el plano de la membrana, igual que las proteínas, a menos que estén anclados por interacciones específicas. El movimiento de lípidos y proteínas puede ser lateral, el cual se había propuesto que era un movimiento totalmente azaroso, pero se tienen ahora ciertos indicios de que algunos elementos pueden estar controlados por el sistema del citoesqueleto (Briskin, 1994). Otro tipo de movimiento que presentan tanto lípidos como proteínas es el rotacional (que en lípidos oscila alrededor de  $10^{-8}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$  y en proteínas  $4 \cdot 10^{-9}\text{cm}^2\text{s}^{-1}$ ) y existe evidencia de un tercer tipo de movimiento que es exclusivo de los lípidos que es el tipo "flip-flop" en el que los lípidos rotan  $180^\circ$  sobre su eje para desplazarse a la otra cara de la bicapa lipídica, este movimiento es lento ( $10^9$  veces más tiempo) y en algunas ocasiones es facilitado por proteínas específicas llamadas

flipasas (Voet y Voet, 1995). En realidad, se puede considerar a las membranas como disoluciones bidimensionales de proteínas y lípidos orientados.

En ciertos casos, se sabe que la sobrevivencia de las células depende de la fluidez de la membrana, cambios en la fluidez pueden ayudar a las células a adaptarse y no morir, por ejemplo un decremento drástico en la temperatura induce una disminución en la fluidez sin alterar la función de sus enzimas y otras proteínas. Alternativamente se ha encontrado que en respuesta al frío la composición de los ácidos grasos con dobles ligaduras aumenta, lo cual promueve la fluidez y le permite a las células realizar sus funciones de intercambio de nutrientes aún a bajas temperaturas (Briskin, 1994; Darnell *et al.*, 1993).

La membrana plasmática confiere a las células su individualidad al separarlas de su entorno, además regula la entrada y salida de materiales, permitiendo la entrada de unos y restringiendo el paso de otros. Esta propiedad de la membrana se llama permeabilidad selectiva, con ello se asegura que las moléculas esenciales como la glucosa, aminoácidos y lípidos entren rápidamente en la célula, que los intermediarios metabólicos queden retenidos y que los compuestos desechables dejen la célula. La permeabilidad selectiva de la membrana plasmática permite a la célula mantener un medio interno constante (Darnell *et al.*, 1993).

La permeabilidad de la membrana, depende de varios factores relacionados con las propiedades fisicoquímicas de las sustancias a ser transportadas, como son:

- a) Solubilidad en los lípidos. Las sustancias que se disuelven en los lípidos (moléculas hidrófobas, no polares) penetran con facilidad en la membrana, dado que esta está compuesta en su mayor parte por fosfolípidos.
- b) Tamaño. La mayor parte de las moléculas de gran tamaño no pasan a través de la membrana, sólo un pequeño número de moléculas no polares de pequeño tamaño pueden atravesar la capa de fosfolípidos ( $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ ).

- c) Carga. En condiciones normales, las moléculas cargadas y los iones no pasan a través de la membrana, sin embargo, algunas sustancias cargadas pasan por los canales proteicos y los acarreadores.

### **1.2. Transporte a través de la membrana celular**

Los mecanismos que permiten a las sustancias cruzar las membranas plasmáticas son esenciales para la vida y la comunicación entre las células. Para entender con los mecanismos de transporte, primero se definirá lo que es un gradiente de concentración, proceso que ocurre con el movimiento de solutos y agua a través de una membrana.

Concentración es un término que se refiere al número de moléculas o iones de una sustancia en un volumen dado de fluido. En ausencia de otras fuerzas, las moléculas de un tipo dado se moverán hacia o siguiendo el potencial impuesto por su gradiente de concentración, es decir, tenderán a moverse desde la región en la que se encuentran en mayor concentración hacia donde estén menos concentradas. Lo anterior ocurre porque las moléculas constantemente colisionan una con otra, millones de veces por segundo, las colisiones azarosas mueven las moléculas hacia atrás y adelante, pero los movimientos más probables serán aquellos que lleven hacia donde hay menor concentración de moléculas. De manera similar, para cualquier volumen definido los gradientes pueden también existir entre dos regiones que difieren en presión, temperatura o carga eléctrica neta (Hall y Baker, 1982).

Considerando que el desplazamiento de una molécula o ión puede ocurrir a través de una membrana biológica y que la tendencia en el movimiento de las moléculas puede ser llevada al equilibrio, se han utilizado términos cuantitativos para establecer si el proceso puede ocurrir o no de manera favorable. Para ello se utiliza frecuentemente la ecuación del cambio de energía libre de Gibbs, con lo cual es posible cuantificar el potencial químico asociado al gradiente electroquímico ya sea de una molécula cargada o no cargada (Nicholls y Ferguson, 1997).

Cuando la molécula en estudio no se encuentra cargada se puede considerar que el cambio en la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) para la transferencia de un mol de soluto a través de la membrana desde el compartimento A hasta el B ( $X_A \rightarrow X_B$ ); es decir, de la concentración  $[X]_A$  a la concentración  $[X]_B$  puede definirse como:

$$\Delta G (\text{KJmol}^{-1}) = RT \ln ([X]_B / [X]_A) \quad \text{Ecuación (1)}$$

En donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

En el equilibrio el  $\Delta G$  sería igual a cero y cuando el movimiento del soluto va desde A, siendo más concentrada la molécula en este compartimento (y por lo tanto  $[X_B]/[X_A] < 1$ ) el paso al compartimento B produce un  $\Delta G$  negativo con lo cual el proceso es termodinámicamente favorable o espontáneo. La misma condición, pero en dirección contraria se encontraría cuando en el compartimento B la molécula estuviera en menor concentración y tuviera que pasar al compartimento A, por lo que el proceso es termodinámicamente desfavorable con un  $\Delta G$  positivo. Así entonces, el movimiento de esta molécula en tal dirección está imposibilitado a menos que exista una fuerza adicional que la conduzca a moverse en el sentido contrario o "en contra" del potencial químico establecido por su gradiente de concentración (Nicholls y Ferguson, 1997).

Cuando ocurre la transferencia de una molécula cargada a través de la membrana. Un término debe añadirse a la ecuación 1 En este caso el  $\Delta G$  para el transporte de una mol de un anión  $X^{m-}$  transportado hacia su potencial eléctrico<sup>1</sup>, es decir,  $\Delta \Psi$  en mV sin la influencia de su concentración está dado por:

$$\Delta G (\text{KJmol}^{-1}) = -mF\Delta \Psi \quad \text{Ecuación (2)}$$

---

<sup>1</sup> Potencial de membrana es un parámetro que se refiere a la diferencia en carga eléctrica entre dos fases acuosas separadas por una membrana a veces llamada diferencia de potencial eléctrico y representado con  $\Delta \Psi$ .

Donde F es la constante de Faraday. Si el movimiento de esta molécula cargada está afectada tanto por su concentración como por su gradiente eléctrico, la ecuación queda como:

$$\Delta G \text{ (KJ mol}^{-1}\text{)} = - mF \Delta \Psi + 2.3 RT \log_{10} ([X^{m+}]_B / [X^{m+}]_A) \quad \text{Ecuación (3)}$$

El  $\Delta G$  en esta ecuación a veces se expresa como el gradiente electroquímico del ión ó  $\Delta \mu^{\cdot} X^{m+}$  (KJmol<sup>-1</sup>).

Debido a la complejidad de los sistemas de transporte se tienen diferentes clasificaciones de éste, a continuación se explica uno de los esquemas de clasificación más completos (Aguilar y Claros, 1997) (Figura 2).

### 1.2.1. Difusión simple

El transporte no mediado o denominado difusión simple, es el movimiento azaroso de moléculas o iones a favor del potencial impuesto por su gradiente de concentración, independientemente de que otras sustancias se encuentran también presentes.

La velocidad de la difusión depende de varios factores como son el tamaño de la molécula, la carga eléctrica, su liposolubilidad y por supuesto su concentración. Moléculas pequeñas y eléctricamente neutras pueden difundir rápidamente a través de la bicapa, como por ejemplo el O<sub>2</sub>, el CO<sub>2</sub> y el etanol.

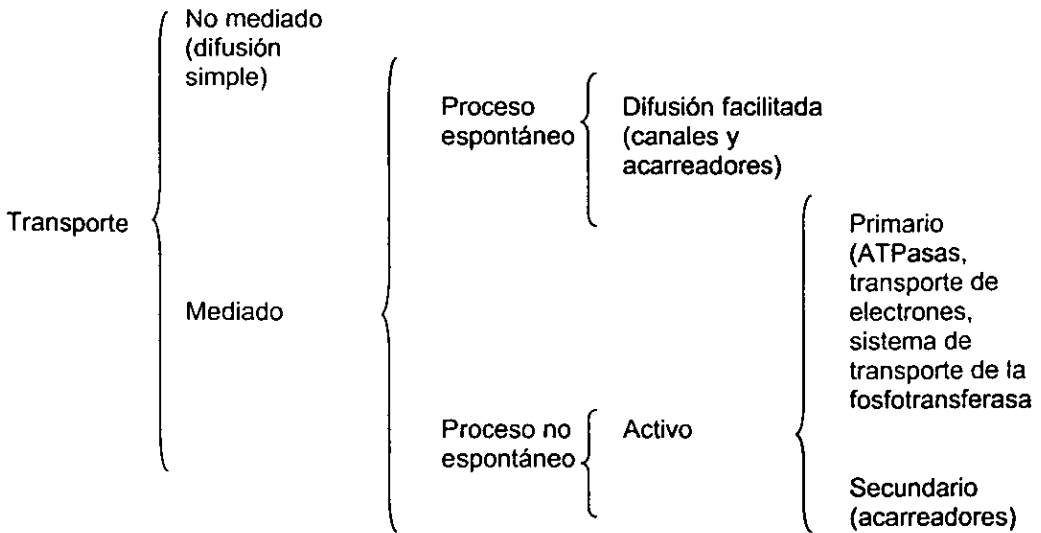


Figura 2. Clasificación del transporte a través de las membranas biológicas, adaptado de Aguilar y Claros (1997).

### 1.2.2. Difusión facilitada

En el transporte mediado se encuentran involucradas proteínas, que reconocen de manera específica los solutos a ser transportados. Dentro de este tipo de transporte se pueden encontrar los procesos independientes o dependientes de energía, es decir, espontáneos o no espontáneos (Figura 2).

Diferentes proteínas de membrana están involucradas en la difusión facilitada, algunas son canales otras son acarreadores, su función es la de ayudar a un soluto en particular a moverse en la dirección termodinámicamente favorable (a favor del potencial impuesto por su gradiente de concentración). Algunos de los solutos que son transportados por este medio son la glucosa, otras moléculas altamente solubles en agua, iones como  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $HCO_3^-$  entre otros.

La difusión facilitada es mucho más rápida que la difusión simple y depende de los siguientes factores: a) de la concentración de la sustancia a ambos lados de la membrana, b) del número de proteínas transportadoras existentes en la membrana, c) de la rapidez de interacción entre el soluto y el transportador, d) de la prontitud en el cambio de conformación del transportador con la molécula a transportar y sin ella (Murray, 1997).

La velocidad de transporte de un soluto mediado por proteínas presenta un patrón de saturación por el soluto de tipo hiperbólico, similar al que presentan ciertas enzimas y que se indica con la siguiente ecuación:

$$J_A = J_{\max} [A] / (S_{0.5} + [A]) \qquad \text{Ecuación (4)}$$

En donde  $J_A$  es el flujo o velocidad de paso por unidad de área del soluto A,  $J_{\max}$  es el flujo máximo de A mediado por el transportador,  $S_{0.5}$  es la concentración del soluto A a la cual se obtiene la mitad de su máximo flujo ( $J_{\max}/2$ ).

Es posible alterar la velocidad de transporte de un soluto dependiente de proteínas, al modificar el estado nativo de la proteína, ya sea por cambios en la composición de fosfolípidos de la membrana, la presencia de compuestos análogos al sustrato y la modificación química de la proteína (Voet y Voet, 1995).

A continuación se describirán a las proteínas que median el movimiento de solutos por difusión facilitada, los canales y los acarreadores (Figura 3).



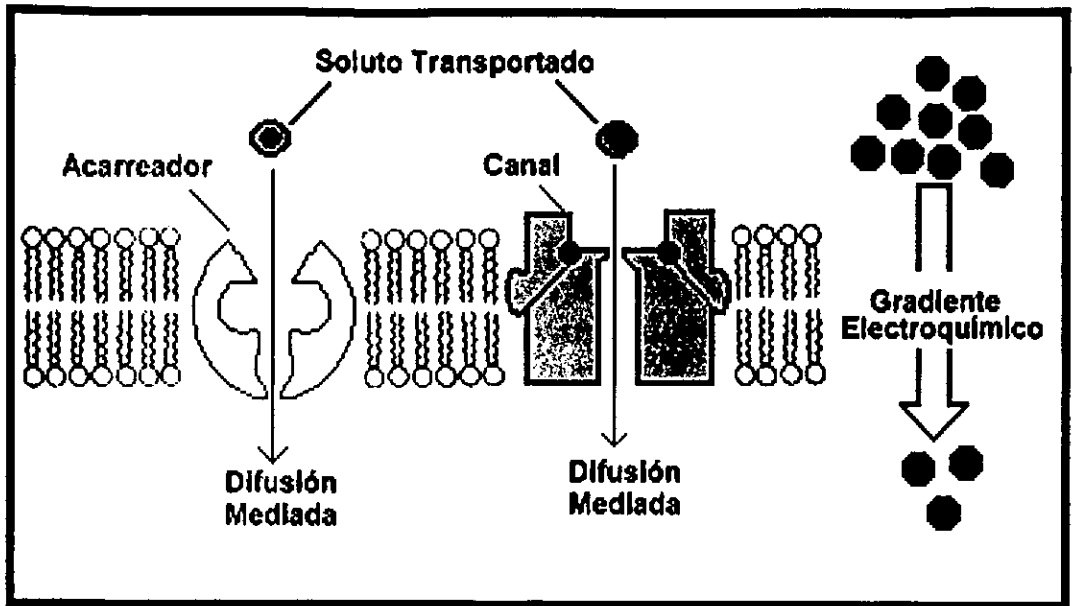


Figura 3. Transporte espontáneo de solutos mediado por acarreadores y canales. El soluto es transportado en la dirección de su gradiente electroquímico, transporte denominado difusión facilitada o mediada (Adaptado de Raven, 1992 ).

Los canales llevan a cabo el movimiento de iones a favor del potencial químico establecido por su gradiente de concentración a una velocidad de  $10^7$  iones por segundo (Logan *et al.*, 1997). Son proteínas que pueden componerse de 1, 4, 5 o 6 subunidades y tienen la propiedad de formar un anillo simétrico o casi simétrico. Existen condiciones celulares particulares que favorecen la apertura de cierto tipo de canal, condición que puede propiciar el cierre de otro canal para un ión diferente. La apertura o cierre del canal dependerá del tipo del canal que se trate y de los ligandos que se le unan como es el caso de los receptores a neurotransmisores; canales dependientes de voltaje o de los cambios en el potencial de membrana; canales dependientes de segundos mensajeros y los gap junction que son estructuras proteicas que forman un canal y se encuentran presentes en las membranas de dos células adyacentes (Lewin, 1994).

Los **acarreadores** son proteínas transmembranales que presentan sitios de unión específica para uno o más solutos, el mecanismo de transporte se ha propuesto que ocurre en cuatro pasos fundamentales: la unión del soluto, el movimiento conformacional que permite mover el soluto al otro lado de la membrana o paso de transporte, la disociación del soluto, y el regreso a la conformación inicial o recuperación. El proceso cinético del transporte fue descrito primero para el acarreador o transportador de glucosa, sin embargo parece ser un mecanismo general de transporte (Voet y Voet, 1995).

Se han descrito varios tipos de acarreadores atendiendo a sus mecanismos cinéticos y estequiométricos de transporte lo que da lugar a la denominada clasificación estequiométrica, los acarreadores que transportan un solo soluto a través de la membrana son llamados **uniportadores** y de manera estricta son los que llevan a cabo el proceso de difusión facilitada. Son denominados **simportadores** aquellos acarreadores que transportan dos solutos diferentes de manera simultánea y en la misma dirección, mientras que cuando los solutos se transportan uno en una dirección y otro en la dirección opuesta el acarreador se denomina **antiportador** (Voet y Voet, 1995). La velocidad promedio con la que un acarreador transporta un soluto oscila entre 10 - 1000 eventos de transporte por segundo (Logan *et al.*, 1997) Cuando un acarreador transporta más de un soluto por lo general está fuertemente ligado a la disipación de la energía provista por otro sistema transportador denominado transporte activo, el cual se explicará en la siguiente sección (Figura 3 y 4).

### 1.2.3. Transporte activo

El movimiento activo de un soluto a través de la membrana en contra del potencial químico impuesto por su gradiente de concentración, un proceso no espontáneo, es llamado transporte activo. Las proteínas que realizan este tipo de transporte específico de solutos hacia fuera o adentro de la célula llevarán a cabo un movimiento conformacional pero que dependerá grandemente del gasto de energía. Cuando la proteína transportadora o transportador mueve directamente una o varias moléculas en contra de su gradiente de concentración y gasta la energía (principalmente hidrolizando ATP) se dice que el proceso es de transporte activo primario.

La ATPasa de  $H^+$  localizada en la membrana plasmática presenta dos actividades, hidroliza ATP y transporta  $H^+$  desde el citosol hacia el exterior de la célula, creando de esta manera una diferencia de potencial eléctrico y de pH (Figura 4). El potencial de membrana que produce la salida activa de protones puede ir desde -70 mV hasta -150 mV, en gradiente eléctrico suficiente para llevar a cabo el transporte pasivo de iones hasta encontrar su potencial de equilibrio (Morsomme y Boutry, 2000). Por otra parte la energía almacenada en esta fuerza protón-motriz puede acoplarse al transporte de solutos no cargados por sistemas de cotransporte con protones, el denominado **transporte activo secundario**. En la Figura 4 se muestran los transportadores que se han clonado en plantas. Aún cuando no se tiene evidencia de su localización y funcionalidad, se puede observar que muchos de los transportadores dependen para su actividad del bombeo de protones, realizado por la ATPasa de la membrana plasmática.

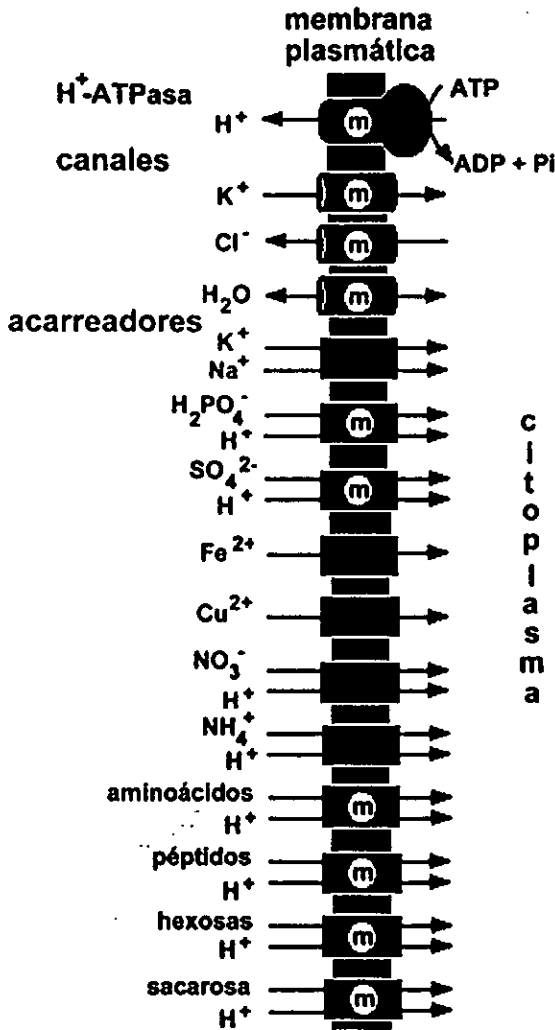


Figura 4. Esquema de los sistemas de transporte que han sido clonados y cuya probable localización es la membrana plasmática. m; Indica que hay evidencia de una familia multigénica. Para los acarreadores una sola flecha indica que es un uniportador y dos flechas un cotransportador (utiliza la energía del gradiente electroquímico transmembranal de Na<sup>+</sup> o H<sup>+</sup>; nótese que en muchos casos la estequiometría no se conoce). Tomado de Logan *et al.*, 1997.

### **1.3. Transporte de sacarosa a larga distancia**

Los carbohidratos representan la principal fuente de carbono y energía para los organismos heterótrofos. Las plantas utilizan y producen en muchas de sus reacciones los monosacáridos glucosa y fructosa, sin embargo es necesario que estas unidades carbonadas sean almacenadas y transportadas en compuestos que son osmóticamente menos activos y/o de no fácil acceso para las enzimas que habitualmente existen en el metabolismo celular.

El compuesto más abundante que es transportado en el floema de la mayoría de las especies es sacarosa, debido a su carácter no reductor y de poca reactividad, lo cual facilita su transporte a larga distancia sin sufrir alguna modificación (Frommer, 1996). La sacarosa de las hojas maduras es distribuida en la planta a través del sistema vascular, para apoyar el crecimiento de tejidos heterótrofos, como hojas en desarrollo, ápices, raíces y órganos reproductores. Para el transporte a larga distancia (de azúcares, iones y aminoácidos) de los órganos fuente (tejidos que exportan) a los órganos demanda (tejidos que importan), las plantas han desarrollado una red, llamada floema (Frommer, 1996).

El floema de las angiospermas consiste en varios tipos de células que están asociadas muy cercanamente con el xilema dentro de la envoltura vascular. Se trata de dos tipos de células relacionadas ontogénicamente: las células acompañantes y los elementos cribosos. Estos dos tipos de células están ampliamente modificadas y bien interconectadas por el plasmodesmata<sup>2</sup>. Los elementos cribosos, perdieron su núcleo, vacuolas y muchos otros organelos durante su maduración, formando tubos de células vivas conectadas por poros. Las células acompañantes, se caracterizan por un protoplasma denso, presencia de núcleo y muchas mitocondrias, se ha sugerido que las células acompañantes proveen de nutrientes para la sobrevivencia de los elementos cribosos, transportados por medio de uniones plasmodesmata (Figura 5).

---

<sup>2</sup> Canales citoplásmicos finos que dividen la pared celular y conectan una célula a las células vecinas en las plantas superiores; cada canal está unido con una membrana plasmática (Stenesh, 1989).

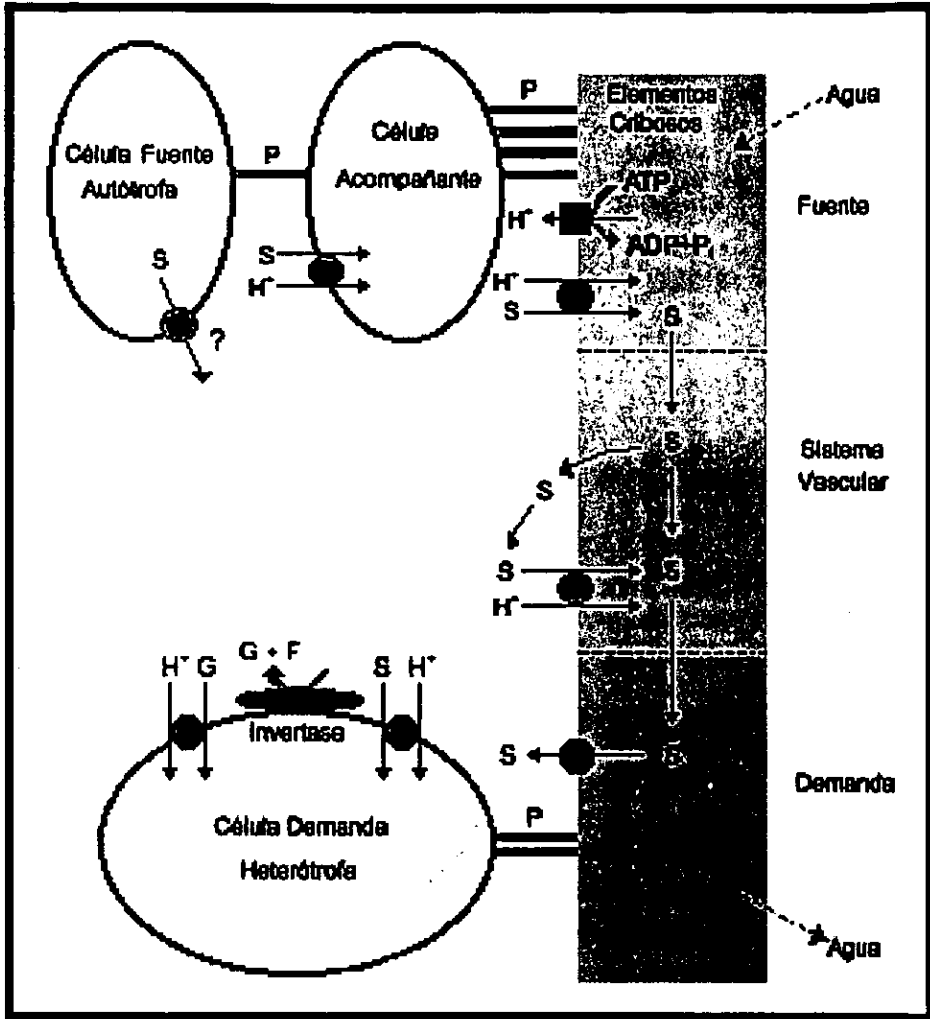


Figura 5. Transporte a larga distancia de azúcares entre tejidos fuente y demanda (Williams et al., 2000). La sacarosa (S) es transportada desde los tejidos demanda hacia el complejo de células acompañantes por la vía de transporte a través del plasmodesmata (P) y vaciada hacia los elementos cribosos mediante transportadores específicos, el importe a las células demanda puede ocurrir por el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> o bien a través de los transportadores de hexosas. Glucosa (G) y fructosa (F) son los productos de hidrólisis enzimática de la invertasa asociada a la pared celular.

El movimiento de sacarosa de célula a célula se cree que ocurre vía plasmodesmata desde el sitio de síntesis o tejido fuente hacia el complejo de elementos cribosos/células acompañantes (Lalonde, 1999).

En muchas especies de plantas, la sacarosa es sintetizada en el citosol de las hojas fotosintéticamente activas y es transportada hacia el floema contra un potencial químico impuesto por su gradiente de concentración para su transporte a larga distancia (Overvoorde, 1996). Para el transporte de sacarosa se pueden observar dos rutas: (1) difusión directa célula a célula transporte vía el plasmodesmata o llamada ruta simplástica; y (2) transporte mediado por acarreadores a través de la membrana plasmática denominada ruta apoplástica (Figura 5).

### 1.3.1. Transporte simplástico

Los organismos superiores han desarrollado un sistema de uniones intercelulares llamadas plasmodesmata, a través de los cuales el transporte de sacarosa se lleva a cabo siguiendo el potencial químico impuesto por su gradiente de concentración. Los tejidos fuente, aquellos que sintetizan más nutrientes de los que pueden metabolizar, donarán a los tejidos demanda metabolitos que no son capaces de sintetizar como la sacarosa.

Muestras de la funcionalidad de la ruta simplástica, para la descarga de metabolitos al floema, se ha obtenido mediante diferentes evidencias experimentales. Por ejemplo, el análisis anatómico de la difusión de compuestos fluorescentes a través de las células, demostró la rapidez con la que algunos compuestos de bajo peso molecular pueden llegar a las células vecinas. Xoconostle-Cázares *et al.*, 1999, reportaron el movimiento del RNA para el simportador de sacarosa entre células distintas, evidenciando el papel tan importante que juegan los plasmodesmata no sólo en la nutrición, sino también en la comunicación intercelular.

### 1.3.2. Transporte apoplástico

El modelo apoplástico de la carga (del inglés "loading") y descarga (del inglés "unloading") del floema, postula la existencia de transportadores específicos que transportan azúcares y aminoácidos a través de la membrana. En hojas maduras la sacarosa fluye a través de la ruta simplástica desde las células del mesófilo hacia el complejo de los elementos cribosos/células acompañantes, acumulándose probablemente entre ocho a diez veces en el apoplasto de este complejo. La acumulación de sacarosa se postula es facilitada por la actividad de una ATPasa de protones específica de tejido, ya que se demostró mediante la expresión de una fusión del gene *aha3* con el gene reportero para la  $\beta$ -glucuronidasa, que la ATPasa de protones de la membrana plasmática se expresa abundantemente en el floema (DeWitt *et al.*, 1995). Mediante las técnicas de hibridación *in situ*, inmunocitocalización y la fusión del gen con el promotor de GUS se evidenció la localización del simportador sacarosa protón en el floema, generalmente en las células acompañantes (Riesmeier *et al.*, 1992; Stadler *et al.*, 1995; Stadler y Sauer, 1996).

Actualmente se maneja un modelo en el cual se presenta el posible movimiento de sacarosa a través de ambas rutas la simplástica y la apoplástica (Figura 5). Sin dejar de considerar la posibilidad de que en los tejidos demanda pudiera encontrarse un mayor transporte de los productos de la hidrólisis de la sacarosa, fructosa y glucosa, que se generan por la actividad de la invertasa localizada en la pared celular (Frommer, 1996).

## 1.4. Simportador Sacarosa/H<sup>+</sup>

### 1.4.1. Clonación, secuenciación y estructura del simportador en la membrana.

El primer simportador de sacarosa fue clonado por complementación funcional en una mutante de levadura, utilizando para ello una biblioteca de cDNA de espinaca construida en un vector de expresión para levadura. Para identificar y clonar al transportador de sacarosa, se modificó una cepa de levadura para que presentara las siguientes características: ser deficiente en la actividad de transporte de sacarosa e invertasa, y contener una sacarosa



sintasa proveniente de plantas. La cepa resultante fue transformada con la biblioteca de cDNA de espinaca, aquellas transformantes que adquirieron la habilidad de crecer en sacarosa fueron seleccionadas y de ellas se obtuvo el cDNA del simportador de espinaca (Riesmeier *et al.*, 1992). La obtención del cDNA para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de espinaca facilitó la identificación del transportador de papa (Riesmeier *et al.*, 1993).

A la fecha se han identificado más de 20 genes para el transportador de sacarosa en diferentes especies, encontrándose que pertenecen a una familia multigénica, cuando menos para todas las especies de dicotiledoneas de donde se han clonado, por ejemplo se han encontrado 7 genes en *Arabidopsis thaliana* (Williams *et al.*, 2000), 2 genes en zanahoria (DcSUT1 y DcSUT2), 2 genes en *Plantago major* (PmSUC1 y PmSUC2) y 3 genes en *Nicotiana tabacum* (NtSUT3), entre otros. Mientras que en el caso de *Oryza sativa* y *Zea mays*, miembros ambos de la familia de las monocotiledoneas, sólo se ha encontrado un gen para el simportador de sacarosa (Aoki *et al.*, 1999; Hirose *et al.*, 1997).

A partir de la secuencia de nucleótidos se predice que la proteína puede contener de 501 a 594 residuos de aminoácidos con un peso molecular estimado de 52.9 a 55 kDa y tres sitios potenciales de glicosilación. El análisis de hidropatía sugiere que es una proteína integral de membrana con 10 a 12 segmentos transmembranales en arreglos  $\alpha$  hélices (Figura 6).

La comparación y análisis de 12 de las secuencias para el transportador de sacarosa, muestra que las regiones transmembranales de la proteína están altamente conservadas, mientras que las regiones carboxilo y amino parecen ser las más variables y con una probable localización citosólica.

El análisis de la secuencia del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> reveló la presencia de sitios putativos de fosforilación en serina y treonina, ambos residuos se encuentran en las asas citoplásmicas en la secuencia [ST]XX[DE] que es sitio de fosforilación de cinasas tipo CK2 y la secuencia [ST]X[RX] que es sitio potencial de fosforilación por proteínas cinasas C. En esta última hay una Thr (Thr<sup>103</sup>) altamente conservada y unos residuos de serina que están

menos conservados (Ser<sup>38</sup> y Ser<sup>99</sup>, en la secuencia de *Beta vulgaris* BvSUT1) pero que también son sitios potenciales de fosforilación (Deltrot et al., 2000).

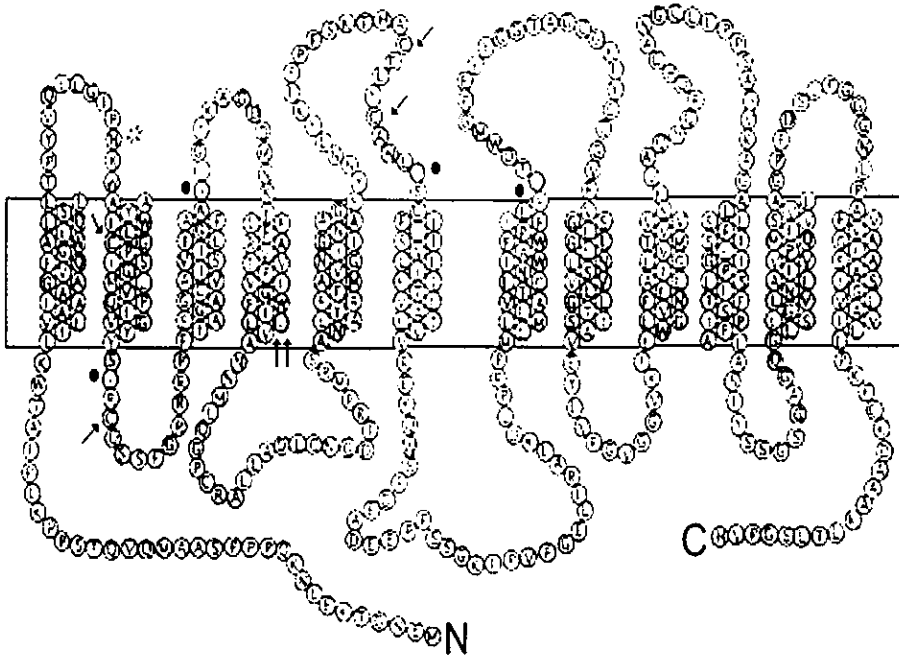


Figura 6. Modelo topológico del transportador de sacarosa de apio (tomado de Lemoine, 2000). En él se indican las regiones amino (N) y carboxilo (C) de la proteína localizadas en el citosol. La proteína cruza 12 veces la membrana y en este esquema se denotan con flecha ↑ las cisteínas que se consideran importantes para su función, con ● los residuos cargados que se encuentran en el límite de los segmentos transmembranales, con doble flecha ↕↕ el residuo de ácido aspártico conservado localizado en un segmento transmembranal y con ∗ la histidina que se encuentra localizada en la cara externa de la membrana, accesible al inhibidor DEPC.

En cuanto a sitios potenciales de glucosilación para los transportadores de sacarosa, se predicen varios sitios, como el N[~P] [ST] [~P] que está localizado en StSUT1 en el Asn 3 y 92, en AtSUC1 y AtSUC2, en el Asn 154 y 402; sin embargo sólo los sitios localizados en las asas extracelulares, tales como el Asn <sup>402</sup> en AtSUC2 serían los sitios más probables de glicosilarse (Deltrot *et al.*, 2000).

### 1.4.2. Análisis funcional y propiedades cinéticas

La primera evidencia de un simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en la membrana plasmática de células vegetales se dió a finales de 1970, en donde Giaquinta propuso que este transportador podría ser responsable de la acumulación de sacarosa en el tejido vascular de hoja (Giaquinta, 1977).

Subsecuentes experimentos usando vesículas de membrana plasmática de hojas y expuestas a diferentes potenciales electroquímicos, en la ausencia y presencia de un  $\Delta pH$ , aportaron evidencia adicional sobre el transporte de sacarosa dependiente del movimiento de protones (Bush, 1993).

Con el avance de las técnicas de la biología molecular se han obtenido y caracterizado distintos genes para el transportador, algunos de éstos han sido expresados de manera funcional en ovocitos de *Xenopus* y en levaduras. En los parámetros cinéticos del transportador obtenidos en estos sistemas heterólogos, el valor de la Km para sacarosa parece no diferir de aquellas determinaciones que se hicieron en las membranas nativas (Tabla 1). La Km determinada para el transportador es de 0.3 a 1.5 mM (Tabla 1).

El simportador es altamente específico para sacarosa, ya que glucosa, fructosa, lactosa, maltosa, manosa y melobiosa no son capaces de inhibir el transporte de sacarosa, aún a concentraciones 10 veces mayores que la de sacarosa.

El análisis cuidadoso de la unión e inhibición del transporte de sacarosa utilizando más de 23 glucósidos diferentes (Hecht *et al.*, 1992; Hitz *et al.*, 1986) así como el uso de un

análogo no metabolizable de la glucosa el 3-O-metil-D-glucosa marcada con carbono 14 (Gogarten y Bentrup, 1989) aportaron evidencias de que los hidroxilos del C1 y C3 son importantes para el reconocimiento así como es fundamental la interacción hidrofóbica de la proteína con el anillo de pirano.

Tabla 1. Valor de Km aparente para el transporte de sacarosa, por el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.

ESPECIE DE PLANTA	SISTEMA DE EXPRESIÓN	Km aparente (mM)	REFERENCIA
Papa	Xenopus	0.5 - 1	Riesmeier, <i>et al.</i> , 1993
Espinaca	Levaduras	1.5	Sauer, <i>et al.</i> , 1994
Papa	Levaduras	1	Sauer, <i>et al.</i> , 1994
Remolacha	VMP* de Hojas	0.54	Buckhout, 1994
Zanahoria	Levaduras	0.5	Shakya y Strum, 1998
Remolacha	VMP* de Hojas	0.45	Buckhout, 1989
Remolacha	VMP* de Hojas	1	Bush, 1993
Arabidopsis	Levaduras	0.45	Sauer, <i>et al.</i> , 1994
Plantago	Levaduras	0.3	Gahrtz, <i>et al.</i> , 1996
Haba	Levaduras	1.4	Weber, <i>et al.</i> , 1997

\*VMP es Vesículas de membrana plasmática.

En vesículas de membrana plasmática de hojas de remolacha se determinó que la Km aparente para los protones es de 0.7  $\mu$ M, resultado similar al obtenido en vesículas de membrana plasmática de cotiledones de ricino. Este valor puede tener consecuencias fisiológicas importantes ya que el valor del pH del apoplasto es de 5.0 (10  $\mu$ M) a 6.0 (1  $\mu$ M), por lo que en este ambiente ácido, la disponibilidad por los protones no es el paso limitante (Bush, 1993; Slone y Buckhout, 1991).

El simportador sacarosa/H<sup>+</sup> es inhibido por el dietilpirocarbonato (DEPC) y el ácido p-cloromercuribencensulfónico (PCMBS) con valores de I<sub>50</sub> de 30 a 750  $\mu$ M, respectivamente. El anillo de imidazol de la histidina es el blanco primario del DEPC y el grupo sulfhidrito de la

cisteína es el sitio blanco del PCMBs. También se ha probado a la N-etilmaleimida como inhibidor aunque no se ha observado efecto inhibitorio en todos los tejidos probados.

Se han analizado curvas de tiempo y concentración de DEPC y PCMBs en la actividad de transporte de sacarosa. El DEPC inhibe al transporte de sacarosa preferentemente a concentraciones bajas de sacarosa, ya que 7 mM sacarosa disminuye significativamente la inhibición por DEPC. Lo anterior sugiere que la histidina modificada por el DEPC se encuentra cercana al sitio activo o en el sitio activo, ya que es inaccesible al DEPC cuando el sustrato se encuentra presente (Bush, 1993).

Existen cisteínas que se encuentran conservadas en la hélice 2 y en la tercer asa extracelular (Figura 6), así como residuos de ácido aspártico y lisina que se encuentran en la orilla de los segmentos transmembranales en las hélices 3, 6 y 7. Como se mencionó anteriormente un residuo importante en la proteína es la histidina localizada en la primer asa extracelular (Figura 6), ya que es un residuo conservado en todas las secuencias para el transportador de sacarosa y además es el sitio potencial de modificación del DEPC, por lo que esta histidina ha sido reemplazada por diferentes residuos (Lemoine, 2000), tanto hidrofóbicos (Gly, Leu), polares (Cys, Asn, Gln, Ser, Tyr) o residuos cargados (Asp, Lys, Arg). Esto para observar el efecto de la sustitución de éste residuo en la actividad del transportador.

Cuando la histidina fue reemplazada por un residuo cargado positivamente (Arg o Lys), la actividad del transportador de sacarosa expresado en levaduras aumentó, pero la afinidad por la sacarosa se redujo obteniéndose con la sustitución de la histidina por lisina un incremento de 14 veces tanto de la  $K_m$  como de la  $V_{max}$ . Mientras que la sustitución de la His por Asp produjo una disminución de 8 veces en el valor de la  $V_{max}$ . Cuando el transportador presentó la mutación de la His por Gly o Ser no se detectaron cambios en los parámetros cinéticos comparados contra la proteína nativa, esto sugiere que la carga positiva no es indispensable para la actividad (Lemoine, 2000).

### 1.4.3. Propiedades fisiológicas

Se demostró por el uso de plantas transgénicas de papa y tabaco que no expresaban al transportador de sacarosa (SUT1), que este transportador es esencial para la descarga al floema, ya que la reducción de la actividad de transporte de sacarosa afecta el reparto de carbono y la fotosíntesis. Las plantas de tabaco que contenían a SUT1 en antisentido acumulaban de 5 a 10 veces más sacarosa y almidón en las hojas, comparadas con las plantas silvestres. El aspecto de las plantas estaba muy alterado, mostrando hojas pequeñas y curvadas, con una evidente clorosis y una alta acumulación de antocianinas, que exhibían un marcado retardo en el crecimiento (Kühn *et al.*, 1996). Por lo que, parece ser que los simportadores sacarosa/H<sup>+</sup> son indispensables para la toma de sacarosa por los tejidos de demanda, al menos en las especies *Solanaceas* (Lalonde *et al.*, 1999).

El papel fisiológico de las múltiples copias de un gene se desconoce, sin embargo para el gene del simportador de sacarosa se tienen evidencias de que estos genes y sus proteínas se expresan con alta especificidad sólo en algunos tejidos. En el caso de *Plantago major*, SUC1 se expresa en óvulos jóvenes en mayor proporción que en otros tejidos (Tabla 2), SUT1 y SUT2 en *Dacus carota* presentan patrones específicos de expresión. Sin embargo, de manera interesante los diferentes transportadores se encuentran no sólo en los tejidos de demanda sino también en las hojas (tejido fuente) lo cual indica que presentan una doble función tanto en la descarga de las hojas hacia el floema como en el importe a los tejidos fuente como son las semillas, óvulos jóvenes y cotiledones (Lalonde *et al.*, 1999).

Tabla 2. Familia de genes descritos para los transportadores de sacarosa, adaptado de Lalonde *et al.*, 1999 y Aoki *et al.*, 1999.

Nombre	Especie	Longitud (a.a.)	No. De Acceso	Localización*
AgSUT1	<i>Apium graveolens</i>	512	4091891	
AtSUC1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	513	481132	Hf, Hd, Ra, Fi, Floema
AtSSUC2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	512	407092	Hf, Hd, FI, CA
AtSUTX1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	474	2160188	
AtSUTX2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	513	3287687	
AtSUTX3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	492	3810593	
AtSUTX4	<i>Arabidopsis thaliana</i>	594	3461813	
BvSUT1	<i>Beta vulgaris</i>	523	633172	
DcSUT1a/b	<i>Daucus carota</i>	501	2969889, 2969887	Hf
DcSUT2	<i>Daucus carota</i>	515	2969884	FI
LeSUT1	<i>Lycopersicon esculentum</i>	511	575299	Hf, Ra, Hd, FI
NtSUT1	<i>Nicotiana tabacum</i>	507	575351	Hf, Ra, Hd, FI
NtSUT3	<i>Nicotiana tabacum</i>	520	149981	
OsSUT1	<i>Oriza sativa</i>	537	2723471	E, Hf, Hd, Hb
PmSUC1	<i>Plantago major</i>	510	1086253	FI, Hf, Hd, Ra, CA, Óvulos jóvenes
PmSUC2	<i>Plantago major</i>	510	415988	Hf, Ra, FI, Hd, CA
RcSCR1	<i>Ricinus communis</i>	533	542020	C, CS, Ra, Hf, Hd
SoSUT1	<i>Spinacea oleracea</i>	525	549000	Hf
StSUT1	<i>Solanum tuberosum</i>	516	542087	Hf, Ra, FI, Floema,
VfSUT1	<i>Vicia faba</i>	523	Z93774	C, CS, Hf, Hd, Ra
ZmSUT1	<i>Zea mays</i>	521	BAA83501	S

\*Hb, hoja bandera; Hf, hoja fuente; Hd, hoja demanda; FI, flor; CA, Células acompañantes; Ra, Raíz; C, Cotiledón; E, Endospermo; Fr, Fruto; S, Semilla; CS, Cubierta de la semilla.

También se han realizado estudios de transporte de azúcares en semillas en desarrollo y durante la germinación encontrándose que células epidérmicas del cotiledón de *Vicia faba* expresan a VfSTP1, el transportador de monosacáridos y que su expresión está confinada a las regiones epidérmicas, que son las células que cubren a la región parenquimatosa, mitóticamente activa, por lo que se propone que las células epidérmicas a través de la expresión de VfSTP1 abastecen de sustratos para el metabolismo de las células en desarrollo.

En estudios tardíos del desarrollo del embrión VfSTP1 es reemplazado por el transportador de sacarosa VfSUT1. Las células epidérmicas con la morfología de células de transferencia y con alta actividad de almacenamiento, expresa muy altos niveles de VfSUT1, indicando que el transportador codificado por este gene podría proveer los sustratos para la síntesis de compuestos de almacenamiento (Weber *et al.*, 1997).

Durante la germinación de la semilla, es necesario que los productos de reserva sean hidrolizados, dentro de estos se encontraría la sacarosa, que deberá ser liberada al espacio apoplástico. En *Ricinus communis*, el transportador RcSUT1 se expresa en niveles altos tanto en las células epidérmicas del cotiledón y que están cercanas al endospermo como en el floema. Esto sugiere que las células epidérmicas inicialmente acumulan sacarosa desde el apoplasto y desde ahí la sacarosa es transferida simplásticamente a la región del floema (Bick *et al.*, 1998).

Las distribuciones tisular y celular específicas del transportador de sacarosa indican una regulación compleja de su expresión. Algunos resultados que complican aún más el panorama de su estudio son aquellos que muestran que el transportador no sólo es importante para proveer los esqueletos carbonados y el sustrato para obtener la energía y realizar el metabolismo celular; si no también su papel en la señalización o detección de los niveles de azúcares que tienen implicaciones importantes en la diferenciación, morfogénesis y desarrollo de la planta (Lalonde *et al.*, 1999).



Recientemente, se clonó y secuenció el gene para el transportador de sacarosa en maíz, denominado ZmSUT1 (Aoki *et al.*, 1999), el gen codifica para una proteína de 521 aminoácidos con un peso molecular estimado de 55.2 kDa, un pI de 8.11, presenta una identidad del 82% con el transportador de arroz y cerca de un 40 a 45% con los transportadores de azúcares de las dicotiledóneas.

ZmSUT1 es el único gen para el transportador en maíz y se expresa en la hoja bandera, flor, pedicelo, cáscara, muy poco en el grano y en niveles altos en semillas germinadas 5 y 8 días en la oscuridad.

Una de las evidencias que los autores proponen como fuerte para demostrar que este es el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, es la presencia de la His<sup>69</sup> que es la histidina que correspondería a la His<sup>65</sup> en AtSUC1 *Arabidopsis thaliana*, especie en la que el análisis de mutantes sitio-dirigidas indica que este residuo participa de algún modo en la unión de la sacarosa (Aoki *et al.*, 1999; Matsukura *et al.*, 2000). Los autores que identificaron el gene a partir de maíz, no determinaron la actividad de transporte de sacarosa/H<sup>+</sup> en los tejidos que estudiaron sino la presencia del RNAm para el transportador .

Se demostró que la ATPasa-H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de embriones de maíz se encuentra activa, a los tiempos iniciales de la germinación (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998), así como en el período de la protusión de la radícula (Sánchez-Linares, 1998). La ATPasa-H<sup>+</sup> sería la encargada de generar el potencial electroquímico necesario para impulsar la entrada de sacarosa a las células del embrión en germinación. Se propone que el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> se encuentra involucrado en la germinación de la semilla. Esta sacarosa fue probablemente sintetizada en el escutelo a expensas de la glucosa proveniente de la hidrólisis del almidón (presente en el endospermo) y proveniente también del metabolismo de lípidos que son transformados a glucosa, por la vía del glioxilato (Street y Öpik, 1986). Por eso es probable que el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> se encuentre involucrado en el proceso de germinación de la semilla de maíz, en este trabajo se demostró la presencia de este simportador durante este período, y en la etapa posterior a la salida de la radícula.

## **2. HIPÓTESIS**

Siendo la sacarosa el metabolito de preferencia para la nutrición celular en plantas maduras, es probable que la actividad del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> se correlacione con el proceso de germinación de la semilla de maíz.

### 3. OBJETIVO GENERAL

Investigar la presencia y el posible papel del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> localizado en la membrana plasmática en ejes embrionarios de maíz, durante la germinación y después de la elongación de la raíz.

#### 3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Medir el porcentaje de germinación y la acumulación de peso húmedo para establecer los tiempos óptimos para el estudio del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en ejes y embriones de maíz durante la germinación
2. Obtener la fracción microsomal y protoplastos de ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de imbibición.
3. Caracterizar la actividad de transporte de sacarosa en los protoplastos obtenidos de ejes embrionarios de maíz.
4. Medir la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática en la fracción microsomal obtenida de ejes embrionarios de maíz.
5. Obtener el patrón de actividad del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en ejes embrionarios germinados diferentes tiempos.
6. Obtener un anticuerpo específico que reconozca únicamente al simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.
7. Detectar la presencia del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en la fracción microsomal de ejes embrionarios embebidos por diferentes tiempos, utilizando un anticuerpo específico.

8. Obtener el perfil de expresión de proteína para el transportador de sacarosa a lo largo de la germinación.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material biológico**

Se disectaron manualmente embriones de maíz de la variedad Chatqueño (cosecha 1999), que se almacenaron hasta su uso a 4°C.

### **4.2. Imbibición de embriones y ejes**

Lotes de 30g de embriones y 0.5g de ejes, se desinfectaron con una solución al 2% de hipoclorito de sodio durante dos minutos, enjuagándose después dos veces con agua destilada durante dos minutos cada vez. Posteriormente se colocaron en cajas de Petri estériles de 15 cm de diámetro, que contenían agar al 1.2% esterilizado. Los embriones se incubaron a 29°C en la obscuridad por diferentes tiempos.

### **4.3. Medición del porcentaje de germinación en embriones y ejes**

Los embriones se sembraron en la forma descrita anteriormente y se incubaron por 2, 5, 8, 12, 15, 18, 22, 24, 30, 33, 36 y 48 horas; para cada tiempo se sembraron 20 embriones y 25 ejes. Un embrión se consideró como germinado cuando al menos la radícula presentó aproximadamente 2 mm de longitud.

### **4.4. Acumulación de peso húmedo en embriones y ejes**

Después de la incubación y conteo de embriones y ejes germinados, estos fueron pesados para obtener el peso húmedo por embrión o eje. Además se pesaron 20 embriones y 25 ejes sin embeber, tomados al azar, para determinar el peso de los embriones y ejes al tiempo cero. Los datos de las gráficas del curso temporal de toma de agua se obtuvieron al usar la siguiente relación:

Acumulación de peso húmedo = (Peso germinado - Peso seco) / Peso al tiempo cero

#### **4.5. Obtención de la fracción microsomal**

Al concluir el tiempo de imbibición, los ejes embrionarios se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron en el ultracongelador REVCO a - 70°C hasta su uso.

Los embriones se colocaron en una licuadora (Waring Blender Cat. No.8420 Eberbach Corporation Scientific Instruments and Apparatus), se les añadió amortiguador de homogeneización [50 mM HEPES / BTP pH 7.8, 250 mM Sorbitol, 1 mM EDTA, 1 mM KCl, 5 mM DTE y 40 µg Mezcla de inhibidores de proteasas/mL de buffer (Complete Boehringer - Mannheim)], en una relación de 2 mL de amortiguador por 1 g de tejido y se molieron a baja velocidad en la licuadora por 20 segundos. Se filtraron a través de cuatro capas de gasa (previamente humedecidas con agua) y el homogeneizado se centrifugó a 1500 g por 10 minutos a 4°C en la ultracentrifuga Optima TL Beckman con rotor TLA 100.4. Se eliminó la capa de grasa que quedó en la parte superior y se tomó con cuidado el sobrenadante. Éste se centrifugó a 13000 g por 10 minutos en la ultracentrifuga Optima TL Beckman. En este paso se eliminaron las mitocondrias que quedaron en el botón y el sobrenadante se centrifugó nuevamente pero ahora a 100000 g durante 1.5 h a 4°C. El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador de ajuste de peso (500 mM Sorbitol, 5 mM KPi pH 7.8, 0.2 mM KCl, 5 mM DTE) a esta fracción se le denomina fracción microsomal.

#### **4.6. Determinación de proteína**

El método utilizado es el de Lowry modificado por Peterson (1977). Se realizó primero una curva patrón con diferentes concentraciones de albúmina de suero Bovino (BSA) en concentraciones de 0 -100 µg en un volumen de 900 µL, posteriormente se agregaron 100 µL de 0.15% Desoxicolato de sodio (DOC) incubándose por 10 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se añadió 1 mL de reactivo A (reactivo que está constituido de partes iguales de: Solución de Carbonato-Tartrato-Cobre denominada CTC (Carbonato de Sodio 10%, Sulfato de cobre 0.1%, Tartrato de potasio 0.2%), Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10%, Hidróxido de sodio 0.8 N y agua desionizada. Nuevamente se incubaron 10 minutos y después se agregaron 500 µL de reactivo B, solución que contiene un volumen del reactivo

de Folin Cicalteau mezclado con cinco volúmenes de H<sub>2</sub>O. Se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente y se midieron las absorbencias a 750 nm.

Con las muestras se realizó el mismo procedimiento, pero en lugar de utilizar BSA, se agregaron 7 µL de la fracción microsomal, protoplastos o amortiguador de ajuste de peso. El tratamiento de las muestras y controles se realizó por triplicado.

### 4.7. Obtención de protoplastos de ejes embrionarios

El procedimiento de obtención de protoplastos se realizó utilizando medios y material estéril. Los medios utilizados para la obtención de protoplastos fueron esterilizados después de ajustar la osmolaridad con sorbitol, esto se realizó por filtración en un aparato Millipore a través de papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45 µm de diámetro. Se preincubaron los ejes embrionarios (60mg tejido/mL) cortados en trozos muy pequeños en el medio básico (3 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Arginina, 10 mM Mes/KOH pH 5.5, BSA 0.5% y Sorbitol para ajustar a 850 mOsm), durante dos horas con agitación constante en una incubadora con agitación lateral a 100 rpm.

El tejido se retira del medio básico y se coloca en el medio de digestión que contiene, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Arginina, 10 mM Mes/KOH pH 5.5, BSA 0.5%, Polivinil pirrolidona 0.5%, Celulasa Onozuka RS 2.5%, Macerozyme 0.5% y Sorbitol para ajustar a 850 mOsm, se incubó por 15 horas a una temperatura de 25°C, con agitación constante 100 rpm.

Al concluir el tiempo de incubación el medio con el tejido se filtró a través de una malla de Nylon de 60 µm, los trozos de tejido se lavaron sobre la malla con medio básico ajustado a 850–900 mOsm, para arrastrar al filtrado los protoplastos que se encontraban atrapados en el tejido. El filtrado se centrifugó a 1000 rpm, en la centrifuga BECKMAN GS-6R Centrifuge, durante 5 o 7 minutos y se separaron cuidadosamente los protoplastos y se resuspendieron en Buffer de dilución que contenía HEPES/BTP 2 mM pH 7.8, Sorbitol 350mM y DTT 1mM.

Para comprobar que la formación de los protoplastos fue exitosa se observó en el microscopio una muestra del botón y se contaron el número de protoplastos por medio de un hemocitómetro. La cantidad de protoplastos que usualmente se encontraba en las diferentes preparaciones fue de  $9-15 \cdot 10^5$  protoplastos/mL y que tenían una apariencia redonda como se muestra en la Figura 7.

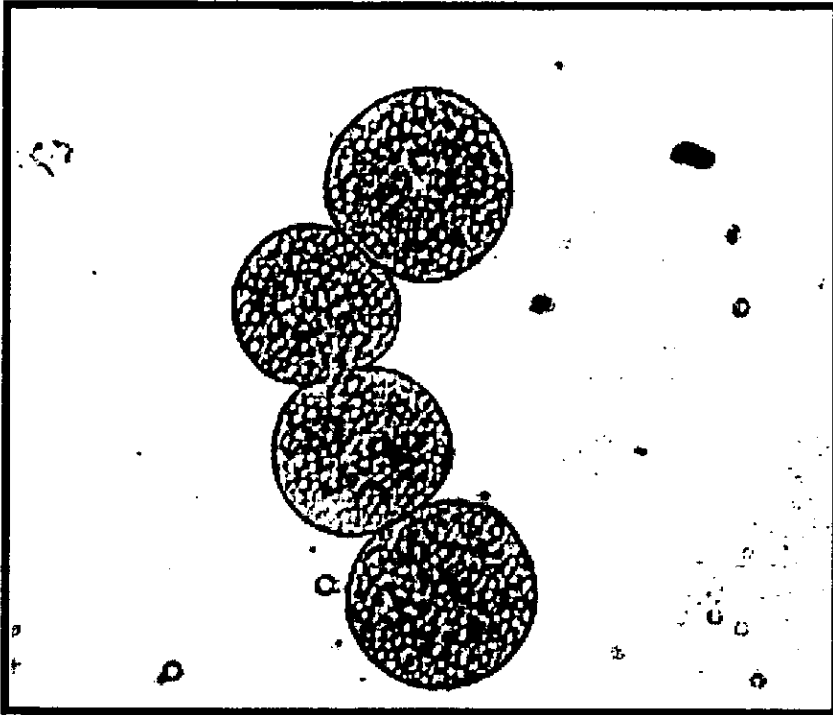


Figura 7. Protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 18 horas.

#### **4.8. Determinación de fosfatos**

Se siguió el procedimiento descrito por (González-Romo *et al.*, 1992). Toda la vidriería que se utilizó estaba libre de fosfatos. Para lograr esto el material después de lavado se colocó en ácido sulfúrico diluido 1:3 por dos días y posteriormente se enjuagó con agua desionizada.



La curva patrón de Pi se realizó de 0 a 100  $\eta$ mol ajustado a un volumen total de 150  $\mu$ L con agua destilada a la cual se le adicionaron 150  $\mu$ L de SDS al 24%, después se añadieron 300  $\mu$ L de una mezcla en relación 1:1 de las soluciones ácido ascórbico 12% en HCl 1N y molibdato de amonio 2% en HCl 1N, se incubaron de 3 a 8 minutos a temperatura ambiente y después se añadió 450  $\mu$ L de solución E (Citrato de sodio 2%, Metarsenito de sodio 2%, Ácido acético 2%). Se incubó 20 minutos a temperatura ambiente, transcurrido este tiempo, se midió la absorbencia a 850  $\eta$ m. La curva es lineal de 10 a 80  $\eta$ mol Pi.

#### **4.9. Determinación de la actividad de ATPasa por hidrólisis de ATP**

La hidrólisis de ATP se midió como liberación de Pi y los resultados se expresaron en  $\eta$ mol Pi  $\text{mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . El procedimiento realizado fue el siguiente, se utilizaron 150  $\mu$ L del medio de reacción de hidrólisis de ATP el cual contenía 250 mM Sacarosa, 20 mM MOPS/BTP pH 6.5, 10 mM ATP/BTP pH 6.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7  $\mu$ M CCCP y en algunos casos se adicionaron los inhibidores 0.5 mM Eritrocina, 0.3 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  (inhibidores específicos de la ATPasa de la membrana plasmática) y 2 mM  $\text{NaN}_3$  (inhibidor de la ATPasa mitocondrial). Se trabajaron las muestras por triplicado, realizando un control (sin inhibidores), otro con cada uno de los inhibidores y otro sin proteína (blanco). Después de la adición de reactivos se preincubaron los tubos 5 minutos a 30°C y posteriormente la reacción de hidrólisis de ATP se inició al añadir 20  $\mu$ g de proteína membranal, deteniéndose después de la incubación por 30 minutos a 30°C, con la adición de 150  $\mu$ L de SDS al 24%.

#### **4.10. Medición de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz**

Se siguió la metodología descrita por Buckhout (1989), utilizando un medio de transporte que contenía 2 mM HEPES/BTP ajustado a diferentes pH (7.8, 6.15, 5.5 y 4), 350 mM Sorbitol, 1 mM DTT, 24  $\mu$ L sacarosa-[ $^{14}\text{C}$ ] (0.0888 MBq, 2.4  $\mu$ Ci, NEN<sup>TM</sup> Life Science Products, actividad específica 401.0 mCi/ mmol), 0.1 a 10 mM de Sacarosa, 0, 1, 2 y 4  $\mu$ M Valinomicina (solución en etanol a una concentración de 0.50 mM). Al medio de transporte

se le añadieron 120  $\mu\text{L}$  de Protoplastos que se encontraban en buffer de dilución a una concentración de 1mg de proteína. La reacción se llevó a cabo a 10°C y se inició con la adición de la mezcla de sacarosa fría y marcada radioactivamente a las concentraciones indicadas en cada figura y, posteriormente, se fueron tomando 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior por diferentes tiempos (1, 2, 4, 6 y 8 minutos). La reacción se detuvo al filtrar el volumen de 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción con los protoplastos a través de un papel de nitrocelulosa con un diámetro del poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , lavando con 2.5 mL de buffer de lavado (2 mM HEPES/BTP ajustado a los siguientes pHs 7.8, 6.15, 5.5 y 4; 350 mM Sorbitol, 1 mM DTT y Sacarosa 1 mM). Posteriormente, se colocaron los filtros 30 minutos en horno a 120°C, se dejaron enfriar y se les agregó 5 mL de líquido de centelleo (2, 5 Difenil-oxazol 3 g, Etilenglicol 37 mL, Etanol absoluto 106 mL, Xilol 600 mL y Tritón 257 mL). Se leyeron las cuentas por minuto de cada muestra en un contador de centelleo Minaxi  $\beta$  Tri-Carb 4000 series Packard Liquid Scintillation Counter. Los blancos y controles realizados fueron amortiguador de dilución filtrado y sin filtrar; 5  $\mu\text{L}$  de sacarosa radioactiva filtrada y sin filtrar.

Los resultados se expresaron como pmol de sacarosa / mg de Proteína según la fórmula que se muestra. Para obtener la actividad específica del transportador se obtuvieron las pendientes de cada una de las gráficas de los cursos temporales.

$$\text{Actividad de transporte de sacarosa} = \frac{\text{CPM muestra} * \eta \text{ mol } 5 \mu\text{L Sacarosa marcada} * 1000}{\text{CPM } 5 \mu\text{L Sacarosa marcada}}$$

(pmol de sacarosa / mg de Proteína)

En donde los 5  $\mu\text{L}$  sacarosa marcada que daban 1'227,463 CPM que son las que se utilizaron como control para obtener las  $\eta\text{mol}$  de sacarosa de la muestra.

#### 4.11. Separación de proteínas por electroforesis en poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

El procedimiento de electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS que se siguió fue el de Shäger y Von Jagow (1987). Para ello se prepararon los geles separador y concentrador según se indica en la Tabla 3, el gel obtenido tenía un grosor de 0.75 mm. Se tomaron 25  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción microsomal de ejes embrionarios de maíz y se mezclaron 1:1 con

el amortiguador de muestra (SDS 10%,  $\beta$ - mercaptoetanol 15%, Urea 8 M, Trizma base 0.5%, azul de bromofenol 0.01%). Se aplicaron al gel concentrador las muestras de proteínas a separar y en un pozo se cargaron 7 $\mu$ L de estándares de peso molecular preteñidos (Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Cat. No. 10748-010 GIBCO BRL).

Tabla 3. Preparación de un minigel (con 0.75 mm de grosor) según la técnica de Shäger y Von-Jagow (1987). Los componentes del gel se añadieron en el siguiente orden:

SOLUCIONES	SEPARADOR (10%)	CONCENTRADOR
Acrilamida- Bisacrilamida (30%-0.8%)	1.114 mL	224.6 $\mu$ l
Amortiguador del gel ( 3M Tris, SDS 0.3%, 1N HCl)	1.114 mL	421.1 $\mu$ l
Glicerol	445 $\mu$ l	—
Agua	668 $\mu$ l	1038.8 $\mu$ l
Persulfato de amonio 10%*	11.14 $\mu$ l	14.03 $\mu$ l
TEMED*	1.11 $\mu$ l	1.4 $\mu$ l
Volumen total	3354.4 $\mu$ l	1700 $\mu$ l

\*Añadir al último, son los agentes polimerizantes

Los estándares de peso molecular presentaron el patrón de corrimiento como el que se muestra en la Figura 8, a partir de ellos se calculó el peso molecular de las bandas reveladas con el anticuerpo.

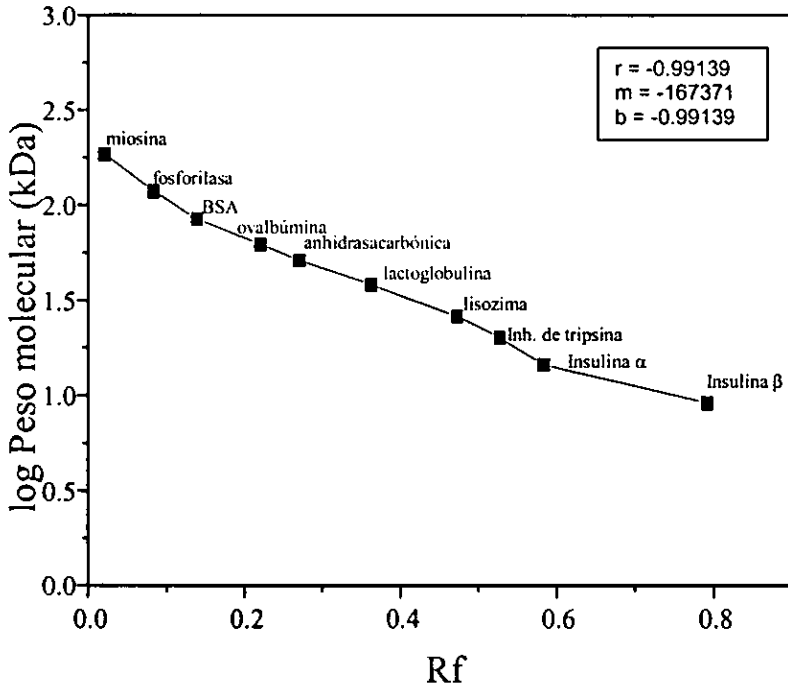


Figura 8. Curva de separación de estándares de peso molecular en un gel de Shäger y Von-Jagow al 10%. Los datos se expresaron en log del peso molecular y Rf. Los estándares eran las siguientes proteínas: Miosina (cadena H) 200 kDa, Fosforilasa b 97.4 kDa, BSA 68 kDa, Ovalbúmina 43 kDa, Anhidrasacarbónica 29 kDa, β- Lactoglobulina 18.4 kDa, Lisozima 14.3 kDa, Inhibidor de tripsina bovina 6.2 kDa, Insulina β 3.4 kDa e Insulina α 2.3 kDa.

#### 4.11.1. Tinción del gel con azul de Coomassie

Una vez terminada la electroforesis, se separaron las placas de vidrio y se removió cuidadosamente el gel y se sumergió en la solución de tinción de proteínas [1500 mL

Metanol, 1500 mL agua desionizada, 300 mL Ácido acético, 6 g Azul brillante R de Coomassie (Sigma B-0630)]. Para disminuir el color del fondo del gel se sumergió el gel en la solución desteñidora (1500 mL Etanol, 1500 mL H<sub>2</sub>O, 300 mL Ácido acético), agitando suavemente, al tomar la coloración deseada se almacena en una solución de ácido acético al 10% hasta que el gel sea secado o fotografiado.

### **4.12. Electrotransferencia de proteínas a papel de nitrocelulosa**

Manipular siempre el gel de PAGE-SDS y la nitrocelulosa con guantes. Remover el gel de las placas de vidrio, cortándole al gel una esquina para usarla como referencia. El gel se lavó por 10 minutos en amortiguador de transferencia (25mM Trizma base, 192 mM Glicina, 20% Metanol, 0.1% SDS) con agitación constante. Para la transferencia se utilizó una cámara húmeda TE Series Transphor Electroforesis Unit HSI HOEFER.

Se abrieron las rejillas sujetadoras del gel, colocando sobre de ella una capa de esponja saturada con amortiguador de transferencia. Después se colocaron dos cuadros de papel filtro empapados en amortiguador de transferencia, de tamaño igual al de la esponja y la rejilla. Encima del papel filtro se colocó el gel y después se colocó cuidadosamente una hoja de papel de nitrocelulosa humedecida en amortiguador de transferencia de un tamaño correspondiente al del gel. Al final la nitrocelulosa fue cubierta con dos hojas de papel filtro humedecidas. Se suprimieron las burbujas de aire que pudieran quedar entre las capas de gel y papel (rodando un tubo de ensayo sobre la superficie del papel). Se añadió la segunda esponja saturada con buffer de transferencia y luego se colocó la segunda rejilla y se cerró el cassette.

Se realizó la transferencia de las proteínas al gel de nitrocelulosa a 240 mA por 2 horas. Después de transcurrido el tiempo de transferencia, el papel de nitrocelulosa se removió del cassette y se sumergió en solución de TBS (20mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl), y se agitó suavemente por 10 minutos en el agitador lateral HOEFER Red Rotor.

Para comprobar la transferencia de las proteínas al papel de nitrocelulosa, en algunos casos se realizó la tinción de las proteínas, sumergiendo el papel en una solución de rojo de Ponceau S al 0.1% en ácido acético al 5% por 5 minutos y después se lavaba con agua para eliminar el colorante y se continuaba con el procedimiento de bloqueo.

Para detectar al transportador de sacarosa en el papel de nitrocelulosa se sumergió el papel de nitrocelulosa en solución bloqueadora (3% leche en TBS) y se mantuvo en agitación por 30 minutos a 37°C. Después se removió la solución bloqueadora y se cambió por solución de TTBS (TBS suplementado con 0.5% Tween- 20). Se realizaron dos lavados más con TTBS durante 5 minutos cada vez. Después de remover el TTBS, se añadieron 10 mL del TBS con el primer anticuerpo en diluciones 1:250, 1:300, 1:500, 1:1000, 1:2000 y 1:3000 del suero de los conejos. Para la detección de la proteína a lo largo de la germinación se utilizó el anticuerpo a una dilución 1:2000. Se dejó incubando con el primer anticuerpo toda la noche.

Después de transcurrido el tiempo de incubación se lavó el papel de nitrocelulosa 2 veces con TTBS y una vez con TBS 5 minutos cada vez y con agitación suave. Por último se añadió el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1:1000 en TBS, se incubó por 5 horas a temperatura ambiente con agitación lateral suave y constante. La réplica se lavó 2 veces con TTBS y al final una vez con TBS, cada lavado de 5 minutos. De aquí, la réplica estuvo lista para ser revelada según el 2º anticuerpo.

#### **4.13. Procedimiento para revelado de fosfatasa alcalina.**

Se decantó el TBS y se añadió la solución para desarrollar color la cual contenía 1 mL de 0.15% de 5-Bromo-4-cloro-3 indolilfosfato disuelta en 100% dimetilformamida, 1 mL de 0.3% Nitroazul de tetrazolio en 70% de dimetilformamida y 100 mL de amortiguador de carbonatos 0.1 M y pH 9.8. Las bandas se hicieron visibles entre los primeros cinco minutos. La reacción se detuvo al sumergir la réplica en H<sub>2</sub>O, posteriormente se lavó dos veces con agua y se colocó entre dos papeles filtro Watman y se almacenaron.

**4.14. Obtención del anticuerpo contra el transportador de sacarosa de membrana plasmática de maíz**

**4.14.1. Diseño de la secuencia**

La secuencia de nucleótidos del cDNA del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz recientemente reportada (Aoki *et al.*, 1999), permitió deducir a partir de ella la secuencia de aminoácidos para el transportador. Ésta secuencia fue colocada en el programa PC-GENE y se determinó cual era la secuencia apropiada para producir una respuesta inmune contra el transportador de sacarosa. El programa PC-GENE encontró tres secuencias probablemente antigénicas según se muestra en la Figura 9. El péptido que se escogió fue **WGRRR** (secuencia No. 1) debido a que es una secuencia altamente conservada en las 12 secuencias que se conocen de transportadores sacarosa/H<sup>+</sup> en diferentes especies (Lemoine, 2000).

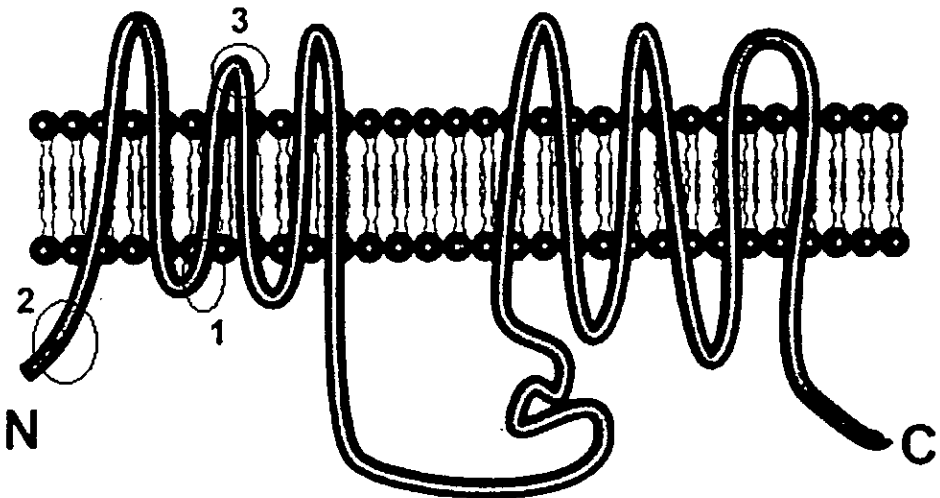


Figura 9. Esquema del transportador de sacarosa, mostrando las secuencias antigénicas. La secuencia marcada con 1 es WGRRR, la 2 es ARGDGE y la 3 es GDTKEH.

Con el fin de obtener una mejor respuesta inmune se escogieron varios aminoácidos antes y después de esta secuencia peptídica, presentes sólo en el transportador de maíz, además se utilizó la cisteína presente de manera natural en la proteína para conjugarla con hemocianina.

La síntesis del péptido y la haptización con hemocianina (Figura 10) se solicitó a la compañía Quality Biochemicals, en Maryland, E.U.A. El procedimiento como se muestra en la figura 10 incluyó: a) la síntesis del péptido, b) la unión al tiol de la cisteína con MBS (m-maleimidobenzoil- N- hidroxisuccinato éster) y c) la conjugación con la hemocianina (Keyhole limpet hemocyanin, KLH).



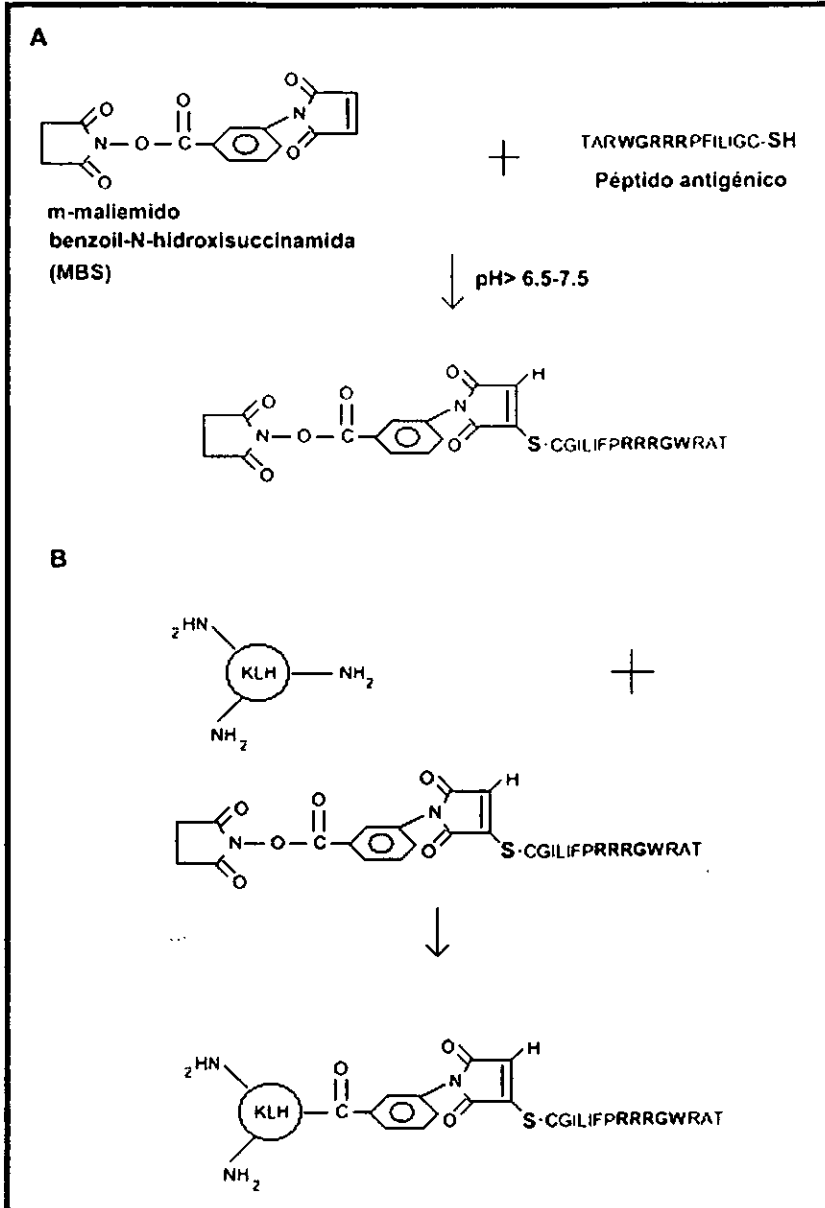


Figura 10. Haptenización del péptido antigénico a hemocianina. A. Reacción de la cisteína del péptido con MBS. B. Reacción entre la región hidroxisuccinamida con los grupos amino de la hemocianina (KLH).

### 4.14.2. Obtención del suero inmune y titulación del anticuerpo

El esquema de inmunización que se siguió fue el reportado por González-Halphen *et al* (1988). Se utilizaron dos conejos (hembra y macho) y el procedimiento fue el siguiente:

Se mezclaron 100  $\mu\text{g}$  de proteína con 1 a 1.5 mL de Adyuvante Completo de Freund, se agitaron en vortex VWR Scientific-2 GENIE y después se mantuvieron 1 hora con agitación constante en agitador orbital Eppendorf Mixer 5432, por último se agitó nuevamente en el vortex. Esta mezcla se inyectó de manera intramuscular a los conejos.

A las tres semanas se inyectaron por vía intramuscular 50  $\mu\text{g}$  de proteína disueltos en 1 mL de adyuvante incompleto de Freund (primer refuerzo). Este paso se repitió dos veces más y a los dos días después del tercer refuerzo se realizó la sangría de prueba. La sangre colectada se dejó coagular y el suero obtenido al centrifugar a 15000 rpm por 20 minutos fue utilizado para la titulación del anticuerpo por la técnica de inmunorréplica, para ello se separaron las proteínas de la fracción microsomal de ejes de maíz de 24 horas de imbibición, en geles de PAGE-SDS.

Se determinó que la dilución óptima del anticuerpo en los dos sueros obtenidos era 1:2000, después de esto se realizó la sangría a blanco de los dos conejos.

### 4.14.3. Obtención de los perfiles densitométricos de las Inmunorréplicas

Se hicieron las densitometrías de las bandas de proteínas reveladas con el anticuerpo contra el transportador sacarosa/ $\text{H}^+$ , utilizando el densitómetro LKB Bromma UltraScan XL Enhanced Densitometer.

El papel de nitrocelulosa se colocó en el aparato de lectura, el densitómetro registra las bandas de proteína, indicando la densidad de las bandas como pixeles. De esta forma se conoce de manera aproximada la cantidad de proteína presente en cada banda. La cantidad de proteína encontrada se reportó en unidades relativas.

## **5. RESULTADOS**

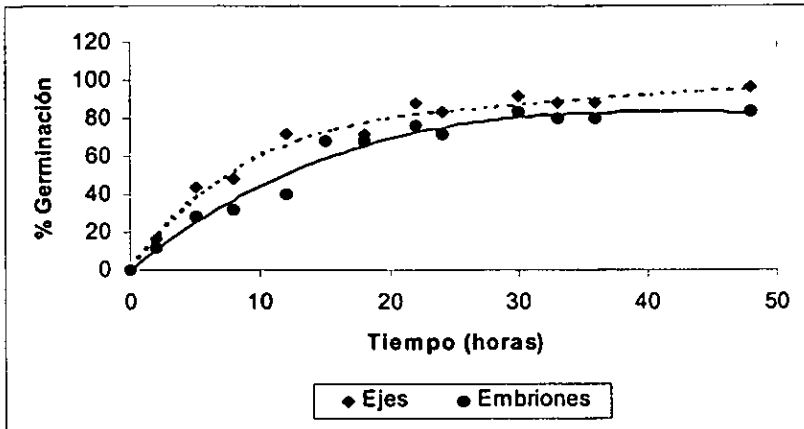
### **5.1. Determinación del porcentaje de germinación y determinación de la acumulación de agua en ejes y embriones de maíz.**

Con el propósito de determinar los tiempos óptimos para la medición de la actividad del transportador de sacarosa, se midió el porcentaje de germinación y toma de agua de embriones y ejes embebidos desde 0 hasta 48 horas.

Se midieron simultáneamente el porcentaje de germinación de embriones y ejes de maíz para comprobar que al realizar la extracción de los ejes embrionarios, no se dañara su capacidad para germinar. Se encontró que la germinación tanto en ejes como en embriones alcanza un máximo del 96% y 84% respectivamente (Figura 11A ), lo que nos indica que tanto el eje como el embrión siguen viables aún después de haber sido removidos de la semilla.

Las curvas de toma de agua tanto para ejes como para embriones presentaron un comportamiento sigmoideal (Figura 11B), en el que se pueden apreciar las tres fases de toma de agua características de la germinación (Bewley y Black, 1986). La fase I corresponde al período entre las 0 y 5 horas de germinación en donde se observa un incremento rápido de agua, el cual se sabe ocurre principalmente por la hidratación de los componentes celulares. La fase II en este cultivar comenzó a las 5 horas y concluyó a las 30 horas, esta fase antecede a la división celular y es la fase en la que hay un incremento importante en la actividad metabólica del embrión, ya que se sintetizan proteínas, carbohidratos, lípidos, DNA y RNA, para sustentar el crecimiento y la formación de nuevas células. La fase final o III de la germinación comenzó a las 30 horas, misma en la que se observa un incremento en peso húmedo que se debe principalmente a la aparición de nuevos tejidos.

A



B

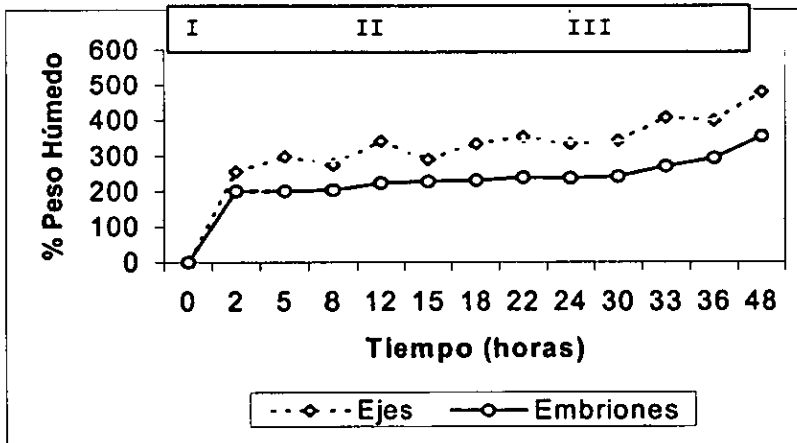


Figura 11. Curvas de germinación (A) y toma de agua (B) de ejes embrionarios y embriones de maíz. Los embriones y ejes fueron embebidos según lo descrito en Materiales y Métodos. Los valores son el promedio de 2 experimentos independientes con 20 embriones o ejes por caja. Los  $\blacklozenge, \bullet$  corresponden a los datos de germinación y los  $\circ, \circ$  a los datos de toma de agua. Los números romanos I, II y III indican las tres fases características de toma de agua.

Aunque el porcentaje de toma de agua de los ejes embrionarios es mayor que en embriones, esto probablemente se deba a que el tejido embrionario está cubierto por el escutelo, el cual absorbe agua impidiendo así la toma directa de agua a las células del eje, así como puede ser también por la presencia de agua en el escutelo, por lo que estos últimos necesitan menos tiempo para la captación de agua y por lo tanto para su germinación.

Con los resultados de las figuras 11 A y B se decidió escoger los tiempos de 8, 24, 30, 36, 50 y 72 horas, con el fin de tener puntos en las fases más activas de la germinación y aún en tiempos posteriores a la elongación de la radícula, en los que se detectaría y mediría la actividad del transportador de sacarosa/ $H^+$ .

### **5.2. Caracterización de la actividad de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos**

Con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de ensayo de la actividad del simportador sacarosa/ $H^+$  en los protoplastos de ejes embrionarios de maíz, se realizaron unas curvas de toma de [ $^{14}C$ ] sacarosa a diferentes tiempos de incubación en un medio de ensayo que contenía 0.1 mM Sacarosa y en presencia o ausencia de diferentes compuestos que pondrían en evidencia su dependencia del  $\Delta pH$  y/o del  $\Delta \Psi$ .

Se detectó la actividad de transporte de sacarosa en los protoplastos de ejes embrionarios de maíz, la cual aumentó de forma lineal conforme avanzó el tiempo de incubación (Figura 12). La disminución de la actividad de transporte después de la adición de 10  $\mu M$  del protonóforo CCCP, demuestra que la acumulación de sacarosa es sensible a cambios en el gradiente de protones. Dato que concuerda con el efecto del ionóforo como el CCCP en la actividad del simportador sacarosa/ $H^+$  reportada en otros trabajos (Bush y Langston, 1988).

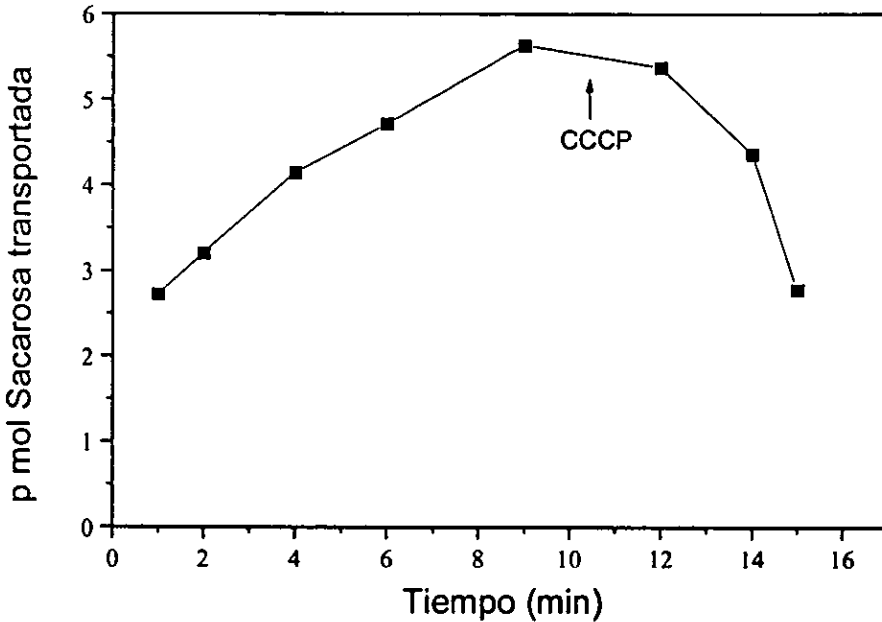


Figura 12. Curso temporal del transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 24 horas. Se observa el efecto de  $10 \mu\text{M}$  CCCP y Buffer de dilución a pH 6.15 en la actividad de transporte de sacarosa.

### 5.2.1. Sensibilidad del transporte de sacarosa a cambios en el pH extracelular

Se ha demostrado que el transporte de sacarosa es sensible a cambios en el pH extracelular (Bush, 1990 y Buckhout, 1994) y como se observó en la Figura 12, en los protoplastos de ejes embrionarios de maíz hay una disminución en la toma de sacarosa por efecto del CCCP, por lo que es probable que la entrada de sacarosa al protoplasto aumente al incrementar la diferencia de pH entre el amortiguador de ensayo y el interior del protoplasto (Figura 13). Con el objeto de probar lo anterior, se adicionaron  $200 \mu\text{L}$  de

protoplastos equilibrados a pH 7.8 a un medio de ensayo que contenía el amortiguador de dilución ajustado a diferentes pHs 4.0, 5.5, 6.15 ó 7.8.

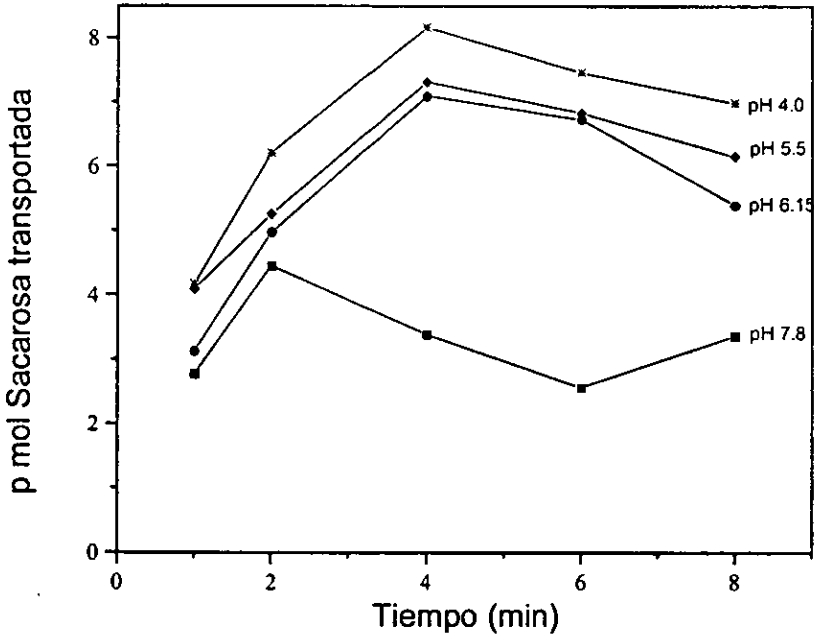


Figura 13. Dependencia de la actividad de transporte de sacarosa de los protoplastos de ejes embrionarios de maíz, al pH del medio de ensayo. El medio de ensayo de transporte de sacarosa contenía 0.1mM Sacarosa, 2  $\mu$ M Valinomicina, 0.4  $\mu$ Ci [ $^{14}$ C- Sacarosa] y a los pHs indicados en la figura con 2 mM de HEPES/BTP . Estos resultados son el promedio de 3 repeticiones diferentes.

Los resultados demuestran que la disminución del pH del medio de ensayo produce un incremento en el transporte de sacarosa máximo en protoplastos de ejes embrionarios de maíz y este aumento fue casi de un 100% a un pH de 4.0 comparado con el de 7.8. Se decidió que en los subsecuentes experimentos el pH del medio fuera de 6.15 ya que no hubo

una diferencia importante entre las curvas de actividad de transporte entre los pH 6.15, 5.5 y 4.0.

### **5.2.2. Efecto de Valinomicina y $K^+$ en el transporte de sacarosa**

Cuando se produce una diferencia de pH a través de la membrana, también se crea una diferencia de carga eléctrica, para eliminar la probable contribución del  $\Delta\Psi$  al transporte de sacarosa observado, se adicionó al medio de transporte un ionóforo, la Valinomicina, compuesto que transporta de manera específica  $K^+$  y lo hace a favor del potencial generado por su gradiente electroquímico (Nicholls y Ferguson, 1997).

Si el transporte de sacarosa solo depende del  $\Delta pH$  al eliminar el  $\Delta\Psi$  (que se produjo al inducir la diferencia de pH) se predice un aumento en la actividad del simportador sacarosa/ $H^+$  ya que de manera constante podrán entrar los protones y el transporte de sacarosa no se detendrá. Como se observa en la Figura 14, cuando se añade Valinomicina a una concentración de 4  $\mu M$  al medio de ensayo, pero sin adicionar  $K^+$ , se presenta un incremento de 1.3 veces de la actividad de transporte de sacarosa con respecto al control. Mientras que la adición de  $K^+$  produce un incremento de 3 veces con respecto al control sin Valinomicina desde la concentración de 2  $\mu M$  Valinomicina. Es probable que la concentración de  $K^+$  que los protoplastos tienen no sea suficiente para colapsar el  $\Delta\Psi$  dependiente de Valinomicina, por lo que la adición exógena de  $K^+$  facilita la movilización de  $K^+$  de los compartimentos intracelulares, produciendo probablemente la disminución o pérdida del  $\Delta\Psi$  y por tanto se observa un incremento en el transporte de sacarosa.

Los resultados indican que la actividad de transporte de sacarosa en los protoplastos de ejes embrionarios depende directamente del  $\Delta pH$  e inversamente del  $\Delta\Psi$ , por lo que al abatir el  $\Delta\Psi$  aumenta el transporte de sacarosa.



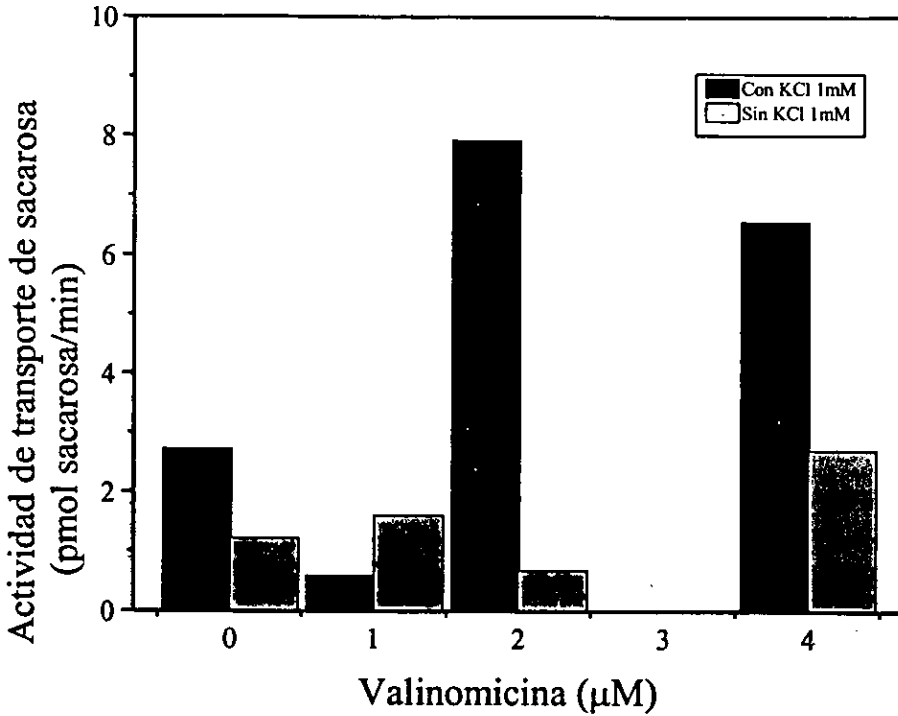


Figura 14. Efecto de la Valinomicina y el potasio sobre la actividad de transporte de sacarosa en protoplastos de ejes embrionarios de maíz. El medio de ensayo contenía 2 mM HEPES/BTP pH 6.15, 2.8  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Sacarosa, 0.1 mM Sacarosa y las concentraciones indicadas de Valinomicina y  $\text{K}^+$ . Se añadieron 140  $\mu\text{L}$  de protoplastos y la reacción se dejó transcurrir por 4 minutos a  $10^\circ\text{C}$ , se detuvo la reacción al filtrar el medio en papel de nitrocelulosa.

En adelante se decidió realizar la determinación de la actividad de transporte de sacarosa adicionando 2  $\mu\text{M}$  Valinomicina y 1mM  $\text{K}^+$ .

### **5.2.3. Efecto de dos inhibidores del transporte de sacarosa, sobre la actividad de transporte de sacarosa de protoplastos de ejes embrionarios**

Se conoce que el transporte de sacarosa dependiente de  $\Delta pH$  es virtualmente inhibido por la modificación covalente con PCMBS y DEPC (Bush, 1993). Estos inhibidores, reaccionan con los residuos de histidina y cisteína del transportador sacarosa/ $H^+$  porque forman enlaces covalentes con la proteína (Bush, 1993).

Con el objetivo de comprobar que la toma de sacarosa dependiente del  $\Delta pH$  se debe a un simportador sacarosa/ $H^+$ , se incubaron protoplastos de ejes embrionarios de maíz a diferentes concentraciones de PCMBS y DEPC (Figura 15).

Se encontró que tanto PCMBS como DEPC inhiben el transporte en un 77.9 y 82.9%, respectivamente. A 500  $\mu M$  de PCMBS se tiene aproximadamente la inhibición del 50% de actividad, valor similar al encontrado en hojas de remolacha  $I_{50}$  350  $\mu M$  (Bush, 1993).

En cuanto al DEPC se logró la mayor inhibición del transporte de sacarosa a 1 mM que está alejado del valor de  $I_{50}$  reportado. Sin embargo es probable que esta diferencia se deba a las concentraciones de sacarosa utilizadas, ya que en betabel se utilizó 0.1 mM de sacarosa en el medio de ensayo y nosotros usamos 3 y 5 mM de sacarosa (Figura 15).

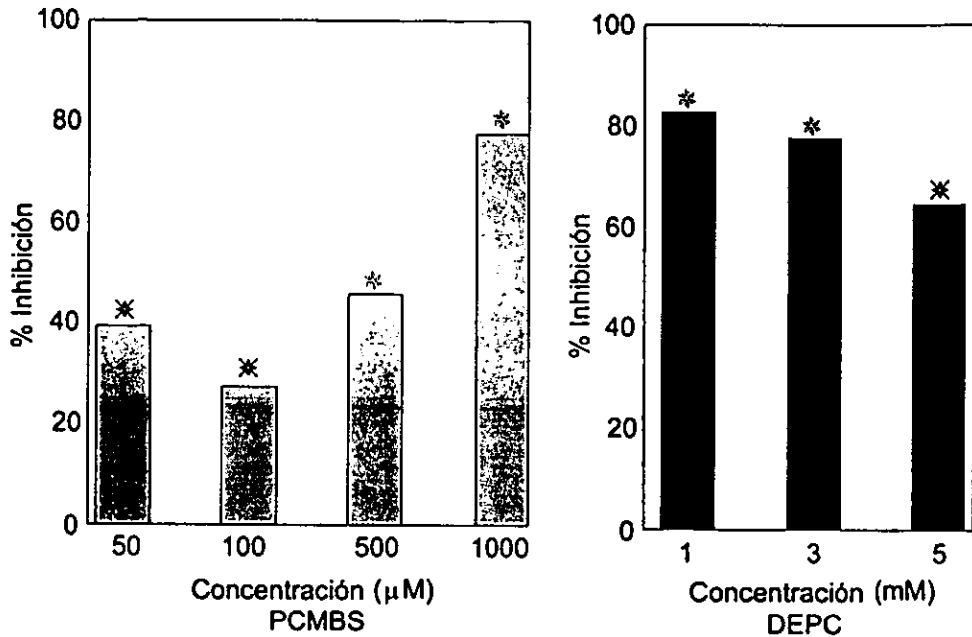


Figura 15. Efecto de diferentes concentraciones de PCMBs y DEPC en la actividad de transporte de sacarosa. El medio de ensayo contenía 2 mM HEPES/BTP pH 6.15, 2.8  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Sacarosa, 3 a 5 mM Sacarosa, 2  $\mu\text{M}$  Valinomicina, 1m KCl y las concentraciones indicadas de PCMBs y DEPC. La actividad del control fue de 7.9 pmolessac  $\text{min}^{-1}200\mu\text{l}$  protoplastos $^{-1}$ . Los resultados marcados con \* se realizaron a 5mM de sacarosa y con \* a 3 mM de sacarosa.

Los resultados hasta aquí presentados apoyan que el transporte de sacarosa se debe al simportador sacarosa/ $\text{H}^+$  localizado en las membranas plasmáticas de los ejes embrionarios de maíz.

#### **5.2.4. Obtención de los parámetros cinéticos para el simportador**

Con el objeto de comparar y determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{max}$  del transporte de sacarosa dependiente del pH, se midió la actividad de transporte de sacarosa a diferentes concentraciones de sacarosa desde 0.1 hasta 10 mM, realizándose para cada concentración una curva de tiempo de 0 a 8 minutos. Las pendientes de cada una de las curvas corresponden a la actividad del simportador dado en picomoles de sacarosa  $\text{min}^{-1}$   $200\mu\text{L}$  de protoplastos<sup>-1</sup>. La curva de velocidad de transporte de sacarosa mostró un comportamiento Michaeliano (Figura 16). La  $V_{max}$  y la  $K_m$  se determinaron con el ajuste de los datos experimentales a una hipérbola cuadrática, ecuación disponible en el programa Micro Cal Origin versión 3.0.

La  $V_{max}$  obtenida de la curva en la Figura 16 fue de  $0.834 \text{ pmol sacarosa min}^{-1} 200 \mu\text{L}$  protoplastos<sup>-1</sup> y la  $K_m$  fue de 1.5 mM. El valor de  $K_m$  obtenido es similar a los reportados por otros autores, para tejidos de alta demanda o producción de carbohidratos  $K_m = 0.3\text{-}1.5 \text{ mM}$  (Tabla 1 en la Introducción).

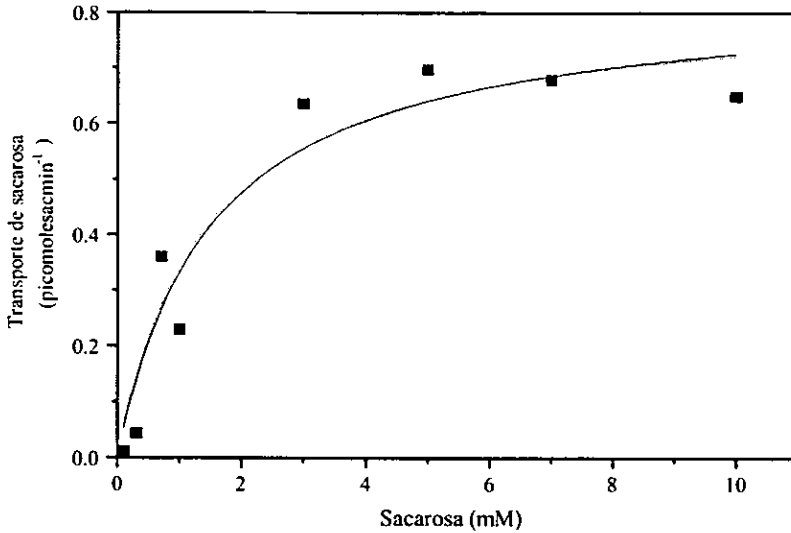


Figura 16. Cinética de actividad del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en protoplastos de ejes embrionarios de maíz embebidos 24h. Cada uno de los puntos experimentales corresponden a la pendiente de 6 puntos del curso temporal de toma de sacarosa por los protoplastos de ejes embrionarios, en las condiciones descritas en la Figura 15. Los datos obtenidos son el promedio de 4 preparaciones de protoplastos diferentes.

### 5.3. Transporte de sacarosa y actividad de la ATPasa de protones a lo largo de la germinación

Para poder medir el transporte de sacarosa a lo largo del período de germinación de ejes de maíz se obtuvieron protoplastos de ejes embrionarios embebidos 8, 24, 30, 36, 50 y 72 horas. Tomando en cuenta que la Km para el transportador es de 1.5 mM, se midió la actividad del transportador a 3 mM de sacarosa (Figura 17).

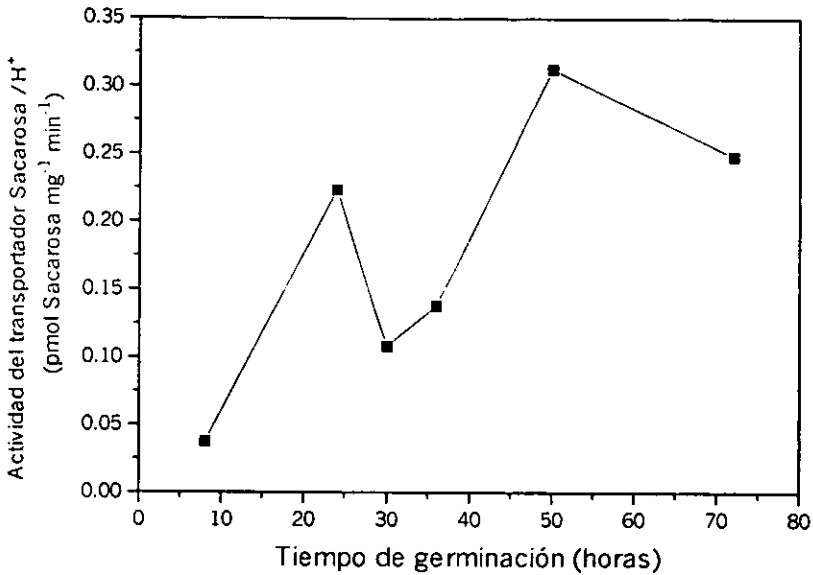


Figura 17. Cinética de la actividad del transportador de sacarosa a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz. Cada uno de los puntos experimentales representa la pendiente de una curva de actividad con respecto al tiempo a 3 mM sacarosa, similar a la que se muestra en la figura 16. Las curvas temporales de actividad de transporte se realizaron en 2 preparaciones de protoplastos diferentes. En un medio de ensayo que contuvo: 2.4  $\mu\text{Ci}$  [ $^{14}\text{C}$ ]-Sacarosa, amortiguador de dilución pH 6.15, 2  $\mu\text{M}$  Valinomicina.

A las ocho horas de germinación de los ejes embrionarios, los protoplastos obtenidos muestran una actividad de transporte muy baja (0.037 pmolsac/mg/min). Sin embargo aumenta 6 veces a las 24 horas de germinación para posteriormente disminuir a las 30 horas, después de este tiempo se observa un incremento gradual de la actividad de transporte de los protoplastos para disminuir ligeramente a las 72 horas.

El transporte de sacarosa a través de la membrana plasmática se energiza por un simporte con  $H^+$  provenientes de la ATPasa de  $H^+$  de la membrana plasmática. (Zhou 1997), estas observaciones sugieren que esta enzima está involucrada en el proceso de germinación de la semilla, ya que la diferencia de potencial eléctrico y de pH en la membrana sería utilizado para el transporte de sacarosa por las células embrionarias.

La disminución de la actividad de transporte de sacarosa a los diferentes tiempos de germinación se explica por una disminución en la actividad de bombeo de protones por la bomba primaria, localizada en la membrana plasmática. Resultados previos (Sánchez-Nieto *et al.*, 1998) demostraron la existencia de la ATPasa en embriones de maíz germinados a tiempos cortos (0 a 5 horas), sin embargo, se hizo necesario determinar en este trabajo la actividad de la ATPasa en los ejes embrionarios de maíz a los tiempos en los cuales se midió la actividad de transporte de sacarosa.

La medición de la actividad de ATPasa se realizó en la fracción microsomal de ejes embrionarios embebidos diferentes tiempos, en un ensayo en el que se detecta la liberación de fosfato inorgánico como uno de los productos de su actividad. La actividad de ATPasa en las fracciones microsomales mostró un incremento constante y lineal entre las 8 y 72 horas de la germinación de los ejes embrionarios. Actividad que se postula induce la toma de sacarosa en contra del potencial impuesto por su gradiente de concentración.

Lo anterior no explica la disminución en la actividad que el simportador presenta a las 30 horas por lo que se hizo necesario medir los niveles de proteína a lo largo de la germinación y compararlos con los de la actividad de transporte.

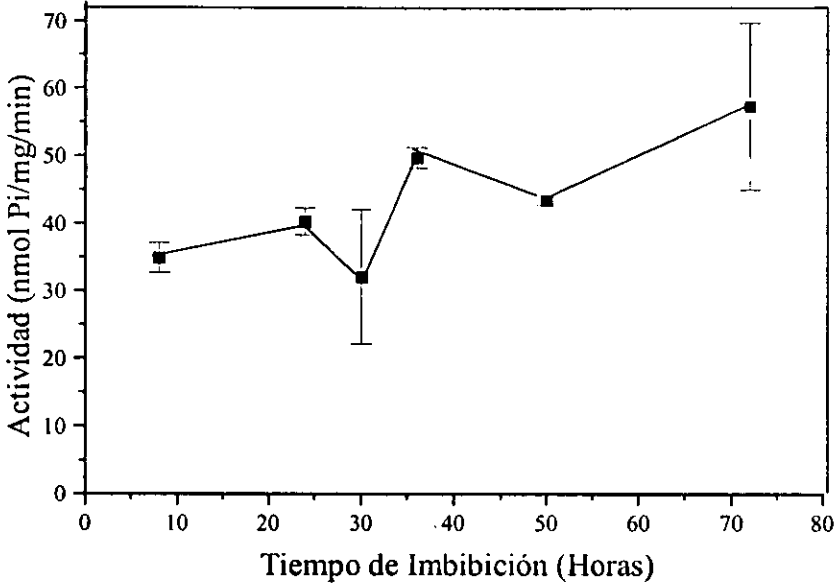


Figura 18. Perfil de la actividad específica de la ATPasa de membrana plasmática en microsomas obtenidos de ejes embrionarios de maíz. Cada punto es el resultado del promedio de dos ensayos de preparaciones microsomales diferentes.

#### 5.4. Patrón de expresión del cotransportador Sacarosa/H<sup>+</sup> durante la germinación

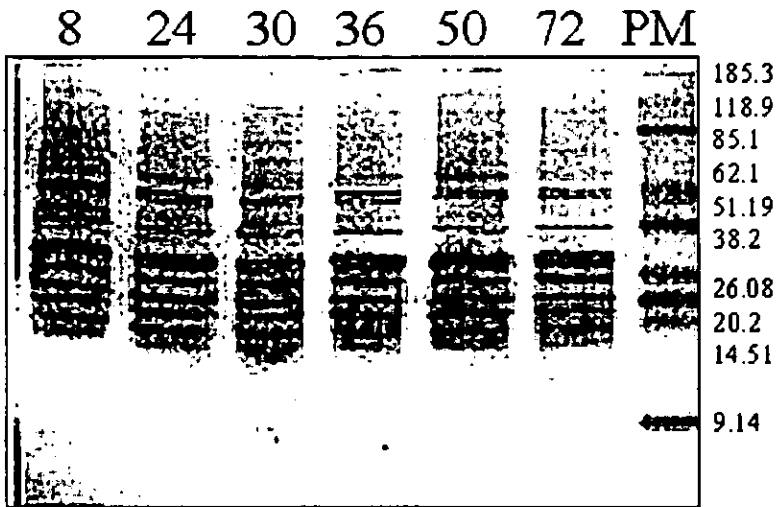
Para la detección del simportador se utilizó la fracción microsomal de ejes embrionarios de maíz germinados a diferentes tiempos y se obtuvo y utilizó un anticuerpo específico contra el simportador de maíz según se describió en la sección de materiales y métodos.



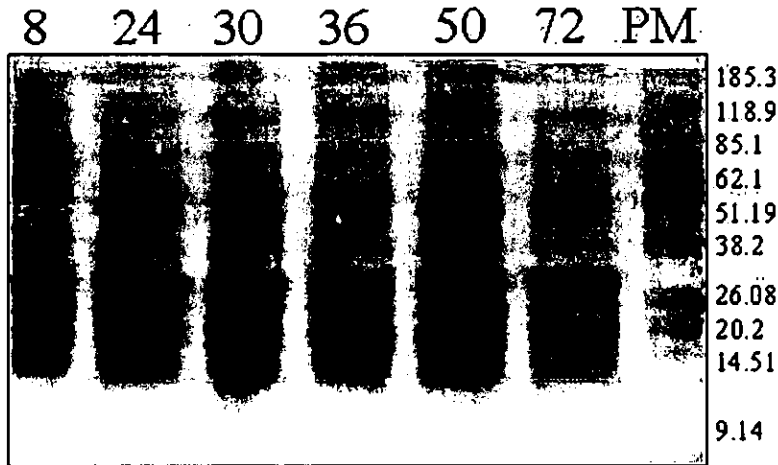
En la Figura 19A se muestra el patrón de bandas de proteínas de la fracción microsomal de ejes embrionarios embebidos 8, 24, 30, 36, 50 y 72 horas, en un gel de PAGE-SDS teñido con azul de Coomasie y en la Figura 19B se muestra el patrón de bandas de proteína después de la transferencia a papel de nitrocelulosa, las proteínas se tiñeron con rojo de Ponceau. Ambos son los controles de que la cantidad de proteína aplicada en cada carril es similar.

Dos fueron las proteínas detectadas con el anticuerpo contra el transportador (Figura19C) una de aproximadamente 20 kDa y otra de aproximadamente 64 kDa. De acuerdo a la secuencia genómica, se esperaba una banda de 55.2 kDa que podría corresponder con la banda de 64 kDa observada. La banda de 20 kDa no parece ser producto de proteólisis, ya que aparece de manera consistente aún cuando se aumentó la concentración de los inhibidores de proteasas. Buscando en la base de datos del Genebank y de la recién obtenida secuencia genómica de *Arabidopsis thaliana* (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/atgenome/genome.shtml>) se encontró que las únicas proteínas que presentan la secuencia que fue usada para producir el anticuerpo contra el transportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz son los transportadores de azúcares en *Hordeum vulgare* y *Oriza sativa*. Por lo que por este medio no obtuvimos información que nos ayudara a identificar a la proteína de 20 kDa.

A



B



C

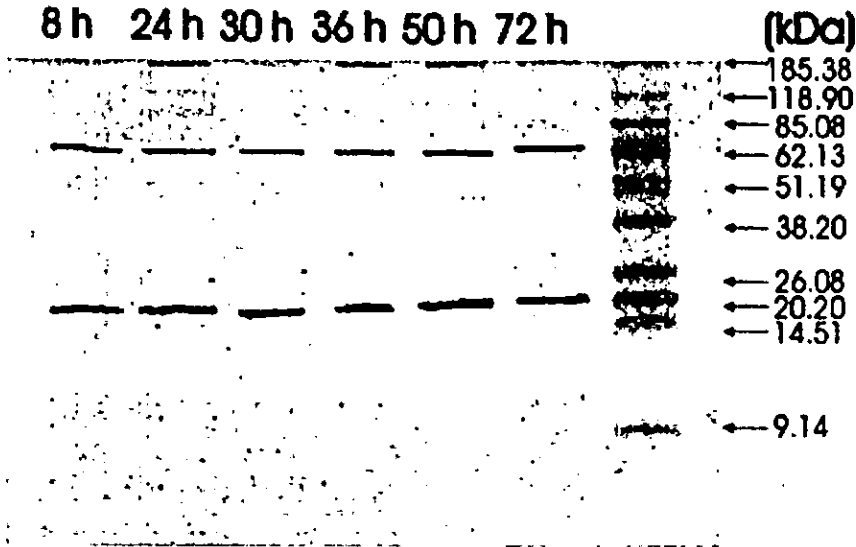


Figura 19. Detección del simportador sacarosa/ $H^+$  a lo largo de la germinación. Se corrieron 20  $\mu$ g de proteína microsomal en un gel de PAGE-SDS, en A) se muestran las proteínas teñidas en el gel con azul de Coomassie; en B) Después de la transferencia de las proteínas del gel al papel de nitrocelulosa, se detectaron las proteínas con rojo de Ponceau y en C) se muestra la reacción del anticuerpo con las bandas de proteína de la fracción microsomal de ejes embrionarios de maíz.

En la Figura 20 se muestran solo los valores de la densitometría de la banda de 64 kDa.

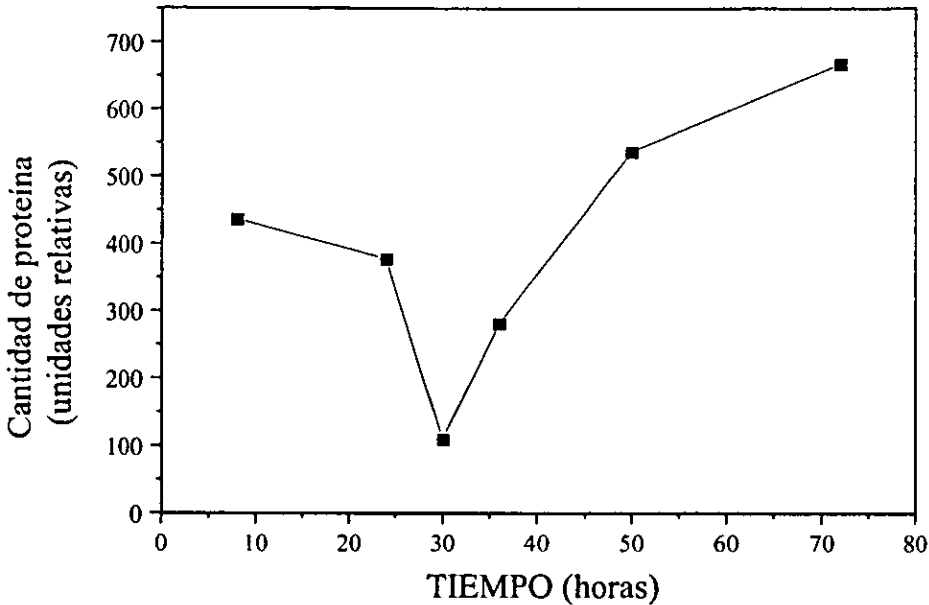


Figura 20. Niveles de proteína (simportador sacarosa/ $H^+$ ) durante la germinación de ejes embrionarios de maíz. Los valores de cantidad de proteína fueron obtenidos de la densitometría de la banda de 64 kDa detectadas con el anticuerpo específico contra el transportador de la Figura 19C.

Como se muestra en la Figura 20, el transportador de sacarosa está presente en cantidades similares a las 8 y 24 horas de germinación, mientras que a las 30 horas hay una disminución de 4 veces en la cantidad de proteína, para después aumentar de las 40 hasta las 72 horas de manera constante y a un nivel superior que al encontrado a las 8 horas.

La actividad específica del transportador sacarosa/ $H^+$  a lo largo de la germinación (Figura 21) se obtuvo al realizar el índice de la actividad del transportador (Figura 17) entre los niveles del transportador detectados con el anticuerpo (Figura 20). Tomando como el

100% la suma de el área de las bandas detectadas para la proteína de 64 kDa a los diferentes tiempos.

El simportador presenta niveles muy bajos de actividad a las 8 horas para presentar un incremento importante entre las 24 y 30 horas de la germinación, después de este tiempo disminuye ligeramente y se mantiene hasta las 72 horas de germinación.

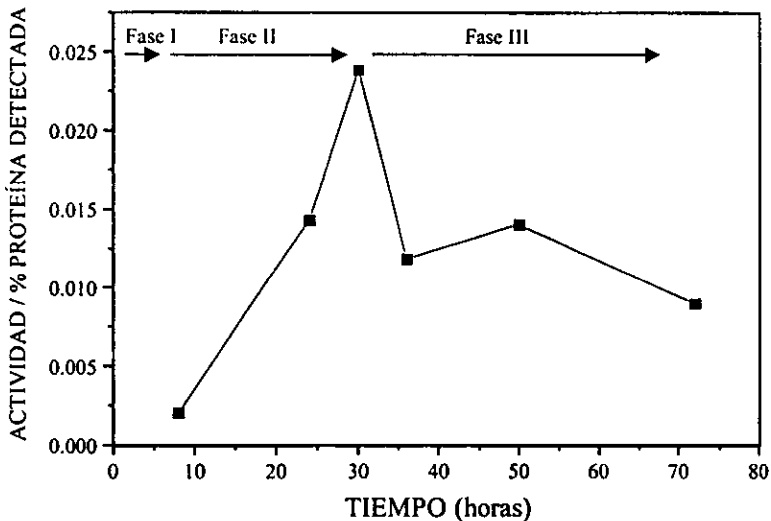


Figura 21. Curva de actividad específica del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> a lo largo de la germinación de ejes embrionarios de maíz.

Es probable que a tiempos cortos de la germinación la proteína no se encuentre en estado activo ya sea por no encontrarse adecuadamente estructurada en la membrana o bien a que existan señales intracelulares que no le permiten mantenerse activa a este tiempo como pueden ser las bajas concentraciones intracelulares bajas de carbohidratos. Ya que a las 24 horas presenta 7 veces más actividad que a las 8 horas. El pico de actividad a las 30

horas podría deberse a un ajuste entre la proteína recién sintetizada y la remanente, para después mantenerse constante poco antes y durante la salida de la radícula, es decir en la etapa III de la germinación y el período postgerminativo.

## 6. DISCUSIÓN

La semilla madura de maíz contiene una reserva de carbohidratos, localizada principalmente en el endospermo. El almidón representa el 70 a 80% de los compuestos almacenados (Bewley y Black, 1986). Durante el proceso germinativo el almidón es hidrolizado y transportado hacia los tejidos internos para mantener el metabolismo del eje embrionario en las etapas tempranas de su crecimiento y hasta que sus hojas sean capaces de llevar a cabo la fotosíntesis.

Es factible que la actividad de transporte de sacarosa sea uno de los procesos esenciales para el metabolismo de las células del eje embrionario. Un transportador de azúcares ampliamente descrito en la literatura es el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, por lo que en este trabajo se investigó su posible participación a lo largo de la germinación, en el eje embrionario que es un tejido que propiamente crece y se diferencia para dar lugar a la nueva planta.

### 6.1. Parámetros fisiológicos de ejes y embriones de maíz.

La germinación de una semilla inicia con la entrada de agua y termina cuando se rompe la cubierta de la semilla y sale la raíz primaria. En la germinación se han reconocido tres fases con respecto a la acumulación de peso húmedo de los tejidos embrionarios (Bewley y Black, 1986)

Para determinar que no se perdiera la viabilidad tanto del embrión como del eje embrionario al ser extraídos de la semilla y además conocer cuales eran los tiempos en que ocurrían las tres fases de la germinación se realizaron curvas de germinación y de acumulación de peso húmedo en ejes y embriones de maíz.

Aún con la extracción de los ejes de la semilla, éstos siguieron viables ya que se obtuvo un 96% de viabilidad. En cuanto a las fases de la germinación se lograron distinguir las tres fases. Fase I o de imbibición que finalizó a las 5 horas, fase determinante para que el

proceso germinativo ocurra, ya que con la entrada de agua, los componentes celulares comienzan a hidratarse y adoptar la conformación y acomodo adecuados para presentar sus funciones esenciales, como la toma de oxígeno para iniciar el proceso respiratorio.

La segunda fase ocurrió entre las 5 y 30 horas, período en el que las células del embrión empiezan el proceso respiratorio con la consecuente producción de poder reductor y ATP, ambos indispensables para la síntesis de las biomoléculas complejas, por lo que el metabolismo aumenta de manera importante, ya que ocurren los procesos de reparación y síntesis de compuestos que anteceden a la división celular del eje embrionario. La fase II se distingue por mantener sin cambios importantes y por un período prolongado el contenido de humedad, aún cuando se observa un aumento considerable en el tamaño del tejido.

La fase tres comenzó a las 30 horas y es el final del proceso germinativo, ocurre cuando la raíz primaria o radícula sale de la cubierta de la semilla, momento en el que la germinación se completa.

Para estudiar el transporte de sacarosa a lo largo de la germinación y en el inmediato período posgerminativo se escogieron los tiempos 8, 24, 30, 36, 50 y 72 horas de imbibición, tiempos en los cuales se esperaba un metabolismo activo.

### **6.2. Características del transporte de sacarosa en los ejes embrionarios de maíz.**

Durante la germinación los tejidos de reserva suministran la sacarosa a los tejidos embrionarios en crecimiento, proceso que podría ser similar al que ocurre en una planta madura, la descarga de la sacarosa del tejido fuente como las hojas y su transporte a través del floema hacia los tejidos demanda, como las raíces y tubérculos (Lemoine, 2000).

En los tejidos demanda se ha encontrado la existencia del transporte de sacarosa a través de dos principales vías, la primera a través de transportadores transmembranales y la segunda a través de plasmodesmata (Lemoine, 2000).



La toma de sacarosa que se detectó en los protoplastos de ejes embrionarios de maíz podría ocurrir a través del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, ya que los plasmodesmata no se encontrarían presentes en este tipo de preparación.

Al medir el transporte de sacarosa a tiempos cortos de incubación se observa de manera constante que la sacarosa dentro de los protoplastos podía provenir de dos posibles fuentes, una el proceso por difusión y segunda por el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.

El proceso de entrada de sacarosa por difusión se evidenció al observar que el protonóforo CCCP se abatía en su totalidad la actividad de toma de sacarosa por los protoplastos. Además, la exposición por tiempos prolongados a la sacarosa (40 minutos), producía un abatimiento en el gradiente de pH. Siendo entonces evidente que la sacarosa que entraba a los protoplastos de los ejes embrionarios es por un mecanismo que depende de un gradiente electroquímico.

#### **6.2.1. El transportador de sacarosa en ejes embrionarios es el simportador sacarosa/H<sup>+</sup>**

Con el propósito de buscar la existencia del transportador sacarosa/H<sup>+</sup> en los protoplastos de ejes embrionarios de maíz se investigaron algunas de sus propiedades características, su dependencia al pH, sensibilidad a reactivos específicos como DEPC y PCMBs y determinar algunas de sus constantes cinéticas. Para así poder determinar si la actividad de transporte de sacarosa en los protoplastos era debida al simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.

Evidencia de que el transporte de sacarosa en el eje embrionario se debe a un transporte dependiente de protones, se encontró al observar que la actividad de transporte de sacarosa aumentaba 2 veces al imponer una diferencia de pH de 7.8 a 4.0 en el interior y en el exterior respectivamente y además era directamente dependiente del gradiente de pH y de forma inversa al  $\Delta\Psi$ , ya que al eliminar este último componente por la adición de Valinomicina y K<sup>+</sup> en el medio de ensayo, la actividad se incrementaba tres veces.

Otra evidencia que sustenta la propuesta de que el transporte de sacarosa mayoritario en los protoplastos de ejes embrionarios se debe al transportador sacarosa/H<sup>+</sup> es la inhibición del transporte por PCMBS y DEPC, ambos compuestos comúnmente utilizados para inhibir al transportador. 500  $\mu\text{M}$  de PCMBS inhibió al 50% la actividad de transporte de sacarosa, valor parecido al encontrado en hojas de remolacha 350  $\mu\text{M}$  (Bush, 1993), mientras que el DEPC 1 mM inhibe un 82.9% el transporte de sacarosa.

Por otra parte, se encontró que el transporte de sacarosa seguía una cinética de saturación con una  $K_m$  de 1.5 mM, valor muy similar al reportado para otros simportadores de sacarosa de otras especies y tejidos maduros como papa, espinaca, remolacha y haba (Tabla 1 en Introducción y Lemoine, 2000).

Es importante hacer notar que este es el primer estudio en el que se caracteriza al simportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz, aún cuando en 1999, Aoki y colaboradores, demostraron la existencia de un gene que codifica para el transportador.

### **6.3. Actividad del transportador sacarosa/H<sup>+</sup> en la germinación.**

El transporte secundario de nutrientes en las células vegetales depende de manera importante del bombeo de protones por la ATPasa localizada en la membrana plasmática. En la germinación de ejes embrionarios de maíz encontramos que la actividad de la ATPasa de protones es alta 35  $\text{nmolPimg}^{-1}\text{min}^{-1}$  a las 8 horas y se incrementa posteriormente de manera lineal conforme avanza la germinación para alcanzar a las 72 horas 57.5  $\text{nmolPimg}^{-1}\text{min}^{-1}$  (Jahn *et al.*, 1997; Svennelid *et al.* 1999).

La actividad de la bomba de protones podría sustentar el transporte ininterrumpido de sacarosa a través del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> a lo largo de la germinación, sin embargo, el patrón de actividad del transportador presenta un patrón variable de actividad con valores bajos de actividad de transporte a las 8 y 30 horas de germinación.

Los datos sugieren que la proteína detectada al inicio entre las 8 y 24 horas es la proteína residual del proceso de formación y maduración de la semilla, misma proteína que se degrada rápidamente (6 horas) y que posteriormente se empieza a sintetizar de manera activa, probablemente para prepararse para la elongación y división celular.

La escasa actividad del transportador a las 8 horas, se explica por la presencia de bajas cantidades del transportador a ese tiempo, y porque su síntesis comienza a tiempos posteriores, siendo entonces una proteína residual del proceso de embriogénesis, proteína que podría no haber conservado su capacidad de transporte debido a cambios en su topología en la membrana, después del paso por el periodo de desecación y almacenamiento, previo a la germinación. Otra posibilidad es que la composición de la membrana a ese tiempo no fuera la óptima para llevar a cabo su función, ya que las proteínas membranales son muy sensibles a cambios en el entorno lipídico, cambios que de manera normal ocurren con el aumento en las actividades reparativas y en general del metabolismo muy al inicio de la germinación. En cuanto a la disminución de la actividad del transporte a las 30 horas se explica por un aumento en la degradación de la proteína en conjunto con una disminución en su síntesis.

A partir de las 36 horas se encontró que la incorporación de sacarosa por los protoplastos se iba incrementando de manera gradual, periodo que coincide con la aparición de la radícula y su posterior crecimiento, en embriones de arroz se observó que a las 36 horas de germinación el contenido de azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa llegan a caer a valores del 10% comparados con el embrión seco y este valor se mantiene hasta las 120 horas de germinación. Sin embargo, si el medio en el que crecen los embriones contiene 100 mM de glucosa se mantiene el mismo nivel de carbohidratos a lo largo de toda la germinación. De manera interesante cuando los embriones de arroz son extraídos hasta las 72 o 120 horas de germinación, estos contienen valores de 3 a 4 veces más altos que el embrión seco (Matsukura, et al. 2000). Estos resultados indican que probablemente el transportador de sacarosa es más activo al final de la germinación en el periodo de elongación y diferenciación del embrión tanto para arroz como para el maíz.

#### 6.4. Niveles del transportador a lo largo de la germinación

Aoki y colaboradores en 1999, clonaron y secuenciaron el transportador de sacarosa en plantas de maíz de 14 días, la longitud de la región codificante del gene es de 1,563 pb con una señal de poliadenilación en la región 3' no traducida. El gene codifica para una proteína de 521 aminoácidos con una masa molecular estimada de 55.2 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína presenta 82% de identidad con el transportador de azúcares de arroz (Aoki *et al.*, 1999). Con esta información disponible en el Gene Bank (BAA83501) se seleccionó una secuencia de aminoácidos que fuera altamente antigénica, para producir anticuerpos específicos contra la proteína, la secuencia **TARWGRRRPILIGC** se haptenizó con hemocianina y se inyectó a conejos. El anticuerpo obtenido reconoce a 2 proteínas, una de 64 kDa y otra de 20 kDa.

Aún cuando el peso molecular esperado es menor a 64 kDa es probable que la proteína que se une al anticuerpo sea el transportador de sacarosa, ya que las proteínas membranales suelen presentar corrimiento anómalo en geles de PAGE-SDS, debido a los lípidos que suelen permanecer unidos a la proteína o bien a que la carga eléctrica de la proteína que en su forma extendida puede modificar su patrón de migración en el gel.

El patrón densitométrico de esta proteína mostró una baja cantidad de proteína a las 30 horas lo cual concuerda con la escasa actividad que se detectó a este tiempo. La actividad específica del transportador entre las 24 y 72 horas permanece constante y es 6 veces mayor a la detectada a las 8 horas, por lo que es probable que la actividad baja que se detecta a las 8 horas se deba a una proteína defectuosa y que probablemente participó en alguna de las fases de la embriogénesis y que al inicio de la germinación parece no ser importante.

Probablemente durante la embriogénesis el transportador de azúcares se encontrará en cantidades abundantes y funcional ya que en *Vicia faba* se encontró que este transportador contribuye con un 50% en la actividad de transporte de sacarosa hacia el tejido embrionario y al de reserva. Sin embargo, su pobre abundancia al inicio de la germinación

podría deberse a que esta proteína no es necesaria en el eje embrionario para sostener el metabolismo recién activado, metabolismo que puede establecerse a través de los monosacáridos glucosa y fructosa y que entrarían a las células del eje a través del transportador de hexosas y que éste también se ha encontrado en embriones en desarrollo de *Vicia faba*, específicamente en las zonas con mayor actividad mitótica. (Weber *et al.* 1997)

Esta propuesta puede sustentarse en que también existe una actividad de invertasa en las células que presentan o están en aparente división celular o de activo crecimiento, más que en los tejidos de almacenamiento (Weber *et al.* 1997).

En este trabajo presentamos evidencia de la existencia del transportador sacarosa/H<sup>+</sup> de maíz. Postulamos que su actividad es más importante en estadios cercanos a la protusión de la radícula y en el período posgerminativo más que en el inicio de la germinación, en el que aparentemente el metabolismo podría llevarse a cabo a expensas del transporte de monosacáridos.

## 7. CONCLUSIONES

1. Durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz se encontró que el transporte de sacarosa es el debido al simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.
2. Se determinó que el transporte de sacarosa a las 24 horas de germinación de los ejes embrionarios era principalmente debido al simportador sacarosa/H<sup>+</sup>, ya que:
  - A) Este transporte fue sensible a la adición de 10  $\mu\text{M}$  de CCCP, activable por la adición de Valinomicina y altamente dependiente del pH.
  - B) La  $V_{\text{max}}$  obtenida para el simportador sacarosa/H<sup>+</sup> fue de  $0.834 \text{ pmolsacmin}^{-1}\text{mg}^{-1}$ , y la  $K_m$  para la sacarosa de 1.5 mM. Éstos datos coinciden con los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$  reportados para el simportador en otras especies de plantas.
  - C) La actividad de transporte de sacarosa se inhibió en un 50% con 500  $\mu\text{M}$  de PCMBs y un 82.9% con 1mM de DEPC, los cuales son inhibidores específicos de la actividad del simportador sacarosa/H<sup>+</sup>.
3. La actividad de ATPasa en la germinación es alto y se incrementa de manera lineal y constante desde las 8 hasta las 72 horas, contrario al transporte de sacarosa dependiente de pH, el cual presenta dos puntos de muy baja actividad, 8 y 30 horas de germinación, lo cual sugiere la posible participación de otros transportadores para la toma de carbohidratos por el eje embrionario en las fases iniciales de la germinación, cuando el transportador de sacarosa no es capaz de sustentar la toma de carbohidratos hacia el eje.
4. La detección del simportador mediante anticuerpos específicos, aunado con los resultados de su actividad, nos permite sugerir tres eventos que suceden a lo largo de la germinación de los ejes embrionarios. Primero que el transportador que se presenta a las 8 horas posiblemente es el "remanente" del período de embriogénesis; el segundo evento es el recambio del transportador "viejo" o "remanente" por el nuevo, proceso que toma

lugar principalmente entre las 24 y 36 horas de germinación y el tercer evento es el mantenimiento de un nivel constante de actividad debida exclusivamente a la proteína nueva durante el período tardío de la germinación y posgerminativo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, M. y Claros, M. G. (1997) (<http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentros/ENCUENTROS37/transporte.html>)
2. Aoki, N., Hirose, T., Takahashi, S., Ono, K., Ishimaru, K., Oshugi, R. (1999) Molecular cloning and expression of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.) *Plant Cell Physiol.* 40: 1072-1078.
3. Bewley, J. D. y Black, M. (1986) *Physiology and biochemistry of seeds. VI. Development, germination and growth.* Springer-Verlag.
4. Bick, J. A., Neelam, A., Smith, E., Nelson, S. J., Hall, J. L., Williams, L. E. (1998) Expression analysis of a sucrose carrier in the germination seedling of *Ricinus communis*. *Plant Mol. Biol.* 38: 425-435.
5. Briskin D.P. (1994) Membranes and transport systems in plants: An overview. *Weed Sci.* 42: 255-262
6. Buckhout, T. J. (1989) Sucrose transport in isolated plasma-membrane vesicles from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) Evidence for an electronic sucrose-proton symport. *Planta* 178: 393- 399.
7. Buckhout, T. J. (1994) Kinetics analysis of the plasma membrane sucrose-H<sup>+</sup> symporter from Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaves. *Plant Physiol.* 88: 991- 998.
8. Bush, D. R. y Langston-Unkefer, P. J. (1988) Amino acid transport into membrane vesicles isolated from Zucchini. *Plant Physiol.* 88: 487-490.
9. Bush, D. R. (1990) Electrogenicity, pH-dependence, and stoichiometry of the proton-sucrose symport. *Plant Physiol.* 93: 1590-1596.



10. Bush, D. R. (1993), Inhibitors of the proton-sucrose symport. Arch. Biochem. Biophys. 307: 355-360.
11. Bush, D. R., Li, Z. C., (1991) Proton coupled sucrose and aminoacid transport across the plant plasma membrane. In recent advances in phloem transport and assimilate compartmentation, Ed. J. L. Bonneman, S. Deltrot, W. J. Lucas, J. Dainty. France; Presses Academiques. pp 148-153.
12. Darnell, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1993) Biología Celular y Molecular, 2ª edición, Ediciones Omega, S.A. Barcelona. pp. 1188.
13. Deltrot, S. y Bonnemain, J.L. (1980) Involvement of protons as a substrate for the sucrose carrier during phloem loading in *Vicia faba* leaves. Plant Physiol. 67: 560-564.
14. DeWitt, N. D., Sussman, M. R. (1995) Immunocytological localization of an epitope-tagged plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) in phloem companion cells. Plant Cell 7: 2053-2067.
15. Frommer, W. B., Hummel, S., Unsled, M., y Ninnemann, O. (1995) Seed and vascular expression of a High-Affinity transporter of cationic aminoacids in Arabidopsis. Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 12036-12040.
16. Gahrtz, M., Schmelzer, E., Stolz, J., y Sauer, N. (1996) Expression of the PmSUC1 sucrose carrier from *Plantago major* L. Is induced during seed development. Plant J. 9: 93-100.
17. Giaquinta, R. T. (1977) Possible role of pH gradient and membrane ATPase in the loading of sucrose into the sieve tubes. Nature 267: 369-370.

18. Gogarten, J. P. and Bentrup, F. W. (1989) Substrate specificity of the hexose carrier in the plasma membrane of *Chenopodium* suspension cells probes by transmembrane exchange diffusion. *Planta*. 178: 52-60.
19. González-Halphen, D., Lindorfer, M. A. y Capaldi, R. A. (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochem*. 27: 7021- 7031.
20. González-Romo, P., Sánchez-Nieto, S., y Gavilanes Ruiz M. (1992) A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentration. *Anal. Biochem*. 200: 235-238.
21. Hall, J. L., Baker, D. A. (1982) *Membranas Celulares y transporte de iones*. 1ª Edición. CECSA, pp 151.
22. Hecht, R., Slone, J. H., Buckhout, T. J., Hitz, W. D., Van Der Woude, W. J. (1992) Substrate specificity of the H<sup>+</sup>-sucrose symporter on the plasma membrane of sugar beets (*Beta vulgaris* L.) *Plant Physiol*. 99: 439-444.
23. Hirose, T., Imaizumi, N., Scofield, G. N., Furbank, R. T., Oshugi, R. (1997) cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Physiol*. 38: 1389-1396.
24. Hitz, W. D., Card, P. J., y Ripp, K. G. (1986). Substrate recognition by a sucrose transporting protein. *J. Biol. Chem*. 261: 11986-11991.
25. <http://www.tigr.org/tdb/e2k1/ath1/atgenome/genome.shtml>
26. Jade, M. Bush D.R. (1998) His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 9025-9030

27. Jahn T, Fulgsang A.T., Olsson A, Bruntrup IA, Collige DB, Volkmann D, Sommarin M, Palmgren MG, Larsson C. (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell* 9:1805-1814.
28. Kühn, C., Quick, W. P., Schulz, A., Sonnewald, U., y Frommer, W. B. (1996) Companion cell-specific inhibition of the potato sucrose transporter SUT1. *Plant Cell Environ.* 19: 1115-1123.
29. Lalonde, S., Eckhard, B., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J., Frommer, W., Ward, J. (1999) The dual function of Sugar carriers transport and sugar sensing. *Plant Cell.* 11: 707- 726.
30. Lemoine, R. (2000) Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 246 - 262.
31. Lewin, B. (1994) *Genes V.* Oxford University Press. E.U.A. 1272 págs.
32. Logan, H., Basset, M., Very, A. A. y Sentenac, H. (1997) Plasma membrane transport system in higher plants: From Black boxes to molecular physiology, *Physiologia Plantarum* 100:1-15.
33. Matsukura, C., Sayito, T., Hirose, T., Oshugi, R., Perata, P., Yamaguchi, J., (2000). Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol.* 124: 85-94.
34. Morsomme, P., Boutry, M. (2000) The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1465: 1-16.
35. Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W. (1997) *Bioquímica de Harper.* 14ª Edición en español. Editorial El Manual Moderno, México, 1021 págs.

36. Nicholls, D. G. y Ferguson, S. J. (1997). *Bioenergetics 2*. Academic Press. E.U.A. 255 págs.
37. Overvoorde, P., Frommer, W., Grimes, H. (1996) A soybean sucrose binding protein indepently mediates nonsaturable sucrose uptake in yeasts. *Plant Cell*. 8: 271-280.
38. Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal. Biochem*. 83: 346-356.
39. Raven, H. P., Evert, F. R. Eichhorn, S. E. (1992). *Biology of Plants*. 5ª Edición, Worth Publishers Inc. E.U.A. pp. 68.
40. Riesmeier, J. W., Hirner, B., Frommer, W. B. (1993) Expression of source transporter from potato correlates with the sink-to-source transition in leaves. *Plant Cell* 5: 1591-1598.
41. Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., Frommer, W. B. (1992) Isolation ond characterization of a sucrose carrier cDNA from spinach by functional expression in yeast. *EMBO J*. 11: 4705-4713.
42. Sánchez-Linares, L. (1998). Tesis de maestría. Actividad de bombeo de  $H^+$  por la ATPasa de la membrana plasmática en embriones de maíz durante la germinación. UNAM.
43. Sánchez-Nieto, S., Tuena de Gómez-Poyou, M., Rodríguez-Sotres, R., Carballo, A., Gavilanes-Ruiz, M. (1998) Comparison of plasma membrane  $H^+$ -ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos. *Biochim. Biophys. Acta*. 1414: 175-187.
44. Sauer, N., Baier, K., Gahrtz, M., Stadler, R., Stolz, J., Truernit, E. (1994) Sugar transport across the plasma membranes of higher plants. *Kluwer Academic Publishers, Plant Mol. Biol.* 26: 1671 - 1679.

45. Schäger, H. y Von-Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
46. Shakya, R., Strum, A. (1998) Characterization of source- and sink- specific sucrose/H<sup>+</sup> symporters from carrot. *Plant Physiol.* 118: 1473-1480.
47. Singer, S. J., y Nicolson, G. L., (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720-731.
48. Slone, J. H., Buckhout, T. J. (1992) In vitro analysis of the H<sup>+</sup>-hexose symporter on the plasma membrane of sugar beets (*Beta vulgaris L.*). *Plant Physiol.* 99: 945-951.
49. Stadler, R., Brandner, J., Schulz, A., Gahrtz, M., Sauer, N., (1995) Ploem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7: 1545-1554.
50. Stenesh, J. (1989) *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.* 2ª Edición. Wiley Interscience. pp. 368.
51. Street, H. E. y Ópik, H. (1986) *The physiology of Flowering Plants: Their growth and development.* 3ª Edición. Ed. Edward Arnold. Gran Bretaña. pp. 5-25.
52. Stryer, L. (1990) *Bioquímica.* Tomo I y II, 3ª edición, editorial Reverté, España. 1084 págs.
53. Svanneid F, Olsson A, Piotrowski M, Rosenquist M, Ottman C, Larsson C, Oecking C, Sommarin M (1999) Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell.* 11: 2379-2391.

54. Voet, D., Voet, J. (1995). *Biochemistry*, 2ª Edición. John Wiley & Sons Inc., E.U.A. 1361 págs.
55. Weber H., Borisjuk L., Wobus U. (1997) A role for sugar transporters during seed development: molecular characterization of a hexose and a sucrose carrier in Faba Bean seeds. *Plant Cell* 9: 895-908.
56. Weber, H., Borisjuk L., Heim, U. Buchner, P, Wabus U (1995) Seed coat-associated invertases of Faba Bean control both unloading and storage function: Cloning of cDNAs and cell type-specific expression. *Plant Cell* 7: 1835-1846.
57. Williams, L. E., Lemoine, R., y Sauer, N. (2000) Sugar transporters in higher plants- a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci.* 5: 283-290.
58. Williams, L.E., Nelson S.J., Hall J.L. (1992) Characterization of solute/proton cotransport in plasma membrane vesicles from *Ricinus* cotyledons, and comparison with other tissues. *Planta* 186:541-550
59. Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., Mc Farland, K. C. Franceschi, V. R. y Lucas, W. L. (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98.
60. Zhou, J-J., Theodoulou, F., Sauer, N., Sanders, D., Miller, A. J. (1997) A Kinetic model with ordered cytoplasmic dissociation for SUC1, an *Arabidopsis* H<sup>+</sup>/Sucrose cotransporter expressed in *Xenopus* Oocytes. *J. Membr. Biol.* 159: 113- 125.