

108



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA VIA **MEP** POR GLUCOSA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

AIDE JIMÉNEZ MARTÍNEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

MÉXICO, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



DIRECTORA DE TESIS: D. ROSA LEMUS MEJÍA

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

2002



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.



DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
"Estudio de la regulación en la expresión de genes de la vía MEP por glucosa".

realizado por Aidé Jiménez Martínez.

con número de cuenta 9210271-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Patricia León Mejía.

Propietario

Dr. Angel Arturo Guevara García.

Propietario

Dr. Luis Felipe Jiménez García.

Suplente

Dra. Georgina Ponce Romero.

Suplente

Dr. Mario Rocha Sosa.

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por todo su apoyo y comprensión, porque gracias a ti logré hacer este sueño realidad. Gracias de todo corazón.

A mi abuelita Sarita por toda la ternura que me ha dado

A mi hermana Mayra porque siempre ha estado cerca de mi en todo momento.

A todos los integrantes del laboratorio de quienes aprendí tantas cosas. Gracias por ser excelentes compañeros.

A mis maestros que me contagiaron el gusto por la ciencia, en especial a la Dra. Patricia León por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo.

**Gracias a mi amiga Sara Cortés por los ánimos que me dabas para continuar.
Gracias Carlos Fragoso amigo de toda la vida.**

ABREVIATURAS

ABA	ácido abscísico
Acetil CoA	acetil coenzima A
AGPS1	gen que codifica para la ADP-glucosa pirofosforilasa
Amy3D	gen que codifica para la isoforma 3D de la enzima α -amilasa
APTI	gen que codifica para una proteína transportadora de fosfatos
CABI	gen que codifica para la proteína 1 que se pega a clorofilas
CIN	gen que codifica para la invertasa de la pared celular
CIN	gen que codifica para la enzima invertasa de la pared celular
CLA1	gen que codifica para la enzima 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
cla-1	mutante con cloroplastos alterados
CMK	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-cinasa
CMK	enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-cinasa
CMS	2-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
CMS	enzima 2-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
CH-A	gen que codifica para la enzima chalcona sintasa
DMAPP	dimetilalil difosfato
DXP	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato
DXR	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
DXS	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa
FPP	farnesil difosfato
GGPP	geranil geranil difosfato
GPP	geranil difosfato
GUS	gen que codifica para la enzima β -glucuronidasa
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
HMGGR	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa
HMGGS	3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa
HXX1	gen que codifica para la enzima hexocinasa 1
HXX1	gen que codifica para la hexocinasa 1

IPP	isopentenil difosfato
ISPC	gen que codifica para la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa
ISPD	gen que codifica para la enzima 2-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa
ISPE	gen que codifica para la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-cinasa
ISPF	gen que codifica para la enzima 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclofosfato sintasa
MECPS	enzima 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclofosfato sintasa
MECPS	2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclofosfato sintasa
MK	mevalonato cinasa
NR	gen que codifica para la enzima nitrato reductasa
NR1	gen que codifica para la nitrato reductasa 1
PAL1	gen que codifica para la enzima fenilalanina amonio-liasa1
PAL1	gen que codifica para la fenilalanina amonio-liasa1
PC	gen que codifica para la proteína plastocianina
PMDC	difosfomevalonato descarboxilasa
PMK	5-fosfomevalonato cinasa
RBCS	gen que codifica la unidad pequeña de rubisco
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
Via MEP	via 2-C-metil-D-eritritol-4-Fosfato
Via MVA	via mevalónica

INDICE

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Generalidades de isoprenoides.....	2
1.2 Biosíntesis de isoprenoides.....	3
1.2.1 Vía mevalónica (MVA).....	3
1.2.2 El descubrimiento de la vía MEP.....	5
1.2.3 Vía MEP.....	8
1.3 Compartimentalización de la biosíntesis de isoprenoides en plantas superiores.....	9
1.4 Los azúcares como reguladores de la expresión génica.....	12
1.4.1 Vías de señalización de azúcares.....	14
1.4.1.1 Vía hexocinasa.....	14
1.4.1.2 Vías independientes de hexocinasa.....	15
1.4.2 Moléculas participantes en la cascada de transducción de señales.....	16
1.4.3 Niveles de regulación genética por azúcares.....	17
1.4.3.1 Transcripción.....	17
1.4.3.2 Estabilidad del RNAm.....	17
1.4.3.3 Traducción.....	18
1.4.3.4 Interacción proteína-proteína.....	18
2 ANTECEDENTES.....	19
3 JUSTIFICACIÓN.....	21
4 OBJETIVOS.....	22
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1 Material Biológico.....	23
5.2 Esterilización de las semillas.....	23
5.3 Extracción de RNA.....	23
5.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa.....	24
5.5 Transferencia del RNA a una membrana de nylon.....	24
5.6 Hibridación por northern blot.....	25
5.7 Obtención de fragmentos de DNA para sonda.....	25
5.8 Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR).....	25
5.8.1 Obtención de cDNA.....	25

5.8.2 Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR)	26
5.9 Análisis histoquímico de la actividad de la enzima β -glucuronidasa	27
5.10 Medios de germinación de plantas	27
5.11 Buffers	28
5.12 Soluciones	28
6 RESULTADOS	30
6.1 Altas concentraciones de glucosa reprimen la expresión del gen <i>CLA1</i>	30
6.2 Umbral de concentración de glucosa en la que disminuye la expresión de <i>CLA1</i>	31
6.3 La expresión del gen <i>CLA1</i> puede regular su expresión vía hexocinasa	33
6.4 La expresión de <i>CLA1</i> no está reprimida en varias mutantes afectadas en la vía de señalización por azúcares	35
6.5 El promotor de <i>CLA1</i> parece no contener secuencias involucradas en la represión por glucosa	37
6.6 El promotor de <i>CLA1</i> contiene secuencias involucradas en la respuesta a azúcares	39
6.7 La expresión de los genes <i>ISPC</i> , <i>ISPE</i> e <i>ISPF</i> se reprimen por glucosa	41
7 DISCUSIÓN	42
8 CONCLUSIONES	45
9 REFERENCIAS	46

RESUMEN

Todos los seres vivos pueden sintetizar isoprenoides, sin embargo las plantas son los organismos que producen más variedad de éstos. En las plantas los isoprenoides participan en procesos biológicos muy importantes como: la fotosíntesis, la respiración, el crecimiento, el ciclo celular, mecanismos de defensa y su adaptación al medio ambiente. Además muchos de los isoprenoides producidos por las plantas son importantes en la industria y en la salud del hombre. La síntesis de isoprenoides en plantas se lleva a cabo por dos vías metabólicas: la vía mevalónica y la vía MEP. La vía mevalónica se realiza en el citoplasma mientras que la vía MEP en los plastidios. En el laboratorio donde se realizó este trabajo se tiene interés en el estudio de esta última vía. Se han realizado análisis sobre el patrón de expresión del gen *CLA1* que codifica para la enzima que realiza el primer paso biosintético de la vía MEP y se ha observado que *CLA1* es especialmente abundante en tejidos jóvenes, y que su expresión puede inducirse por luz. Otros factores de regulación pueden ser los azúcares, debido a que varios de los isoprenoides involucrados en la fotosíntesis como el fitol y los carotenoides, provienen exclusivamente de la vía MEP. El proceso de fotosíntesis tiene como finalidad la obtención de azúcares y sus niveles pueden influir en la acumulación de transcrito de los genes de esta vía. Estudiando esta posibilidad, se realizó el análisis de la regulación en la expresión de *CLA1* por glucosa. Los resultados obtenidos mostraron que la expresión de *CLA1* se reprime en presencia de altas concentraciones de glucosa y que en esta represión participa la hexocinasa 1. Adicionalmente se observó que la expresión de otros genes de la vía MEP como *ISPC*, *ISPE* e *ISPF* también son regulados por glucosa.

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de isoprenoides

Los isoprenoides constituyen uno de los grupos de compuestos más abundantes y diversos que se encuentran en todos los organismos vivos. En plantas superiores se han reportado más de 25,000 tipos de isoprenoides que desempeñan una gran variedad de funciones biológicas, participando en procesos como la fotosíntesis, el crecimiento, el ciclo celular, mecanismos de defensa, la adaptación al medio ambiente etc. Además, muchos isoprenoides tienen importancia en la industria donde son utilizados como resinas, saborizantes, fragancias y antineoplásicos (McGarvey et al., 1995; Sacchetti et al., 1997). Todos los isoprenoides son sintetizados a partir de dos moléculas de 5 carbonos: el isopentenil difosfato (IPP) y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP), la estructura de cada una se puede ver en la Figura 1. La condensación consecutiva y modificación de estos bloques básicos originan la gran diversidad de isoprenoides, dando por resultado compuestos de cinco, diez, quince ó más carbonos (C_n). La nomenclatura para los isoprenoides se establece de acuerdo al número de carbonos por los que están formados, teniéndose hemiterpenos (C₅), monoterpenos C₁₀, sesquiterpenos C₁₅, diterpenos C₂₀, triterpenos C₃₀, tetraterpenos C₄₀ y politerpenos (C₅H₈)_n. (Lichtenthaler 1998).

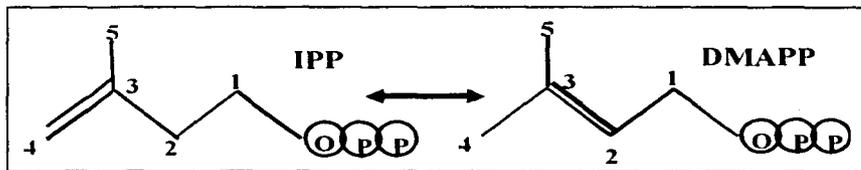


Figura 1. Moléculas de isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP) que constituyen los esqueletos de cinco carbonos de donde se derivan todos los isoprenoides.

En los organismos tanto el IPP como el DMAPP pueden sintetizarse por alguna de las siguientes vías metabólicas:

a) Vía mevalónica, en la que el ácido mevalónico constituye el primer intermediario comprometido.

b) Vía MEP, cuyo nombre deriva del 2-C-metil-D-eritritol-4-Fosfato, el cual es el primer intermediario comprometido de esta ruta biosintética.

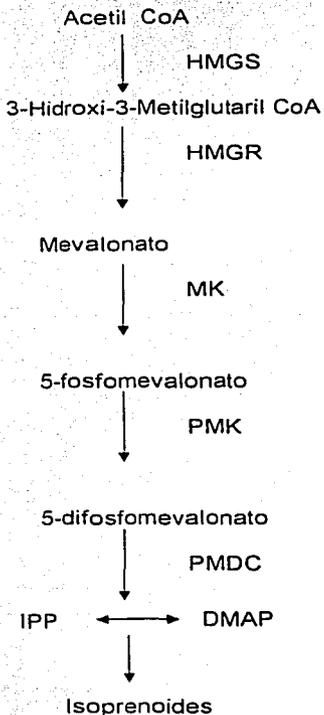
Ambas rutas que se resumen en la Figura 2, han sido estudiadas con detalle y una breve descripción de cada una de ellas se presenta a continuación.

1.2 Biosíntesis de isoprenoides:

1.2.1 Vía mevalónica (MVA)

Esta vía se estableció por primera vez en 1958 en animales y levaduras por Conrad Broch y Feodor Lynen (Lichthentaler 2000). En ella, tres moléculas de acetil CoA son condensadas para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMGCoA) por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA sintasa (HMGS) (Figura 2). Esta HMGCoA es reducida a ácido mevalónico por efecto de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGR). El ácido mevalónico a su vez es fosforilado por la enzima mevalonato cinasa (MK) convirtiéndose en 5-fosfomevalonato, el cual sufre una segunda fosforilación formándose el compuesto 5-difosfomevalonato por la acción de la enzima 5-fosfomevalonato cinasa (PMK). Finalmente el compuesto 5-difosfomevalonato es convertido a IPP por la enzima 5-difosfomevalonato descarboxilasa (PMDC) (Newman y Chappel 1999). De esta vía la enzima HMGR ha sido la más estudiada por considerarse una enzima limitante en la síntesis de isoprenoides. Sin embargo, a pesar del gran interés por el estudio de esta enzima la caracterización bioquímica es limitada debido a que la purificación de la proteína ha resultado difícil. Por otro lado estudios sobre la regulación de los genes también han resultado complejos porque la HMGR es una enzima codificada por una familia de genes. El número de genes varía dependiendo de la especie de planta, por ejemplo en papa se han reportado siete, mientras que en *Arabidopsis thaliana* se han identificado dos. El análisis de la expresión de *HMGR1* y *HMGR2* de *Arabidopsis* mostró que éstos son diferencialmente expresados, *HMGR1* es altamente expresado en todas las partes de la planta, y *HMGR2* es detectado sólo en raíces e inflorescencias (Bach, T.J. 1999). Otros estudios han revelado que la luz es uno de los factores que regulan la expresión de *HMGR1* (Learned, 1996). El análisis de la regulación de los genes *HMGR1* y *HMGR2* de *Arabidopsis*, así como de los genes de otras especies de plantas continúa en proceso.

VIA MEVALÓNICA



VIA MEP

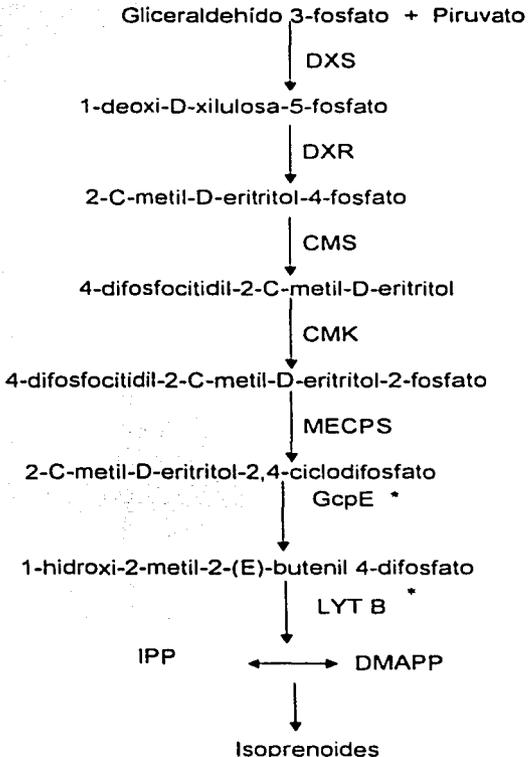


Figura 2. Vías biosintéticas para la formación de isoprenoides. Enzimas via mevalónica: HMGS, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa; HMGR, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa; MK, mevalonato cinasa; PMK, 5-fosfomevalonato cinasa; PMDC, 5-difosfomevalonato descarboxilasa. Enzimas via MEP: DXS, 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; DXR, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa; CMS, 2-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa; CMK, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-cinasa. MECPS, 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclodifosfato sintasa. * Recientemente se demostró en bacterias, la función de estas enzimas.

1.2.2 El descubrimiento de la vía MEP

Durante mucho tiempo se tuvo la idea de que la vía mevalónica era la única existente para la síntesis de isoprenoides. Sin embargo, a lo largo de los años el estudio de la ruta mevalónica en diferentes organismos arrojó resultados inconsistentes que culminaron con el descubrimiento de la vía MEP. Estas incongruencias se observaron principalmente en eubacterias y plantas superiores. Por ejemplo, en eubacterias, estudios de la biosíntesis de hopanoides (moléculas que modulan la fluidez y la permeabilidad de la membrana), usando acetato marcado con ^{13}C , mostraron que la estructura de los hopanoides era completamente diferente de la esperada. Los resultados indicaron que el acetato parecía no ser directamente incorporado a estos isoprenoides, ya que se encontró sólo un átomo de C marcado, el C-4 de cada unidad isoprenica. Lo anterior fue observado en tres especies de eubacterias, *Methylobacterium organophilum*, *Rhodospseudomonas palustris* y *Rhodospseudomonas acidophila*, (Rohmer, 1998). Un hallazgo semejante se observó con la ubiquinona en *Escherichia coli*. Por otra parte, en plantas también existían observaciones que no concordaban con que todos los isoprenoides provenían de la vía mevalónica, por ejemplo el $^{14}\text{CO}_2$ era incorporado rápidamente a isoprenoides plastídicos (carotenoides, fitol, plastoquinona-9), mientras el acetato y mevalonato marcado con ^{14}C eran incorporados a esteroides citosólicos y en una muy baja proporción a isoprenoides plastídicos. Además, el uso de mevanolina, un inhibidor altamente específico de la enzima HMG-CoA reductasa, inhibía la acumulación de esteroides citosólicos y de ubiquinona, pero no afectaba la acumulación de fitol, carotenoides y plastoquinona-9 en plastidios. Finalmente, se vio que plastidios aislados no podían hacer IPP a partir de MVA (Lichtenthaler 2000). Ante estos resultados contradictorios con la vía mevalónica, en 1993 Michael Rohmer y Frieder W. Lichtenthaler reinvestigaron la biosíntesis de isoprenoides en plastidios realizando experimentos de marcaje con ^{13}C tanto en algas unicelulares (*Scenedesmus*, *Chlorella* y *Chlamydomonas reinhardtii*) como en plantas (zanahoria y cebada). De estos análisis se observó que el patrón de marcaje encontrado en los isoprenoides plastídicos de plantas como β -caroteno, luteína, y fitol no concordaba con la formación de IPP según la vía mevalónica. En contraste, isoprenoides citosólicos como sitosterol, estigmasterol y campesterol sí correspondían al patrón de marcaje esperado de la vía mevalónica. En cuanto a las algas unicelulares estudiadas, se encontró que tanto sus esteroides como sus

isoprenoides plastídicos diferían del patrón de marcaje esperado por la ruta mevalónica. Esto llevó a la conclusión de la existencia de una nueva vía para la biosíntesis de isoprenoides a la que se denominó la vía MEP, abreviatura del nombre en inglés del primer intermediario comprometido de la vía, el 2-C-metil-D-eritritol-4-Fosfato. Por otro lado, los resultados obtenidos también demostraban que en plantas superiores existían dos vías, una para la síntesis de isoprenoides plastídicos, la vía MEP y otra vía que se encarga de la síntesis de isoprenoides citoplásmicos, la vía mevalónica. (Rohmer 1998; Lichtenthaler 1999).

Como puede verse en la información presentada en la Tabla 1, en la actualidad se sabe que la formación de isoprenoides por la vía mevalónica ocurre en: arqueobacterias, algunas eubacterias, hongos, algunos protozoarios y animales. Mientras que la mayoría de las eubacterias, algas y algunos protozoarios utilizan únicamente la vía MEP. Finalmente, existen organismos que utilizan ambas vías para la producción de sus isoprenoides, como es el caso de las plantas superiores, algunas algas, musgos y hepáticas (Lichtenthaler 2000; Eisenreich et al., 2001).

Tabla 1 Distribución de la vía MVA y MEP en diferentes organismos

Organismo	Vía biosintética de isoprenoides	
	MVA	MEP
Arqueobacterias	X	
Eubacterias (la mayor parte) <i>Escherichia coli</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Chlamydia pneumoniae</i> , <i>Vibrio cólera</i> , <i>Sinechocystis sp. etc</i>		X
Algunas eubacterias parasitas <i>Mycoplasma genitalium</i> , <i>Rickettsia prowazekii</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i> .	X	
Protozoarios <i>Plasmodium falciparum</i>		X
<i>Leishmania sp.</i>	X	
<i>Trypanosoma sp.</i>	X	
Hongos	X	
Animales	X	
Algas Chlorophyta: <i>Scenedesmus obliquus</i> , <i>Chlorella fusca</i> , <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>		X
Euglenophyta: <i>Euglena gracilis</i>	X	
Rhodophyta: <i>Cyanidium caldarium</i> Isoprenoides plastídicos		X
Isoprenoides citosólicos	X	
Plantas superiores Isoprenoides citosólicos	X	
Isoprenoides plastídicos		X

1.2.3 Via MEP

Mientras que todos los pasos biosintéticos de la vía mevalónica han sido identificados desde hace tiempo, el conocimiento de las enzimas participantes y los genes que las codifican, en la vía MEP es reciente. El primer paso de esta ruta involucra una reacción de condensación entre el piruvato y el gliceraldehído 3-fosfato para producir el compuesto 1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP). Como se muestra en la Figura 2, esta reacción es catalizada por la enzima DXP sintasa (DXS), cuyo gen (*ISPA* ó *CLA1* en *Arabidopsis*), ha sido clonado y caracterizado en microorganismos como *Escherichia coli* (Sprenger et al., 1997) y en varias plantas como *Mentha piperita* (Lange et al., 1998) y *Arabidopsis* (Estévez et al., 2000). El DXP producido es transformado a 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) por la acción de DXP reductoisomerasa (DXR) (Kuzuyama et al; 1998), cuyo gen (*ISPC*) también ha sido clonados en *E. coli* (Takahashi et al., 1998) y en varias plantas como *M. piperita* (Lange, et al., 1999), *A. thaliana* (Schwender, J. et al 1999) y *Lycopersicon sculetum* (Rodríguez-Concepción et al 2001). El compuesto MEP a su vez es transformado a 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol por la enzima 2-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (CMS). El gen que codifica para esta enzima (*ISPD*) ha sido clonado en *E.coli* y *A. thaliana* (Rohdich et al., 2000). Posteriormente por la enzima 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-cinasa (CMK), el compuesto 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol es transformado a 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato, que a su vez es convertido en 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclodifosfato por la acción de 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclofosfato sintasa (MECPS). Los genes que codifican para estas enzimas (*ISPE* y *ISPF* respectivamente), han sido clonados en el *E. coli* y en diferentes plantas incluyendo *A. thaliana*. (Rohdich, F. et al., 2001). El 2-C-metil-D-eritritol-2-4-ciclofosfato es convertido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4 difosfato por la acción de la enzima GcpE la cual es codificado por el gen (*ISPG*) (Stephan et al 2001; Altincicek, B., et al 2001). El último compuesto es finalmente transformado en isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato gracias a la enzima LytB codificada por el gen (*IspH*), (Rohdich 2001; Altincicek et al 2001). Debido a que los dos últimos pasos biosintéticos de esta vía son de reciente descubrimiento, las enzimas aún no poseen un nombre que describa su actividad. El estudio de la regulación en la expresión de los genes de la vía MEP es

escasa, los logros alcanzados con el gen *CLA1* que se han realizado en el laboratorio se describirán más adelante.

1.3 Compartimentalización de la biosíntesis de isoprenoides en plantas superiores.

Como ya se mencionó, las plantas superiores utilizan tanto la vía mevalónica como la vía MEP para la formación de todos sus isoprenoides: la vía mevalónica opera en el citoplasma produciendo compuestos como: triterpenos y sesquiterpenos. Mientras que la vía MEP se lleva a cabo en los plastidios produciéndose en ella hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) y tetraterpenos (C_{40}). Siguiendo el principio básico de incorporación del esqueleto de una unidad de cinco carbonos, el precursor correspondiente para producir monoterpenos es el geranil difosfato (GPP), los sesquiterpenos son formados a partir de farnesil difosfato (FPP) y los diterpenos de geranil geranil difosfato (GGPP) como se observa en la Figura 3. En cada uno de los grupos mencionados se incluyen moléculas de enorme importancia biológica, algunos ejemplos se muestran en la Tabla 2 (Eisenreich et al., 2001).

Algunos resultados sugieren que estas dos vías no sean absolutamente independientes. En experimentos utilizando ^{13}C en células de *Catharanthus roseus*, una pequeña parte de este carbono usado para la formación de sitoesterol (isoprenoide citoplasmático), proviene de la vía MEP. Además se sabe que en el diterpeno ginkgolide las tres primeras unidades isoprénicas parecen provenir de la vía MVA y la cuarta unidad isoprénica es derivada la vía MEP. Estos resultados pueden ser explicados por un entrecruzamiento de vías, en la que intermediarios metabólicos podrían estar intercambiándose entre el citoplasma a los plastidios o viceversa. La identidad y naturaleza de estos posibles intermediarios es motivo de estudio (Eisenreich et al., 1998).

CÉLULA VEGETAL

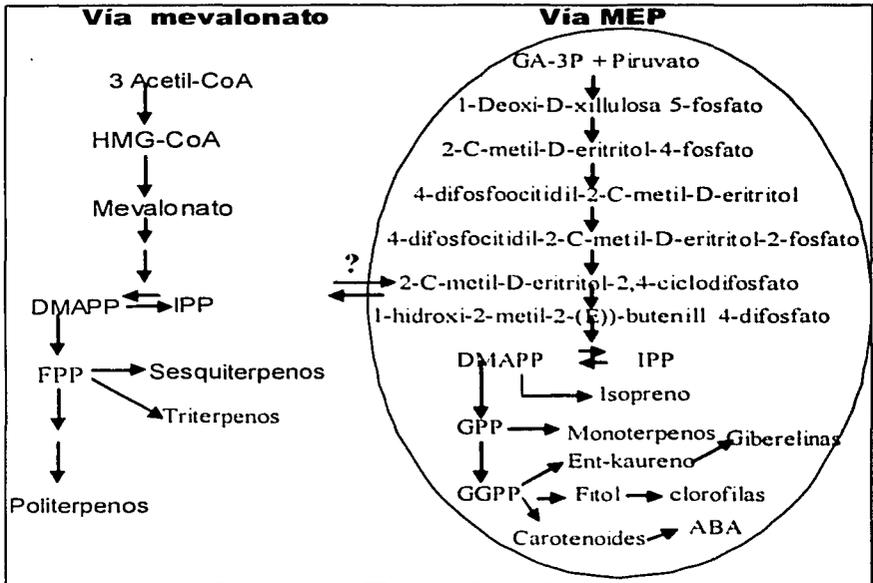


Figura 3 En plantas la vía mevalónica y la vía MEP están compartimentalizadas. La vía mevalónica se realiza en el citoplasma y la vía MEP en los plastidios. DMAPP dimetilalil difosfato, IPP isopentenil difosfato, GPP geranil difosfato, FPP farnesil difosfato, GGPP geranil geranil difosfato, ABA ácido abscísico.

Tabla 2 Ejemplos de isoprenoides producidos en plantas

	<i>Ejemplos</i>	<i>Función</i>
Vía Mevalónica		
Seciterpenos (C15)	Citocininas Brasinoesteroides	Hormonas que promueve la división celular. Hormonas que promueven enlogación celular.
Triterpenos (C30)	Fitoesteroles	Constituyentes estructurales de membranas
Politerpenos (Cn)	Fitoalexinas	Sustancias antimicrobianas
Vía MEP		
Hemiterpenos (C5)	Isopreno	Compuesto volátil liberado en los tejidos fotosintéticos de algunas plantas.
Monoterpenos (C10)	Limoneno Mentol Geraniol	Implicados en la defensa de una gran variedad de patógenos y herbívoros. Algunos son responsables de los olores característicos de las plantas. Por lo tanto, tienen importancia económica porque son utilizados como fragancias y saborizantes.
Diterpenos (C20)	Fitol Taxol Ent kaureno	Forma parte de la cadena hidrófoba de clorofilas y tocoferoles. Es un agente anticancerígeno. Precursor de giberelinas.
Tetraterpenos (C40)	Carotenoides	Pigmentos que participan en la captación de electrones en el proceso de fotosíntesis. Los carotenoides son los responsables de la coloración de flores y frutos. Tienen gran importancia médica pues son antioxidantes y algunos anticancerígenos (licopeno, β -caroteno).
Politerpenos (Cn)	Plastoquinona	Involucrada en el transporte de electrones.

1.4 Los azúcares como reguladores de la expresión génica.

Los azúcares tienen una función importante en el metabolismo de todos los seres vivos debido a que proporcionan esqueletos de carbono para la síntesis de todas las biomoléculas. En las plantas, los azúcares como la sacarosa, glucosa y la fructosa son los principales productos de la fotosíntesis. Estos productos son elaborados principalmente en las células del mesófilo de las hojas y luego transportados como sacarosa, hacia tejidos jóvenes y no fotosintéticos (Rolland et al. 2001).

Está claro que los azúcares pueden actuar como moléculas señalizadoras capaces de reprimir e inducir la expresión de genes. De hecho, la regulación en la expresión genética mediada por azúcares es similar a la que proporcionan las hormonas, mientras que las primeras actúan en un rango de nanomolar a micromolar para dar una señal, los azúcares ejercen su efecto en concentraciones milimolares (Smeekens 2000).

Los azúcares controlan la expresión de genes involucrados en múltiples procesos del ciclo de vida de la planta, desde la germinación, durante el crecimiento vegetativo, la floración y la formación de la semilla. De manera general, se ha observado que bajos niveles de azúcares pueden inducir la expresión de genes involucrados en la fotosíntesis (*CABI*, *RBC'S*) y movilización de reservas (*Amy 3D*). Por el contrario altos niveles de azúcares reprimen la expresión de los genes mencionados e inducen la expresión de genes involucrados en el almacenamiento de azúcares (*AGPS1*). Lo anterior sugiere que al igual que en los microorganismos, la respuesta de algunos genes a los niveles de azúcares, juega un papel importante en la adaptación a los cambios en la disponibilidad de los nutrientes y del medio ambiente. Por otro lado, dado que los azúcares afectan la expresión de una variedad de genes involucrados en varios procesos centrales como: la división celular, metabolismo del nitrógeno y la floración (Tabla 3), resulta claro que tanto las rutas de señalización como el monitoreo de azúcares son importantes en las plantas para controlar diversos procesos de su ciclo de vida (Koch, 1996; Sheen et al 1999).

En el estudio de la regulación genética por azúcares se han utilizado diferentes azúcares y analizado su efecto sobre la expresión de varios genes. Por ejemplo, se ha visto que hay genes que pueden modular su expresión por glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y rafinosa. Sin embargo, para la mayoría de los genes estudiados se ha observado que el efecto de la glucosa es mucho más fuerte con respecto a otros azúcares (Sheen y Jang 1997).

Asimismo, hay genes que responden de manera específica a un azúcar determinado como es el caso de *ATB2*, el cual reprime su traducción sólo por altos niveles de sacarosa (Rook et al., 1998). Finalmente, en células del mesófilo de maíz y algas verdes se ha demostrado que metabolitos intermediarios de la glicólisis como el acetato, también pueden de afectar la expresión de algunos genes fotosintéticos como *CAB* y *RBC'S* (Sheen 1990).

Tabla 3 Genes reportados que regulan su expresión por azúcares

Enzima/Gen	Azúcar	Modo de regulación	Vía de señalización	Función
α -amilasas <i>Amy3D</i>	Glucosa Fructosa Maltosa Sacarosa Rafinosa	Represión -	Hexocinasa	Movilización de reservas (Umemura et al., 1998)
Rubisco <i>RBC'S</i>	Glucosa Sacarosa	Represión -	Hexocinasa	Participa en la fijación de carbono (Xiao et al 2000)
Plastocianina <i>PC'</i>	Sacarosa Glucosa	Represión -	Hexocinasa	Involucrada en la transferencia de electrones en la fotosíntesis (Dikwel 1996; Xiao et al., 2000).
Chalcona sintasa <i>CH-A</i>	Sacarosa Glucosa Fructosa	Inducción +	Independiente de hexocinasa	Enzima clave en la síntesis de flavonoides (Hirokazu et al., 1991; Vitrac et al 2000).
Ciclinas <i>CycD3</i> <i>CyD2</i>	Sacarosa Glucosa	Inducción +	CycD3: Vía independiente hexocinasa CycD2: Vía hexocinasa	Involucradas en la división celular Riou-Khamlichi et al., 2000)
AGPasa <i>Agp81</i>	Sacarosa	Inducción +	Independiente de hexocinasa	Participan en la síntesis de almidón (Wang S-H, 2001)

1.4.1 Vías de señalización de azúcares.

Evidencias experimentales en plantas han demostrado que existen varias vías de señalización por las cuales se perciben los azúcares y se manda una señal que llega al núcleo modificando la expresión de los genes. En una de estas vías participa la HXK1, mientras que otras vías implican moléculas sensoras en la membrana plasmática, a continuación se describen estas vías de señalización y se resumen en la Figura 4.

1.4.1.1 Vía hexocinasa.

Las hexocinasas son enzimas capaces de fosforilar hexosas como glucosa, fructosa, manosa, galactosa etc. La fosforilación de las hexosas es un proceso metabólico muy importante pues es un requisito para el inicio de la glicólisis (Voet y Voet 1992).

En varios organismos se ha demostrado que la hexocinasa está involucrada tanto en la percepción como la señalización de azúcares, por lo que se ha propuesto que esta enzima tiene una función dual, una función catalítica y una sensora (Rolland et al. 2001). En plantas, evidencias de esta función dual fueron dadas por el trabajo de Jang y cols. 1997, analizando los fenotipos de plantas transgénicas de *Arabidopsis* con niveles alterados de la expresión del gen de HXK1. Plantas sobreexpresoras de este gen, mostraron hipersensibilidad a la glucosa, que se manifestó en el detenimiento de su desarrollo en presencia de 4% de glucosa. Por otro lado, plantas antisentido de hexocinasa eran menos sensibles a la glucosa y pudieron continuar con su desarrollo aún en 6% de glucosa. En estas plantas transgénicas, se analizó la expresión de genes que se reprimen (*CABI*, *RBCS*), o se inducen (*NR*) por azúcares. Los resultados mostraron que en condiciones de altos niveles de glucosa había una reducción en la expresión del RNAm de *CABI* y *RBCS* en las plantas silvestres, y una disminución mayor en las plantas sobreexpresoras. Por el contrario, altos niveles de expresión de éstos genes se observaron en las plantas antisentido de *HXK1*. El gen *NR1* que se induce por azúcares fue altamente expresado en las plantas sobreexpresoras con respecto a las plantas antisentido y las silvestres. Esta expresión diferencial en los genes correlacionó con el fenotipo de sensibilidad de las plantas a la glucosa, demostrándose la función sensora y señalizadora de la *HXK1* de *Arabidopsis*. El papel de la hexocinasa como molécula señal es apoyado por experimentos utilizando análogos de glucosa como el 2-deoxiglucosa, el cual es un azúcar, capaz de ser fosforilado

por hexocinasa pero no puede ser metabolizado y que causa represión de *CAB* y *RBCS*. Por su parte, el uso de análogos capaces de entrar a la célula que no son sustratos de hexocinasa como el 6-deoxiglucosa y la 3-O-metilglucosa, no ocasionan efecto sobre la expresión de los genes mencionados (Klein y Stitt 1997).

1.4.1.2 Vías independientes de hexocinasa

a) Moléculas sensores de hexosas

En plantas, se han propuesto mecanismos de señalización por azúcares, que no involucran a la hexocinasa, a partir de la utilización de análogos de glucosa como la 6-deoxiglucosa y la 3-O-metilglucosa. Dichas moléculas pueden ser transportadas a través de la membrana pero no son sustratos de la hexocinasa y sin embargo modulan la expresión de genes que codifican para la invertasa de la pared celular (CIN), la sacarosa sintasa, la fenilalanina amonio-liasa (PAL1), y la patatina clase I (Lalonde *et al.*, 1999). Estos hallazgos han hecho suponer que pueden existir moléculas sensoras en la membrana plasmática que participan en la regulación de genes, de forma similar a lo que ocurre en las levaduras. En estos organismos se ha demostrado la existencia de dos proteínas transmembranales (SNF3 y RGT2), que responden a diferentes concentraciones de azúcares. SNF3 tiene alta afinidad por la glucosa y al percibir bajas concentraciones de glucosa en el medio, induce la expresión de genes que codifican para transportadores de alta afinidad, mientras que en altas concentraciones de glucosa se reprimen. Por otro lado, Rgt2 tiene baja afinidad y al percibir altas concentraciones de glucosa induce la expresión de transportadores de baja afinidad. (Koch 2000). Estas proteínas no parecen tener la función de transportadores, sin embargo, su función sensora, la puede llevar a cabo interactuando con los transportadores de manera directa o a través de otras proteínas.

b) Moléculas sensoras de sacarosa.

Existen evidencias de que el transporte de sacarosa hacia la célula puede enviar una señal que finaliza en la regulación de la expresión de genes. Esta hipótesis se sustenta por el hecho de que existen genes como *ATB2* que exclusivamente reprimen su traducción por sacarosa, mientras que azúcares como glucosa y fructosa solos o en combinación no ejercen ningún efecto (Rook *et al.*, 1998). Esta vía de señalización también podría involucrar directamente al transportador *per se* o a otras proteínas.

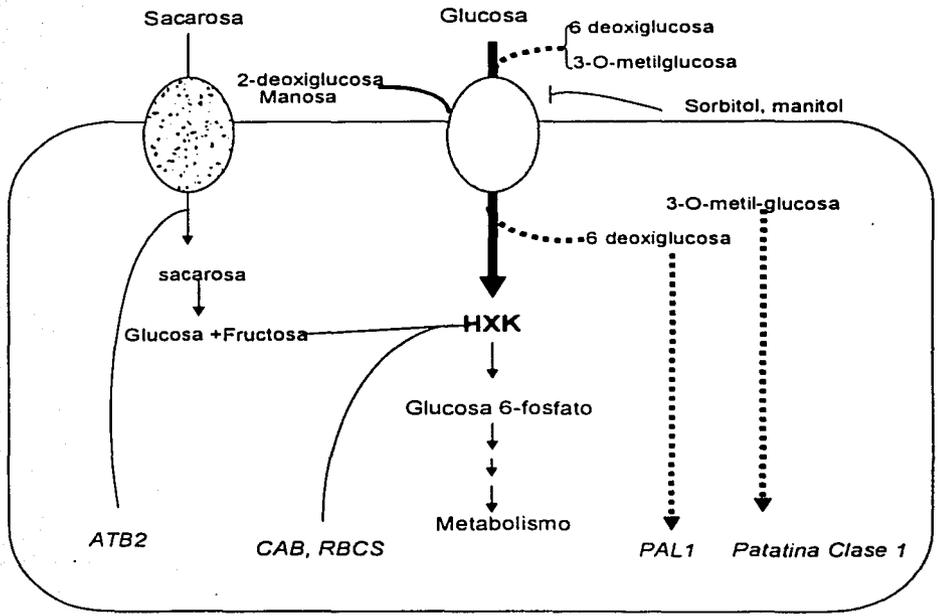


Figura 4 Modelo que muestra las diferentes vías de señalización por azúcares: vía hexocinasa, y vías independientes de hexocinasa. *RBCS* subunidad pequeña de rubisco, *PAL* fenilalanina amonio liasa 1, *CAB* proteína de pegado a clorofila.

1.4.2 Moléculas participantes en la cascada de transducción de señales.

El estudio de la vía de señalización por azúcares es muy complejo y se conoce muy poco sobre las moléculas que intervienen en ella, algunos datos de experimentos han proporcionado información de que moléculas como proteínas cinasas, fosfatasas y Ca^{2+} , están involucradas (Smekens 2000). Por otro lado, existen evidencias de que algunas fitohormonas como ABA y etileno también participan. En el caso de la participación de ABA se ha demostrado, a través de la caracterización de mutantes insensibles a la glucosa, que la acumulación de ABA es esencial para la regulación de genes via hexocinasa

(Arenas-Huerta et al., 2000). La participación de etileno ha sido evidenciada tanto en el estudio de mutantes insensibles a altas concentraciones de glucosa, como de mutantes en la síntesis y percepción de etileno. Por ejemplo, la mutante *gin1* puede continuar su desarrollo en 6% de glucosa, en cambio una planta silvestre en las misma condición, detiene su desarrollo. Sin embargo, si las plantas silvestres son tratadas con el precursor de etileno ACC pueden continuar su desarrollo normal en 6% de glucosa. Además plantas mutantes capaces de sobreproducir etileno (*etol-1*) son insensibles a glucosa. Por el contrario, plantas mutantes insensibles a etileno (*etr1-1*) muestran una hipersensibilidad a la glucosa (Sheen, et al., 1999).

1.4.3 Niveles de regulación genética por azúcares

Se sabe que los azúcares regulan una gran cantidad de procesos y lo pueden hacer en distintos niveles como los que se describen a continuación:

1.4.3.1 Transcripción:

El efecto de los azúcares sobre la transcripción ha sido el más estudiado. A través de deleciones en varios promotores, se han localizado secuencias importantes para las respuestas a azúcares. Por ejemplo, el gen *Amy3D* se reprime en altas concentraciones de azúcares y se induce en bajas concentraciones. Estudios analizando el promotor de este gen permitió encontrar secuencias involucradas en la respuesta a azúcares. Dentro de estas secuencias se encontraron motivos de cajas G (CACAT) y el elemento TATCCA (Lu, C. et al., 1998; Hwang, Y-S. et al., 1998). Por otro lado, existen secuencias involucradas en la inducción de genes por azúcares como es el caso del elemento TGGACGG, encontrado en el promotor del gen β -*amy*, el cual codifica para la enzima β -amilasa (Maeo, K. et al 2001)

1.4.3.2 Estabilidad del RNAm:

Se ha reportado que los azúcares pueden modular la estabilidad del RNAm, como en el caso del gen *Ramy 3E*, cuyo mensajero tiene una vida media de 12 horas en células crecidas sin azúcar y sólo de 1 hora con la presencia de azúcar (Sheu et al., 1994). Se han descrito mecanismos regulatorios que modulan la vida media del RNAm y descubierto la

presencia de secuencias en la región 3' no traducida de los RNAm que son responsables de su estabilidad (Atwater et al., 1990). Estudios de los RNAm que codifican para las amilasas 3D permitieron demostrar que la región 3' no traducida es importante en su estabilidad. Un análisis detallado de esta región permitió conocer secuencias ricas en AU. Estas secuencias influyen en la estabilidad del mensajero en bajas concentraciones de azúcar y alternativamente pueden servir de blanco para la degradación del RNAm ante la presencia de altas concentraciones de azúcar (Chan y Yu 1998).

1.4.3.3 Traducción:

La modulación a nivel traduccional también existe en la regulación de genes por azúcares. En particular, esto se ha demostrado para el gen *ATB2*. El estudio de la regulación de este gen se realizó utilizando plantas transgénicas que contenían el promotor de *ATB2* unido al gen reportero *GUS*. Los resultados mostraron una disminución de la actividad de la proteína β -glucuronidasa por sacarosa, mientras que los niveles de RNAm endógeno de *ATB2* y de *ATB2-GUS* no presentaron ninguna represión, sugiriendo la existencia de una regulación a nivel de la traducción de la proteína (Rook et al., 1998).

1.4.3.4 Interacción proteína-proteína

En levaduras se han encontrado moléculas importantes en la vía de transducción de azúcares como lo es el complejo SNF1. Este complejo en bajas concentraciones de glucosa se activa y fosforila a una proteína que se pega a DNA denominada MIG1. La fosforilización le permite a MIG1 mantenerse en el citosol y permitir la activación de genes. En presencia de glucosa, MIG1 se localiza en el núcleo donde interactúa con el complejo represor SSN6/TUP1 para ejercer su acción represora. En plantas como *Arabidopsis* y tabaco se encontró que los homólogos de SNF1: AKIN10 y AKIN11 son capaces de interactuar con la proteína PRL1, que se sugiere tiene un papel importante en la vía de transducción por azúcares. PRL1 se localiza en el núcleo y su mutación incrementa la sensibilidad de las plantas a la glucosa. *In vitro* se ha demostrado en *Arabidopsis* que la interacción AKIN10 y AKIN11 con PRL1 es dependiente de glucosa. En bajas concentraciones de glucosa la interacción se incrementa sugiriendo que estas proteínas responden a señales endógenas de azúcar (Bhalerao et al 1999).

ANTECEDENTES

El estudio de una mutante albina de *A. thaliana* en el laboratorio, reveló que dicha mutante se encuentra afectada en un gen requerido para la síntesis de clorofilas y carotenoides. Además del fenotipo albino, la mutante presenta alteraciones en el desarrollo, observándose una diferenciación rudimentaria de las membranas tilacoidales. Estas cualidades condujeron a nombrar a la mutante como *cla-1* por "cloroplastos alterados" (Mandel et al 1996). Estudios genéticos y moleculares permitieron establecer que la mutación es en un solo gen (*CLA1*). El análisis de la secuencia de aminoácidos de este gen, mostró que podía ser parte de una familia de enzimas denominadas DXP sintasas. Ensayos *in vitro* mostraron con la proteína DXS es capaz de formar el compuesto DXP a partir de piruvato y gliceraldehído 3-fosfato. Además, ensayos *in vivo*, añadiendo el producto DXP a plantas mutantes *cla1*, reversionaron el fenotipo albino a verde, con lo que se demostró que el gen *CLA1* codifica para una DXP sintasa de *A. thaliana* (Estévez et al 2000). Esta enzima cataliza el primer paso biosintético de la vía MEP, que como ya se mencionó es una de las vías por la cual se sintetizan isoprenoides involucrados en distintos procesos biológicos de la planta (Tabla 2). Debido a la gran diversidad de isoprenoides que se producen en esta vía, se predice que este sujeta a diferentes factores de regulación, que pueden influir directa o indirectamente en la biosíntesis de los isoprenoides. Por lo anterior es necesario el estudio detallado de los factores que puedan estar involucrados en la regulación de la vía MEP

Previo a mi trabajo en el laboratorio se había comenzado a caracterizar algunos de los factores de regulación que influyen en la expresión del RNAm de *CLA1* y de la proteína que codifica. Análisis de tipo northern (hibridación DNA:RNA), en plantas de diferentes edades, mostró como resultado que la expresión del gen *CLA1* disminuye con la edad de las plantas. Resultados similares se obtuvieron con el análisis de la proteína realizando experimentos tipo westerns y utilizando plantas transgénicas con el promotor de *CLA1* unido al gen reportero *GUS*. El estudio de la expresión del RNAm y de la proteína en diferentes tejidos de plantas permitió conocer que *CLA1* está presente en la mayoría de los tejidos de la planta (hojas maduras, caulinas, botones y raíces), aunque se detectó una

mayor expresión en etapas de desarrollo jóvenes. El estudio de los niveles de proteína coincidió con lo encontrado con el RNAm (Estévez et al 2000). Por otro lado, en estudios de la expresión del RNAm en diferentes condiciones de luz, se observó que la expresión del RNAm de *CLA1* se induce por luz (Mandel et al 1996). Finalmente, datos preliminares en el laboratorio mostraron que el RNAm de *CLA1* parece ser modulado también por glucosa, este es el antecedente inmediato que dio origen a la realización del presente trabajo, que consistió en analizar con mayor detalle la regulación por glucosa del gen *CLA1* y de explorar el efecto de este azúcar sobre los niveles de la expresión de otros genes de la vía MEP (*ISPC*, *ISPD*, *ISPE*, e *ISPF*).

JUSTIFICACIÓN

El estudio de las rutas biosintéticas de isoprenoides, resulta importante por la gran diversidad de compuestos que se sintetizan, varios de ellos participan en el desarrollo y crecimiento de las plantas, así como también de importancia médica e industrial. Particularmente, una vasta cantidad de isoprenoides involucrados en la fotosíntesis (clorofilas y carotenoides), provienen exclusivamente de la vía MEP. Estos pigmentos son cruciales en el proceso de fotosíntesis, cuya finalidad es la obtención de azúcares. Se ha demostrado que los azúcares son capaces de modular la expresión de genes con implicaciones biológicas importantes. Por tanto, es válido el razonamiento de que los azúcares podrían afectar la expresión de genes implicados en la síntesis de isoprenoides, como una forma de regular su síntesis.

OBJETIVOS

Objetivo general: Evaluar si la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de IPP por la vía MEP son regulados por glucosa.

Objetivos particulares:

- Corroborar si el gen *CLA1* regula su expresión por glucosa.
- Determinar el umbral de concentración de glucosa, capaz de afectar la expresión del gen *CLA1*
- Establecer la vía de señalización de azúcares por la que el gen *CLA1* es regulado.
- Explorar si la glucosa afecta la expresión de otros genes de la vía MEP (*ISPC*, *ISPD*, *ISPE* e *ISPF*).

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material biológico.

Para todos los experimentos se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana*. Según los objetivos de cada experimento semillas silvestres de los ecotipos Wassilewskija (WS) y Bensheim (BE), semillas transgénicas sobreexpresoras de hexocinasa 1 (35-AtHXX1) y antisentido de hexocinasa 1 (35-antiAtHXX1), semillas transgénicas con el promotor de *CLA1* fusionadas al gen reportero *GUS*, y semillas de plantas insensibles a altas concentraciones de glucosa (*gin 5*, *gin 6*, *gin 7*, *gin 8*). Las semillas fueron sembradas en medio de germinación sólido o líquido.

5.2 Esterilización de las semillas.

Las semillas se embeben en agua estéril durante 20 minutos para iniciar su imbibición. Posteriormente se les retira el agua y se desinfectan durante un minuto con etanol 100%, e hipoclorito de sodio al 20% durante 5 minutos. Finalmente, para remover la solución de hipoclorito se deben hacer al menos 5 lavados con agua estéril. Las semillas desinfectadas se siembran en medio de germinación estéril (Ver receta de medios más adelante) y se mantienen 3 días a 4° C con el propósito de romper su latencia, que implica bajar los niveles de ABA para que las semillas puedan germinar.

5.3 Extracción de RNA.

Para la obtención de RNA total, el tejido congelado en nitrógeno líquido, se pulveriza con ayuda de un mortero o politrón. El tejido pulverizado se coloca en un tubo falcon y se añade de 1 a 1.5 volúmenes de buffer Z6 que contiene una alta concentración de clorhidrato de guanidina que ayuda a desintegrar las estructuras celulares. Se añade β -mercaptoetanol para desnaturalizar proteínas (6 μ l por cada ml de buffer Z6) y se adiciona un volumen de fenol/cloroformo, se agita vigorosamente y se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4° C. Al final de la centrifugación se separa la fase acuosa, donde permanecen los ácidos nucleicos, ya que en la fase inferior se halla el cloroformo con las estructuras celulares más pesadas y las proteínas desnaturalizadas en la interfase. A la fase acuosa recuperada se le

agrega 1/20 de volumen de ácido acético 1M y 0.7 volúmenes de etanol al 70%, se mezcla por inversión y se incuba a 20°C de 3 a 4 horas para que precipiten los ácidos nucleicos. Posteriormente se centrifuga a 10,000 rpm durante 30 minutos a 4°C obteniéndose una pastilla de ácidos nucleicos. Esta pastilla se lava con etanol al 70% para quitar el exceso de sales y se resuspende en LiCl 2M incubándose toda la noche a 4°C. El LiCl permite precipitar sólo RNA. Una vez obtenida la pastilla de RNA por centrifugación ésta se lava con etanol al 70% y se deja secar de 5 a 10 minutos. Finalmente, la pastilla de RNA se resuspende en un volumen pequeño de agua estéril. Para cuantificar el RNA se utiliza un espectrofotómetro, el cual mide su absorbancia a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del RNA se evalúa a través de un gel de agarosa al 1.2% teñido con bromuro de etidio.

5.4 Electroforesis de RNA en geles de agarosa.

Para visualizar la integridad del RNA se utilizan geles al 1.2% de agarosa en buffer MOPS 1%. Se corren en cámaras de electroforesis horizontales a 70-80 volts. Las muestras de RNA antes de ser cargadas en el gel, se les añade buffer de carga que contiene formaldehído y formamida que son agentes desnaturalizantes, además de colorantes que ayudan a ubicar la muestra en el gel (ver receta completa en apartado de buffers) y se calientan 5 minutos a 65° C para desnaturalizar el RNA.

5.5 Transferencia del RNA a una membrana de nylon.

Para hibridar los RNAs, se transfieren por capilaridad a una membrana de nylon (Hybon N+), la cual tiene la propiedad de estar cargada positivamente a diferencia de los RNAs que tienen carga negativa. Para ello en un recipiente se añade un buffer que facilite la transferencia (SSC 10X), se coloca un cristal y sobre de éste un papel Whatman 3MM del ancho del gel lo suficientemente largo para que toque la solución, encima se pone el gel y sobre de él la membrana de nylon, evitando la formación de burbujas. Encima se colocan tres hojas de papel Whatman y varios papeles absorbentes. Finalmente se coloca otro vidrio y un peso para que se logre la transferencia por capilaridad. Después de aproximadamente 12 horas de transferencia la membrana se fija por luz UV.

5.6 Hibridación por northern blot.

El DNA que se va a utilizar como sonda para hibridar la membrana se marca radioactivamente con dCTP (α^{32} P) usando el Megaprime RPN 1607 siguiendo las instrucciones del fabricante. Antes de agregar la sonda marcada, la membrana se coloca en un tubo de hibridación al menos una hora, con buffer de prehibridación (ver sección de buffers) con el fin de saturar la membrana y evitar que la sonda se pegue inespecíficamente. Posteriormente la membrana se incuba con la solución en un horno de hibridación a 65°C. Para realizar la hibridación la sonda marcada radioactivamente se adiciona a la membrana y se incuba a 65°C durante aproximadamente 12 horas. Al término de este tiempo la membrana se lava tres veces con solución de lavado (ver sección de soluciones). Para verificar la intensidad de radioactividad de la membrana se utiliza un contador Geiger. Finalmente la membrana se cubre con plástico y se deja exponer en una película de BioMax MS-1 ó X-Omat a -70°C uno ó dos días.

5.7 Obtención de fragmentos de DNA para sonda

Para el gen *CLA1* se utiliza como sonda un fragmento del gen de aproximadamente 1500 pb. Este fragmento se obtiene mediante una digestión del vector pBluescript II KS-, en el que se encuentra clonado el gen, la digestión se realiza con la enzima *Bgl II*. La sonda para el gen *CAB1* se obtiene por digestión del plásmido recombinante correspondiente con la enzima *Eco RI* que produce un fragmento de aproximadamente 1 kb. Para purificar los fragmentos de DNA, éstos se corren en un gel de agarosa al 1 % con 0.5 µg/ml de bromuro de etidio en cámaras horizontales a 70-80 volts con buffer de corrida TAE 0.5 X. La banda de interés se corta y se separa el DNA de la azarosa con minicolumnas Wizard según las instrucciones del fabricante.

5.8 Transcripción Reversa acoplada a PCR (RT-PCR)

5.8.1 Obtención de cDNA

La transcriptasa reversa es una enzima capaz de transcribir en presencia de un cebador (oligo de dT), una hebra de DNA a partir de RNA. Para todas las reacciones se utilizó la enzima Superscript II Rnasa H- transcriptasa reversa (Gibco BRL), ésta enzima se aísla de una cepa de *E. coli* recombinante.

Para sintetizar el cDNA se tomaron 5µl de RNA total de plantas crecidas en diferentes condiciones y se llevó a cabo la reacción de la siguiente forma: el RNA se diluye con 10 µl de agua y se agrega 1µl de oligo de dT el cual complementa con la cadena de poli A del RNA, todo esto se debe incubar a 70°C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionan los nucleótidos cada uno de ellos a una concentración de 10mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP), para evitar la degradación del RNA antes de que se transcriba a cDNA se agrega 1µl de inhibidor de RNasa. La reacción se lleva a cabo en agregando 4 µl de buffer 5X first-strand , 2µl 0.1M de DTT (ditiotreitol), 1ul de la enzima transcriptasa reversa (Superscript) y se adicionan 15 µl de agua. La reacción se incuba 1 hora a 42°C para permitir la polimerización y finalmente la enzima se inactiva a 75°C por 15 minutos.

5.8.2 Reacciones en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica se usa para amplificar un segmento de DNA que se encuentra entre dos regiones de una secuencia conocida. La amplificación se lleva a cabo empleando dos cebadores complementarios al templado que se desea amplificar. Los cDNAs obtenidos por transcripción reversa se usaron como templado para amplificar los genes de interés mediante el uso de los siguientes cebadores:

GEN	CEBADOR 1	CEBADOR 2	Tamaño de DNA amplificado (pares de bases)
<i>ISPC'</i>	5'- GCA-TCG-ATG-AGT-AGT-AGT-GCG-GTT-CTC-TG-3'	5'-CGG-GAT-CCC-TTC-CAA-CAA-CAA-ATT-CTT-CAT-G-3'	1500
<i>ISPD</i>	5'-CTT-TTA-GCT-GGA-GGT-CAA-GGC3'	5'-CAT-CAG-GTG-TTG-TAA-CCT-TGA-TG-3'	525
<i>ISP E</i>	5'GCT-CTT-CTC-ACC-TTG-CAA-GAT-C-3'	5'-CCA-TTC-ATT-AGC-CTC-ACG-CGT-3'	931
<i>ISPF</i>	5'-CGG-CAA-TGG-CTA-CTT-CTT-CTA-C3'	5'GAC-TTC-TAT-TTC-TTC-ATG-AGG-AG-3'	679
<i>APT1</i>	5'-TCC-CAG-AAT-CGC-TAA-GAT-TGC-C-3'	5'-CCT-TTC-CCT-TAA-GCT-CTG-3'	478

5.9 Análisis histoquímica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa..

Para estos ensayos, se toman 3 ó 4 plantas de cada línea transgénica y se embeben en solución X-Gluc el cual es sustrato de la enzima β -glucuronidasa (ver apartado soluciones). La reacción enzimática origina una coloración azul que permite observar *in planta* la actividad del gen *GUS* en los lugares donde se localiza la enzima. Las plantas se incuban en esta solución a 37°C por 12-16 horas. Terminado el tiempo de incubación la solución de X-Gluc se retira y se dan dos lavados a las plantas con agua destilada. Después se lavan 4 veces con etanol al 70% y se añade una solución con acetona:metanol (1:3) para eliminar la clorofila. Finalmente, para eliminar el exceso de solventes, las plantas se lavan al menos 4 veces con agua destilada y se conservan en glicerol a 4°C hasta el momento de su análisis al microscopio.

5.10 Medios de germinación de plantas:

Medio de germinación (GM)

1X mezcla de sales de Murashige and Skoog (MS) salts mixture (Gibco BRL).

1% de sacarosa.

0.5 g/l de MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico) (Sigma)

1 ml/l vitaminas Garborg's B-5 (stock 1000X) . Para 10 ml de stock de vitaminas se requiere de 1g mio-inositol, 0.1g tiamina HCl, 10 mg ácido nicotínico y 10 mg piridoxina HCl

El pH del medio se debe ajustar a 5.7 con KOH 1 N y esterilizarse en la autoclave durante 25 minutos a 120°C. Para un medio sólido se agrega 0.8% de fitoagar (GIBCO). Para tener un control de la cantidad de azúcar en los medios, éstos se preparaban con todo lo que contiene el medio GM pero sin sacarosa es decir sin fuente de carbono, con el fin de añadir la cantidad deseada de azúcar, este medio se le nombra ME + % de glucosa utilizado.

5.11 Buffers

Buffer Z6 (1X)

Clorhidrato de guanidina 8M

MES (ácido 2-[N-Morfolino] etanosulfónico) (Sigma) 20mM

EDTA (ácido tetraacético etilenodinitrilo) 20mM

Buffer de prehibridación/ hibridación. (1X)

Modificado de Church y Gilbert SDS 7%

Buffer fosfatos 0.5M pH 7.2

EDTA 10mM

5.12 Soluciones

SSC 20X (stock)

175.3 g de NaCl y 88.2 g de citrato de sodio, disolver en 800 ml de agua. Ajustar el pH a 7 con 10 N de NaOH, ajustar a 1000 ml con agua, esterilizar en autoclave.

Solución de lavado severo

SSC 0.1X y SDS 0.1X

Solución X-GLUC

Buffer de fosfato de sodio pH 7.0	100mM
EDTA	10 mM
Ferrocianuro de potasio	0.5 mM
Ferricianuro de potasio	0.5 mM
Tritón X-100	0.5 mM
X-Gluc en DMSO (sustrato)	1 mg/ml

Preparación de geles de RNA

Para 30 ml de gel

Iodocetamida 0.276 g

Agarosa 0.36 g (1.2 %)

MOPS 10X 3 ml

H₂O 27 ml

Buffer de carga de muestras de RNA.

MOPS 10X	8.2%
Formaldehido	18%
Formamida	75%
Bromuro de etidio	5%
Azul de bromofenol	0.25%
Xileno cianol	0.25%
Glicerol	3%

Geles agarosa para DNA (1%)

Para 100 ml de gel

1g de agarosa

0.5% de TAE

99 H₂O Añadir 4 μ l de bromuro de etidio (stock 10mg/ml) por cada 100 ml de agar.

RESULTADOS

6.1 Altas concentraciones de glucosa reprimen la expresión del gen *CLA1*

El efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *CLA1* se analizó a través de experimentos tipo northern, empleando RNA total de plantas silvestres (WS) de *Arabidopsis*, que fueron crecidas en medio sólido ME con 2% y 7% de glucosa. Como puede verse en la Figura 5, la expresión del gen *CLA1* es reprimida en presencia de glucosa al 7%.

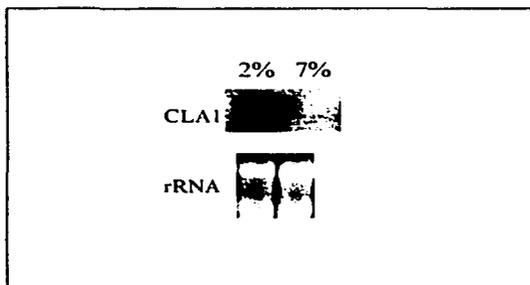


Figura 5 Represión del gen *CLA1* por altas concentraciones de glucosa. RNA de plantas silvestres (WS) fue extraído e hibridado con el gen *CLA1*. Como control de carga se muestra el gel teñido con bromuro de etidio donde se observan los RNA ribosomales.

6.2 Umbral de concentración de glucosa en la que disminuye la expresión de *CLA1*.

Con el objetivo de determinar la concentración de glucosa capaz de disminuir los niveles de transcrito de *CLA1*, plantas silvestres del ecotipo WS fueron sembradas y mantenidas por 15 días en medio de germinación (GM), medio ME sin fuente de carbono y medio ME con concentraciones crecientes de glucosa (ver apartado medios). La presencia de altas concentraciones de glucosa (6% y 7%) afectan el desarrollo normal de las plantas como se puede apreciar en la Figura 6A. Las plantas que crecen en GM son de color verde claro, tienen una raíz principal larga y desarrollan hojas verdaderas. Esto contrasta con las plantas que crecen en ME sin fuente de carbono, que poseen una raíz corta y gruesa y no logran desarrollar hojas verdaderas, puesto que las plantas que crecen *in vitro* se comportan como heterótrofos. Las plantas que crecen en 2% y 3% de glucosa son de tamaño mayor, desarrollan una raíz principal larga y varias raíces laterales, mientras que plantas que crecen en 4% y 5% son de color verde oscuro y tienen raíces más gruesas. Finalmente plantas que crecen en concentraciones de 6% y 7% no expanden sus cotiledones, acumulan antocianinas y poseen una raíz muy corta. De las plantas crecidas en las condiciones anteriores se extrajo RNA total y se analizó la expresión del gen *CLA1* mediante hibridación tipo northern (Figura 6B). Los resultados muestran expresión del gen *CLA1* en plantas crecidas en medio GM, en ME sin fuente de carbono y ME con 2% de glucosa mientras que a partir de 3% de glucosa no se detecta expresión del RNAm. Como control positivo se utilizó el gen que codifica para plastocianina (Figura 6C), que reprime su expresión en altas concentraciones de glucosa (Dijkwel *et al.*, 1996). Como control de carga se muestra el gel teñido con bromuro de etidio donde se aprecian los RNA ribosomales (Figura 6D).

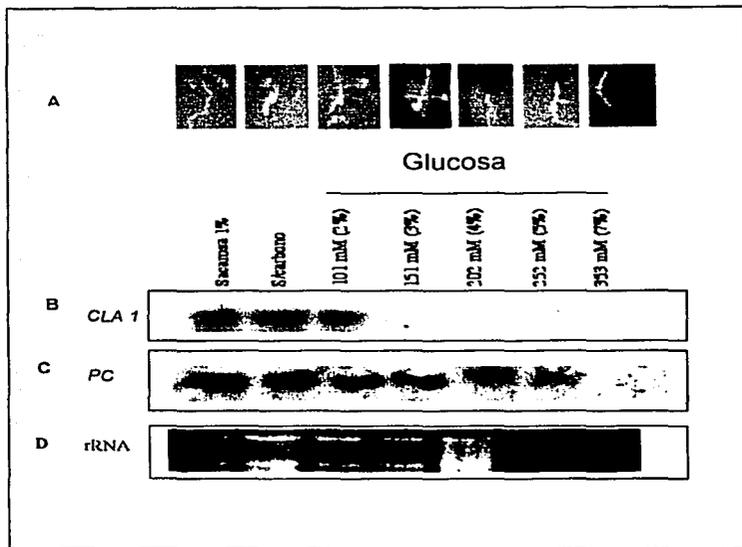


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la expresión del *CLA1*. A. Fenotipo que presentan plantas (WS) crecidas durante 15 días en diferentes concentraciones de glucosa. B Análisis de la expresión del gen *CLA1* por northern de las plantas mostradas en A. C Expresión del gen *PC* fue utilizada como control positivo. D Se muestran ribosomales como control de carga.

6.3 La expresión del gen *CLA1* parece regular su expresión vía hexocinasa.

Para conocer si en la represión del gen *CLA1* por glucosa participa la *HXX1*, se realizaron experimentos usando plantas transgénicas de *Arabidopsis*, sobreexpresoras y con bajos niveles de *HXX1* (antisentido). Estas plantas fueron germinadas en medio GM líquido y crecidas durante 6 días en oscuridad en medio GM (control) ó con ME con 5% de glucosa (el propósito de mantenerlas en oscuridad fue para reducir los niveles endógenos de *CLA1* y finalmente fueron inducidas durante 5 horas en luz. Los resultados muestran altos niveles de transcrito de *CLA1* en plantas silvestres (BE) crecidas en la condición control y disminución de la expresión en presencia de 5% de glucosa (Figura 7 carriles 1 y 4). Por su parte, el transcrito de *CLA1* en las plantas sobreexpresoras de *HXX1* crecidas en 5% de glucosa disminuye notablemente en comparación con las plantas silvestres y las plantas con el gen en antisentido crecidas en la misma condición (Figura 7 carriles 4, 5 y 6). Los resultados muestran que existe una clara respuesta diferencial de la expresión del RNAm de *CLA1* entre las plantas sobreexpresoras y las plantas con bajos niveles de *HXX1*, lo que sugiere que la expresión del RNAm de *CLA1* responde a los niveles de *HXX1*. En la Figura 7B se muestra la expresión del gen *CAB* en éstas plantas transgénicas, que se utilizó como un control positivo debido a que este gen reprime su expresión por azúcares vía hexocinasa (Xiao et al., 2000). En la Figura 7C se muestra el gel teñido con bromuro de etidio como control de carga.

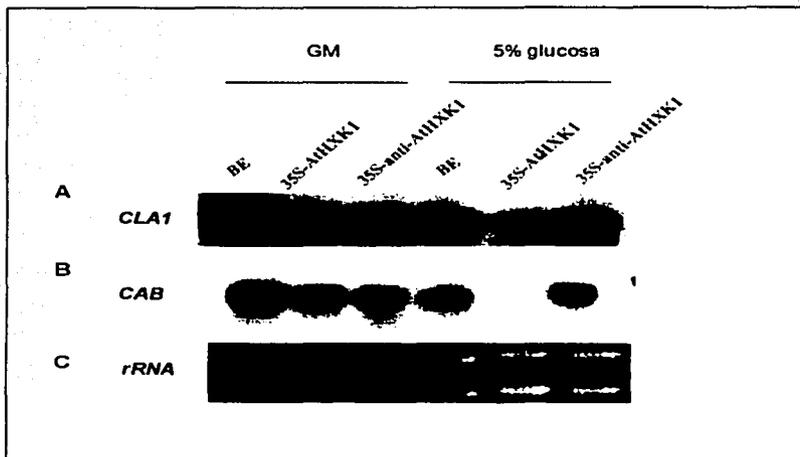


Figura 7 Efecto de niveles alterados de *HXK1* sobre la expresión del gen *CLA1*. A RNA de plantas transgénicas con alterados niveles de *HXK1* y del ecotipo silvestre BE fue utilizado para el análisis de la expresión del gen *CLA1*. B El gen *CAB1* fue utilizado como control positivo. C Se muestran los RNA ribosomales

6.4 La expresión de *CLA1* no está reprimida en varias mutantes afectadas en la vía de señalización por azúcares.

Una de las líneas de interés del laboratorio donde realicé el presente trabajo es elucidar los componentes que participan en la vía de señalización por azúcares. Para ello se ha desarrollado una estrategia experimental que consiste en seleccionar mutantes de *Arabidopsis* que resisten altas concentraciones de glucosa, estas mutantes son denominadas *gin* por insensibles a glucosa. Con la finalidad de analizar la expresión de *CLA1* en mutantes afectadas en la señalización por azúcares, diferentes mutantes *gin* fueron crecidas en baja y alta concentración de glucosa (2% y 6% respectivamente). En la Figura 8 A se muestra represión de *CLA1* en plantas silvestres (WS) crecidas en medio ME con 6% de glucosa, esta represión es menor en las mutantes *gin6* y *gin7* crecidas en la misma condición. La mutante *gin8* presenta una represión similar que la silvestre en presencia de glucosa. El gen CAB fue utilizado como control positivo (Figura 8 B). Por otra parte, la mutante *gin5* no mostró represión en 7% de glucosa (Figura 8 D). Los geles teñidos con bromuro de etidio, que muestran los ribosomales se observan en la Figura 8 C y 8 E.

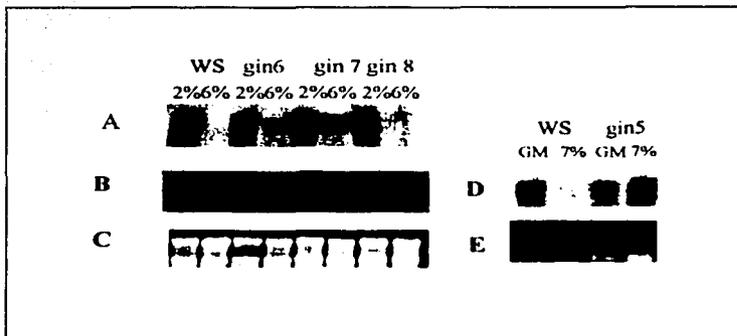


Figura 8 Análisis de la expresión de *CLAI* en diferentes mutantes alteradas en la vía de señalización de azúcares. A y D Análisis de la expresión de *CLAI*. B Análisis de la expresión de *CAB*. C y E Se muestran los RNA ribosomales como control de carga

6.5 El promotor de *CLA1* parece no contener secuencias involucradas en la represión por glucosa.

Uno de los genes reporteros más utilizados para analizar la expresión de un gen *in planta* es *GUS*, que codifica para la enzima β -glucuronidasa. Esta enzima es capaz de hidrolizar una amplia variedad de β -glucuronidos que se pueden conseguir comercialmente y como resultado de la reacción producida se produce un compuesto colorido fácil de visualizar, en los sitios de la actividad enzimática (Jefferson, R. A. et al., 1987). El análisis de la expresión del gen *CLA1* demostraron que este gen se expresa ampliamente por todas las partes de la planta y que altos niveles de expresión se detectan especialmente en tejidos jóvenes (Estévez, J.M et al., 2000). Con el objetivo de conocer si la glucosa provoca algún efecto sobre el patrón de expresión del gen *CLA1 in planta* se utilizaron diferentes líneas de plantas transgénicas que contienen la región completa del promotor de *CLA1* unido a la región codificante del gen *GUS*. Tres líneas de las plantas transgénicas (línea B, 6 y 13), fueron crecidas durante 6 días en medio GM ó ME con 5% de glucosa analizándose la expresión del gen reportero *GUS*, por ensayos histoquímicas (ver técnica en material y métodos). Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la actividad de *GUS* entre las plantas crecidas en GM y las que crecen en 5% de glucosa. Ambas, se tiñen a lo largo de toda la planta con un patrón semejante (Figura 9 A y B). Es importante mencionar que se hicieron varias pruebas manejando diferentes tiempos de incubación con el sustrato (8 a 16 horas) obteniéndose resultados similares a los presentados. Con la finalidad de analizar el nivel de transcrito del gen *GUS* en estas plantas, RNA de las líneas B y 6 fue empleado y analizado su expresión por experimentos tipo northern. Como se puede observar en la Figura 10, ambas líneas transgénicas muestran una inducción cuando crecen en glucosa con respecto a las plantas crecidas en la condición control.

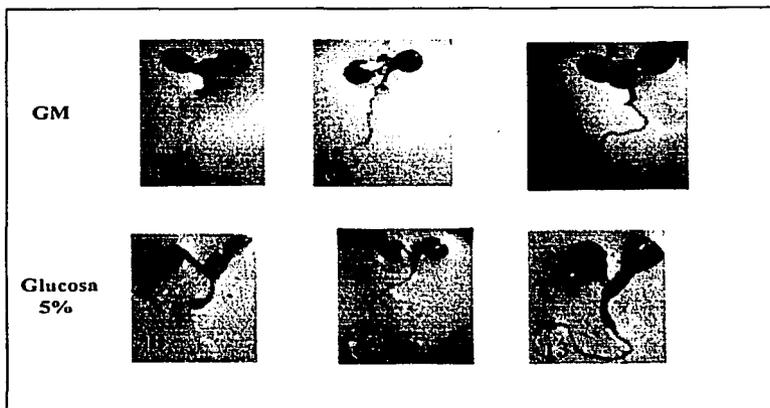


Figura 9 Análisis histoquímico del efecto de la glucosa sobre la actividad del gen *GUS* bajo el control del promotor de *CLA1*. Plantas transgénicas de las líneas B, 6 y 13 fueron crecidas en medio GM ó en medio con 5% de glucosa.

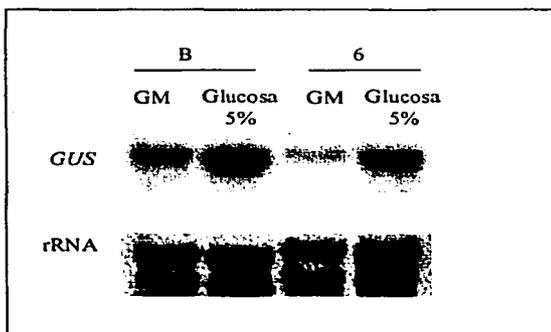


Figura 10 Efecto de la glucosa sobre la expresión del gen *GUS* unido al promotor de *CLA1*. RNA fue extraído de las líneas transgénicas B y 6 crecidas en GM o en 5% de glucosa y analizado la expresión de *GUS* por northern. Como control de carga se muestran los RNA ribosomales sobre la membrana de nylon teñida con azul de metileno.

6.6 El promotor de *CLAI* contiene secuencias involucradas en la respuesta a azúcares.

El análisis de la secuencia del promotor por medio de la base de datos Plant Care (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/>), reveló la presencia de varias secuencias que han sido reportadas como elementos reguladores implicados en la respuesta a azúcares (Figura 11). Estos elementos, TATCCAT/C y cajas G (ACGTGGC) han sido descritos en genes como *Amy3D*, *Amy3E* y *Ami1A*, que reprimen su expresión por glucosa. Las cajas G además han sido descritas como importantes en la respuesta a luz.

En los genes referidos, se ha demostrado que las secuencias mencionadas son importantes para el control de su transcripción en condiciones donde el azúcar es limitante. Incluso el elemento TATCCAT/C se ha clasificado como un "enhancer", debido a que si se añaden varias copias de éste en el promotor aumenta la transcripción. Por otro lado, se ha demostrado que existen proteínas nucleares capaces de pegarse a éstas secuencias (Lu et al., 1997). La presencia de estas secuencias en el promotor de *CLAI* es interesante porque el análisis del promotor de éste gen en plantas transgénicas (*CLAI:GUS*), no demostró que la región regulatoria 5' estuviera implicada en la represión por glucosa. Si se llegara a demostrar que estas secuencias son funcionales, se podría hipotetizar que la regulación de *CLAI* en condiciones limitantes de azúcares puede ser mediada a nivel transcripción, mientras que la disminución del transcrito de *CLAI* por glucosa puede ser dada a nivel postranscripcional.

GCCAGTTTCGACAAAATTTTATCCA ACTGTTATATTCAA ACTAATTGAAA
 ATCGAAAA ACCCATTAAAAATTAGTTAAAAATAACATATCATTTTGAA
 AATGCCAATATTTAAAAATTAACATATCAATTAACATGCTTGTTTTCT
 TAATAAGTTTTGATATATTATAAAATGAACCGCGTATTACAATTTTCT
 TTTTGTGATGGA ACTGTCGTTAGTTAAACACTTAAACTTAAACTTTCATG
 TAAGTTTTGTTTATTCATATTTGACTCAATTGAAACCCAATAATCAAGAA
 TGTCAAATATTATATGTTTTCTGTCGGATTTGTAACGTGATTCTCGTCA
 TTAATAATGTGATAATATCATAAAATTTAATCTATGTAGTTGTTAATAT
 GATATTA AACTTTATTAATGTAATAAGATCGATAATACCTAAGTTACTAA
 CCCAAATCATTACACTTACGAGTTACGACACATACCGCACTATCTTGTT
 ATATTA AATACTCCTTTTCGTTTCTAATAGTTGATGTTATATCAACATTA
 TTATTTACTTTTCAATTTGTTACCGATAGAAAAGAGGAGAAAATTGTTGACAA
 AACAAAAGAAAAAAGTAAATTAATATTATTAATTAATAAAAAATAACA
 ACTGTAAAAGCTATTTTTAAAAATTTTTCTGTGAAAACATCTAAAAATTA
 TTCTTGTAGAAACAGAAGAATATCATTGAAGATAATAGTGTGAAATATA
 TATATATAGAAAATATATAAAGTAGGATTTTTTTCTGTATACCAAAAT
 ATACGGTTTTCCAATTTTATCAAAAACGTGAAAAGATTTTTTTCTTTGTC
 CAGTACCATGCTAAACTGGTTAATTTTTTATTA AAAAAAAAAATCCAATT
 ACAATTCTTCTATAATCCATTTTAAATTCATTTCTTTATACCCACAAAA
 GATTATATTGCCTTTATCGTCTTTGGTATGTATGCGTGAATATATTTATT
 TATTTCTTTTCTTTTCAATTTCTTTTTAAAGAACTTTATAAATGAAATAA
 GGAACAAAACAATATACACATGCTACTAACGTATATAAATAATATCATCAAT
 ATCTATCCAAACTTGGATTTTCATGGTTGACGTGGCCCAACCAAAATCTC
 AAGTTCTCTGCGGATGACGAACCATCTACCATCTCTTTTTTTCTCTCTCT
 TTTTTTTTTTAAATATCATCAGCACGGTTACATAAAATTCGTGATCCATG
 AAGTTGGCTTTCTTGCTGTTTTACTTCATCACCCATTTTTTAAAGTCT
 CCATCTTATACTTCTCAACTCTCCACCACCACCATTTGTCACCACCACA
 TTTAAACACACACTTTCACTTGTAGTGGGATTTCGAAAGTGGGTTTTATTCT
 ATTTGTTTTACTGTTTTTGATAACCTCAAAATTTGCCTAAATTTTTATTCT
 CTATAAATCCTTATATGTTTTACTTACATTCCATAAAGTTTTCAACTTTCT
 TGAGCTCAAAAAGTACCTCCAATG

Figura 11 Secuencias de nucleótidos del promotor del gen *CLAI*. Se muestran los resultados de la búsqueda de posibles elementos de respuesta de la base de datos PlantCare. TATCCATC =Elemento de respuesta azúcar encontrado en *Amy3D* y *Amy3E*. TAACAAA y CCTTT elementos de respuesta a giberelinas y parcialmente involucrados en la respuesta a azúcar en *Amy1A*. Cajas G (ACGTG)= Involucrados en la respuesta de ayuno de azúcares así como reportados como de respuesta a luz.

6.7 La expresión de los genes *ISPC*, *ISPE* e *ISPF* también se reprimen por glucosa.

Para determinar si otros genes de la ruta MEP como: *ISPC*, *ISPD*, *ISPE*, *ISPF* son regulados por glucosa, se hicieron análisis de expresión por RT-PCR a partir de plantas silvestres (WS). Estas plantas crecieron 15 días en medio GM ó con medio ME con 5% de glucosa. Como se muestra en la Figura 12, los genes *ISPC*, *ISPE* e *ISPF* reprimen su expresión en presencia de 5% de glucosa, mientras que el gen *ISPD* no presenta ningún cambio en su expresión. Como control se utilizó el gen *APT1* que no es regulado por glucosa.

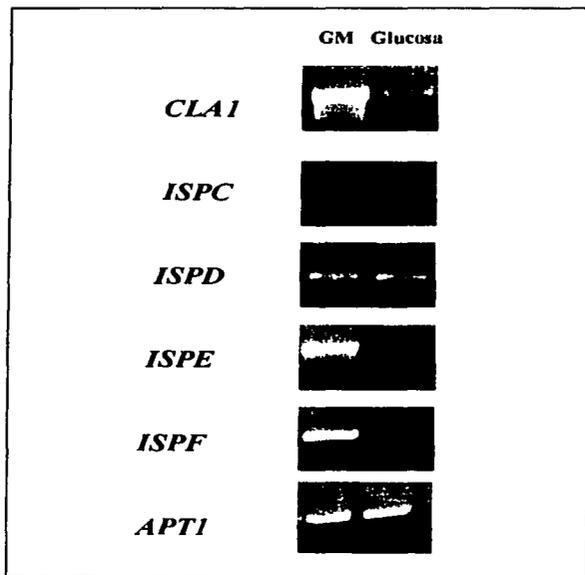


Figura 12. Efecto de la glucosa sobre los genes de la vía MEP. RNA total fue extraído de plantas crecidas durante 15 días en medio de germinación GM con 1% de sacarosa y con 5% de glucosa. 5µg de RNA fue usado para sintetizar cDNA, que se empleó para amplificar por PCR los genes referidos. La amplificación de *APT1* se utilizó como control.

DISCUSIÓN

En este trabajo se reporta el análisis de la respuesta a la glucosa de diferentes genes de la vía MEP, profundizando en el gen *CLA1* que codifica para la enzima DXP, considerada una enzima limitante en la síntesis de isoprenoides. Los resultados muestran que el transcrito de *CLA1* es reprimido en presencia de glucosa y que en el sistema utilizado esta respuesta puede ser dada desde una concentración de 3%. El análisis de plantas transgénicas con niveles alterados de *HXX1*, mostró una clara respuesta diferencial de la expresión de *CLA1* en respuesta a glucosa, entre las plantas sobreexpresoras de *HXX1* con respecto al control y plantas con bajos niveles de *HXX1*. Una mayor represión de *CLA1* fue observada en plantas sobreexpresoras de *HXX1* que sugiere que esta enzima está percibiendo la glucosa y participando en la vía de transducción de señales que da como resultado la represión del transcrito de *CLA1*. La *HXX1* ha resultado participar en la vía de regulación de muchos genes que responden a azúcares y a la fecha ninguno de estos genes responden a otras vías independientes de *HXX1*, es decir las vías parecen ser excluyentes. Sin embargo, para el gen *CLA1* la participación de otras vías de señalización aún tiene que ser demostrada y esto se puede lograr con la ayuda de análogos de glucosa descritos anteriormente.

El transcrito de *CLA1* en algunas mutantes afectadas en la señalización de azúcares no muestra una represión tan fuerte en presencia de glucosa como sucede en plantas silvestres, esto es el caso de las mutantes *gin6* y *gin7*. En cambio, la mutante *gin5* no se observa ninguna represión. Previamente se observó que las mutantes *gin5* y *gin6* tienen alterada la respuesta por glucosa de los genes *CAB1* y *PC*, que son regulados vía hexocinasa, pero no estaban afectadas en la regulación por glucosa de *PAL1*, que es regulado por una ruta independiente de la hexocinasa. Cruzas entre plantas sobreexpresoras de *HXX1* y plantas mutantes *gin5* dieron como resultado en la generación F2, 24% de plantas insensibles a 7% de glucosa (que corresponde al fenotipo de la planta parental *gin5*). Este resultado sugiere que *gin5* participa en la señalización de azúcares vía hexocinasa. (Arenas-Huerta *et al* 2000). Asimismo, la mutante *gin6* también parece participar en la señalización de azúcares vía hexocinasa

(Arroyo A, comunicación personal). Estas evidencias concuerdan con los experimentos aquí reportados, donde se muestra que *CLA1* parece regular su expresión vía hexocinasa. Por su parte, la caracterización de las mutantes *gin7* y *gin8* está iniciando. La mutante *gin8*, presenta una respuesta de *CLA1* a la glucosa casi como las plantas silvestres, que podría sugerir que esta mutante está afectada en un gen que no participa en la vía de transducción de señales que reprime la expresión de *CLA1*.

El patrón de expresión de plantas transgénicas con el promotor de *CLA1* fusionado a *GUS* no mostró diferencias entre plantas tratadas con glucosa con respecto a las plantas control, indicando que en esta secuencia regulatoria no existen elementos importantes para la represión de *CLA1* por glucosa. Una posibilidad es que en la región 3' no traducida del gen *CLA1*, existan secuencias que intervengan en la respuesta a la glucosa. La región 3' ha sido reportada como importante en la estabilidad del RNAm de varios genes. Particularmente, el gen regulado por glucosa como *Amy3D* contienen secuencias regulatorias en la región 3' que determinan la estabilidad del RNAm, aumentándola en ausencia de azúcar y a la vez sirviendo de blanco para la degradación del RNAm en presencia de azúcar (Chan, 1998). Por otra parte, el hallazgo de secuencias que responden a condiciones limitantes de azúcares en el promotor de *CLA1* resulta interesante, porque de demostrarse que son funcionales, podría sugerir que la regulación por azúcares actúa a diferentes niveles, el ayuno de azúcares que permite la inducción del gen *CLA1*, a nivel transcripcional y la presencia de azúcares que afecta su expresión a nivel postranscripcional.

La respuesta a la glucosa de otros genes de la vía MEP fue analizada, en un principio mediante la técnica de northern blot, sin embargo se necesitaban varios días para lograr observar su expresión y no era clara. Lo anterior condujo a pensar que los genes *ISPC*, *ISPD*, *ISPE* e *ISPF*, tienen niveles de expresión más bajos que *CLA1* y por tanto, se recurrió a su análisis por RTPCR. Los resultados obtenidos muestran que a excepción de *ISPD* todos los demás genes estudiados reprimen su expresión por glucosa. Esta regulación diferencial es interesante porque puede indicar un papel específico para cada uno de los genes. Por ejemplo podría ser que *ISPD* no se reprime porque se requieren ciertos niveles de RNAm para mantener la ruta funcional.

Al analizar los efectos de la glucosa, es necesario tomar en cuenta que la glucosa al ser un osmolito puede ocasionar un efecto osmótico en la célula y por tanto ser éste el motivo de la represión de los genes. Sin embargo, para los genes mencionados esto ha sido descartado mediante experimentos con plantas expuestas a manitol y sorbitol, en los que genes estudiados mostraron una clara inducción con respecto al control (Canto-Canché, B. comunicación personal).

En levaduras y bacterias se ha estudiado desde hace tiempo como los azúcares pueden modular la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono que estén a su disposición. En el caso de organismos multicelulares como las plantas, la regulación de genes por azúcares adquiere un significado biológico más amplio que el observado en los microorganismos, puesto que se ha demostrado que los azúcares pueden modular una gran variedad de genes involucrados no sólo en la disponibilidad de los nutrientes sino en procesos como la división celular, la floración, la germinación, el crecimiento vegetativo etc. (Koch, 1996). La regulación de los genes de la vía MEP por glucosa podría tener implicaciones biológicas muy importantes, como queda ejemplificado en el reporte que establece que en *Citrus sinensis* los azúcares disminuyen el contenido de clorofila, indicando la transformación entre cloroplastos y cromoplastos (Huff 1983). Debido a que vía MEP sintetiza en plantas isoprenoides importantes en la fotosíntesis como carotenos y el phytol de las clorofilas, la regulación de la vía MEP por azúcares podría estar involucrada directa o indirectamente en procesos como el mencionado. El estudio de los diversos factores que puedan influir en la modulación de esta vía metabólica pueden influir en el entendimiento de otros procesos biológicos de la planta.

CONCLUSIONES

- La expresión del gen *CLAI* de *Arabidopsis thaliana* es reprimida por glucosa desde una concentración de 3%.
- La represión del gen *CLAI* por glucosa, parece estar mediada por la vía hexocinasa.
- En la región regulatoria 5' de *CLAI*, no hay elementos involucrados en la represión por glucosa. La represión por glucosa puede estar regulada a nivel postranscripcional.
- La expresión de los genes *ISPC*, *ISPE* e *ISPF* de la vía MEP, también disminuyen su expresión en presencia de glucosa.

REFERENCIAS

- Altincicek, B., Kollas, A., Sanderbrand, S., Wiesner, J., Hintz, M., Beck, E. and Jomaa, H. 2001. GcpE is involved in the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia Coli*. *Journal of Bacteriology*. 183:8 2411-2416.
- Altincicek, B., Kollas, A., Eberl, M., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Hintz, M., Beck, E. and Jomaa, H. 2001. LytB a novel gene of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *FEBS* 37-40.
- Arenas-Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J. and León P. 2000. Analysis of *Arabidopsis* glucosa insensitive mutants, *gin5* y *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugars. 14:2085-2096.
- Atwater, J.A., Wisdom, R. and Verma, I. M. 1990. Regulated mRNA stability. *Ann.Rev. Gent.* 24: 519-541.
- Bach, T.J., Boronat, A., Campos N., Ferrer, A. and Vallack, K. 1999. Mevalonate Biosynthesis in Plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34: 107-122.
- Bhalerao, R.P., Salchert, K., Bakó, L., Okresz, L., Szabados, L., Muranak, T., Machida, Y. and Schell, J., Koncz, C. 1999. Regulatory interaction of PRL1 protein with *Arabidopsis* SNF1-like protein kinases. *PNAS* 96: 5322-5327.
- Chan, M.T. and Yu, S-M. 1998. The 3'unstraslated region of a rice α -amylase gene mediates sugar-dependent abundance of mRNA. *Plant Journal*. 15:(5) 685-695.
- Dijkwel, P.P., Kock, P.A.M., Bezemer, R., Weisbeck, P.J and Smeekens, S. 1996. Sucrose represses the developmentally controlled transient activation of plastocianin gene in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* 110: 455-463.
- Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science* 2:78-83.
- Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M.H. and Bacher, A. 1998. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganism. *Chemistry and Biology* 5:R221-R33.
- Estévez, J. M., Cantero, A. Romero, C., Kawaide, H., Jiménez, L.F, Kuzuyama, T., Seto, H. Kamiya, Y. and León, P. 2000. Analysis of the expression of *CLA 1*, a gene that encodes the 1-Deoxyxylulose 5-Phosphate Synthase of the 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 95-103.

- Estévez, J.M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S.O and León, P. 1-deoxy-D-xylulose-5 phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*. 276(25) 22901-229009.
- Gibson, S. 2000. Plant Sugar-response pathways: Part of a complex regulatory web. *Plant Physiology* 124: 1532-1539.
- Hecht, S., Eisenreich, W., Adam, P., Amstlinger, S., Kis, K., Bacher, A., Arigoni, D. and Rohdich, F. 2001. Studies on the non-mevalonate pathway to terpenes: The role of the Gcp E (ISPG) protein. *PNAS* 98(26) 14837-14842.
- Huff, A. 1983. Nutritional Control of Reegrening and Degreening in *Citrus Pell* segments. *Plant Physiology* 73: 243-249.
- Hwang Y-S., Karrer., Thomas, B.R., Chen, L. and Rodríguez, R.L. 1998. *Plant Mol. Biol.* 36 331-334.
- Jang, J-C and Sheen, J. 1997. Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 2(6) 208-214.
- Jang, J-C., León, P., Zhou, L. and Sheen, J. 1997. Hexokinase as sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*. 9: 5-19.
- Klein, D., and Stitt, M. 1997. Effects of 2-deoxyglucose on the expression of *rbcS* and the metabolism of *Chenopodium rubrum* cell-suspension cultures. *Planta* 205: 223-234.
- Koch, K.E. 1996. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 509-540.
- Koch, K.E., Ying, Z., Wu, Y. and Avigne, W.T. 2000. Multiple paths of sugar-sensing and a sugar/oxygen overlap for genes of sucrose and ethanol metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 51: 417-427.
- Kuzumaya, T., Takahashi, S., Watanabe, H. and Seto H. 1998. Direct formation of 2-C-methyl-D-erythrithritol 4-phosphate from 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate by 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase a new enzyme in the non-mevalonate pathway to isopentenyl diphosphate. *Tetrahedron Letters*. 39:4509-4512.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barkey, L., Patrick, J.W. and Frommer, W.B. 1999. The dual function of sugar carriers transport and sugar sensing. *Plant Cell*. 11: 707-726.
- Lange, M. and Croteau, R. 1999. Isopentenyl diphosphate biosynthesis via a mevalonate-independent pathway: Isopentenyl monophosphate kinase catalyzes the terminal enzymatic step. *PNAS* 96:(24) 13714-13719.
- Learned, R. M. 1996. Light suppresses 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 110: 645-655.

Lichtenthaler, H.K. 1998. The plant's 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway for biosynthesis of isoprenoids. *Fett/Lipid* 100: 4-5 128-138.

Lichtenthaler, H.K. 1999. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* 50: 47-65.

Lichtenthaler, H.K. 2000. Sterols and isoprenoids. *Biochemical Society Transactions* 28: 785-789.

Lu, C-A., Lim, E-K. and Yu, S-M. 1998. Sugar response in the promoter of rice α -amylase gene serves as a transcriptional enhancer. *Journal of biological chemistry* 273: 17 1020-1031.

Maeo, K., Tomiya, T., Hayashi, K., Akaike, M., Morikami, A. Ishiguro, S. and Nakamura, K. 2001. Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for β -amylase of sweet potato. *Plant Molecular Biology* 46: 627-637

Mandel, A., Feldman, K.A., Herrera-Estrella, L. Rocha-Sosa, M and León P. 1996. *CLA1* a novel gene required for chloroplast development is highly conserved in evolution. *Plant Journal* 9(5) 646-658.

McGarvey, D.J. and Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1015-1026.

Newman, J.D and Chappell, J. 1999. Isoprenoid Biosynthesis in Plants: Carbon Partitioning with the cytoplasmic pathway. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 34:(2) 95-106.

Riou-Khmlich, C., Menges, M., Healy, S. and Murray, J.A.H. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular and Cellular Biology* 20(13) 4513-4521.

Rodríguez-Concepción, M., Ahumada, I., Díez-Juez, E. Sauret-Gueto, S., Lois, L.M., Gallego, F., Carretero-Paulet, L., Campos, N. and Boronat, A. 2001. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *Plant Journal* 27:(3) 213-222.

Rohdich, F., Hecht, S. Gartner, K., Adam, P., Krieger, C. Amslinger, S., Arigoni, D., Bacher, A., and Eisenreich, W. 2002. Studies on the nonmevalonate terpene biosynthetic pathway: Metabolic role of ISPH (LytB) protein. *PNAS* 99(3) 1158-1163.

Rohdich, F., Klaus, K., Bacher, A and Eisenreich, W. 2001. The non-mevalonate pathway of isoprenoids genes, enzymes and intermediates. *Current Opinion in Chemical Biology* 5: 535-540.

Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Eisenreich, W., Richler, G., Schuhr, C.A., Hecht, S., Zenk, M.H. and Bacher, A. 2000. Biosynthesis of terpenoids 4-Diphosphocytidil-2-C-methyl-D-erythritol synthase of *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 97:(12) 6451-6456.

Rohmer, M. 1998. Isoprenoid biosynthesis via the mevalonate-independent route, a novel target for antibacterial drugs? *Progress in Drug Research* 50: 136-153.

- Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J.M.** 2001. Glucose-sensing mechanism in eukaryotic cells. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 5 310-317.
- Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., Kampen, M.V., Borrias, M., Weisbeck, P. and Smeeckens, S.** 1998. Sucrose-specific signalling represses translation of the *Arabidopsis* *ATB2* bZIP transcription factor gene. *Plant Journal* 15:(2) 253-263.
- Sacchetti, J.C. and Poulter, D.C.** 1997. Creating Isoprenoid Diversity. *Science* 277: 1788-1789
- Schwender, J., Muller, C., Zeider, J. and Lichtenthaler, H.K.** 1999. Cloning and heterologous expression of cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 455: 140-144.
- Sheen, J.** 1990. Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell* 2: 1027-1038.
- Sheen, J., Zhou, L. and Jang, J-C.** 1999. Sugars as signaling molecules. *Current Opinion in Plant Biology*. 2: 410-418.
- Sheu, J.J., Jan, S.P., Lee, H.T. and Yu, S.M.** 1994. Control of transcription and mRNA turnover as mechanisms of metabolic repression of α -amylase gene expression. *Plant Journal* 5: 655-664.
- Smeeckens, S.** 2000. Sugar -induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 49-81.
- Sprenger, G.A., Schorken, U. Wiegert, T., Grolle, S., De Graff, A. A., Taylor, S.W., Begley, T.P., Bringer-Meyer, S. and Sahm, H.** 1997. Identification of a thiamin dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids thiamin and pyridoxol. *PNAS* 94: 12857-12862.
- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H. and Seto, H.** 1998. A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *PNAS* 95: 9879-9884.
- Tsuyaka, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M. and Kameda, Y.** 1991. Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from *Petunia* in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 97: 1414-1421.
- Umemura, T-A., Perata, P., Futsuhara, Y. and Yamaguchi, J.** 1998. Sugar sensing and α -amylase gene repression in rice embryos. *Planta* 204: 420-428.
- Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Defieux, G. and Merillón, J-M.** 2000. Sugar sensing and Ca^{2+} calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins *Phytochemistry* 53: 659-665.
- Voet, D. and Voet, J.** 1992. *Bioquímica*. Ediciones Omega, Barcelona. pp 456-466.