

00591

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNAM
POSGRADO



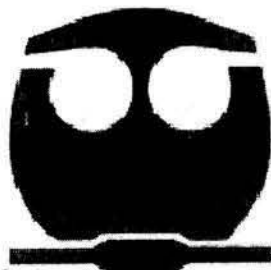
FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CARACTERIZACIÓN DE LOS
TRANSPORTADORES DE
DICARBOXILATOS Y
FOSFOENOLPIRUVATO/FOSFATO
EN EMBRIONES INMADUROS DE
MAÍZ.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)
P R E S E N T A :
AURORA L LARA NÚÑEZ

Tutor: DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES



MÉXICO, D. F.

Junio 2004



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CARACTERIZACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE DICARBOXILATOS Y FOSFOENOLPIRUVATO/FOSFATO EN EMBRIONES INMADUROS DE MAÍZ.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis doctoral se realizó bajo la dirección del Dr. Rogelio Rodríguez Sotres en el laboratorio 115, edificio E, en el Departamento de Bioquímica Vegetal de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres	Facultad de Química, UNAM
Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Dr. Luis Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. Agustín López Mungia, del Instituto de Biotecnología, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de la extracción de plásticos y al Dr. Blas Flores Pérez en cuyo laboratorio se sintetizó el fosfoenolpiruvato marcado con ^{14}C .

Se reconoce la asesoría de Lilián Valencia Turcotte.

El proyecto fue apoyado parcialmente por PAEP-UNAM (203314) y PAPIIT-DGAPA-UNAM (IN201102). Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 11 de junio de 2004.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Dra. Marietta Tuena de Gómez Poyou	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dr. Eduardo Bárzana García	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Dra. Carmen Quinto Hernández	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez	Instituto de Fisiología, UNAM
Suplente	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina
Suplente	Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

Außerhalb des Hörsaals. »Um Ihnen zu beweisen, dass der Mensch im Grunde zu den gutartigen Tieren gehört, würde ich Sie daran erinnern, wie leichtgläubig er so lange gewesen ist. Jetzt erst ist er, ganz spät und nach ungeheurer Selbstüberwindung, ein mißtrauisches Tier geworden –ja! Der Mensch ist jetzt böser als je-«-Ich verstehe dies nicht: warum sollte der Mensch jetzt mißtrauischer und böser sein? - » Weil er jetzt eine Wissenschaft hat- nötig hat!«

Friedrich Nietzsche. Die Fröhliche Wissenschaft

Dedicatorias

Dedico este trabajo a mi familia:

A mi mamá por que con su vida le da sentido a la mía; a mi papá por su apoyo y por estar ahí siempre.

A mis hermanos: Isolda, Manuel, Rogelio, Gerardo, Odette y Arturo. Por ser parte importante en mi vida, por estar conmigo en las situaciones buenas y malas, por ser siempre un apoyo incondicional.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Aurora Lara Núñez

FECHA: 10 junio 2004

FIRMA: Aurora Lara Núñez

Agradecimientos

Agradezco a los miembros del comité tutorial por sus comentarios, su apoyo y la invaluable asesoría en este proyecto. En especial al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres, por ser, además de mi asesor durante ya varios años, un amigo.

Así mismo agradezco al jurado que revisó esta tesis, por su paciencia y por contribuir con su conocimiento a la culminación de este proyecto.

Gracias Sobeida, por el enorme apoyo y confianza en mí.

Un especial agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme ser parte de esta gran institución.

A mis amigos de toda la vida: Paco García, Karina Arenas y Carmen Flores, esto no se hubiera realizado sin ustedes; a mis amigos de alimentos: Milton Altúzar, Chucho Recillas, Omar Rangel y Olivia González, y a Gladis Balcázar. Muchas gracias por estar ahí, por ser quienes son, por escucharme y compartir conmigo su invaluable tiempo.

A mis amigos del alemán: Nahiey Rodríguez, Alberto Zúñiga, Braulio Pérez, Nasheli Ortiz y María Hernández, por ese maravilloso tiempo compartido, por las pláticas interminables, por las noches de desvelo.

A mis compañeros del laboratorio: Lilián Valencia, Beatriz King, Eric Hernández, Ernesto Reyes y Ernesto Navarro por disfrutar de mi música y compartir esta experiencia conmigo, así como a Pilo del 114. En especial agradezco a Ricardo Chávez, magnífico compañero y gran amigo.

Finalmente agradezco a todos aquellos que contribuyeron a la realización de este trabajo, especialmente a Lety García y Adelina González.

Índice

Reconocimientos	2
Dedicatorias	3
Agradecimientos.....	4
1. Abreviaturas	8
2. Resumen	9
3. Abstract.....	10
4. Introducción.....	11
5. Antecedentes.....	14
5.1 Maíz.....	14
5.2 Maduración de la semilla.....	16
5.3 Reservas en la semilla.....	17
5.3.1 Carbohidratos.	17
5.3.2 Lípidos.....	18
5.3.3 Proteínas	18
5.4 Proceso de acumulación de reservas en semillas.....	19
5.4.1 Síntesis de almidón.....	20
5.4.2 Síntesis de triacilgliceroles.....	20
5.4.3 Síntesis de proteínas de reserva.....	22
5.5 Regulación de la biosíntesis de los compuestos de reserva.....	23
5.5.1 Regulación por compartimentalización.....	23
5.6 Papel único de los plástidos.....	24
5.7 Tipos de plástidos.....	24
5.8 Metabolismo dentro de los plástidos.....	25
5.8.1 Glicólisis.....	26
5.8.2. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato.....	28
5.8.3 Ruta del shikimato, síntesis de aminoácidos aromáticos.....	28
5.8.4. Asimilación de nitrógeno.....	29
5.9 Reparto de carbono en semillas de maíz	29
5.10 Transportadores de la membrana interna plastidial.....	30
5.10.1. Canales iónicos.....	30
5.10.2 Intercambiadores	31
5.10.2.1 Los intercambiadores de compuestos fosfatados por fosfato.....	31
5.10.2.1.1 El transportador de triosas fosfato/ fosfato (TPT).....	32
5.10.2.1.2 El transportador de fosfoenolpiruvato/ fosfato (PPT).....	33
5.10.2.1.3. El transportador de hexosas fosfato/ fosfato (HTP).....	33
5.10.2.1.4. El transportador de pentosas fosfato/ fosfato (XPT).....	34
5.10.2.2. Caracterización de los transportadores de fosfato.....	34
5.10.3 Los intercambiadores de dicarboxilatos	35
5.10.4 El transportador plastidial de ATP/APD.....	36
5.10.5 El translocador de glucosa (pGlcT).....	37
6. Planteamiento del problema	38
7. Objetivos.....	39
7.1. Objetivo general	39
7.2. Objetivos particulares.....	39

8. Materiales y métodos.....	40
8.1 Materiales	40
8.1.1 Material Biológico.....	40
8.2 Métodos.....	40
8.2.1 Aislamiento de plástidos.....	40
8.2.2 Determinación de la contaminación de la fracción plastidial.....	42
8.2.3. Cuantificación de las desintegraciones radiactivas mediante centelleo líquido.....	42
8.2.4 Medición del transporte.....	43
8.2.5 Incorporación de precursores marcados en ácidos grasos y proteínas en los plástidos.	43
8.2.6 Extracción de los ácidos grasos y las proteínas plastidiales.....	43
8.2.7. Cromatografía en placa fina	44
8.2.8. Síntesis orgánica de fosfoenolpiruvato.....	45
8.2.9. Determinación de proteína	45
8.2.10 Determinación del espacio permeable.....	46
9. Resultados y análisis.....	47
9.1. Determinación de la pureza y la integridad de los plástidos aislados.	47
9.2. Determinación de la contaminación por otras fracciones celulares de la fracción plastidial.	48
9.3. Intercambiador de malato	48
9.3.1 Condiciones apropiadas para el ensayo de transporte.	48
9.3.2 Naturaleza del transporte del L ⁻ malato.	49
9.3.3 Características del transportador de dicarboxilatos.....	52
9.3.3.1 Transporte activo y pasivo de malato y malonato.....	52
9.3.3.2 Inhibición del transporte de dicarboxilatos.	56
9.3.3.3 Inhibición del intercambio malato/citrato.....	59
9.3.3.4. Caracterización del intercambio de malato/pirofosfato.....	60
9.3.4 Estabilidad del malato y del pirofosfato en las condiciones experimentales empleadas.	64
9.4. Intercambio de fosfoenolpiruvato por fosfato	65
9.4.1 Tiempo de transporte.....	65
9.4.2. Características cinéticas del intercambiador PEP/Pi (PPT).....	66
9.4.3. Efecto de fosfomicina sobre el PPT.	68
9.4.4. Análisis cinético de la inhibición de PPT por FSM.....	69
9.4.5. Otros efectos de la FSM	71
9.4.6. Inhibición del PPT por arsenato y vanadato.....	71
9.5. Síntesis de lípidos y proteínas en el interior del plástido.	72
9.5.1. Incorporación de [¹⁴ C]-acetato y [¹⁴ C]-malato en lípidos y proteínas plastidiales.....	75
9.5.2. Incorporación de acetato en relación al transporte de dicarboxilatos.....	76
9.5.3 Incorporación de malato marcado en relación con el transporte de dicarboxilatos.....	79
9.5.4 Efecto del pirofosfato en la incorporación de malato marcado en plástidos aislados.	80
9.5.5. Incorporación de acetato marcado en relación a PPT.....	82
10. Discusión	86
11. Conclusiones.....	89
Bibliografía.....	90
Artículo aceptado.....	95

1. Abreviaturas

PEP, fosfoenolpiruvato; Pi, fosfato inorgánico; TAG, triacilglicéridos; UDP-Glc, uridina difosfo glucosa; Fru-6P, fructosa 6 fosfato; Glc-6P, glucosa 6 fosfato; HPT, traslocador de hexosas fosfato/fosfato; ADP-Glu, ADP glucosa; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; acetyl-CoA, acetyl-coenzima A; ACP, proteína acarreadora de acilos; MDH, enzima málico deshidrogenasa; NADH, nicotin adenina dinucleótido; NADPH, nicotin adenina dinucleótido fosfato; ATP, adenina trifosfato; OPPP, ruta oxidativa de las pentosas fosfato; FSM, fosfomicina; PK, enzima piruvato cinasa; AGPasa, ADP glucosa pirofosforilasa ; TPT, translocador de triosas fosfato/fosfato; 2PGA, 2 fosfoglicerato; 3PGA, 3 fosfoglicerato; PPT, translocador de fosfoenolpiruvato/fosfato; FBPasa, fosfofructo cinasa; XPT, translocador de xilulosa fosfato/fosfato; Xul, xilulosa; ACCasa, acetyl coenzima A carboxilasa; pGluT, proteína transportadora de glucosa; DT, translocador de dicarboxilatos; PPI, pirofosfato; OAA, oxaloacetato; ACS, acetyl coenzima A sintasa; PDH, piruvato deshidrogenasa.

2. Resumen

En este trabajo se estudiaron las características cinéticas y su posible papel en la distribución de carbono entre lípidos y proteínas de dos intercambiadores de la membrana interna plastidial. El primero, el transportador de dicarboxilatos, tiene la capacidad de intercambiar malato por los dicarboxilatos oxaloacetato, malonato, maleato, succinato, glutamato y aspartato, por el tricarboxilato citrato e, inesperadamente, por el ión pirofosfato. El *n*-butilmalonato, un inhibidor clásico de los transportadores de dicarboxilatos en mitocondria, inhibió los intercambios malato/malonato, malato/citrato y malato/pirofosfato, y además se encontró que el mecanismo de inhibición del intercambio malato/malonato es competitivo. Es necesaria la presencia de sustrato en ambos lados de la membrana plastidial para que se lleve a cabo el intercambio de manera eficiente. Altas concentraciones de sustrato (5 mM) hacen evidente un transporte pasivo lento, mientras que a bajas concentraciones de sustrato la cinética de transporte se puede ajustar a un mecanismo tipo Michaelis-Menten. La actividad de intercambio de dicarboxilatos no se vio afectada por un gradiente de protones, por la presencia de fosfatos o sulfatos ni por la presencia de un desacoplante (CCCP). La actividad de intercambio de dicarboxilatos puede estar mediada por una o más proteínas con características cinéticas semejantes y su función podría ser la de proporcionar poder reductor al estroma y carbono, al intercambiar pirofosfato por malato o malato por citrato para alimentar la síntesis de ácidos grasos en el interior del plástido, de tal manera que este transportador podría ser una puerta de entrada al plástido de carbono y poder reductor.

El segundo de los transportadores estudiados en este trabajo es el que intercambia fosfoenolpiruvato por fosfato. Se encontró que este intercambiador presenta una alta afinidad por fosfoenolpiruvato y por 2-fosfoglicerato, pero transporta pobremente triosas fosfato. También se encontró que la fosfomicina, un análogo del fosfoenolpiruvato, inhibió la actividad del intercambio PEP/Pi con un mecanismo de inhibición incompetitivo. Asimismo, el arsenato y el vanadato, ambos iones análogos del fosfato, también inhibieron la actividad de este transportador, aunque se requiere mayor cantidad de cualquiera de estos dos iones que de fosfomicina para lograr un efecto de inhibición similar. El papel de este segundo transportador sería el de aportar carbono en forma de fosfoenolpiruvato para la síntesis de ácidos grasos y energía en forma de ATP vía glicólisis.

3. Abstract

The kinetic characteristics of two inner membrane translocators of the maize embryos plastids are presented here in relation to their possible roles in the regulation of carbon partition.

First, the dicarboxylate translocator is able to exchange malate for the dicarboxylates oxaloacetate, malonate, maleate, succinate, glutamate and aspartate; for the tricarboxylate citrate and, unexpectedly, for pyrophosphate. Dicarboxylate transport is efficiently performed only if substrates are present on both sides of the membrane, and *n*-butylmalonate, a classic inhibitor of the dicarboxylate translocator of the mitochondria, inhibited the exchanges malate/malonate, malate/citrate and malate/pyrophosphate. The malate/malonate inhibition by *n*-butylmalonate was found to be competitive.

The transport showed hyperbolic saturation with high affinity for several dicarboxylates, while at higher substrate concentrations a diffusive component was observed. The exchange dicarboxylate activity was not affected by a proton gradient, phosphate or sulfate in the incubation medium, or the presence of an uncoupler (CCCP). This activity could be mediated by one or more proteins with similar kinetic characteristics, serving as a shuttle for reducing power, but also as a carbon/phosphate exchanger via malate/pyrophosphate. The physiological role of the malate/citrate exchanges is still unclear since a role for citrate has not been proposed inside the plastids.

The second translocator studied in this work exchange phosphoenolpyruvate for phosphate. It was found that this exchanger has a high affinity for phosphoenolpyruvate and 2-phosphoglyceric acid, but transported poorly trioses phosphate. It was also found that phosphomicine, a phosphoenolpyruvate analogue, inhibited the PEP/Pi exchange with an uncompetitive kinetic mechanism. The phosphate isosteric analogs, arsenate and vanadate, also inhibited this translocator activity but with lower affinity.

Physiological evidence provided here is consistent with an entry gate role for carbon skeletons and, possibly energy, played by this transporter during the fatty acid synthesis.

4. Introducción

Las semillas son la fuente de aceites y de proteínas de origen vegetal más importante en el mundo, para el consumo humano, animal y para la producción de alimentos procesados. El alto contenido de reservas nutritivas de la semillas (Tabla 1) está destinado a garantizar el establecimiento de su siguiente generación, aunque hay evidencias claras de que la domesticación de ciertas especies por el hombre ha ejercido presión de selección (Allard, 1999). Como resultado, el contenido de reservas de varias semillas cultivadas pudiera exceder con mucho las necesidades reproductivas reales de la planta. En concreto, al maíz se le considera una planta incapaz de subsistir en ausencia del hombre, pero que a su vez ha influenciado profundamente a las sociedades humanas mesoamericanas, interdependencia que el historiador Arturo Warman designó con el término coevolución (Warman, 1988; Salvador, 1997; Benz y Long, 2000).

Tabla 1. Composición aproximada de algunos cereales empleados para la alimentación humana y animal*.

	Contenido promedio (%)		
	Proteínas	Lípidos	Carbohidratos
Cebada	12	3	76
Maíz	10	5	80
Avena	13	8	66
Centeno	12	2	76
Trigo	12	2	75

*tomada de Bewley & Black, 1994.

El cereal que mayor importancia reviste en la dieta del mexicano es el maíz, ya que es el alimento que aporta más beneficios nutritivos por unidad de precio en nuestro país, además de dar identidad a la gastronomía nacional (Moreno Casasola, 1966). Lo anterior es gracias a su alto contenido de carbohidratos, lípidos y proteínas (Tabla 1). Así, la comprensión de los procesos involucrados en la síntesis y acumulación de los compuestos de reserva durante el desarrollo de esta semilla posee una gran importancia.

Entre los aspectos más interesantes y con mayor potencial biotecnológico, se encuentran los mecanismos mediante los cuales las semillas regulan el uso de los nutrimentos recibidos desde los tejidos maternos para canalizarlos hacia las diferentes reservas y que se traduce en que ciertas semillas acumulen principalmente lípidos y proteínas y otras acumulen grandes cantidades de carbohidratos.

Aunque los últimos años han traído importantes avances en el conocimiento del metabolismo de los carbohidratos de los vegetales, la regulación de la distribución del carbono dentro de la célula vegetal ha recibido relativamente poca atención, lo que se suma a la gran plasticidad que el metabolismo vegetal posee y a la participación de varios compartimentos celulares en la biosíntesis de reservas. Consecuentemente, nuestra comprensión de dichos mecanismos es aún limitada.

El carbono asimilado por las semillas proviene de la planta madre y llega principalmente en forma de sacarosa. Este nutrimento debe ser parcialmente degradado y los productos de su degradación deben ser repartidos para servir en la generación de energía, para la asimilación de nitrógeno que sustenta la síntesis de proteínas y como fuente de esqueletos carbonados para la síntesis de lípidos y otros carbohidratos.

Tanto la síntesis de lípidos, como la de carbohidratos y la de proteínas de reserva involucran a varios compartimentos celulares y, seguramente, la regulación concertada de numerosas enzimas y proteínas membranales que favorecen, restringen y/o regulan el paso de metabolitos de un compartimiento a otro (Emes y Dennis, 1997).

El desarrollo de las semillas de maíz resulta un muy buen modelo para estudiar los procesos de acumulación de reservas, ya que se trata de una semilla grande, con un periodo de desarrollo relativamente corto y, además, en el embrión de la semilla de maíz se acumulan principalmente lípidos y proteínas, mientras que en el endospermo la principal reserva son los carbohidratos (Bewley & Black, 1994). En esta etapa el tejido carece todavía de la capacidad fotosintética y depende de la planta madre para nutrirse. A pesar de ello, el plástido es un organelo esencial, ya que ahí se lleva a cabo la síntesis *de novo* de ácidos grasos, algunos aminoácidos y metabolitos derivados de isoprenoides y terpenos (Neuhaus y Emes, 2000). Para cumplir con su función biosintética, los plástidos no fotosintéticos dependen de los transportadores ubicados en su membrana interna para intercambiar diversos metabolitos entre el estroma y el citosol y de esta manera satisfacer las necesidades de la célula.

Un metabolito clave en el reparto de carbono es el fosfoenolpiruvato (PEP), debido a que es un por un lado (Davies, 1979) intermediario de la glicólisis y puede ser precursor directo en la síntesis de ácidos grasos o en la síntesis de aminoácidos aromáticos, y, por otro, puede ser carboxilado por la enzima PEP carboxilasa y transformarse en malato (O'Leary, 1982; Blurfert *et al.*, 1983). A su vez,

el malato es un intermediario del ciclo de Krebs, importante en la respiración y un precursor de la síntesis de aminoácidos (Glawischnig *et al.*, 2001), que, dentro del plástido, también puede ser un precursor de la síntesis de ácidos grasos.

Para que estos metabolitos puedan entrar al plástido, es necesaria la presencia de transportadores específicos ubicados en la membrana interna del plástido. Estos transportadores pueden jugar un papel relevante en el control del flujo de carbono entre los dos compartimentos celulares, el estroma y el citosol. En esta tesis se aborda el estudio de dos de estos transportadores: el intercambiador de dicarboxilatos y el intercambiador de PEP/Pi, en relación con el metabolismo de los embriones de la semilla de maíz, durante el periodo de llenado del grano.

5. Antecedentes

5.1 Maíz.

El maíz (*Zea mays*) es una gramínea, la cual se piensa es originaria de México, y que ha sido domesticada desde tiempos prehispánicos (Buckler *et al.*, 1998) El fruto de la planta de maíz se llama comercialmente grano, botánicamente es una cariósida y agrícolamente se le conoce como semilla. Ésta esta compuesta por cuatro partes principales: pericarpio, embrión, endospermo y pedúnculo (Reyes 1990).

El pericarpio es la cubierta del fruto y es de origen materno, ya que se forma a partir de las paredes del ovario. Contiene almidón, grasa, proteína, minerales, carbohidratos y fibra (Figura 1).

El endospermo es el principal tejido de reserva de la semilla. Está constituido principalmente por almidón (86.6% del almidón total del grano) y contiene además proteínas; se rodea de una fina capa de células ricas en proteína, denominada aleurona.

El embrión se encuentra inmerso en el endospermo, está formado por los tejidos primordiales de los órganos y aparatos de la planta adulta y que son la radícula, cubierta por la coleoriza, una plúmula con tres a cinco hojas primordiales, cubierta por el coleóptilo y el escutelo o cotiledón, que es el tejido embrionario de reserva. El embrión contiene la mayor cantidad de lípidos del grano (34.4 %; Figura 1).

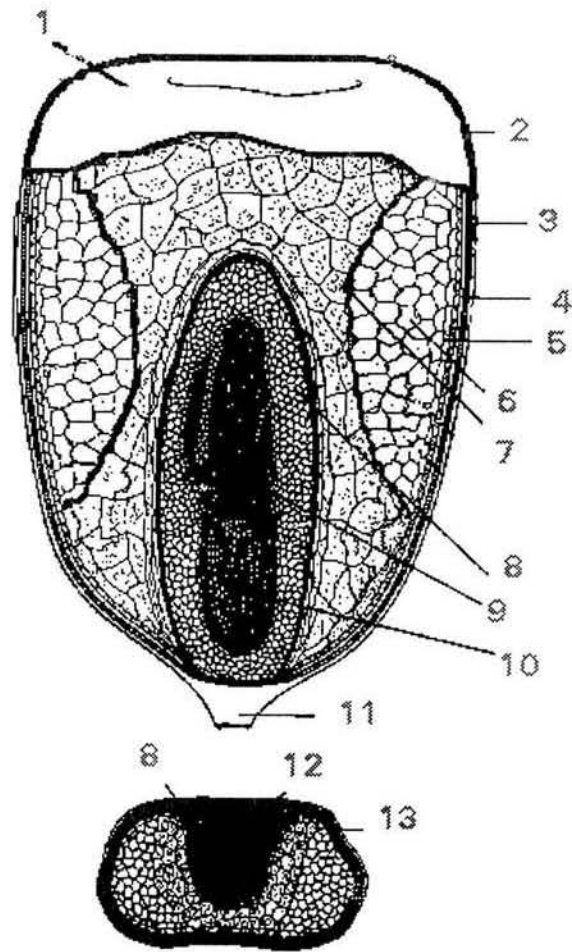


Figura 1. Corte longitudinal y transversal de la semilla de maíz. Las partes que lo constituyen son las siguientes: 1) Pericarpio, 2) Epidermis, 3) Mesocarpio, 4) Cubierta de semilla (testa), 5) Capa de aleurona, 6) Endospermo córneo, 7) Endospermo farináceo, 8) Escutelo, 9) Plúmula, o Tallo y Hojas rudimentarios, 10) Radícula o raíz primaria, 11) Pedúnculo, 12) Eje embrionario, 13) Pericarpio (Tomada de Hosney, 1992).

Durante la germinación, la plántula se desarrolla a partir del embrión nutriéndose gracias a la movilización de las reservas, en tanto el aparato fotosintético llega a establecerse.

En el ciclo biológico del maíz se distinguen varios estadios:

1 Semilla; 2 Germinación; 3 Emergencia; 4 Plántula; 5 Crecimiento activo, 6 Prefloración; 7 Floración masculina (espigamiento); 8 Floración femenina; 9 Polinización; 10 Fecundación; 11

Grano lechoso (elote); 12 Grano masoso (elocinte); 13 Madurez fisiológica; 14 Madurez de cosecha (16-25% de humedad), 15 Grano comercial o semilla (12-14 % de humedad); Rastrojo (planta seca con 12-14% de humedad, sin mazorca).

La composición química de la semilla es variable y está relacionada con: estadio, raza, variedad, tecnología de cultivo y clima.

En general, el maíz tiene alto valor nutritivo como fuente de energía, por su alto contenido de carbohidratos, aunque no posee suficientes proteínas, tanto en calidad como cantidad, por poseer un bajo contenido de dos aminoácidos esenciales: lisina y triptófano, además, es pobre en la vitamina niacina (Reyes, 1990).

5.2 Maduración de la semilla.

De manera general, el desarrollo de la semilla se puede dividir en tres etapas: histodiferenciación, expansión celular y desecación. En la histodiferenciación las células del cigoto dan lugar a los diversos tejidos embrionarios, mientras que el tejido que constituye al endospermo se diferencia para dar lugar al endospermo almidonoso y a la capa de aleurona. La división y diferenciación celular en el embrión cesa generalmente en etapas tempranas del desarrollo de las semillas, lo que marca el final de la histodiferenciación e inicia la segunda fase, llamada de expansión celular o llenado. Esta fase se caracteriza por un aumento en el tamaño de las células y por el depósito de compuestos de reserva en los tejidos de almacenamiento (Bewley & Black, 1994). La actividad de los procesos biológicos de esta segunda fase disminuye gradualmente conforme se reduce el contenido de agua y se llega entonces a una fase final de secado de la semilla. Esta última fase está acompañada de una acumulación de proteínas y carbohidratos especializados que confieren estabilidad a las estructuras celulares, particularmente a las membranas.

Un número importante de los eventos metabólicos en el desarrollo de las semillas son, en términos generales, anabólicos. Mientras las reservas se acumulan, el embrión aumenta de tamaño, pero se retiene la típica forma embrionaria debido a que este crecimiento se sustenta sólo en la expansión de las células ya existentes (Boesenwickel & Bouman, 1995).

La fase final de secado termina con el desarrollo de la semilla, la cual entra en el estado de inactividad o latencia característico de las semillas deshidratadas.

5.3 Reservas en la semilla

Alrededor del 70 % de la alimentación humana proviene directamente de las semillas y una gran proporción del consumo restante de alimentos se deriva de animales, que son alimentados a su vez con semillas. La composición química de la semilla es determinada por factores genéticos y aunque ciertas modificaciones en la composición pueden ser el resultado de prácticas agronómicas o ser impuestas por condiciones del medio ambiente, tales cambios suelen ser relativamente pequeños (Bewley & Black, 1994). A continuación se explicarán brevemente las características de los compuestos de reserva más abundantes en las semillas de maíz, cuya composición se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición promedio de la semilla de maíz

Componente	Porcentaje
Almidón	74.4
Lípidos	4.7
Proteína	9.6
Carbohidratos libres	1.94
Minerales	1.43
Fibra	9.93

Reyes Castañeda, 1990. El maíz y su cultivo

5.3.1 Carbohidratos.

El almidón es el carbohidrato que se halla más comúnmente en las semillas, aunque también carbohidratos como la hemicelulosa, amiloides, celulosa, pectinas, mucílagos y otros di- y trisacáridos pueden estar presentes.

El almidón que se acumula en las plantas es un depósito formado de dos tipos de polímeros de glucosa, la amilosa y la amilopectina. La amilosa es un polímero de cadena lineal de 300 a 400 unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos $\alpha(1\rightarrow4)$. La amilopectina es mucho más grande y consiste en secciones lineales unidas con enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$ que se bifurcan con uniones $\alpha(1\rightarrow6)$ para producir una molécula multiramificada. Además, en el almidón algunos residuos se encuentran esterificados con ácido fosfórico y el grado de dicha fosforilación varía en función de la especie y las condiciones ambientales y nutrimentales de la planta (Bewley y Black, 1994).

La síntesis de almidón se inicia en los amiloplastos, organelos especializados de las células del endospermo que poseen uno o más gránulos de almidón. Durante la expansión hay un incremento gradual en el tamaño del o los gránulos hasta que el amiloplasto se llena por completo. Ya que la síntesis de almidón se lleva a cabo en el interior de los amiloplastos, los azúcares que sirven como precursores pueden ingresar como hexosas, hexosas-fosfato, triosas-fosfato, fosfoenolpiruvato y, posiblemente, incluso como piruvato, ya que el plástido es capaz de incorporar, mediante diversos transportadores, todos estos compuestos y varias evidencias indican que posee las enzimas necesarias para realizar toda la ruta de la gluconeogénesis (Batz *et al.* 1992).

Por otro lado, los azúcares pueden ser empleados en el citoplasma para la síntesis de di-, tri- y tetrasacáridos, lo cual significa que los amiloplastos deberán competir con el citoplasma para poder sintetizar almidón; el balance entre estas dos actividades biosintéticas es determinante de varias características de la semilla, tales como su dulzor y su textura.

5.3.2 Lípidos.

Los principales lípidos que se almacenan en las semillas son los triacilgliceroles (TAG), los cuales consisten en un esqueleto de glicerol con ácidos grasos esterificados en sus tres hidroxilos. El papel de los TAG es el de servir de reserva energética y de carbono. Entre los ácidos grasos más frecuentes en los TAG se encuentran ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (16:0), pero casi siempre predominan los insaturados como el ácido oleico (18:1 Δ^9), el linoléico (18:2 $\Delta^{9,12}$) y el α -linolénico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$).

Algunas semillas también tienen cantidades apreciables de fosfolípidos, glicerolípidos y esteroides. La síntesis de ácidos grasos tiene lugar de manera casi exclusiva en los plástidos, de donde son exportados hacia el retículo endoplásmico para ser esterificados con el glicerol y empaquetados en los llamados cuerpos lipídicos (Huang, *et al.*, 1993).

5.3.3 Proteínas

Las proteínas de reserva de la semillas se depositan en cuerpos proteicos y se clasifican en grupos de acuerdo con su solubilidad: 1) albúminas, solubles en agua; 2) globulinas, solubles en soluciones salinas diluidas; 3) prolaminas, solubles en mezclas de alcohol-agua, y 4) glutelinas, que se disuelven en soluciones ácidas o básicas diluidas. En las semillas de maíz las prolaminas (zeínas) y

las glutelinas se depositan en el endospermo, mientras que las globulinas se depositan en el embrión (Bewley y Black, 1994).

La síntesis de proteínas de reserva se encuentra fuertemente regulada en función del tejido, del estadio de desarrollo de la semilla y la disponibilidad de nitrógeno, azufre y fotosintatos (Shewry, 1995).

5.4 Proceso de acumulación de reservas en semillas.

La fuente de carbono más importante para las semillas de gramíneas es la sacarosa, ya que representa el 85% del carbono total que entra a la semilla. Este azúcar es importado desde los tejidos fotosintéticos hacia la semilla en desarrollo, siendo descargada en las terminales del floema localizadas en la base del grano, en la región llamada pedicelo. Desde ahí, células de transferencia especializadas facilitan la movilización de este recurso desde el tejido materno a la región externa del endospermo en desarrollo. Para facilitar este proceso la sacarosa se desdobra en glucosa y fructosa por las invertasas presentes en el apoplasto del pedicelo y en las células del endospermo. Las células del endospermo emplean las hexosas generadas principalmente para la biosíntesis de almidón, como fuente de carbono y energía, para proveer otras rutas biosintéticas, o bien, para generar nuevamente sacarosa que pueda ser exportada para mantener el desarrollo de las células más interiores y del embrión (Bewley & Black, 1994).

Además de la fuente de carbono, las semillas reciben un aporte de nitrógeno, principalmente como asparagina, glutamina y pequeños péptidos que son transportados desde la planta madre (Bewley & Black, 1994). La formación de otros aminoácidos ocurre dentro de los granos en desarrollo en donde el grupo amino proviene de estos aminoácidos precursores, mientras que los esqueletos de carbono son proporcionados por los carbohidratos translocados. La rapidez de síntesis de proteínas de almacenamiento puede ser controlada por la rapidez a la cual la glutamina y la asparagina son asimiladas, por la capacidad de los tejidos para sintetizar otros aminoácidos, o por el aporte de los esqueletos carbonados requeridos en este proceso (Bewley & Black, 1994).

Los apartados que siguen se enfocan en los procesos metabólicos involucrados en la biosíntesis de los compuestos de reserva más importantes para la semilla.

5.4.1 Síntesis de almidón.

La síntesis de almidón requiere de adenosina difosfoglucona (ADP-Glc) y de glucosa-1-fosfato (Glc-6-P), sustratos de la enzima almidón sintasa, responsable de las síntesis de amilosa (cfr 5.3.1), la que precede a las modificaciones que dan origen a la amilopectina.

Para proveer estos recursos, la sacarosa se convierte en fructosa y UDP-Glc por la enzima sacarosa sintasa, aunque hay evidencias también de la participación de invertasas que generan hexosas libres, que pueden ser fosforiladas por la glucocinasa y la fructocinasa. La hexosa fosfato isomerasa se encargan de convertir a la Frc-6-P en Glc-6-P, mientras que la acción secuencial de las enzimas citosólicas UDP-Glc pirofosforilasa y una fosfoglucomutasa convierten a la UDP-Glc a Glc-6-P.

La Glc-6-P entra al amiloplasto (cfr. 5.3.1) por la actividad de un translocador específico en la membrana interna plastidial, el intercambiador de hexosas fosfato/fosfato. Dentro del plástido la Glc-6-P se transforma en Glc-1-P a través de la fosfoglucomutasa plastidial y también en ADP-Glc por la ADP-Glc pirofosforilasa. La almidón sintasa es una proteína muy compleja que cataliza la transferencia de la posición 4 del extremo no reductor de una cadena de amilosa al carbono anomérico de la ADP-Glc, liberando el ADP. De esta manera se incrementa la longitud de la cadena en una unidad y el proceso se repite numerosas veces.

Por otro lado, la enzima ramificante crea uniones glucosídicas $\alpha(1\rightarrow6)$, introduciendo pequeñas cadenas de residuos de glucosa con uniones $\alpha(1\rightarrow4)$ a la amilosa.

En tejidos no fotosintéticos que acumulan almidón, como el endospermo de la semilla de maíz, la síntesis de almidón se inicia en los proplástidos con la formación de uno (maíz y trigo) o más (arroz, avena) gránulos de almidón pequeños, los cuales ocupan solo una pequeña parte del volumen de este organelo. Después hay un incremento gradual en el tamaño del gránulo (o gránulos), hasta que el amiloplasto maduro esté completamente lleno (Bewley & Black, 1994).

Durante su síntesis, el almidón es fosforilado y el grado de fosforilación es variable, lo que modifica sus características físicoquímicas y, también, favorece que estos depósitos puedan ser degradados más adelante (Bewley y Black, 1994).

5.4.2 Síntesis de triacilgliceroles.

Los lípidos en la semillas se encuentran en dos formas mayoritarias: como reservas metabólicas en forma de triacilglicedroles (TAG) o como lípidos membranales involucrados en la estructura celular, con una cabeza hidrofílica en la posición *sn* 3 del esqueleto del glicerol. La síntesis de ácido grasos está estrictamente limitada al compartimiento plastidial. En algunos tejidos heterotróficos,

como en los cotiledones de varias leguminosas oleaginosas, los lípidos se sintetizan en altas cantidades que pueden llegar a ser hasta el 40 % del peso seco de la semilla. Ya que estos tejidos de almacenamiento son esencialmente no fotosintéticos, flujos substanciales de carbono deben de entrar al plástido durante la biosíntesis de lípidos.

Estudios con plástidos aislados han demostrado que una amplia gama de intermediarios pueden utilizarse en la síntesis de ácidos grasos. Entre éstos, el acetato proveniente de la mitocondria es una fuente primaria para la síntesis *de novo* de ácidos grasos, pero otros precursores citosólicos también son sustratos de esta ruta metabólica como malato, Glc6P, triosas fosfato, piruvato y PEP. Se ha demostrado que en el endospermo de semillas de ricino, el malato formado en el citosol puede ser importado por los plástidos y es descarboxilado para producir piruvato y de aquí acetil-CoA (Smith *et al.*, 1992). La conversión de malato a acetil-CoA, vía la enzima málica y la piruvato deshidrogenasa, genera NADPH, un reductor empleado en la biosíntesis de ácidos grasos.

De manera general, la síntesis de triacilgliceroles se puede dividir en tres fases: (1) la producción del esqueleto de glicerol; (2) la formación de los ácidos grasos y (3) la esterificación del glicerol con los ácidos grasos. Es importante mencionar que para la síntesis de triacilgliceroles no participa el glicerol libre ni los ácidos grasos libres, sino más bien el glicerol-3-fosfato y los ácidos grasos unidos a la coenzima A o a una proteína acarreadora de acilos (ACP).

A continuación se presenta una descripción detallada de la síntesis de ácidos grasos, partiendo desde la sacarosa hasta la cadena naciente de un ácido graso: la sacarosa se transporta a las semillas en desarrollo y se convierte en hexosas fosfato y triosas fosfato por las reacciones de la glicólisis. Posteriormente, la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) se reduce en el citosol para producir glicerol-3-fosfato, el cual es después acilado; la acilación puede ocurrir también en el interior del plástido, pero no está claro cual es aquí la fuente de glicerol-3-fosfato. El acetil-CoA se carboxila para producir malonil-CoA, cuyo residuo de malonil se transfiere a la proteína acarreadora de acilos formando malonil-ACP. El primer paso en la formación de la cadena de ácido graso se da cuando el acetilo del acetil-CoA y un residuo de malonil-ACP se condensan para formar acetoacetil-ACP con la liberación de CO₂. A través de pasos de reducción, empleando NADPH ó NADH, y una deshidratación, el acetoacetil-ACP se convierte en un residuo acilo de 4/C totalmente reducido. La cadena continúa alargándose con la condensación de otro residuo de malonil-ACP, formando un nuevo 3-oxoacil-ACP y liberando un CO₂. Los pasos de reducción y deshidratación se repiten para hacer una cadena de ácido graso saturado y la adición secuencial de unidades de 2 carbonos continúa hasta alcanzar acilos-ACP de 16C (16:0, palmitoil-ACP) a 18 C (18:0, estearil-ACP). Los ácidos libres esteárico o palmítico pueden ser liberados, o el estearil-ACP es casi siempre insaturado anaeróbicamente para producir oleoil-ACP, del cual se deriva el oleato libre (18:1). La

síntesis de acil-ACPs es catalizada por un complejo de enzimas, llamadas el complejo sintetasa de ácidos grasos, que consiste en seis enzimas alrededor de las moléculas de ACP, a la cual están unidos los intermediarios de la ruta de la formación de acilos. A diferencia de la sintetasa de ácidos grasos citoplasmática de las células animales y de las levaduras, las enzimas de la sintetasa plastidial son polipéptidos independientes semejantes a los encontrados en las bacterias (Ohlrogge y Jaworski, 1997)

Los tres ácidos grasos, el palmitato, el estearato y el oleato, dejan el plástido y se unen con la CoA y pueden entonces ser sustratos de las enzimas de la síntesis de lípidos en el retículo endoplásmico. La salida de los ácidos grasos desde el plástido requiere de las tioesterasas, las cuales hidrolizan el enlace entre la ACP y el ácido graso de la Acil-CoA sintetasa, la cual es un enzima membranal asociada a la membrana del plástido. Se ha propuesto que esta última enzima exporta los ácidos grasos al tiempo que los esterifica y que este proceso está acoplado a la entrada de glucosa-6-fosfato al interior del plástido (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

Además del suministro de carbono, la síntesis de ácidos grasos depende de la provisión de ATP y equivalentes reductores. En tejidos no fotosintéticos estos componentes deben ser provistos por el citosol o deben ser generados internamente. La ruta de la glicólisis completa o parcial dentro de este organelo permite la síntesis de ATP a partir de Glc6P, triosas fosfato o PEP; alternativamente, el ATP puede ser importado del citosol (Neuhaus y Emes, 2000). El poder reductor podría ser provisto por la descarboxilación oxidativa secuencial del malato hasta acetyl-CoA, o también por la vía oxidativa de las pentosas.

La síntesis de ácidos grasos dependiente de acetato en leucoplastos en desarrollo en las semillas de ricino se estimula 4 veces cuando se agrega en el medio PEP, comparada a cuando sólo se agrega ATP en el medio. Esto indica que el ATP generado internamente es más efectivo para proveer la biosíntesis de ácidos grasos (Boyle *et al.*, 1990).

5.4.3 Síntesis de proteínas de reserva.

De manera general, la síntesis de las diferentes proteínas de reserva de una semilla y la síntesis de lípidos se inician en la misma fase del desarrollo, pero no de manera simultánea.

En cebada, trigo y maíz las prolaminas, altamente insolubles, se sintetizan en los polisomas asociados al retículo endoplásmico. Las proteínas sintetizadas *de novo* pasan a través de la membrana del retículo endoplásmico al lumen, donde, debido a su naturaleza hidrofóbica, se agregan en pequeñas partículas.

5.5 Regulación de la biosíntesis de los compuestos de reserva.

La mayoría de las semillas contienen dos o más compuestos de reserva en cantidades apreciables y una gran extensión de éstos se sintetizan concomitantemente durante el desarrollo de la semilla. La siguiente discusión se centrará particularmente en la síntesis y la deposición de lípidos y proteínas ya que son los aspectos de mayor interés para el presente trabajo.

¿Qué determina el tipo y la proporción de las reservas que se acumulan en las diferentes semillas? Es una pregunta que sólo ha sido contestada en parte, ya que se ignoran muchos de los mecanismos de regulación del metabolismo durante el desarrollo de las semillas y, en especial, nuestro conocimiento de la regulación concertada que debe ocurrir entre varios compartimentos es bastante limitado.

5.5.1 Regulación por compartimentalización.

La compartimentalización del metabolismo y el secuestro de rutas metabólicas dentro de organelos rodeados por una membrana ocurren en todas las células eucariontes, pero en las células de plantas superiores alcanza mayor complejidad debido a la presencia de los plástidos. En las células eucariotas algunas rutas pueden ocurrir simultáneamente en varios compartimentos; otras son exclusivas de un compartimiento, aunque sus productos deban ser transportados a otras partes de la célula y, algunas más, pueden ocurrir en parte en un compartimiento y ser completadas en otro distinto. La división de la célula en volúmenes pequeños puede servir para concentrar los intermediarios de una ruta y puede prevenir la actividad de los ciclos fútiles. Rutas relacionadas que interactúan a través del suministro y demanda de substratos también pueden estar en proximidad al ser secuestradas juntas.

Como consecuencia de lo anterior, además de la regulación de las enzimas participantes en cada compartimiento, el funcionamiento coordinado de la célula requiere un control del flujo de metabolitos entre las rutas confinadas a los diferentes compartimentos en respuesta a las demandas del metabolismo celular. Esto se alcanza a través de una permeabilidad altamente selectiva de las membranas organelares que limitan el número de intermediarios que pueden ser transportados de un compartimiento al otro y la velocidad con la que son transportados (Emes y Dennis, 1997).

5.6 Papel único de los plástidos.

La diferencia más conspicua entre las plantas y otros organismos es la presencia de un compartimento adicional, el plástido, el cual se encuentra en casi todos los tejidos vegetales. Hay una gran variedad de tipos de plástidos, cada uno de los cuales tiene distintas funciones metabólicas y capacidades. El plástido más comúnmente estudiado es el cloroplasto, al que se le ha puesto mucha atención debido a su papel en la generación fotoquímica de poder reductor y ATP que se utiliza en la biosíntesis reductiva de carbohidratos a partir de CO_2 . Sin embargo, a menudo se ha restado importancia al hecho de que muchas rutas metabólicas, que en las células animales son citosólicas, en la célula vegetal ocurren en los plástidos, tales como la síntesis de polisacáridos de reserva y la síntesis de ácidos grasos. Además, los plástidos son también sitios de biosíntesis de metabolitos que las células animales son incapaces de sintetizar, tales como la síntesis de glutamato y glutamina a partir de nitrato, de los aminoácidos aromáticos, de los carotenos y de otros metabolitos secundarios. Además de estas actividades anabólicas, los plástidos también son capaces de catabolizar hexosas fosfato vía la glucólisis y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato.

Si bien la mayor parte de la capacidad biosintética distintiva de una célula vegetal se asocia con los cloroplastos, en los tejidos no fotosintéticos el carbono y la energía deben ser importados para nutrir las rutas biosintéticas que ocurren en los llamados plástidos heterotróficos.

5.7 Tipos de plástidos

Los plástidos son organelos semi-autónomos, con una amplia diversidad estructural y funcional y rutas biosintéticas únicas. Son capaces de transcribir y traducir la información presente en su propio genoma, pero son altamente dependientes del importe de proteínas que se codifican en el genoma nuclear y se transcriben en el citoplasma. Los plástidos se encuentran presentes en casi todas las células vegetales y su diversidad estructural y funcional refleja su papel en los diferentes tipos de células. De acuerdo a su estado de desarrollo se distinguen como juveniles (proplástidos), diferenciados, maduros y senescentes. Las células meristemáticas contienen proplástidos, lo cual asegura la continuidad de los plástidos de generación en generación; los protoplastos presentan una alta plasticidad estructural y metabólica que les permite desarrollarse en diferentes tipos de plástidos que permanecen interconvertibles.

El metabolismo de los diferentes tipos de plástidos está unido a la función de los tejidos donde se encuentran. Mientras que la función principal de las hojas iluminadas es la asimilación de CO_2 en

carbohidratos proceso que se lleva a cabo en los cloroplastos, los plástidos de raíces están principalmente involucrados en la asimilación de nitrógeno inorgánico.

Los cromoplastos sintetizan grandes cantidades de carotenoides, y son los responsables del color amarillo, anaranjado o rojo de muchos frutos y pétalos de flores y ciertas raíces.

Con el nombre de etioplastos se denominan a los plástidos que se encuentran en hojas de plantas que han crecido en completa oscuridad y que se transforman en cloroplastos cuando la hoja es expuesta a la luz.

Los amiloplastos son plástidos maduros, en los cuales la mayoría de su volumen interno esta lleno de almidón. Se encuentran en las células diferenciadas de raíz y en los tejidos de almacenamiento como cotiledones, endospermo y tubérculos.

La interconversión entre estos tipos de plástidos está acompañada por cambios dramáticos, incluyendo el desarrollo o la regresión de sistemas membranales internos (por ejemplo tilacoides y cuerpos prolamelares) y la adquisición de enzimas específicas que reflejan el metabolismo especializado de cada tipo de plástido. En todas la etapas de diferenciación las dos membranas que limitan la envoltura del organelo permanecen aparentemente sin cambio (Joyard *et al*, 1998).

Localizada en la interfase entre el plástido y el citosol circundante, las cubiertas membranales plastidiales son las estructuras clave para la integración del metabolismo plastidial y la función de la célula; tal coordinación se extiende al desarrollo plastidial y la diferenciación celular, debido a que los plástidos son organelos semi-autónomos. De nuevo, las membranas que cubren al plástido son puntos esenciales en el control de la expresión del genoma plastidial y nuclear, ya que cuentan con al menos dos sistemas de importe de proteínas desde el citosol (Chen y Schnell, 1999).

Las membranas de los cloroplastos poseen varios lípidos característicos, incluyendo galactolípidos y sulfolípidos propios (sulfoquinovosil-diacilglicerol) ; pigmentos, como los carotenoides y la clorofila, y prenilquinonas, como la plastoquinona y los tocoferoles. Aunque la composición lipídica de las membranas de los plástidos no fotosintéticos no ha sido estudiada tan detalladamente, es evidente que dicha diversidad requiere de rutas metabólicas complejas vinculadas a la formación, diferenciación y el recambio de las membranas plastidiales.

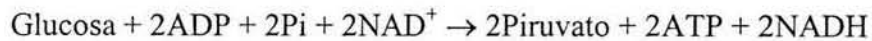
5.8 Metabolismo dentro de los plástidos.

A diferentes niveles, dependiendo de la especie y de la etapa de desarrollo, tanto la glicólisis como la ruta oxidativa de las pentosas fosfato (OPPP) se hallan tanto en plástidos no fotosintéticos como en el citosol. La síntesis de ácidos grasos se realiza de manera exclusiva en el plástido, así como la

ruta del shikimato. Esta última ruta es la que conduce a la síntesis de aminoácidos aromáticos y de otros metabolitos secundarios derivados del indol. Como ya se ha mencionado, también es en el interior del plástido donde se lleva a cabo la reducción de nitrato a amonio y su fijación en aminoácidos.

5.8.1 Glicólisis.

La ruta de la glicólisis está presente en casi todos los organismos, pero hay diferencias importantes con respecto a esta ruta entre las plantas, la bacterias y los organismos animales. La ecuación clásica para la glicólisis es:



Esquema 1. Ecuación química global de la glucólisis.

En estos términos, parecería que la función de la glicólisis es producir solamente ATP y poder reductor en forma de NADH. Mientras que ésta es una función importante de dicha ruta en las células vegetales, especialmente en los tejidos heterotróficos y en las hojas durante la oscuridad, una función no menos importante es la de proveer intermediarios para las rutas biosintéticas. El flujo de carbono que se requiere para satisfacer las demandas de la biosíntesis en las plantas es grande, debido a que estas son autotróficas y pueden sintetizar todos los componentes que necesitan para su crecimiento y desarrollo.

Las unidades de hexosa necesarias para la glucólisis pueden provenir de la degradación del almidón, almacenado en cloroplastos o en amiloplastos. En otros tejidos, especialmente durante el día, el fluido apoplástico puede aportar suficiente sacarosa para satisfacer la demanda glicolítica e, incluso, la síntesis de almidón. En las semillas, la fase de llenado del grano demanda grandes cantidades de sacarosa para la síntesis de lípidos, proteínas y carbohidratos de reserva. En esta etapa del ciclo de vida de una planta, la actividad glicolítica es esencial para sostener la demanda de esqueletos carbonados y, además, para proveer de precursores a la respiración mitocondrial.

La ruta glicolítica en las células vegetales se encuentra en el citoplasma y en los plástidos. Aunque los plástidos de varios tejidos no fotosintéticos, incluyendo los de semillas de ricino y trigo en desarrollo, tienen todo el conjunto de las enzimas glicolíticas de glucosa a piruvato, algunos cloroplastos pueden carecer de una o varias de las enzimas finales de la glicólisis (Plaxton, 1996) (Figura 2). Esta duplicidad le confiere a la planta una gran flexibilidad metabólica.

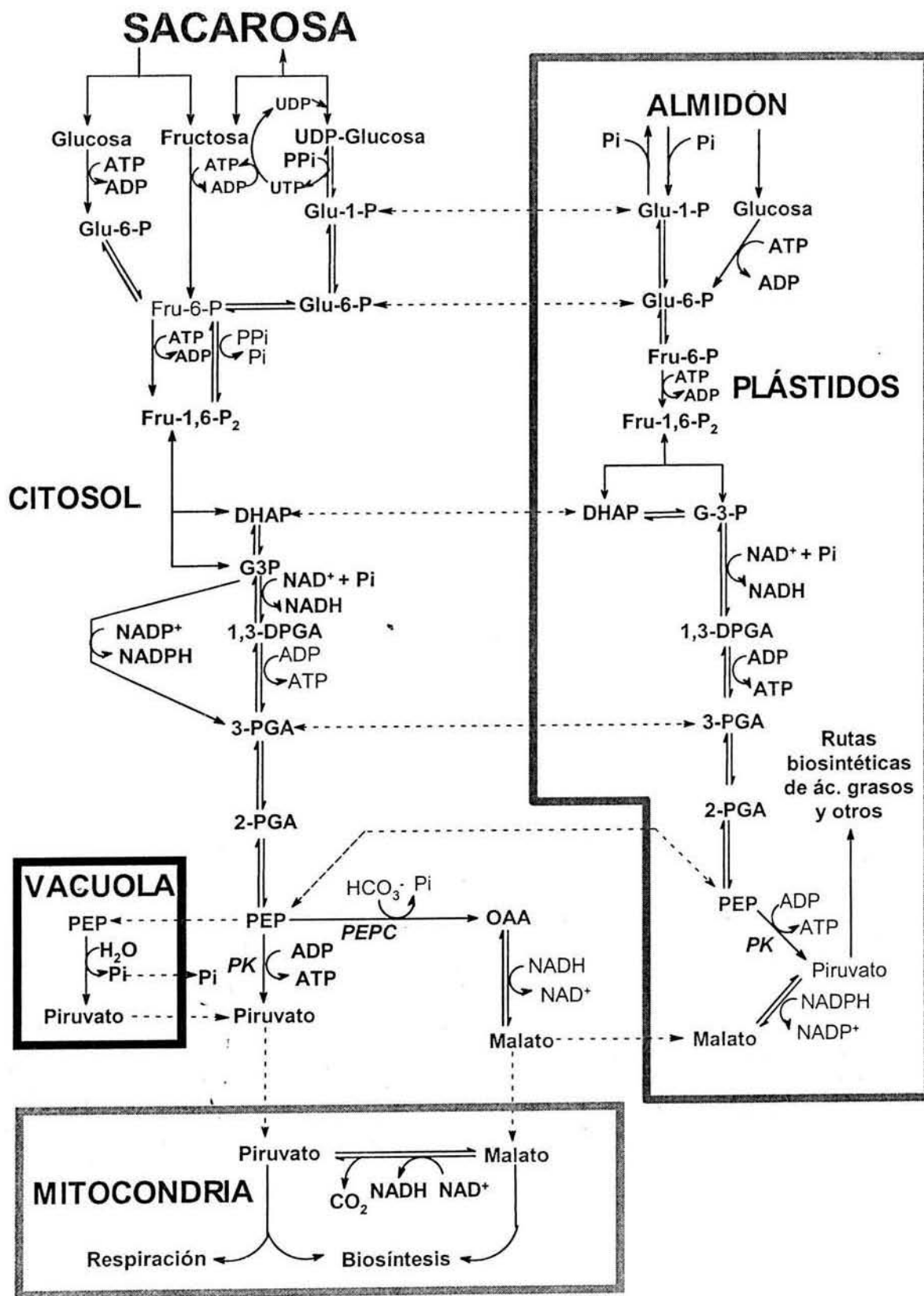


Figura 2. Organización de la glicólisis vegetal. Tomado de Plaxton, 1996.

5.8.2. Ruta oxidativa de las pentosas fosfato

A semejanza de lo que ocurre con la glucólisis, las dos deshidrogenaciones iniciales de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato pueden ser catalizadas por isoenzimas citosólicas y estromales (glucosa-6P deshidrogenasa y gluconato-6P deshidrogenasa). El balance global de la ruta de las pentosas fosfato plantea la degradación de glucosa-6-fosfato hasta CO₂ con la producción exclusiva de equivalentes de oxido-reducción (esquema 2). Sin embargo, la ruta opera cíclicamente permitiendo la oxidación de Glc6P a un mol de CO₂ y un mol de ribulosa-5-fosfato (Ru-5-P). La Ru-5-P se produce en el metabolismo fotosintético de los cloroplastos durante la fase de regeneración del aceptor a partir de triosas fosfato (Ciclo de Calvin-Benson). Los plástidos no fotosintéticos poseen todas las enzimas de este ciclo, pero no la contraparte citosólica. Así, la Ru-5-P puede ser convertida en triosa-P. Las triosas fosfato pueden salir al citosol o permanecer en el estroma, para ser reconvertidas en G-6-P (aunque, claro está, se recupera sólo 5/6 partes de la cantidad invertida inicialmente). Por otro lado, sólo dentro del plástido la Ru-5-P puede ser convertida a Ribosa-5-P, que participa en la síntesis de diversos nucleótidos, o bien ser transformada a eritrosa-4-P, involucrada en la síntesis de aminoácidos aromáticos.



Esquema 2. Reacción química global de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato.

El intercambio de intermediarios entre el citoplasma y el estroma plastidial es fundamental para todos los procesos anteriores.

5.8.3 Ruta del shikimato, síntesis de aminoácidos aromáticos.

La ruta del shikimato une el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de compuestos aromáticos. En una secuencia de siete pasos metabólicos, dos moléculas de PEP y una de eritrosa-4-fosfato se convierten en shikimato y luego en corismato, que es el precursor de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) y de muchos metabolitos secundarios aromáticos. El shikimato y todos los intermediarios posteriores de la ruta pueden ser a su vez precursores de una variedad de metabolitos secundarios en las plantas. Esta ruta sólo se encuentra en microorganismos y plantas, pero no en animales. Varias enzimas de la ruta del shikimato en plantas presentan

isoenzimas cuya expresión está sujeta a regulación tejido-específica y que responde a las condiciones de crecimiento (Herrmann y Weaver, 1999).

5.8.4. Asimilación de nitrógeno.

El paso inicial de la asimilación de nitrógeno inorgánico ocurre en el citosol y es catalizado por la nitrato reductasa, pero todas las reacciones subsecuentes de la asimilación primaria en la biosíntesis de aminoácidos ocurren dentro de los plástidos, tanto en tejidos fotosintéticos como no fotosintéticos. La asimilación de nitrógeno requiere de gran cantidad de ATP y poder reductor, por lo que los plástidos no fotosintéticos tienen que realizar la oxidación de carbohidratos para poder mantener este proceso. El requerimiento de ATP puede ser satisfecho tanto por importe de ATP desde el citosol como a través de la actividad glicolítica dentro de este organelo.

Estudios con amiloplastos aislados de raíz han demostrado que la oxidación de la Glc6-P está fuertemente acoplada a las reacciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa (NiR) y glutamato sintasa (GOGAT) (Bowsher *et al.*, 1992; Bowsher *et al.* 1989).

5.9 Reparto de carbono en semillas de maíz

En un trabajo previo se encontró que si se incuban embriones inmaduros de maíz con [^{14}C]-acetato en presencia de fosfomicina (FSM), un análogo estructural del fosfoenolpiruvato (PEP), se modifica la distribución de la marca incorporada en lípidos y en proteínas, con respecto a la que se observa en embriones incubados solamente con [^{14}C]-acetato. La fosfomicina estimula la incorporación de acetato en proteínas totales y provoca una disminución de la marca en los lípidos totales (Lara-Núñez, 1999). Es este mismo trabajo se analizó el efecto de la FSM sobre dos enzimas claves en el metabolismo carbonado y cuyo sustrato es el PEP: la PEP carboxilasa (PEPC) y la piruvato cinasa (PK), la primera cataliza una reacción anaplerótica al ciclo de Krebs, carboxilando el PEP para producir oxaloacetato y la segunda es una enzima reguladora de la glicólisis que cataliza la conversión de PEP a piruvato produciendo ATP.

Mientras que la FSM estimula *in vitro* la actividad de la PEPC, su presencia inhibe parcialmente la actividad de la PK. El efecto de este compuesto sobre ambas enzimas podría explicar su efecto final sobre el reparto de carbono, ya que al estimular a la PEPC estaría provocando desviación del carbono proveniente de la glicólisis citosólica al ciclo de Krebs y de ahí a la síntesis de proteínas,

mientras que al inhibir a la PK disminuiría simultáneamente el aporte de la glicólisis a la síntesis de piruvato, el cual es un precursor de ácidos grasos.

Sin embargo, en la célula existen otras proteínas cuyo sustrato es el PEP y por lo tanto son blancos de la FSM. Estas otras proteínas son parte del metabolismo del plástido. Por un lado se encuentran las enzimas que participan en la síntesis de aminoácidos vía la ruta del shikimato, pero no hay que olvidar la actividad del transportador de PEP por fosfato, que bien podría ser inhibido por este antibiótico.

Lo anterior hace que la interpretación del efecto de la FSM con base a su efecto sobre la PEPC y la PK sea incompleta. Entre otras cosas, dicha explicación supone que el piruvato es mejor sustrato para la síntesis de ácidos grasos que el malato, lo que tampoco se sabe con certeza, ya que se ha reportado la presencia de intercambiadores de dicarboxilatos en cloroplastos, como el intercambiador de malato por fosfato en plástidos de ricino, y la existencia de una malato deshidrogenasa descarboxilante plastidial, cuya actividad permitiría la conversión de malato en piruvato en el interior de los plástidos.

5.10 Transportadores de la membrana interna plastidial.

Los plástidos están rodeados por dos membranas, conocidas como membrana interna y externa. Éstas se distinguen por su estructura, función y propiedades bioquímicas, pero también cooperan, por ejemplo, en la síntesis de lípidos y en la translocación de proteínas codificadas en el núcleo. En esta sección se presentan las características de los principales transportadores inmersos en la membrana interna plastidial.

5.10.1. Canales iónicos

Los canales iónicos de la membrana plasmática de las células vegetales y de las membranas de organelos están involucrados en la regulación del volumen, en el transporte transepitelial y en la regulación del potencial de membrana. En los cloroplastos, los canales iónicos participan en la homeostasis del pH a través de la membrana interna y a través de las membranas de los tilacoides.

La mayoría de los canales iónicos de plantas pueden discriminar a favor de cationes o de aniones. Los más importantes reportados en estas membranas son el canal de cluro y los canales de potasio. Aunque también se conoce de la presencia de canales de cationes divalentes (Neuhaus y Wagner, 2000).

5.10.2 .Intercambiadores

Los acarreadores son transportadores que catalizan reacciones vectoriales. Una característica de estas proteínas es que presentan una cinética de saturación en función de la concentración del metabolito transportado. Frecuentemente esta cinética puede ser expresada en términos de la ecuación de Michaelis-Menten, propuesta para la catálisis enzimática. Así, cada transportador puede caracterizarse por una constante de disociación aparente (equivalente a la K_M) para el metabolito transportado y un flujo máximo de transporte, J_{MAX} que se alcanza a concentración saturante del metabolito transportado.

Los acarreadores pueden ser uniportadores, si el transporte se realiza acarreado una molécula de metabolito en cada evento de transporte; simportadores, si el acarreador acopla el transporte simultáneo de dos moléculas en una misma dirección, o intercambiadores, si se acopla la entrada de un metabolito con la salida de otro en un ciclo de transporte del acarreador.

5.10.2.1 Los intercambiadores de compuestos fosfatados por fosfato.

En cloroplastos, así como en plástidos no fotosintéticos, el intercambio controlado de fosfato por varios metabolitos fosforilados es crucial para el funcionamiento del metabolismo. Una característica importante del proceso de transporte es que el importe/exporte de P_i (fosfato) y un compuesto fosfatado está balanceado estequiométricamente. Esta regulación tan estrecha es necesaria por las siguientes razones:

- (1) En cloroplastos, la fosforilación del ADP a ATP depende de un suministro continuo de P_i . Durante la fijación de CO_2 cantidades substanciales de triosas fosfato dejan el cloroplasto y se requiere de la entrada simultánea de P_i para mantener la síntesis de ATP estimulada por la luz.
- (2) En plástidos no fotosintéticos, la entrada de hexosas fosfato tiene que estar acoplada el exporte de P_i , ya que la enzima estromal ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa, enzima clave en la biosíntesis de almidón) se inhibe alostéricamente con concentraciones crecientes de P_i .

El movimiento de intermediarios fosforilados y el de P_i es mediado por una familia de proteínas transportadoras que incluyen a los transportadores triosa fosfato/fosfato, fosfoenolpiruvato/fosfato, glucosa 6-fosfato/fosfato y pentosas fosfato/fosfato. Además, se ha reportado, en Arabidopsis, la

presencia de una proteína plastidial que posee actividad de uniportador de fosfato (Versaw y Harrison, 2002)

5.10.2.1.1 El transportador de triosas fosfato/fosfato (TPT).

La fijación de CO₂ a través de la fotosíntesis conduce a la generación de triosas fosfato (gliceraldehído 3-fosfato y di-hidroxiacetona fosfato; G3P y DHAP, respectivamente) que se exportan al citosol principalmente para la síntesis de sacarosa. Dicho exporte está mediado por el transportador de triosas fosfato/fosfato, la proteína mejor caracterizada de la membrana plastidial.

El TPT representa el 10% de la proteína de la membrana interna plastidial. Su masa molecular es alrededor de 29 kD, posee 6-7 dominios hidrofóbicos, posiblemente transmembranales. La estructura cuaternaria más probable para el TPT, de acuerdo con la evidencia experimental, es la de un dímero (Neuhaus y Wagner, 2000).

El TPT es capaz de intercambiar fosfato inorgánico por moléculas de tres carbonos, fosforiladas en la posición 3, tales como las triosas fosfato y el 3-fosfoglicerato (3PGA). Moléculas de 3 carbonos fosforiladas en posición 2, como el PEP y el 2-fosfoglicerato (2PGA), son transportadas con baja eficiencia por este transportador y es probable que dicho transporte carezca de significado *in vivo*. El transporte procede a través de un mecanismo de reacción tipo ping-pong, lo que significa que el primer metabolito es transportado a través de la membrana y deja el sitio de unión para que un segundo metabolito pueda ser acarreado en sentido inverso. La afinidad del transportador presenta asimetría en ambos lados de la membrana: la afinidad por cualquiera de los substratos es alrededor de 5 veces menor cuando la unión ocurre en el lado estromal del cloroplasto.

Dependiendo de cómo se mida, los cloroplastos de espinaca pueden ser relativamente impermeables al fosfato (Fuks y Homblé, 1999) o se puede observar transporte unidireccional de fosfato, pero con una V_{MAX} de 2 a 3 ordenes de magnitud inferior a la de antiporte (Bielecki, 1973; Versaw y Harrison, 2002).

En ciertas condiciones, el TPT también puede actuar a través de un mecanismo uniporte tipo canal con una V_{MAX} de un orden de magnitud superior a la presente en el modo antiportador (Flügge, 1999). Sin embargo, es poco probable que este comportamiento sea operante *in vivo*.

La secuencia de DNA que codifica para esta proteína ha permitido deducir la secuencia de los aminoácidos que la componen en varias especies, incluyendo maíz, espinaca, chícharo y *Flaveria*.

5.10.2.1.2 *El transportador de fosfoenolpiruvato/fosfato (PPT).*

El PPT intercambia, con alta afinidad, fosfato por compuestos de tres carbono con una molécula de fosfato unida al carbono 2 (PEP y 2PGA), pero acepta pobremente a las triosas fosfato o al 3PGA (Fisher *et al.*, 1997).

El PPT tiene sólo 30 % de similitud con el TPT a nivel de la secuencia de aminoácidos y muestra alrededor de 11 veces más afinidad por PEP que el TPT. Esta afinidad asegura que en condiciones *in vivo*, los plástidos sean capaces de importar PEP para alimentar reacciones anabólicas específicas.

El PPT se expresa tanto en hojas como en tejidos no fotosintéticos. Es probable que el PPT represente una proteína constitutiva necesaria en todos los tipos de células vegetal.

Se ha demostrado la expresión del PPT en plástidos de raíz de chícharo, de brotes de coliflor, embriones de maíz, de pimiento morrón y cromoplastos del fruto del tomate (Fisher *et al.*, 1997).

En los distintos tipos de plásticos, el PEP puede ser empleado como precursor de la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos aromáticos, alcaloides derivados del indol, flavonoides, o compuestos fenólicos. Debido a la ausencia o baja actividad de las enzimas fosfoglucomutasa y/o enolasa en algunos tipos de plásticos, la glicólisis no puede proceder más allá del 3PGA, por lo cual estos plástidos dependen del suministro de PEP a través de PPT.

5.10.2.1.3. *El transportador de hexosas fosfato/fosfato (HPT).*

La enzima fructosa 1,6- bisfosfatasa (FBPasa) es muy activa en los cloroplastos y es estrictamente necesaria para la conversión de las triosas fosfato a hexosas fosfato, lo que da como resultado una síntesis activa de almidón durante el día. En los tejidos no fotosintéticos, los plástidos biosintéticos carecen de esta actividad, por lo que la conversión de triosas fosfato a hexosas-fosfato no ocurre. La síntesis de almidón y la ruta oxidativa de las pentosas fosfato en los plástidos no fotosintéticos depende de la entrada de hexosas provenientes del citosol. Las hexosas fosfato pueden ser generadas en el citosol a partir de la sacarosa proveniente de otros tejidos, o en el caso de las semillas, de la planta madre.

La entrada de las hexosas fosfato al plástido está mediada por un intercambiador de hexosas fosfato/fosfato (HPT). La clona completa de c-DNA de maíz para el HPT tiene una longitud de 1647 pares de bases y codifica para una proteína de 387 aminoácidos. Esta proteína altamente hidrofóbica posee seis posibles α -hélices transmembranales y se ha predicho que *in vivo* funciona

como un homodímero. Homólogos del transportador de la planta de maíz se han identificado en chícharo y coliflor (Flügge, 1999).

En plástidos no fotosintéticos el sustrato preferido de este transportador es la Glc-6P, pero posee una afinidad significativa por las triosas fosfato, en particular la DHAP. Por lo tanto, se ha estimado que el HPT importa glucosa 6-fosfato del citosol en intercambio por DHAP y de esta manera balancea las pozas de carbono-fosfato y completa la operación cíclica de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, al compensar la ausencia de la FBPasa en el plástido.

5.10.2.1.4. El transportador de pentosas fosfato/fosfato (XPT).

Este transportador tiene una gran semejanza con el HPT de varias plantas, incluyendo el de *Arabidopsis*, acepta como sustratos principalmente fosfato, triosas fosfato y xilulosa 5-fosfato (Xul-5-P), o con menor eficiencia ribulosa 5-fosfato y eritrosa 4-fosfato. La Glc-6P o la ribosa 5-fosfato no son transportadas por esta proteína. El XPT se expresa en prácticamente toda la planta excepto en órganos reproductivos masculinos y pétalos (Eicks *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que la función principal de este transportador es la de translocar Xul-5-P producida en el citosol hacia el plástido, donde es metabolizado. Xul-5-P es un intermediario del ciclo de Kelvin y de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato. Ambos ciclos proveen de esqueletos carbonados para otras reacciones biosintéticas. Por ejemplo, la ribosa 5-fosfato se emplea en la síntesis de nucleótidos y la eritrosa 5-fosfato es un precursor inmediato en la ruta del shikimato.

5.10.2.2. Caracterización de los transportadores de fosfato.

Todos los miembros de la familia de transportadores plastidiales que intercambian fosfato por compuestos fosfatados son codificados en el núcleo y poseen un péptido de tránsito N-terminal (de cerca de 80 residuos de aminoácidos) que dirigen a la proteína al sitio correcto en el plástido. Los transportadores maduros de fosfato consisten en aproximadamente 330 residuos de aminoácidos por monómero, son altamente hidrofóbicos y contienen información para la integración de la proteína en la membrana. Se ha predicho que cada monómero presenta de 5 a 7 segmentos transmembranales, los cuales forman α -hélices que atraviesan la membrana en zig-zag, conectadas por segmentos hidrofílicos. Por lo tanto, estos transportadores de fosfato pertenecen al grupo de translocadores con un patrón de plegamiento helicoidal llamado 6+6, motivo también presente en varios acarreadores mitocondriales (Flügge, 1999).

Basados en el modelo tentativo para el arreglo del TPT en la membrana es probable que las 12 α -hélices del dímero del translocador de fosfatos participen en la formación de un canal hidrofílico de translocación, por medio del cual los sustratos pueden ser transportados a través de la membrana.

5.10.3 *Los intercambiadores de dicarboxilatos*

La primera caracterización detallada de un transportador de dicarboxilatos se llevó a cabo en los cloroplastos de espinaca (Lehner y Held, 1978). De la observación de que una variedad de ácidos dicarboxílicos inhibían competitivamente el transporte de otros ácidos dicarboxílicos se concluyó que compuestos como el malato, aspartato, fumarato y succinato se transportaban por el mismo acarreador. Un análisis bioquímico detallado condujo a la conclusión de que por lo menos hay dos proteínas transportadoras de dicarboxilatos en la membrana interna del cloroplasto (Woo *et al.*, 1987): un translocador cataliza el importe de 2-oxoglutarato en intercambio por malato (transportador de 2-oxaloacetato/malato) y el otro cataliza el exporte de glutamato en intercambio por malato citosólico (transportador de glutamato/malato). Se ha propuesto que estos translocadores trabajan en un mecanismo de exporte de nitrógeno orgánico tipo lanzadera, ya que hace posible el intercambio de 2-oxoglutarato por glutamato en forma neta, con la intermediación del L-malato (Woo *et al.*, 1987). En las mitocondrias se ha observado también un sistema similar (Laloi, 1999).

La función de estos transportadores está estrechamente ligada con la asimilación del amonio en los plástidos, amonio que se obtiene de la reducción del nitrito, y para evitar la pérdida de nitrógeno durante la fotorespiración. El amonio libre se usa primeramente en la síntesis de glutamina, catalizada por la glutamina sintasa (GS) y entonces la glutamina/2-oxoglutarato amino transferasa (GOGAT) emplea glutamina como donador del grupo amino hacia el aceptor 2-oxoglutarato, para generar glutamato (Stitt, 1997). Una vez asimilado el amonio en los cloroplastos se distribuye el resto de la célula.

Los transportadores de dicarboxilatos participan también en otra lanzadera cuya actividad se ha encontrado en los cloroplastos, aunque se supone que puede ser funcional en otros tejidos, aunque quizá en el sentido opuesto. En las células de las hojas existen isoformas que catalizan la reducción del oxaloacetato a L-malato, tanto en el citosol, con NADH como donador de electrones, como en el estroma, con el NADPH. Un intercambiador de dicarboxilatos, con una elevada actividad con L-malato y oxaloacetato, forma con las dos enzimas anteriores el sistema de “la válvula de malato”. Dicho sistema acopla la salida de L-malato y la reducción del NAD^+ citoplasmático, con la entrada de oxaloacetato y la oxidación del NADPH estromal, resultando en un exporte neto de poder reductor desde el cloroplasto iluminado hacia el citosol.

Los dos transportadores descritos arriba presentan una afinidad muy baja por el OAA (concentración en citosol de 0.4 a 0.06 mM) como para poder importar cantidades substanciales de OAA *in vivo*, por lo que es más probable que no participen en este sistema. En cloroplastos de maíz y espinaca se ha descubierto un acarreador específico para el OAA con alta afinidad (del orden micromolar) por este compuesto (Hatch *et al.*, 1984). Se ha observado que tras la entrada del OAA hay una liberación concomitante de malato, pero esto no necesariamente significa que el transporte de malato sea catalizado por el transportador con gran afinidad por OAA. A la fecha no está claro si este importador de OAA actúa como un intercambiador o cataliza un uniporte de OAA, seguido por un transporte unidireccional de malato.

El transportador 2-oxoglutarato/malato ya ha sido clonado y el peso molecular aparente de la proteína purificada es de 45 kD. Esta es una proteína altamente hidrofóbica de 569 aminoácidos y tiene 12 dominios transmembranales putativos (Weber *et al.*, 1995).

Se ha identificado otro tipo de transportador de malato a nivel bioquímico en leucoplastos de endospermo de semillas de ricino. Este transportador importa malato en plástidos aislados y exporta Pi con una estequiometría 1:1 (Eastmond *et al.*, 1997); se piensa que este transportador aporta malato para la síntesis de ácidos grasos, ya que *in vitro*, este metabolito resultó ser la fuente más eficiente para la síntesis de ácidos grasos en este tipo de plástidos (Smith *et al.*, 1992). La naturaleza molecular del intercambiador malato/Pi hasta la fecha se desconoce.

5.10.4 El transportador plastidial de ATP/ADP

El transporte de adenilatos ocurre a través de la membrana de varios organelos y compartimentos subcelulares, tales como las mitocondria, el cloroplasto e incluso el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Neuhaus y Wagner, 2000). El más prominente y mejor caracterizado de los transportadores de esta familia es el acarreador mitocondrial de adenín nucleótidos ADP/ATP (ACC). Al igual que el de la mitocondria, el transportador de adenilatos de cloroplastos cataliza la entrada de ATP al citosol en intercambio por ADP del estroma. Se trata de una proteína membranal muy hidrofóbica con 12 dominios α -hélice transmembranales (Kamfenkel *et al.*, 1995).

A diferencia de su función en los cloroplastos, el translocador de ATP/ADP se encarga de proveer al plástido de ATP para mantener su metabolismo, incluyendo la síntesis de RNA, proteínas, almidón y ácidos grasos. Sin la provisión de ATP externa, casi no hay síntesis de almidón en los plástidos de chícharo o de brotes de coliflor (Hill, Smith, 1991; Neuhaus, 1993). También se ha visto experimentalmente que se requiere de un suministro externo de ATP para que los plástidos lleven a cabo la síntesis de ácidos grasos en semillas de colza, brotes de coliflor y endospermo de

maíz y trigo (Kang y Rawsthorne, 1994). Por otra parte, se ha visto que en los amiloplastos de brotes de coliflor, las rutas de síntesis de almidón y ácidos grasos compiten por el ATP y la actividad del transportador ATP/ADP limita la velocidad de síntesis de estas biomoléculas (Möhlmann y Neuhaus, 1997).

5.10.5 El translocador de glucosa (*pGlcT*).

El almidón almacenado en el plástido, para poder ser fuente de carbono o de energía, tiene que ser degradado. Esta degradación puede ser a través de la ruta fosforolítica que genera principalmente fosfato, o por la ruta amilolítica, produciendo los azúcares libres glucosa y maltosa. Hay evidencia que indica que la última ruta es la predominante en la degradación del almidón que funciona como una reserva de energía de corto plazo. La ruta amilolítica de degradación de almidón requiere la presencia de un transportador capaz de exportar los azúcares resultantes de la degradación, función que es cubierta por *pGluT*. Esta proteína es también predominantemente apolar, ya que presenta 12 dominios transmembranales, arreglados en grupos de seis cruces transmembranales y que se encuentran separados por un dominio hidrofílico relativamente grande.

El posible papel fisiológico de *pGlcT* es el de catalizar la salida de Glc del plástido derivada del rompimiento hidrolítico del almidón almacenado transitoriamente en este organelo. Se presume que se requiera de un gradiente de concentración entre el estroma plastidial y el citosol para poder exportar cantidades importantes de glucosa. Después de ser exportada del cloroplasto, la glucosa es convertida en Glc-6-P por la actividad de una hexocinasa, que está localizada en la membrana externa del cloroplasto (Weber *et al*, 2000).

6. Planteamiento del problema

Dos metabolitos clave en el metabolismo carbonado son el PEP y el malato. El primero es un intermediario de la glucólisis, el cual puede ser transformado a piruvato por la PK y de ahí ser precursor en la síntesis de ácidos grasos, o entrar a la ruta del shikimato para dar origen a aminoácidos aromáticos u otros metabolitos secundarios, o ser transformado en malato vía la PEP carboxilasa y la malato deshidrogenasa. Por su parte, el malato es un intermediario del ciclo de Krebs y, por lo tanto, es precursor de varios aminoácidos. También, se ha propuesto que el malato es mejor precursor de ácidos grasos que el piruvato y el acetato por tener la capacidad de donar dos equivalentes reductores, necesarios para que la ruta se lleve a cabo. Para que ambos metabolitos sean aprovechados en el plástido deben entrar a través de sus respectivos transportadores, el PPT para el caso del PEP y el DT (transportador de dicarboxilatos) en el caso del malato. Es evidente que las características de estos sistemas de transporte pueden determinar en gran medida cual de estos metabolitos es la fuente de carbono mayoritaria para la síntesis de lípidos e, indirectamente, cuál sería entonces más abundante para proporcionar esqueletos carbonados a la síntesis de aminoácidos y proteínas.

Ya se mencionó en el apartado 5.9 que la fosfomicina (FSM) tiene un claro efecto sobre el aprovechamiento del acetato en los embriones enteros (Lara-Núñez, 1999). Sin embargo, en los experimentos citados sólo se analizó el efecto de la fosfomicina sobre la PEPC y la PK. En dicho trabajo se encontró que el efecto más notorio de la FSM era su estimulación de la actividad de PEPC, pero no se analizó el papel que pudieran jugar los transportadores responsables de introducir al estroma el sustrato PEP, o el producto de dicha reacción, el oxaloacetato, el cual se puede convertir rápidamente en malato.

En este trabajo se plantea el estudio de estos dos transportadores en embriones inmaduros de maíz, ya que en este estadio es cuando los plástidos acumulan activamente los compuestos de reserva que le ayudarán a la semilla a establecerse como plántula durante la germinación. Las preguntas que a continuación se plantean resumen de manera general el interés del presente proyecto.

¿Cuáles son las características de los transportadores de dicarboxilatos y el intercambiador fosfoenolpiruvato/fosfato en los plástidos aislados de embriones inmaduros de maíz?

Una vez conocidas sus características en el plástido, ¿qué se puede inferir del papel que estos transportadores tienen en la regulación del flujo de carbono entre el citosol y el estroma plastidial, en relación con la síntesis de reservas en el tejido embrionario de la semilla de maíz?

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Estudiar la capacidad de los plástidos aislados de semillas en desarrollo para intercambiar dicarboxilatos y PEP por fosfato, y correlacionar este comportamiento con lo que se conoce acerca de la regulación del uso de carbono en la síntesis de lípidos y proteínas en semillas inmaduras.

7.2. Objetivos particulares.

- Optimizar la metodología para aislar plástidos a partir de embriones inmaduros de maíz
- Determinar la contaminación de la fracción plastidial por otros compartimentos celulares.
- Caracterizar el transporte de dicarboxilatos en plástidos aislados de embrión inmaduro de maíz.
- Caracterizar la actividad del transportador de PEP/fosfato en el sistema en estudio.
- Correlacionar la actividad de transporte de los dos transportadores mencionados arriba con la entrada de metabolitos al plástido para la síntesis de proteínas y lípidos.

8. Materiales y métodos.

8.1 Materiales

El [^{14}C]-malato y el [^{14}C]-malonato se obtuvieron de American Radiochemicals-Pharmacia, y el [^{14}C]-acetato, el [^{32}P]- PO_4^{3-} y el [^{32}P]-pirofosfato de New England Nuclear-Roche.

8.1.1 Material Biológico

Para realizar el trabajo experimental de esta investigación se emplearon semillas de maíz (*Zea mays* L.) provenientes de elotes frescos recién cosechados (con edad fisiológica entre 18 y 24 días después de la polinización) adquiridos en una tienda local, de donde se extrajo el embrión.

8.2 Métodos.

8.2.1 Aislamiento de plástidos.

Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4° C. Se extrajeron de 3-5 gramos de embrión de maíz los cuales se mantuvieron en una solución de manitol 0.5 M hasta la molienda (no más de 30 min.). Se molieron suavemente en mortero y pistilo con 2 volúmenes de amortiguador A (HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, sorbitol 0.4 M, EDTA 2 mM, MgCl_2 1 mM, DTT 1 mM, 1% p/v ficoll y 1% p/v BSA. El homogenado se filtró a través de dos capas de gasa. Este filtrado se depositó en la superficie de un gradiente discontinuo de percoll, en un tubo FalconTM de polipropileno de 15 mL y se centrifugó a 6000 g por 15 min. en un rotor de columpio Beckman JS-13.

El gradiente se preparó disolviendo PEG-4000 (3% p/v), BSA (1 % p/v) y ficoll 1 % (p/v) en Percoll (PBF-Percoll). Esta solución PBF-Percoll se mezcló en diversas proporciones con amortiguador HEPES-KOH 50 mM (pH 7.5), sorbitol 0.4 M, MgCl_2 1 mM y DTT 1 mM. De tal manera que el gradiente consistió en 1 mL de 80 % PBF-percoll (v/v) y 20% de amortiguador, 1.8

mL de 35 % PBF-percoll (v/v) y 65 % de amortiguador , 1.8 mL de 22 % PBF-percoll (v/v) y 78 % de amortiguador, y 1.8 mL de 10 % PBF-percoll (v/v) y 90 % de amortiguador.

Los plástidos quedan retenidos en la interfase 35-22 % de donde se recuperaron y lavaron dos veces con 2 mL de amortiguador B (HEPES-KOH 50 mM, pH 7.5, sorbitol 0.4 M, EDTA 2 mM, MgCl₂ 1 mM y DTT 1 mM) a 12000 rpm por 5 min. El pellet final, considerado la fracción de plástidos puros, se resuspendió en 1 mL de amortiguador B (Negm *et al.*, 1995).

Se determinó la integridad de los plástidos midiendo la fracción de actividad latente de la enzima mállica dependiente de NADP (NADP-ME, exclusiva del estroma plastidial). Es decir, la relación de actividades antes y después de añadir a la cubeta de reacción tritón X-100 al 0.1 %. La actividad de NADP-ME se determinó mediante la metodología reportada por Smith y colaboradores (1992). Brevemente, se incubaron las muestras (5 ó 10 µL) en amortiguador HEPES-KOH (pH 7) 50 mM, KCl 20 mM, MnCl₂ 6 mM, L-malato 5 mM, EDTA 0.75 mM y NADP⁺ 1 mM en 1 mL. Se siguió el cambio de absorbancia a 340 nm por 3 minutos.

El porcentaje de integridad (IP) de los plástidos se define conforme a la relación descrita en la ecuación 1.

$$IP = \frac{(NADPME_{Tritón\ X100} - NADPME)}{NADPME_{Tritón\ X100}} \times 100 \quad \text{Ec. 1.}$$

en la que NADP-ME representa la actividad de esta enzima medida antes de agregar el detergente y NADP-ME_{Tritón X-100} representa la actividad de la misma enzima, en la misma celda, después de agregar el tritón X-100. Esta determinación se realizó siempre por triplicado.

Se encontró que la actividad de la EM se inhibe en un 8 % por Tritón X-100, por lo cual se corrigió la actividad de dicha enzima en presencia del detergente para calcular la *IP*.

Para determinar la eficiencia del procedimiento de aislamiento de los plástidos se determinó la actividad total de la enzima NADP-ME en una alícuota del extracto crudo (en presencia de tritón X-100). El índice de recuperación (R) se define conforme a la relación descrita por la ecuación 2.

$$R = \frac{(NADPME_{Tritón\ X100} - NADPME)}{NADPME_{E.crudo}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

en la que NADP-ME_{E.crudo} es la actividad de esta enzima en el extracto crudo. Las actividades se expresan en nmol min⁻¹ g_{proteína}⁻¹.

8.2.2 Determinación de la contaminación de la fracción plastidial

Para determinar el porcentaje de contaminación de la fracción plastidial por otros compartimentos celulares se midió la actividad de enzimas marcadoras de citosol, PEP carboxilasa; de mitocondria, fumarasa, y de peroxisomas, catalasa.

La PEP carboxilasa se ensayó conforme al método descrito por Uedam y Sugiyama (1976): en amortiguador TEA-HCl 100 mM que contenía NaHCO₃ 20 mM, NADH 0.2 mM (pH 7.3), PEP 5 mM y 2 unidades de MDH se añadió la fracción a determinar actividad (10 µL) y se monitoreó ésta siguiendo la absorbancia a 340 nm.

La fumarasa se ensayó conforme al método reportado por Hatch (1978), para lo cual las muestras (10 µL) se añadieron a una cubeta que contenía amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7.5) y L-malato 50 mM. Se monitoreó el cambio de absorbancia a 240 nm.

Finalmente, la catalasa se determinó conforme al ensayo descrito por Luck, (1965) que consistió en agregar la muestra a analizar (10 µL) a un amortiguador de fosfatos 100 mM (pH 7.0) y H₂O₂ 12.5 mM y medir la absorbancia a 240 nm.

Todos los ensayos se realizaron a 25 °C en un volumen final fue de 1 mL. Para iniciar la reacción se añadió a la celda de reacción una alícuota de la fracción a ensayar y los cambios en absorbancia se registraron en función del tiempo en un espectrofotómetro Beckman DU-65, con celda termostatizada. Las actividades se expresan en nmol min⁻¹ g_{proteína}⁻¹ y el cálculo de la contaminación por cada fracción se realizó según la relación expresada en la ecuación 3.

$$\text{Contaminación} = \left(\frac{A_{F.Plástidial}}{A_{E.crudo}} \right) \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

en la que A_{F.Plástidial} se refiere a la actividad de la enzima en la fracción de los plástidos purificados y A_{E.Crudo} se refiere a la actividad de la misma enzima medida en el extracto crudo.

8.2.3. Cuantificación de las desintegraciones radiactivas mediante centelleo líquido.

La cuantificación de las desintegraciones radiactivas de ³H, ¹⁴C y/o ³²P se realizó mediante centelleo líquido. Las muestras acuosas (hasta 0.4 mL) se colocan en un vial de polipropileno de 3 mL (volumen nominal) para centelleo líquido y se mezclan con 3 mL de un cóctel preparado como sigue: feniloxazol 12 g, etilenglicol 148 mL, etanol 424 mL, tritón 1028 mL y xilol 2400 mL. Las

muestras se guardan en la oscuridad por 24 horas para reducir la quimioluminiscencia y se cuenta la emisión de luz en un contador Packard modelo LC 6500.

8.2.4 Medición del transporte.

Para medir el transporte se empleó la técnica de centrifugación a través de una capa sencilla de aceite de silicón, diseñada por Heldt (1976). En este caso consistió en colocar en un tubo de centrifugación con capacidad de 250 μL una fase inferior (20 μL) de una solución saturada de Na_2SO_4 y ácido perclórico al 10 % (p/v), una capa de 70 μL aceite de silicona AR 200 de densidad intermedia ($d_{4}^{20} = 1.049$) y de baja viscosidad y una capa superior con un volumen final de 100 μL que contenía la fracción plastidial y el metabolito marcado, iniciándose de esta manera la reacción, la cual se lleva a cabo a 15 °C (excepto cuando se indica otra cosa) por 15 s (para el intercambiador de fosfoenolpiruvato por fosfato, PPT) o 1 min (para el intercambiador de dicarboxilatos, DT).

El transporte se deja proceder por el tiempo adecuado y se detiene al centrifugar en una microfuga a 12000 rpm por un minuto. La radioactividad arrastrada a la fase inferior se cuantifica mediante centelleo líquido y se determina la cantidad de metabolito transportado.

8.2.5 Incorporación de precursores marcados en ácidos grasos y proteínas en los plástidos.

El medio de reacción en el que se incubaron los plástidos íntegros y activos, denominado medio C, tenía la siguiente composición: NADH 0.5 mM, coenzima A 0.5 mM, ATP 6 mM, NaHCO_2 15 mM, glucosa 2 mM y glucosa-6-fosfato 0.5 mM y el precursor marcado (acetato-1,2- ^{14}C o malato U- ^{14}C) disueltos en el amortiguador A. La reacción de incorporación se inició agregando los plástidos en un volumen final de 0.4 mL, y se incubaron por 15 minutos a 15 °C. La reacción se paró agregando 1 mL de cloroformo-metanol 1:1 (v/v) (Eastmond *et al.*, 1989).

8.2.6 Extracción de los ácidos grasos y las proteínas plastidiales.

La mezcla de plástidos con cloroformo-metanol (vease 8.2.4) se centrifugó en microfuga a 2500 rpm durante 15 min. En el tubo se forman dos fases líquidas, separadas por una interfase. La interfase es donde queda la mayor cantidad de proteínas plastidiales; la fase superior es acuosa, con

un alto contenido de carbohidratos y ácidos orgánicos, y la fase inferior, la orgánica, contiene principalmente lípidos provenientes de los plástidos. Estas dos fases y la interfase se separaron.

Al contenido de la interfase sólida se le adicionó acetona fría con HCl al 1 % (5 mL). Esta mezcla se agitó vigorosamente y se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para permitir la precipitación de las proteínas y, luego, la mezcla se centrifugó a 12000 rpm por 30 minutos, tras lo cual se eliminó el sobrenadante. El paquete proteico resultante se resuspendió en 200 μL de amortiguador con Tris-HCL 100 mM pH 6.8, SDS 1% (p/v), urea 2 M y tween-20 0.2 %. De este resuspendido se tomó una alícuota de 100 μL y se mezcló con 3 mL de líquido de centelleo para medir la radioactividad.

Para cuantificar la radiactividad incorporada en los ácidos grasos se recuperó una alícuota de 100 μL de la fase orgánica, se depositó en un vial de centelleo líquido, se evaporó el cloroformo y se añadieron 3 mL de líquido de centelleo. El vial se contó en un contador de centelleo Packard debidamente calibrado conforme a las indicaciones del fabricante.

8.2.7. Cromatografía en placa fina

Para separar las diferentes clases de lípidos se empleó cromatografía de placa fina (TLC).

La separación de ácidos orgánicos y compuestos fosfatados también se realizó mediante esta técnica.

En todos los casos se empleó una capa de sílica gel depositada sobre aluminio. Las placas se desarrollaron con los solventes siguientes, según el caso:

- i) Para la separación de las clases de lípidos, las placas se desarrollaron hasta la mitad con: cloroformo-metanol-ác. acético-agua (85:15:10:3.5 v/v). Luego se dejaron secar y se desarrollaron ahora hasta el final de la placa con: hexano-éter etílico-ác. acético (75:25:1 v/v). Los lípidos polares se separan en la primera mitad de la placa y los lípidos neutros en la segunda mitad.
- ii) Medio de elusión para resolver fosfatos y compuestos fosforilados: metanol- NH_4OH conc.-ác. tricloroacético al 10%-agua (50:15:5:30)
- iii) Medio de elusión para resolver ácidos mono y dicarboxílicos: cloroformo- metanol-ácido acético-agua (5:3:3:2).

8.2.8. Síntesis orgánica de fosfoenolpiruvato.

Debido a que el fosfoenolpiruvato marcado con ^{14}C ó ^3H no está comercialmente disponible, se realizó la síntesis orgánica de este compuesto a partir de piruvato-1- ^{14}C . Esta síntesis se realizó de la siguiente manera:

El ^{14}C -piruvato comercial se pasa por una columna de intercambio catiónico (Dowex A50 X8) para liberar al ácido, que se disuelve en tetracloruro de carbono. Se le agrega entonces bromo seco en cantidad equimolar. Esta reacción se deja en agitación por tres días a temperatura ambiente, en un matraz de bola sellado herméticamente, con un septum de hule. El producto de la reacción (3-bromopiruvato) apareció como una pasta espesa en el fondo del matraz. El bromopiruvato se lavó dos veces con dicloroetano seco para eliminar el exceso de bromo y se secó con flujo de nitrógeno. A continuación se agregó éter etílico destilado y seco, y se enfrió la reacción en baño de hielo, manteniendo el matraz bien tapado. Posteriormente se adicionó un equivalente molar de trimetilfosfito, suponiendo que no han ocurrido pérdidas respecto al del piruvato inicial. La reacción se dejó en agitación por 3 días. Concluido este tiempo se evaporó el éter con corriente de nitrógeno y se agregó ciclohexilamina en concentración equimolar al piruvato de partida en agua para neutralizar el producto de la reacción. Nuevamente se deja hidrolizar la mezcla por tres días y finalmente se elimina el agua mediante un rotavapor, para recuperar un polvo blanco. Para separar el PEP así sintetizado del piruvato que no reaccionó se aplicó el polvo disuelto en metanol a una placa preparativa de sílica gel ($2 \times 200 \times 200$ mm) y se desarrolló con cloroformo, metanol, ácido trifluoroacético (60:40:0.11 v/v). La zona correspondiente al PEP se identificó mediante un estándar de PEP comercial que se corrió en ambos lados de la placa y se tiñó con vapores de yodo (evitando teñir la zona del producto marcado. Tras recuperar la sílica raspándola de la placa se disolvió el PEP en agua, se eliminó la sílica por centrifugación y se comprobó la presencia de PEP enzimáticamente a través de la reacción de piruvato cinasa (PK) acoplada a la lactato deshidrogenasa (Bucher y Pfleiderer, 1955). De esta manera también se cuantificó la concentración de la solución de PEP y se demostró la ausencia de piruvato contaminante. La marca radiactiva se cuantificó mediante centelleo líquido y se calculó la actividad específica del compuesto en Ci/mmol. El PEP recuperado correspondió a un rendimiento de 31 %.

8.2.9. Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó empleando el método de ácido bicinchonínico reportado por Smith (1985).

8.2.10 Determinación del espacio permeable.

Este espacio representa el espacio accesible al sorbitol en el plastido y se determina incubando a los plástidos en un volumen conocido de medio de transporte conteniendo $^3\text{H}_2\text{O}$ y sorbitol-U- ^{14}C y en un tubo de transporte como el descrito en el punto 8.3.4. Tras centrifugar los plástidos a través de la capa de silicona, se cuantifica la radioactividad de ambos radioisótopos tanto en la fase inferior como superior, se calcula la fracción de espacio permeable como se muestra en la ecuación 4.

$$\text{Volumen permeable a sorbitol (\%)} = \left(\frac{{}^3H_S \times {}^{14}C_I}{{}^3H_I \times {}^{14}C_S} \right) \times 100, \quad \text{Ec 4}$$

en la que 3H_I y 3H_S son las dpm del tritio en las fases inferior y superior, respectivamente y ${}^{14}C_I$ y ${}^{14}C_S$ son las dpm de carbono 14 en las fases inferior y superior, respectivamente.

El volumen plastidial relativo puede calcularse con la relación expresada en la ecuación 5.

$$\text{Volumen plastidial relativo} = \left(\frac{V_S}{P} \right) \times \left(\frac{{}^3H_I}{{}^3H_S} \right) \quad \text{Ec. 5}$$

en la que V_S es el volumen de la fase superior (al inicio del ensayo), 3H_I y 3H_S tienen el mismo significado que en la ecuación 4 y P se refiere a la cantidad de proteína empleada en el ensayo.

9. Resultados y análisis.

9.1. Determinación de la pureza y la integridad de los plástidos aislados.

Para caracterizar los sistemas de transporte que se mencionaron en los objetivos se montó una metodología para aislar los plástidos de embriones de maíz en la fase temprana del llenado del grano, tal como se describe en la sección 8.2.1. Los plástidos se purificaron mediante un gradiente discontinuo de percoll entre las fracciones de 35 y 22 % de percoll. Esta fracción enriquecida se lava dos veces con el medio adecuado y una vez resuspendidos los plástidos se determina la integridad plastidial, la eficiencia de recuperación y la contaminación relativa por otras fracciones celulares, en concreto, citoplasma, mitocondria y peroxisomas.

En la Tabla 1 se presentan las características de las preparaciones de plástidos obtenidas rutinariamente; los datos en la tabla representan el promedio de cinco experimentos independientes.

Tabla 1. Integridad plastidial, recuperación y contaminación por compartimentos celulares no plastidiales. Los plástidos se aislaron y purificaron de embriones inmaduros de maíz, de acuerdo a lo descrito en la sección 8.2.1.

Enzima	Integridad ^a (%)	Recuperación de la actividad ^b (%)	Contaminación ^c (%)	Actividad total (nmol min ⁻¹ g _{proteína} ⁻¹)
NADP-ME	73 ± 3	29.3 ± 2	--	250 ± 59
PEP Carboxilasa	--	1.0 ± 0.3	3.41	53 ± 20
Catalasa	--	0.40 ± 0.02	1.36	47 ± 30
Fumarasa	--	0.70 ± 0.43	2.34	11 ± 8

^a La integridad se calculó de acuerdo a la ecuación 1.

^b Porcentaje de la actividad total de cada enzima recuperada en la fracción plastidial relativa a la actividad hallada en el extracto crudo, ecuación 2. Las actividades de las enzimas PEP carboxilasa, catalasa y fumarasa se usaron como marcadores del citosol, peroxisomas y mitocondrias, respectivamente.

^c El coeficiente de actividad de cada enzima en el extracto plastidial con respecto a la actividad de esa misma enzima en el extracto crudo (Ecuación 3).

La Tabla 1 muestra que la integridad de las preparaciones fue comparable con las de otras preparaciones reportadas en la literatura (Negm *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1992).

En la misma Tabla 1 se ve que la recuperación de plástidos respecto a la preparación cruda tiene un rendimiento aceptable, considerando que se trata de organelos subcelulares.

9.2. Determinación de la contaminación por otras fracciones celulares de la fracción plastidial.

Con el uso de actividades enzimáticas marcadoras de varios compartimentos subcelulares se determinó el nivel de contaminación por otras fracciones celulares que pudieran interferir con el estudio. Como marcador citosólico se eligió la actividad de la enzima PEP carboxilasa, como marcador de mitocondria la actividad de la fumarasa y como marcador de peroxisomas la actividad de la catalasa.

Nuevamente, en la Tabla 1 se muestra el nivel de contaminación en los plástidos purificados y se puede apreciar que la contaminación total por otros compartimentos celulares es inferior al 10%, por lo que la interferencia resultante se encuentra en intervalos manejables y semejantes a los reportados para otros estudios con plástidos no fotosintéticos (Smith *et al.*, 1992; Negm *et al.*, 1995).

9.3. Intercambiador de malato

9.3.1 Condiciones apropiadas para el ensayo de transporte.

Una vez estandarizada la metodología para aislar y purificar los plástidos de embrión de maíz, se buscaron las condiciones apropiadas para la medición del transporte de L-malato en los plástidos. Para ello, se eligió la técnica de centrifugación a través de una capa sencilla de aceite de silicona (ver métodos, sección 8.2.4.), la cual consiste en separar dos medios acuosos de diferente densidad, con una capa de aceite de silicona de densidad intermedia y de baja viscosidad. La fase inferior contiene ácido perclórico al 10 % (v/v), para detener la actividad enzimática y romper los plástidos. La fase superior contiene inicialmente el metabolito a transportarse y los plástidos resuspendidos, antes o después de algún pre-tratamiento. Frecuentemente alguno de los metabolitos a ensayar (el precargado en los plástidos o el externo) se encuentra marcado radiactivamente (ver 8.2.4).

Los plástidos se atemperaron preincubándolos a tres temperaturas diferentes (4, 15 y 25° C) y se inició el transporte agregando ^{14}C -L-malato o ^{14}C -malonato. Al cabo de diferentes periodos se centrifugaron los tubos y se determinó el transporte de L-malato o de malonato.

A 4° C se observó una incorporación de radioactividad en las plástidos muy pobre, mientras que a 25° C se observó que la cantidad de L-malato incorporada a los plástidos alcanzó casi de inmediato un valor constante, posiblemente de aproximación al equilibrio. A 15° C se observó una tasa de incorporación de radioactividad constante con respecto al tiempo hasta los 7 minutos para el ^{14}C -malato (Figura 1) y los 4 minutos para el ^{14}C -malonato. A tiempos más largos se observa un máximo y luego una caída que puede reflejar la aproximación al equilibrio, combinada con la transformación metabólica del sustrato, alteraciones en el turgor y/o el balance electroiónico de los plástidos, o bien la alteración de la integridad membranal.

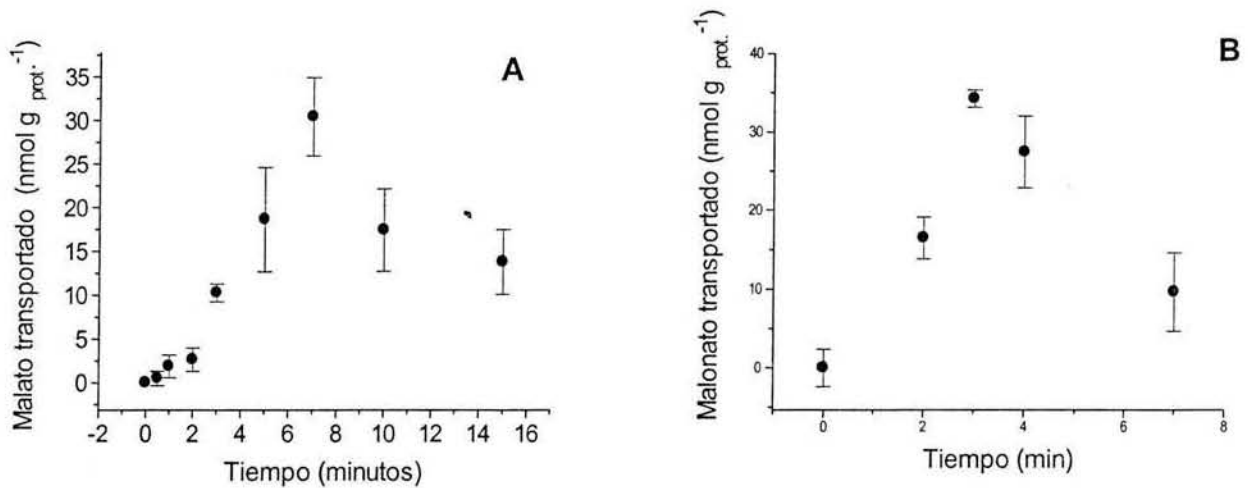


Figura 1. Entrada de ^{14}C -malato (panel A) ó ^{14}C -malonato (panel B) a plástidos como función del tiempo de incubación a 15° C. Los plástidos se aislaron de embriones de maíz en desarrollo (sección 8.2.1) y se ensayaron conforme a los descrito en 8.3.2. La concentración externa de malato fue 109 μM .

Basados en los resultados anteriores, se consideró que el transporte de malato podía realizarse a 15 °C por un minuto, reduciendo así la interferencia por los procesos observados más tardíamente (al margen de cuales fueran sus causas, lo que escapa al ámbito de interés del presente trabajo).

9.3.2 Naturaleza del transporte del L- malato.

Hasta la fecha, tal como se refirió en la sección de antecedentes (5.10.3) los cloroplastos poseen dos sistemas de transporte para dicarboxilatos capaces de transportar L-malato, con actividades

sobrelapadas de dicarboxilato/malato y glutamato/malato (Woo *et al.*, 1987a y b; Weber *et al.*, 1995 y 2000; Menzlaff y Flügge, 1993; Lehner y Held, 1978; Flügge *et al.*, 1988). Además, se ha reportado la existencia de un intercambiador de malato por fosfato en leucoplastos de semillas de ricino (Eastmond, *et al.*, 1997).

En otros sistemas, como las mitocondrias de rata y de *C. elegans*, se han reportado intercambiadores de dicarboxilatos poco selectivos, capaces de intercambiar malato por fosfato, malonato, succinato, sulfato y tiosulfato que, a semejanza de los intercambiadores de dicarboxilatos de cloroplastos, son sensibles a inhibición por *n*-butilmalonato (Fiermonte *et al.*, 1998).

También se han caracterizado cotransportadores de L-malato y protones en *Schizosaccharomices pombe* (Camarasa *et al.*, 2001) y uno de L-malato por H⁺ en las vacuolas de las células de plantas con metabolismo CAM (Cheffings *et al.*, 1997), que puede transportar maleato, oxaloacetato, malonato, succinato y fumarato.

En *Arabidopsis thaliana* se han identificado tres genes con secuencias semejantes a las de transportadores de dicarboxilatos, pero sólo dos de ellos tuvieron la capacidad de intercambiar dicarboxilatos cuando se les reconstituyó *in vitro* (Taniguchi *et al.*, 2002).

Con el fin de conocer la naturaleza del transporte de malato en plástidos aislados de semillas inmaduras de maíz se realizó una serie de experimentos en los cuales los plástidos se preincubaron a 15 °C por 10 minutos, antes de iniciar el transporte, bajo distintas condiciones, tales como diferencias de pH, la presencia del desacoplante CCCP (carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona) o la presencia de iones o metabolitos, incluyendo varios dicarboxilatos y tricarboxilatos. Los resultados de tales experimentos se presentan en la Tabla 2 y los datos mostrados fueron corregidos para eliminar la contribución de radioactividad arrastrada por el espacio permeable a sorbitol de los plástidos.

De estos experimentos se deduce que el transporte de dicarboxilatos en plástidos posee las siguientes características (Tabla 2):

- a) Los plástidos de embrión de maíz en desarrollo son capaces de incorporar L-malato o malonato con baja eficiencia si no se preincuban con algún otro dicarboxilato como L-malato, malonato, succinato, maleato u oxaloacetato. La estimulación por la presencia de estos dicarboxilatos es de 4 a 5 veces.
- b) Este sistema de transporte es capaz de estimularse por tricarboxilatos como el citrato, aunque no sabemos si el intercambio se produce con la forma dianiónica de este tricarboxilato.
- c) El sistema de transporte no es estimulado por iones como Na⁺, K⁺ o diferencias de pH.
- d) Los aniones inorgánicos sulfato y fosfato tampoco fueron efectivos en estimular el transporte.
- e) la presencia de CCCP no modificó el transporte de malonato.

Estos resultados indican que los plástidos del embrión de maíz en desarrollo poseen sistemas de intercambio de dicarboxilatos semejantes a los descritos en cloroplastos de espinaca (Lehner y Held, 1978; Flügge *et al.*, 1988), pero no existe un transportador de L-malato por fosfato como el descrito por Eastmond *et al.* (1997), o cotransportadores de L-malato con H⁺ (Camarasa *et al.*, 2001) L-malato con Na⁺ (Ullmann *et al.*, 2000), o L-malato con K⁺ (Laloi 1999).

Sin embargo, Lehner y Heldt encontraron que los cloroplastos de espinaca no son capaces de intercambiar malonato por otro dicarboxilato. La amplia especificidad del intercambio de malato o malonato por otros dicarboxilatos es más parecida a la del intercambiador de dicarboxilatos de mitocondrias (Fiermonte *et al.*, 1998), aunque el sistema observado aquí resultó incapaz de transportar sulfato por malonato, característica presente en el sistema mitocondrial de levaduras (Palmieri *et al.*, 1999).

Tabla 2. Propiedades del transporte de [¹⁴C]-malato o [¹⁴C]-malonato en plástidos aislados de embrión de maíz

Metabolito de pre-incubación o condición	Entrada de [¹⁴ C]-malonato <i>nmol min⁻¹ g_{proteína}⁻¹</i>	Entrada de [¹⁴ C]-L-malato
Ninguno	13.5 ± 4.3	12.0 ± 4.3
L-malato	88.4 ± 20.7	31.5 ± 3.2
Malonato	57.5 ± 3.2	47.2 ± 18.8
Succinato	49.9 ± 0.6	82.8 ± 30.4
Citrato	40.5 ± 14.6	39.0 ± 2.3
Oxaloacetato	62.3 ± 20.2	nd. ^a
Maleato	23.4 ± 4.6	61.0 ± 17.8
D-malato	nd.	16.3 ± 6.4
NaCl	8.7 ± 2.4	5.2 ± 0.8
KCl	8.5 ± 6.9	nd.
Sulfato	5.7 ± 0.8	nd.
Fosfato	nd.	7.7 ± 4.4
Malonato + CCCP	55.7 ± 18	nd
pH 7	1.6 ± 3.3	5.2 ± 2.7
pH 8	1.6 ± 3.2	nd.

^a nd, no determinado. Los plástidos se preincubaron a pH 7.5 con varios substratos o iones (concentración 5 mM) a 15° C o a la condición de pH indicada por 10 min. El transporte se inició a pH 7.5 con la adición de externa de [¹⁴C]-malonato o [¹⁴C]-L-malato 0.25 mM y se terminó después de 1 min. El resultado es la media de 3 experimentos independientes, cada uno realizado por duplicado. Los datos se corrigieron eliminando la cantidad correspondiente al espacio permeable de [¹⁴C]-sorbitol, y la difusión pasiva.

9.3.3 Características del transportador de dicarboxilatos.

9.3.3.1 Transporte activo y pasivo de malato y malonato.

Para determinar la respuesta del transportador frente a la concentración del metabolito a transportar, se estudió la cinética de saturación del intercambio de L-malato y de malonato (Figura 2), en plástidos control (símbolos vacíos) y en plástidos prellenados con L-malato no radiactivo (símbolos llenos). La primera observación es que, confirmando las observaciones de la Tabla 2, el prellenado de los plástidos resultó en un incremento importante en la tasa de incorporación de L-malato-[¹⁴C] y de malonato-[¹⁴C].

Adicionalmente, a concentraciones elevadas de L-malato, se observó un componente de transporte no saturable, de tipo difusivo, cuya tasa es proporcional a la concentración de metabolito externo. Dicho componente fue menos evidente en plástidos prellenados (Figura 2., símbolos llenos), pero a concentraciones elevadas de L-malato o de malonato su contribución está aún presente. Debido a que dicho componente tiene una contribución significativa sobre el transporte sólo en concentraciones de metabolito muy altas, se determinó el valor del coeficiente de permeabilidad para el componente difusivo a partir de la pendiente de la recta que se observa a concentraciones elevadas del metabolito (de 0.2 a 1 mM). Con dicho coeficiente se analizó entonces el comportamiento del componente saturable ajustando los datos experimentales a la ecuación 6 por regresión no lineal (Sigma Stat v 2.0, San Rafael Ca., USA), con D_p constante.

$$J = \frac{J_{MAX}M}{K_M + M} + D_pM \quad \text{Ec 6}$$

en donde J es la velocidad de transporte, J_{MAX} la velocidad del componente saturable a concentración infinita del metabolito variable M , y D_p es el coeficiente de difusión pasiva.

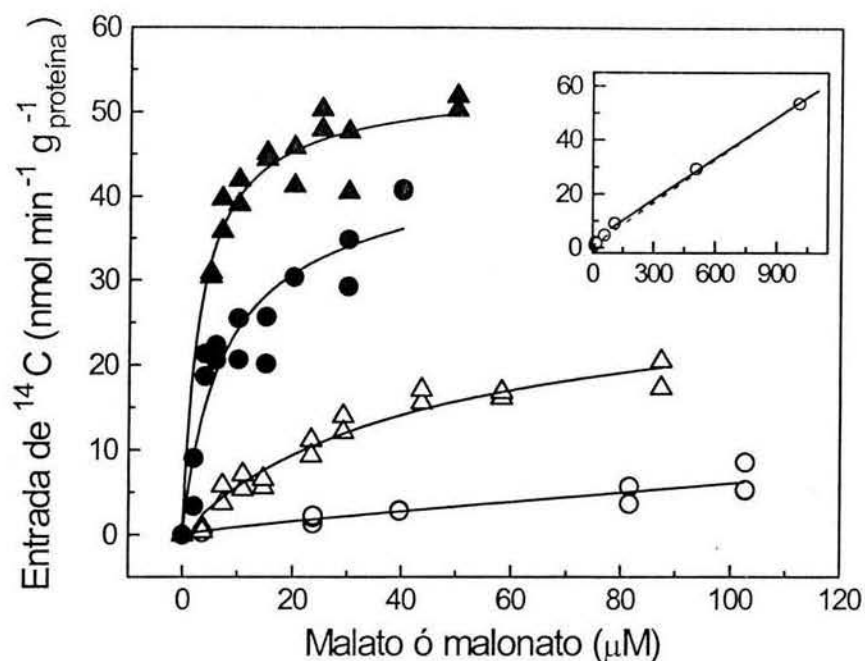


Figura 2. Transporte de [^{14}C]-L-malato (\blacktriangle , Δ) ó [^{14}C]-malonato (\bullet , \circ) en plástidos aislados de embriones inmaduros de maíz antes (Δ , \circ), y después de preincubarlos con L-malato (\blacktriangle) ó malonato 10 mM (\bullet). El transporte se realizó por 1 min a 15 °C. Las líneas se ajustaron con la ecuación 6 usando los valores de los parámetros reportados en la Tabla 3. El recuadro indica la velocidad de transporte antes de preincubar los plástidos con concentraciones crecientes de malonato hasta 1 mM.

Los valores de la Tabla 3 muestran un transporte saturable cuya eficiencia (J_{MAX}/K_M) se incrementa notablemente cuando ambos lados de la membrana tienen concentraciones elevadas del metabolito a transportar (24 veces en el caso de malato y alrededor de 86 veces en el caso de malonato). Este comportamiento es consistente con el de un intercambiador clásico, en este caso de dicarboxilatos.

Tabla 3. Constantes cinéticas del transporte de malato o malonato en plástidos preincubados y sin preincubar con malato o malonato.

Metabolito externo	Metabolito interno	K_M (μM)	J_{max} ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$)	D_p ^c	J_{MAX}/K_M ^c $\text{mL min}^{-1} \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$
[¹⁴ C]-L-Malato ^a	Ninguno	37.4 ± 7.9	26.1 ± 2.6	0.017 ± 0.013	0.70 ± 0.13
[¹⁴ C]-Malonato ^a	Ninguno	13.9 ± 8.3	0.96 ± 0.17	0.06 ± 0.02	0.069 ± 0.037
[¹⁴ C]-L-Malato ^b	L-Malato	3.1 ± 0.5	52.0 ± 1.6	nd	17.0 ± 2.6
[¹⁴ C]-Malonato ^b	L-Malato	6.7 ± 1.9	39.7 ± 3.6	nd	5.93 ± 1.46
Malonato ^d	[¹⁴ C]-Malonato	4.5 ± 3.2	17.6 ± 4.9	nd ^d	4.0 ± 2.5

^a La J_{max} y la K_M se obtuvieron ajustando los datos a la ecuación 6 con el valor de D_p fijo de $0.017 \text{ mL min}^{-1} \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$ para L-malato, y $0.06 \text{ mL min}^{-1} \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$ para malonato. Los valores de D_p se obtuvieron de la pendiente de los datos a alta concentración del L-malato (no mostrado), o malonato (hasta 1 mM) (ver recuadro de la Figura 2), respectivamente.

^b La J_{MAX} y la K_M se obtuvieron de ajustar los datos a la ecuación 6 con una D_p fija a cero.

^c Los resultados son en $\text{mL min}^{-1} \text{g}_{\text{proteína}}^{-1}$.

^d las velocidades se corrigieron al sustraer las velocidad de los controles en la ausencia de malonato externo, lo cual cancela el componente de difusión pasiva.

Los datos de la Figura 2 señalan además que la afinidad del componente saturable por L-malato (en ambas condiciones) es lo suficientemente alta como para considerarla relevante, desde el punto de vista fisiológico. La relevancia del transporte de malonato no es clara, puesto que no se ha reportado un papel fisiológico para este compuesto en el estroma plastidial, lo que no significa que no exista.

Dado que los resultados la Tabla 2 mostraban que otros dicarboxilatos eran capaces de estimular el transporte, la caracterización de este sistema se amplió analizando la salida de L-malato-[¹⁴C] o malonato-[¹⁴C] de plástidos prellenados con el metabolito (0.25 mM , en ambos casos), y su estimulación por diferentes dicarboxilatos. En este tipo de experimentos el control se realiza con plástidos incubados en el medio de transporte, sin metabolito externo; en estas condiciones la radiactividad liberada por difusión pasiva, ya sea desde el espacio permeable a sorbitol o a través de la membrana, se puede determinar y restarse de los demás puntos, eliminando su contribución de las curvas de saturación.

La Tabla 4 presenta los parámetros cinéticos que describen la activación del transporte de malato o malonato por los dicarboxilatos succinato y oxaloacetato, y los aminoácidos glutamato y aspartato. También se muestra el intercambio malonato/malonato y el intercambio del dicarboxilato malonato por el tricarboxilato citrato.

Los dos mejores sustratos para el intercambio con el L-malato fueron el succinato y el oxaloacetato. Un resultado importante y que no se había reportado antes, es que este sistema de intercambio es también capaz de intercambiar malato por pirofosfato (PPi), que es de naturaleza inorgánica. Cabe mencionar que tanto el citrato como el pirofosfato presentan una cierta proporción de sus iones en la forma dianiónica al pH de los ensayos (pH 7.5). A este pH (7.5, cercano al pH del citosol de las células embionarias de maíz (Kurkjian y Guern, 1989)), 90 % del PPi se encuentra ionizado como $\text{HP}_2\text{O}_5^{4-}$, mientras que el 7% presenta una carga de -2, como la mayoría de los dicarboxilatos. Por otro lado, a ese mismo pH y en ausencia de Mg^{2+} , Ca^{2+} u otros cationes divalentes, 99.8 % del malato total presenta una carga de -2.

El pirofosfato es un metabolito importante en la regulación de varios procesos metabólicos entre los que se encuentra la síntesis del almidón en el estroma plastidial (Farré *et al.*, 2000). Con respecto a esta actividad de intercambio de pirofosfato por malato, Lunn & Douce (1996) reportaron el transporte de pirofosfato en cloroplastos de espinaca, pero no encontraron si este transporte se realizaba de manera unidireccional o era mediado por un intercambiador; sin embargo, demostraron que los ácidos nucleicos, el ATP, el ADP, el fosfato o el gradiente de protones no tenían afecto alguno sobre el transporte de PPi. Es probable que la actividad de transporte de pirofosfato reportada por Lunn & Douce (1996) en cloroplastos de espinaca y la actividad de intercambio de pirofosfato por malato encontrada en este trabajo en plástidos de embrión de maíz sean mediadas por una proteína con características similares, sin embargo, es evidente que al tratarse de especies diferentes, este planteamiento es tan sólo una hipótesis, en tanto no exista evidencia experimental directa.

Por otro lado, este intercambio, a diferencia de todos los anteriores, intercambia un compuesto carbonado por otro inorgánico, lo que genera un exporte o importe neto de carbono. Aunque algo semejante podría decirse del intercambio de citrato/malato, no se ha reportado una citrato liasa que pudiera hacer de este sistema una lanzadera de acetato, como ocurre con la mitocondria.

Tabla 4. Parámetros cinéticos del translocador de dicarboxilatos en plástidos aislados de embrión de maíz.

Metabolito de preincubación	Metabolito externo ^a	J_{MAX} (nmol min ⁻¹ g _{proteína} ⁻¹)	K_M (μ M)	J_{MAX}/K_M ^b
[¹⁴ C]-L- malato	succinato	233.7 \pm 18.4	4.4 \pm 2.2	53 \pm 25
[¹⁴ C]-L- malato	oxaloacetato	110.9 \pm 5.9	2.1 \pm 0.8	53 \pm 19
[¹⁴ C]-L- malato	Glutamato	80.3 \pm 5.7	5.2 \pm 1.8	15 \pm 5
[¹⁴ C]- malonato	Malonato	17.9 \pm 4.9	4.5 \pm 3.2	4.0 \pm 2.5
[¹⁴ C]-L- malato	Aspartato	73.4 \pm 14.1	25.8 \pm 8.4	2.8 \pm 0.8
[¹⁴ C]- malonato	Citrato	57.7 \pm 13.1	41.7 \pm 22.8	1.4 \pm 0.7
[¹⁴ C]-L- malato	pirofosfato	226.1 \pm 17.8	180 \pm 38	1.3 \pm 0.2
[¹⁴ C]-L- malato	Malonato	28.8 \pm 12.5	16.1 \pm 10.8	1.8 \pm 0.8

Transporte realizado en plástidos preincubados con [¹⁴C]-malato ó [¹⁴C]-malonato (0.25 mM, 2 μ Ci, por 10 min a 15 °C), se resuspendieron en amortiguador B (ver materiales y métodos). El transporte se inició inmediatamente después de resuspender los plástidos con la adición de éstos a los tubos de transporte con amortiguador B y el metabolito indicado. La velocidad de transporte se determinó como se indica en el texto.

^a Las concentraciones de metabolito externo fueron de 0 a 100 μ M, con excepción de la concentración de pirofosfato, la cual fue de 0 a 300 μ M, y glutamato, succinato y oxaloacetato, de 0 a 30 μ M.

^b Los valores resultantes tienen unidades de nmol min⁻¹ g_{proteína}⁻¹.

9.3.3.2 Inhibición del transporte de dicarboxilatos.

Para ampliar la caracterización del transportador de dicarboxilatos se analizó si análogos de los dicarboxilatos eran capaces de inhibir la actividad de intercambio de malato/malonato. Se estudió el efecto de los ácidos 2-bromohexanóico, sulfobenzoico, ftálico y el *n*-butilmalónico; estos dos últimos son inhibidores del transportador de dicarboxilatos de mitocondria de diferentes especies (Laloi, 1999).

Para realizar estos experimentos se incubaron los plástidos con malato 2 mM a 15 °C por 10 minutos y se inició el transporte transfiriendo a los plástidos a un medio que contenía [¹⁴C]-malato y el inhibidor. En la Figura 3 se muestra que efectivamente estos compuestos inhiben el intercambio de dicarboxilatos, si bien esta inhibición no es completa, lo cual puede deberse al transporte pasivo por la alta concentración de malato en el medio de preincubación. En esta figura se muestran dos controles, el primero es el que indica el 100 % de transporte en plástidos preincubados con malato, y el segundo, denominado blanco, son plástidos sin incubación previa. Los datos indican que estos compuestos inhiben el intercambio de dicarboxilatos con casi la misma efectividad, excepto por el

monocarboxilato 2-bromohexanoico. Los resultados confirman la tendencia del transportador a reconocer compuestos dianiónicos, en los que las cargas tengan cierta separación entre ellas.

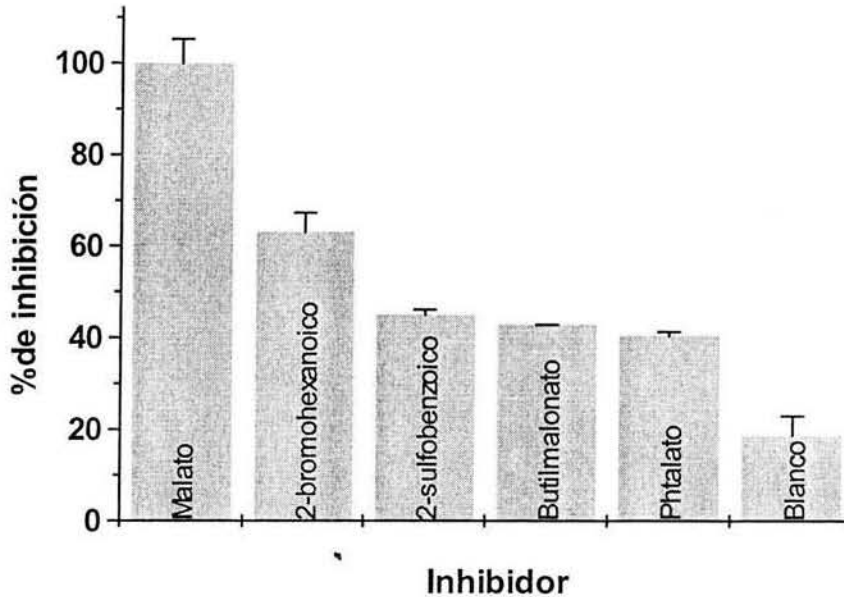


Figura 3. Porcentaje de Inhibición del intercambio de malato/malato por diferentes análogos de dicarboxilatos. Los plástidos se preincubaron con malato 2 mM a 15 °C por 10 minutos y se inició el intercambio al poner en contacto los plástidos con [¹⁴C]-malato 12 μM y 1 mM del inhibidor indicado en cada barra. El tratamiento indicado como blanco son plástidos sin preincubar, y el denominado “malato” son plástidos preincubados con dicho metabolito 2 mM y sin inhibidor, el cual mostraba la mayor velocidad de transporte y fue ajustada a 100%.

Es importante mencionar que en la caracterización de los intercambiadores de dicarboxilatos realizada por Lehner y Heldt (1978), no se observó efecto alguno del *n*-butilmalonato sobre el transporte de los distintos dicarboxilatos empleados para el análisis. En la caracterización posterior de los intercambiadores de 2-oxoglutarato/malato y de glutamato/malato en los cloroplastos de hojas de espinaca y chícharo (Woo *et al.*, 1987a y b; Menzlaff y Flügge, 1993), no se analizó este aspecto. Por lo tanto, en este trabajo se realizó la caracterización cinética de la inhibición del intercambio de malonato/malato por el *n*-butilmalonato, ya que la inhibición por este compuesto en transportadores de dicarboxilatos en mitocondria es la mejor caracterizada (Genchi *et al.*, 1999). Para ello, se preincubaron los plástidos a 15 °C por 10 minutos con [¹⁴C]-L-malato y se midió la

salida de éste durante 1 minuto en presencia de diferentes concentraciones de malonato (2, 4, 6 o 12 μM) como componente fijo-variable y concentraciones variables de *n*-butilmalonato.

En la Figura 4 se muestra el regráfico de Dixon resultante de este experimento. El análisis gráfico muestra que la inhibición es de tipo competitiva, debido a que se observan líneas cuya pendiente disminuye y convergen en un mismo punto en el eje de las abscisas. El análisis por regresión no lineal confirmó este resultado, ya que un ajuste a inhibición no-competitiva muestra que el componente incompetitivo de la inhibición es nulo (K_{IU} tiende a infinito). La K_{IC} encontrada en este último análisis es de $6.7 \pm 2.4 \mu\text{M}$, lo cual indica que este inhibidor se une al transportador con alta afinidad, compitiendo por el sitio activo, en este caso con el malonato, aún cuando el *n*-butilmalonato sólo inhibe el 40 % del transporte (Figura 3). El resultado también sugiere que el *n*-butilmalonato es un auténtico inhibidor (es decir, no se transporta), ya que en el experimento mostrado en la Figura 3, la inhibición podría también explicarse si el ácido añadido fuese transportado, reduciendo por competencia la entrada del malato marcado.

Se analizó también si la fosfomicina presentaba algún efecto sobre el intercambio de dicarboxilatos, pero este compuesto no modificó la actividad de intercambio del L-malato por [^{14}C]-malonato (datos no mostrados).

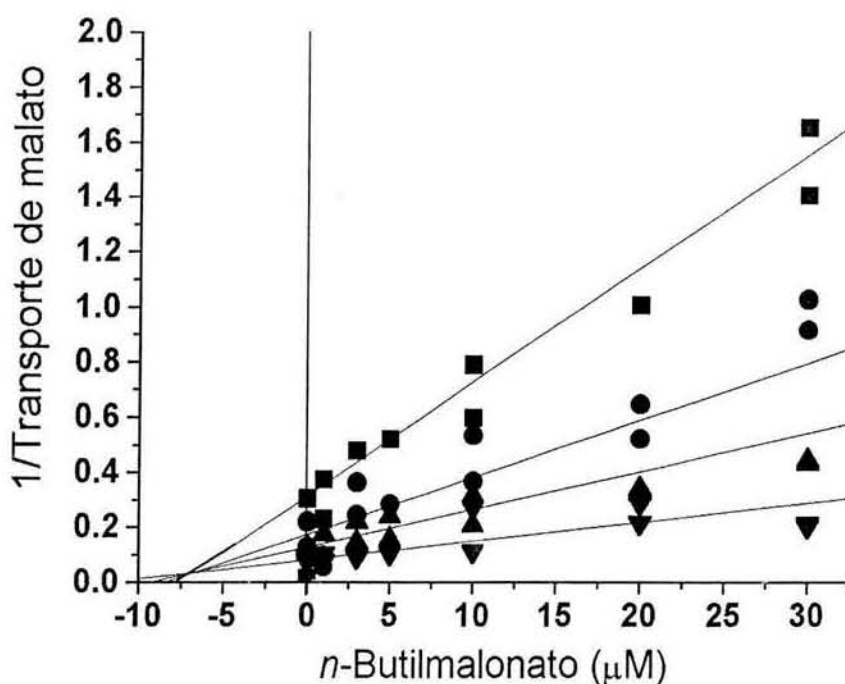


Figura 4. Inhibición del intercambio de malonato/[¹⁴C]-malato por *n*-butilmalonato. Regráfico de Dixon. Los plastidos se preincubaron en amortiguador B con [¹⁴C]-L-malato 0.25 mM, y se midió la velocidad de salida de éste al añadir concentraciones fijas de malonato de 2 (■), 4 (●), 6 (▲) o 12 (▼) μM, y concentraciones variables de *n*-butilmalonato de 0 a 30 μM.

9.3.3.3 Inhibición del intercambio malato/citrato

Con el fin de averiguar si el intercambio de citrato/[¹⁴C]-malato era inhibido también por *n*-butilmalonato se realizó un experimento con plástidos preincubados con [¹⁴C]-malato 0.25 mM en el que se midió la salida de la radioactividad agregando en el medio externo citrato 50 μM y concentraciones crecientes del inhibidor. La curva resultante fue la típica de una inhibición hiperbólica, cuyo análisis por regresión no lineal reveló una I_{50} de 8.0 ± 0.74 μM. Este último valor de inhibición coincide con el valor de K_i de *n*-butilmalonato sobre el intercambio malato/malonato (sección 9.3.3.1), lo cual sugiere la posibilidad de que ambos intercambios sean mediados por un mismo intercambiador o por proteínas transportadoras con características cinéticas semejantes.

9.3.3.4. Caracterización del intercambio de malato/pirofosfato.

Como se mencionó antes (cfr 9.3.3.1), no existe un reporte en la literatura que indique la existencia de una proteína de membrana capaz de intercambiar un dicarboxilato por pirofosfato. En este trabajo se encontró una actividad de intercambio de pirofosfato por malato o malonato en plástidos de maíz. Aunque la K_M para el intercambio $[^{14}\text{C}]$ -malato/PPi es aproximadamente 30 veces más grande que la K_M para el intercambio dicarboxilato/dicarboxilato, el valor de la K_M (0.18 mM) está en el intervalo de la concentración de PPi reportada por Weiner y colaboradores (1987) para el citosol de la célula vegetal (de 0.2 a 0.3 mM).

Para confirmar y caracterizar mejor esta actividad de intercambio, se preincubaron los plástidos de maíz con PPi o malato 10 mM y se midió la tasa de captación de $[^{32}\text{P}]$ -PPi con concentraciones externas de 0 a 900 μM . Los resultados muestran un comportamiento hiperbólico para los intercambios PPi/malato y PPi/PPi (Figura 5), con una K_M de $98.1 \pm 30.1 \mu\text{M}$ y una V_{MAX} de $207.9 \pm 14.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1}$ para el intercambio $[^{32}\text{P}]$ -PPi/malato, mientras que los valores cinéticos para el intercambio $[^{32}\text{P}]$ -PPi/PPi fueron una K_M de $319.1 \pm 76 \mu\text{M}$ y una V_{MAX} de $632.9 \pm 70.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}_{\text{proteína}}^{-1}$.

De acuerdo con estos datos, los intercambios $[^{14}\text{C}]$ -L-malato/PPi (Tabla 4) y $[^{32}\text{P}]$ -PPi/L-malato tienen una V_{MAX} similar, pero la K_M para PPi resultó menor en este experimento, lo que se puede explicar debido a la diferencia en la concentración de L-malato durante la preincubación en ambos experimentos, ya que en los experimentos de la Tabla 4 la concentración de éste fue menor (40 veces, 0.25 mM) y, aunque debería ser suficiente para saturar el transportador con L-malato (Tabla 2), la concentración interna de L-malato que se alcanzó en el estroma durante el periodo de incubación pudo haber sido menor.

Por otro lado, tanto la K_M como la V_{MAX} para el intercambio $[^{32}\text{P}]$ -PPi/PPi fueron mayores que los valores cinéticos correspondientes para el intercambio malato/PPi, lo que resultó en una constante de especificidad (V_{MAX}/K_M) similar (1.98 ± 0.4 , comparada con 2.11 ± 0.58 y 1.3 ± 0.2 , para PPi/L-malato y L-malato/PPi, respectivamente). El hecho de que los valores presenten estas coincidencias, a pesar de la incertidumbre asociada al sistema experimental empleado (organelos enteros) y a la incapacidad para manipular con exactitud las concentraciones internas, permite sostener la propuesta de que estos intercambios son mediados por un mismo sistema de transporte o por varios, pero con características muy semejantes.

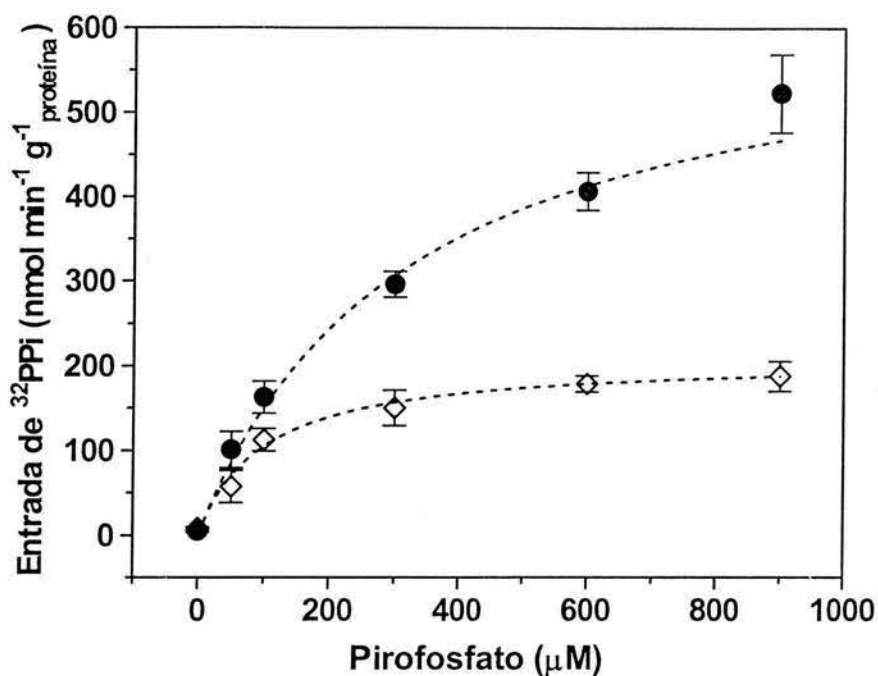


Figura 5. Entrada de $[^{32}\text{P}]$ -Pirofosfato en plástidos aislados de embrión de maíz preincubados con malato (\diamond) ó PPI (\bullet) 10 mM. Los datos representan la media y la desviación estándar de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

La propuesta anterior predice que si un dicarboxilato y el pirofosfato se encuentran en la misma cara de la membrana, entrarían en competencia para ser transportados; por ello, se analizó si la presencia de malato en el medio externo tenía algún efecto sobre el intercambio $[^{32}\text{P}]$ -PPi/PPi. Para este experimento se preincubaron los plástidos con PPI 10 mM y se agregó en el medio externo una concentración fija de $[^{32}\text{P}]$ -PPi (180 μM), junto con concentraciones variables de L-malato (de 0 a 50 μM). La Figura 6 muestra la inhibición de la entrada de $[^{32}\text{P}]$ -PPi, con una I_{50} de 3.4 ± 0.9 μM . Este resultado concuerda con la predicción y, además, la I_{50} es consistente con la K_M reportada en la tabla 2 para el intercambio malato/malato, lo que representa un buen apoyo para la propuesta planteada.

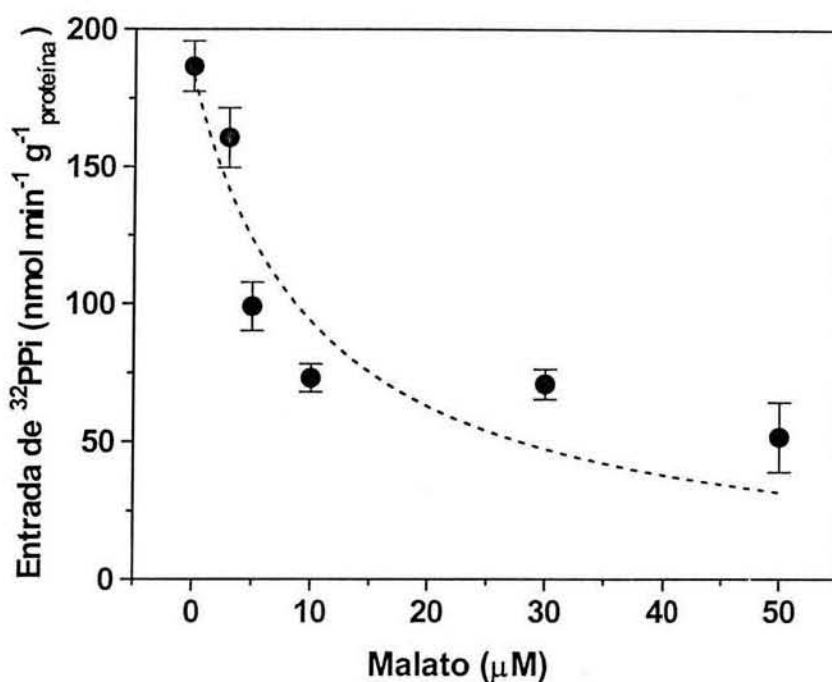


Figura 6. Inhibición del intercambio $[^{32}\text{P}]\text{-PPi/PPi}$ por L-malato. Los plástidos se preincubaron con PPi 10 mM, y se realizó el intercambio con $[^{32}\text{P}]\text{-PPi}$ 180 μM y concentraciones crecientes de L-malato. El valor de I_{50} fue de $3.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$. Los datos representan la media \pm SD de dos experimentos independientes realizados por duplicado.

De acuerdo con lo anterior, se esperaría que el *n*-butilmalonato fuese capaz de inhibir tanto el intercambio $[^{32}\text{P}]\text{-PPi/PPi}$, como el intercambio $[^{32}\text{P}]\text{-PPi/malato}$. Estos experimentos se realizaron con plástidos preincubados con PPi ó malato 10 mM, manteniendo fija la concentración de $[^{32}\text{P}]\text{-PPi}$ externa y variando la concentración del inhibidor. La Figura 7 muestra una inhibición hiperbólica en ambos casos, con una I_{50} de $10.4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ y de $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ para los intercambios $[^{32}\text{P}]\text{-PPi/PPi}$ y $[^{32}\text{P}]\text{-PPi/malato}$, respectivamente. Nuevamente, los resultados confirman la predicción y los valores de I_{50} son consistentes con la magnitud de la K_i para la inhibición del intercambio malonato/ $[^{14}\text{C}]\text{-malato}$ por el *n*-butilmalonato y cercanos a la I_{50} de este inhibidor para el intercambio citrato/malonato.

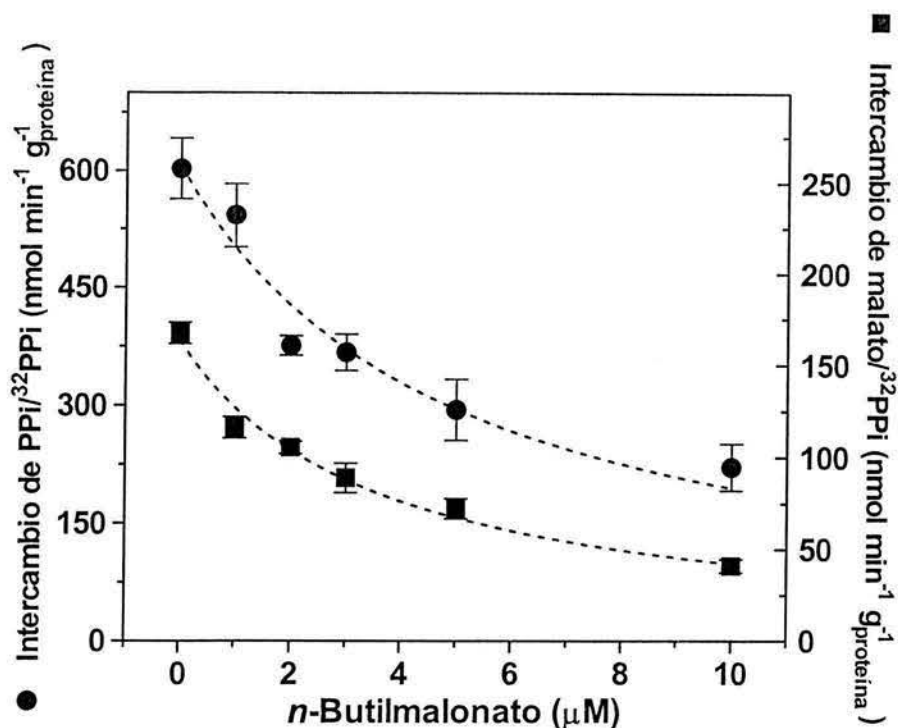


Figura 7. Inhibición de los intercambios de [³²P]-PPi/PPi y [³²P]-PPi/L-malato por *n*-butilmalonato. Los plástidos se preincubaron con PPi 10 mM (●) o L-malato 10 mM (■). La entrada de [³²P] se midió agregando al medio externo [³²P]-PPi 180 μM (0.6 μCi/nmol) y concentraciones crecientes de *n*-butilmalonato. Los datos representan la media ± DS de dos experimentos independientes realizados en dos preparaciones diferentes.

Independientemente de la semejanza numérica encontrada en las distintas I_{50} , tanto para *n*-butilamalonato sobre los intercambios [³²P]-PPi/PPi, [³²P]-PPi/malato, malonato/[¹⁴C]-malato y citrato/[¹⁴C]-malato, como para malato sobre el intercambio [³²P]-PPi/PPi, el hecho de que el efecto haya sido de inhibición indica que dichas actividades son mediadas por una misma proteína o por un grupo de proteínas con características cinéticas similares.

Finalmente, si es un sistema de transporte en los plástidos del embrión de maíz, como se ha propuesto hasta ahora, el [³²P]-PPi debería ser intercambiado por otros dicarboxilatos distintos al malato. En la Tabla 5 se muestra la velocidad de entrada de [³²P]-PPi en plástidos y preincubados con distintos metabolitos y, como se puede apreciar, la entrada de PPi es estimulada por los mismos metabolitos que estimulan la entrada de malato, en concordancia con la propuesta.

Tabla 5. Entrada de [³²P]-pirofosfato en plástidos aislados de embriones de maíz en desarrollo.

Substrato interno de preincubación ^a	Entrada de [³² P] (nmol min ⁻¹ g _{Proteína} ⁻¹)
Ninguno	21.6 ± 7.2
Pirofosfato	134.5 ± 47.2
Oxaloacetato	75.9 ± 20.4
Succinato	69.3 ± 23.2
L-malato	63.5 ± 8.2
Glutamato	39.0 ± 6.6
Aspartato	31.7 ± 16.5

^a Los plástidos se preincubaron con el metabolito indicado (1 mM con excepción del tratamiento basal, donde no se preincubaron los plástidos) por 5 min a 15 °C en amortiguador B (ver materiales y métodos). El transporte se inició con la adición de [³²P]-pirofosfato (180 μM y 0.6 μCi/nmol, concentración final). La velocidad de transporte se determinó como se indica en materiales y métodos.

9.3.4 Estabilidad del malato y del pirofosfato en las condiciones experimentales empleadas.

Debido a que en estos experimentos se trabajó con plástidos íntegros, los cuales tienen un metabolismo complejo, potencialmente capaz de metabolizar tanto al malato como al pirofosfato, se realizaron incubaciones de los plástidos con estos compuestos y se recuperó el contenido de los plástidos, con el fin de averiguar si la velocidad de entrada de dichos metabolitos se afecta por efectos del metabolismo. Para realizar estos controles se incubaron los plástidos con [¹⁴C]-malato (Figura 8A) ó [³²P]-PPi (Figura 8B), a concentraciones similares a las empleadas en los experimentos de transporte, a 15 °C por 1 ó 15 minutos, en tubos con capa de silicona sencilla y se paró la reacción al centrifugar los tubos a 12 000 rpm por un minuto.

En ambos casos se recuperó la fase inferior, en la que se encontraba los plástidos rotos y su contenido radioactivo, así como alícuotas de la fase superior, con el metabolito radioactivo remanente. Las muestras se neutralizaron y se aplicaron a placas de capa fina, que se desarrollaron y se revelaron por exposición a una pantalla de fosforencia (fosforimager®). Como se aprecia en la Figura 8A y 8B, en cada carril sólo hay una mancha que corre a la par que el estándar, lo cual indica que durante la incubación con los metabolitos, la maquinaria biosintética no logró transformarlo en otros metabolitos más pequeños, en cantidades suficientes para ser detectados en la placa.

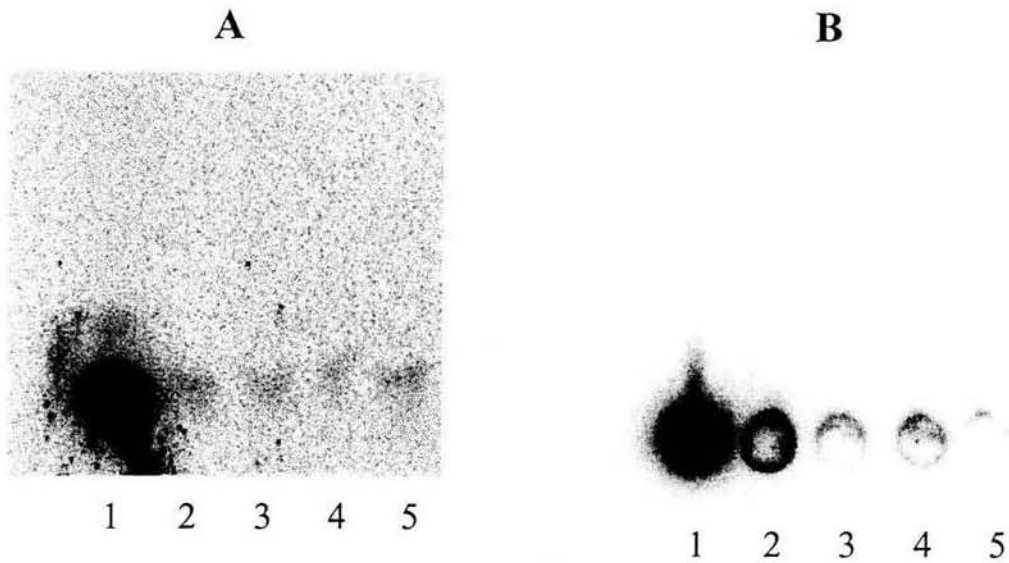


Figura 8. Plástidos preincubados con [^{14}C]-malato (A) ó [^{32}P]-PPi (B) por 1 ó 15 min. A) 1. [^{14}C]-malato comercial; 2. plástidos incubados 1 min + [^{14}C]-malato en fase inferior, posterior a la centrifugación; 3 plástidos + [^{14}C]-malato, fase superior, posterior a la centrifugación; 4 plástidos + [^{14}C]-malato, fase superior, previo a la centrifugación; 5. plástidos incubados 15 min + [^{14}C]-malato en fase inferior posterior a la centrifugación. B) Igual que A pero en lugar de [^{14}C]-malato se empleó [^{32}P]-PPi.

9.4. Intercambio de fosfoenolpiruvato por fosfato

9.4.1 Tiempo de transporte.

A semejanza de la caracterización realizada para el intercambiador de dicarboxilatos, para el de PEP/fosfato se inició el estudio evaluando la velocidad de transporte de [^{14}C]-PEP en función del tiempo. Este transporte resultó ser más rápido que el de dicarboxilatos, ya que la máxima velocidad de transporte se efectuó en el primer minuto de transporte de [^{14}C]-PEP, por lo cual se decidió realizar todas las determinaciones posteriores a los 15 segundos de transporte a 15 °C.

9.4.2. Características cinéticas del intercambiador PEP/Pi (PPT)

Para iniciar la caracterización cinética de este transportador, se realizó una curva de saturación con PEP, incubando los plástidos con fosfato de potasio 5 mM por 10 min previos al inicio del transporte. El transporte se inició agregando los plástidos en la capa superior de los tubos con capa sencilla de silicona y concentraciones crecientes de [14 C]-PEP. En la Figura 9 se muestra la curva de saturación para este intercambio.

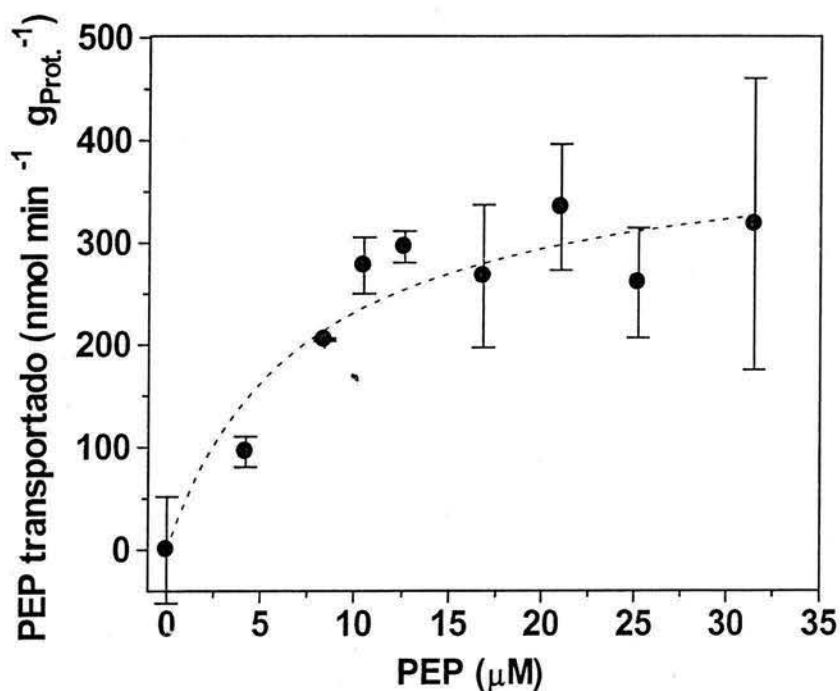


Figura 9. Curva de saturación del intercambio [14 C]-PEP/Pi. En plástidos asilados de embrión de maíz. Estos se preincubaron con K_2PO_4 5 mM por 10 min. Para iniciar el transporte se agregaron concentraciones crecientes de [14 C]-PEP, parándose el transporte tras 15 segundos de incubación a 15 °C por centrifugación.

Como ya se mencionó (sección 5.10.2.1.2), el PPT puede intercambiar, con alta afinidad, PEP ó 2PGA por fosfato, pero transporta pobremente triosas fosfato ó 3PGA. En este trabajo, como se indica en la Figura 9, se verificó una actividad de transporte de PEP por Pi en plástidos de embrión de maíz, con una K_M de $1.4 \pm 0.17 \mu M$ y una V_{MAX} de $402.2 \pm 41.3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ gProteína}^{-1}$ empleando como sustrato [14 C]-PEP.

El [^{14}C]-PEP empleado para realizar estos experimentos se sintetizó en el laboratorio (veáse Métodos, sección 8.2.7), pero el rendimiento y la actividad específica del PEP radioactivo obtenido fueron bajas, a lo que se le suma el hecho de que sólo una fracción de la radiactividad es captada. Como la certidumbre de las medidas era pobre, se decidió medir el transportador empleando [^{32}P]-Pi como sustrato.

Para realizar estos experimentos se preincubaron los plástidos con [^{32}P]-Pi por 10 minutos a 15 °C y pH 7.5, y se determinó la liberación de [^{32}P] estimulada por PEP ó 2PGA en el medio externo (Figura 10). El transporte se inició al poner en contacto los plástidos preincubados con el metabolito externo en la fase superior en los tubos con capa sencilla de silicona, se incubó por 15 segundos a 15 °C y la reacción se paró por centrifugación a 15000 rpm por 1 min.

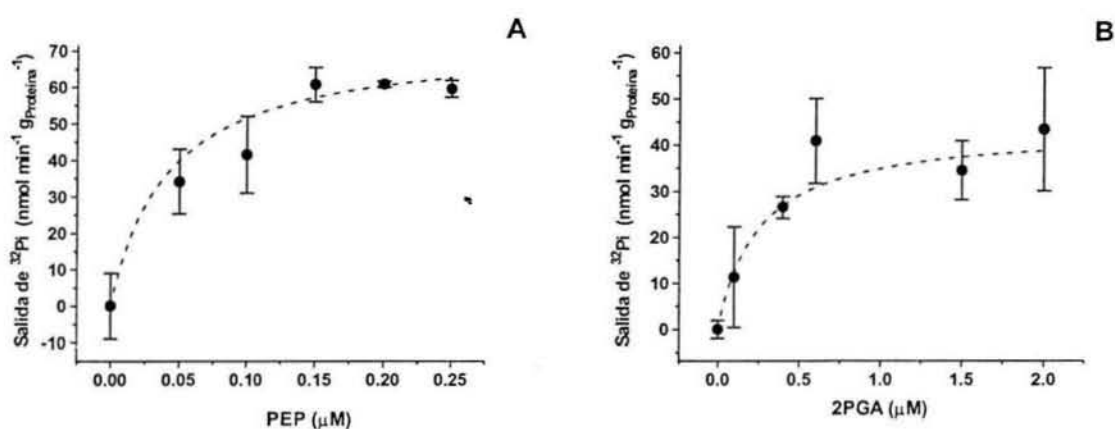


Figura 10. A) Curva de saturación por PEP de PPT en plástidos preincubados con [^{32}P]- PO_4^{3-} , aislados de embrión de maíz; B) curva de saturación por 2PGA de PPT en el mismo sistema.

Del análisis de las curvas en la Figura 10 se obtuvieron, para la saturación con PEP, los valores de $72.9 \pm 7.4 \text{ nmol min}^{-1} \text{ gProteína}^{-1}$ para la V_{MAX} y de $0.041 \pm 0.024 \mu\text{M}$ para la K_{M} , y para la saturación con 2PGA, $43.6 \pm 10.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ gProteína}^{-1}$ para la V_{MAX} , y $0.25 \pm 0.17 \mu\text{M}$ para la K_{M} . Es evidente que la afinidad de la PPT por PEP es muy alta, siendo aproximadamente 6 veces más afin por PEP que por 2-PGA. En la literatura se ha reportado el valor de la K_{M} del PPT para el intercambio PEP/Pi en cloroplastos de brotes de coliflor y con respecto al reportado aquí es 4 órdenes de magnitud más grande (Fisher *et al.*, 1997).

Sin embargo, hay varios aspectos que podrían explicar estas diferencias: por un lado, pueden existir diferencias importantes entre las dos especies, por otro, las determinaciones reportadas por Fisher *et*

al. (1997) se realizaron con proteína recombinante expresada en levadura y reconstituída en liposomas, lo que podría resultar en un procesamiento o un ensamblado a la membrana diferente del transportador. Además, los experimentos reportados por este autor se realizaron con fosfato saturante en el interior de los liposomas, mientras que la concentración de fosfato en el interior del estroma plastidial puede resultar bastante baja, dada la elevada avidéz del metabolismo plastidial por el fosfato y el hecho de que el fosfato puede incorporarse a numerosas moléculas en el estroma. Por ello, si el mecanismo cinético del intercambio es de doble desplazamiento, como se ha reportado, una baja concentración interna de fosfato resultaría en una baja K_M , así como en una baja V_{MAX} .

9.4.3. Efecto de fosfomicina sobre el PPT.

Como se mencionó, la FSM es un análogo de PEP que inhibe a la PK y activa a la PEP carboxilasa. Sin embargo, dada la importancia del PEP en el metabolismo de las plantas, es poco probable que sólo en estos dos puntos la FSM ejerza su efecto en la célula, ya que al ser un análogo del PEP, es posible que afecte la actividad de otras enzimas que interactúen con el PEP. Uno de los posibles puntos donde la FSM podría tener algún efecto es sobre el PPT. En este trabajo se analizó esta posibilidad.

Para evaluar el efecto de la FSM sobre el PPT se realizó una curva de inhibición preincubando los plástidos con [32 P]-Pi por 10 min. a 15 °C. El transporte se inició colocando los plástidos en un medio con una concentración fija de PEP (0.1 μ M) y concentraciones crecientes de FSM, tal como se muestra en la Figura 11. Efectivamente, se observó una inhibición hiperbólica del intercambio PEP/Pi por FSM, encontrándose una I_{50} de $0.18 \pm 0.018 \mu$ M.

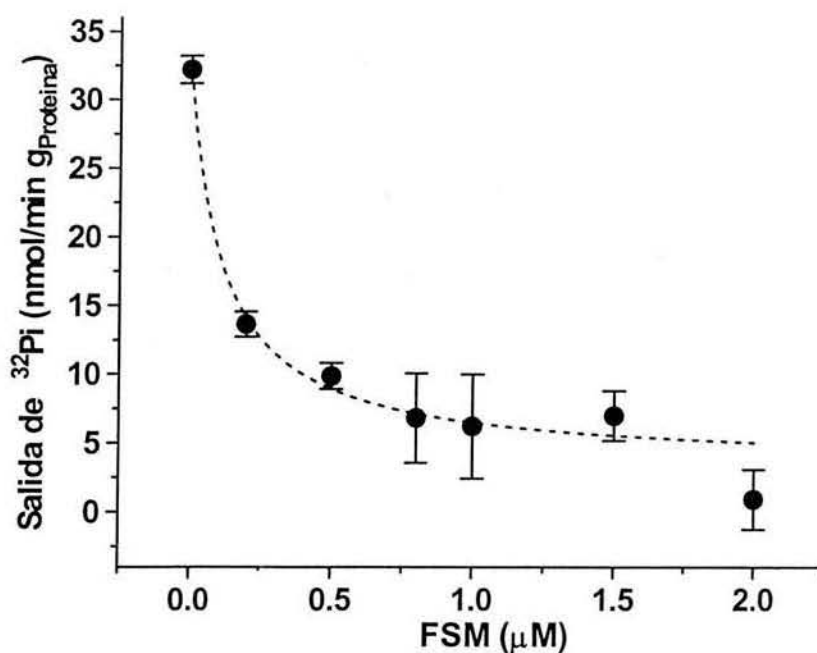


Figura 11. Curva de inhibición de PPT por FSM. Los plástidos se preincubaron con $[^{32}\text{P}]\text{-Pi}$ 0.5 mM por 10 min a 15 °C. La concentración externa de PEP fue de 0.1 μM .

Comparado con la I_{50} de la FSM sobre la PK (2.65 ± 1.33 mM, Lara-Núñez, 1999), el valor aquí reportado es 4 órdenes de magnitud menor, lo que correlaciona con la K_M (PEP) para este transportador. Con este resultado, es posible proponer que la inhibición del PPT por la FSM puede modificar el balance en el uso de carbono entre el plástido y el citoplasma, al limitar el paso del PEP proveniente de la glicólisis citosólica hacia el plástido, en donde es precursor de aminoácidos aromáticos, metabolitos secundarios derivados del indol y, posiblemente, de ácidos grasos. Consecuentemente, el exceso de PEP en el citosol quedaría disponible para ser transformado en oxaloacetato por la PEP carboxilasa, la cual se estimula por FSM, lo que podría proveer de carbono al ciclo de Krebs y estimular, de esta manera, la síntesis de aminoácidos.

9.4.4. Análisis cinético de la inhibición de PPT por FSM

A continuación, se realizó una caracterización más detallada de la inhibición del PPT por FSM para conocer el mecanismo de inhibición. Nuevamente, se incubaron plástidos con $[^{32}\text{P}]\text{-Pi}$ en condiciones similares a las descritas arriba, pero ahora, con cuatro concentraciones fijas distintas de

PEP. Con estos datos se contruyó el gráfico de la Figura 12, propuesto por Cornish-Bowden. Gracias al análisis gráfico de Cornish-Bowden, se confirma que la inhibición es de tipo acompetitiva ya que la pendiente de las líneas aumenta conforme aumenta la concentración de PEP y éstas convergen en un mismo punto.

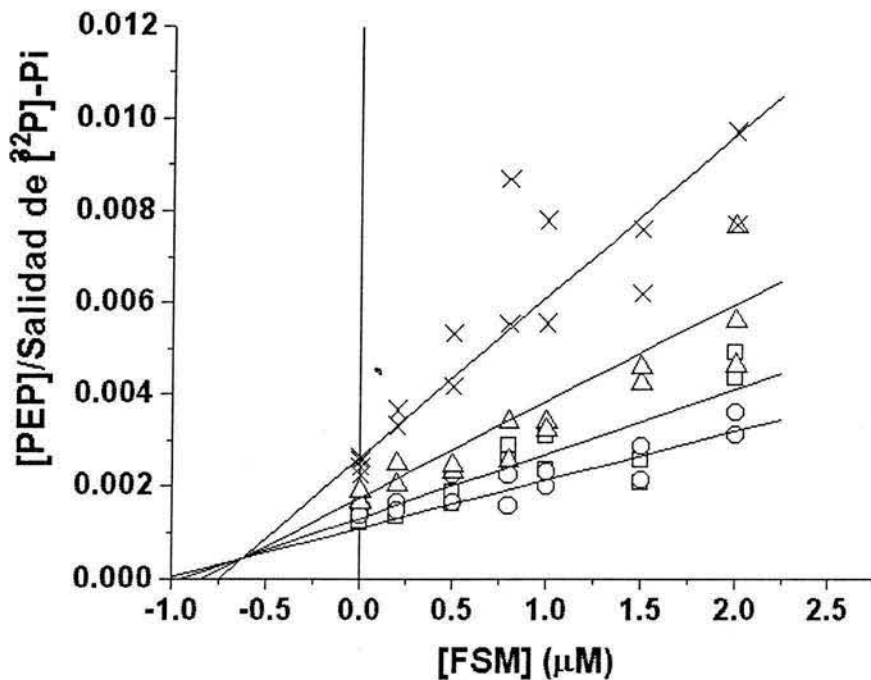


Figura 12. Análisis gráfico de la inhibición de PPT por FSM. Los plástidos se preincubaron con $[^{32}\text{P}]\text{-Pi}$ 0.5 mM. Para iniciar el transporte se agregó en el medio externo las siguientes concentraciones de PEP como sustrato fijo: 0.03 (\square), 0.04 (\circ), 0.06 (Δ) y 0.1 μM (\times), mientras que las concentraciones variables de FSM fueron de 0 a 2 μM . A) Análisis gráfico propuesto por Cornish-Bowden.

La interpretación del análisis gráfico de la Figura 12 se confirmó mediante un análisis por regresión no lineal, de donde se concluyó que la FSM se une al complejo que forman el transportador y el PEP, ó al complejo formado por el transportador y el Pi, con una K_i de $0.63 \pm 0.08 \mu\text{M}$, lo que indica gran afinidad entre la FSM y el transportador, concordante con la afinidad que esta proteína muestra por sus sustratos.

9.4.5. Otros efectos de la FSM

Se ha reportado que el sitio de unión del sustrato es semejante en los dos intercambiadores (TPT y PPT), por lo cual es factible que si la FSM inhibe al PPT, también pudiese inhibir al TPT. Aun cuando se sabe que el TPT se expresa pobremente en tejidos no fotosintéticos, como es el embrión de maíz, no se puede suponer que esté por completo ausente en los plástidos de embrión de maíz. Por ello, se realizó un experimento incubando plástidos con [^{32}P]-Pi y se agregó, como sustrato, 3-PGA ó PEP 50 μM , en ausencia y en presencia de FSM 100 μM . La actividad de transporte de 3PGA fue de la actividad de transporte de PEP, y el transporte de 3PGA se inhibió en un 50 % por FSM, mientras que la actividad de transporte de PEP se inhibió en un 87 % con el mismo compuesto. Como conclusión de este experimento se puede decir que es posible que el efecto de FSM sobre el TPT contribuye al efecto global de FSM en el metabolismo del embrión, sin embargo su contribución debe ser pequeña, dada la baja actividad de este transportador, aunado a que la inhibición por FSM es sólo parcial.

9.4.6. Inhibición del PPT por arsenato y vanadato.

Con el fin de tener más herramientas para caracterizar a este transportador se hizo un análisis del efecto de las sales de arsenato y de vanadato sobre el PPT, ya que ambas son análogas del fosfato, sustrato que se intercambia por PEP ó 2PGA.

Nuevamente se realizaron curvas de inhibición. En este caso, se preincubaron los plástidos con PEP 1 mM, por 10 min. y a 15 °C, con [^{32}P]- Na_2HPO_4 100 μM en el medio externo y concentraciones crecientes de arsenato de sodio hasta 0.7 mM o de vanadato de potasio hasta 5 mM. En ambos casos se observó una inhibición (Figura 13), siendo la I_{50} para arsenato de $14.4 \pm 4.7 \mu\text{M}$, y para vanadato de $530 \pm 200 \mu\text{M}$.

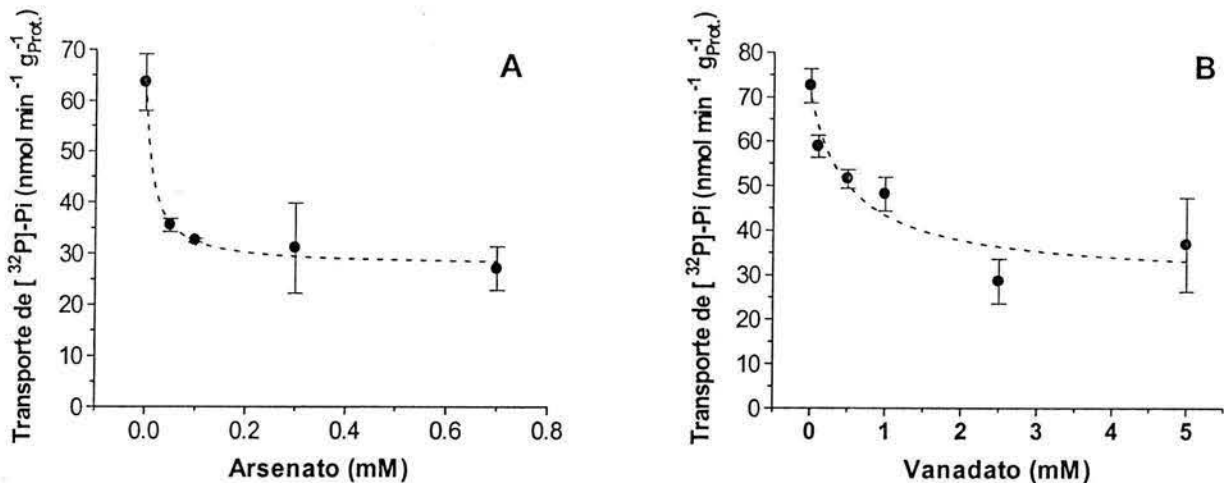


Figura 13. Curvas de inhibición del transporte de $[^{32}\text{P}]\text{-PO}_4^{3-}$ en plástidos incubados con PEP 1 mM por 15 min a 15° C. A) inhibición por arsenato; B) inhibición por vanadato.

De las curvas anteriores se aprecia que el arsenato es mejor inhibidor del intercambio $[^{32}\text{P}]\text{-Pi/PEP}$ que el vanadato, ya que la I_{50} para arsenato es 35 veces más pequeña que la I_{50} para vanadato, lo cual indica que el arsenato se une con mayor afinidad al PPT. Sin embargo la FSM resultó ser un inhibidor mucho más potente que los dos aniones anteriores, ya que para inhibir a este transportador se requiere una concentración aproximadamente 100 veces menor que la concentración requerida para inhibir con cualquiera de los dos análogos de fosfato. Cabe destacar que no se conoce la afinidad del transportador por el fosfato, ni se determinó el mecanismo de la inhibición.

Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se reporta algún tipo de inhibidor para el PPT, y también es la primera vez que se comprueba que los análogos de fosfato pueden inhibir la actividad del PPT.

9.5. Síntesis de lípidos y proteínas en el interior del plástido.

Con el fin de relacionar las características cinéticas de los transportadores con su posible papel fisiológico, se analizó la capacidad biosintética de los plástidos. Como precursores de la síntesis se incluyeron, en el medio externo, $[^{14}\text{C}]\text{-acetato}$ o $[^{14}\text{C}]\text{-malato}$, solos o junto con metabolitos o inhibidores que pudieran afectar el intercambio con el estroma, esto último con el fin de analizar el posible efecto de los transportadores al permitir o no el paso de los metabolitos claves.

Como primer paso se demostró la integridad metabólica de los plástidos, analizando la capacidad para biosintetizar ácidos grasos. En estos mismos experimentos se estimó el tiempo más

conveniente para obtener una incorporación que facilitara la medición de la biosíntesis *de novo*. Para realizar este experimento se incubaron los plástidos de embrión de maíz en el medio C, con [¹⁴C]-acetato, a 25 °C, por 5, 15 y 30 minutos, parándose la reacción con una mezcla de cloroformo-metanol 1:1 (v/v). Posteriormente se separó la fase acuosa de la orgánica, ya que los lípidos se encuentran en la fase orgánica, mientras que la fracción proteica plastidial se encuentra disuelta en la fase acuosa y en el paquete formado entre la fase acuosa y la orgánica. En este experimento se trabajó sólo con la fase orgánica, es decir, con los lípidos radioactivos sintetizados *de novo*, ya que se ha reportado que el acetato marcado se incorpora eficientemente en lípidos y su entrada a este organelo es por difusión pasiva (Smith *et al.*, 1992).

Una vez evaporado el cloroformo de la fase orgánica, se disolvieron los lípidos en 50 µL de hexano y se aplicó la mitad de este volumen a una capa fina de sílica sobre aluminio (TLC). Los lípidos se separaron con un sistema de solventes que resolvía los lípidos neutros (véase Métodos, sección 8.2.6.). Esta placa se expuso a una pantalla de fosforescencia, de la que se recuperó una imagen de la emisión radiactiva mediante el equipo BioRad FX. En la Figura 14 se muestra de la imagen de marca radiactiva obtenida para el experimento anterior, comparada contra la misma placa revelada con yodo

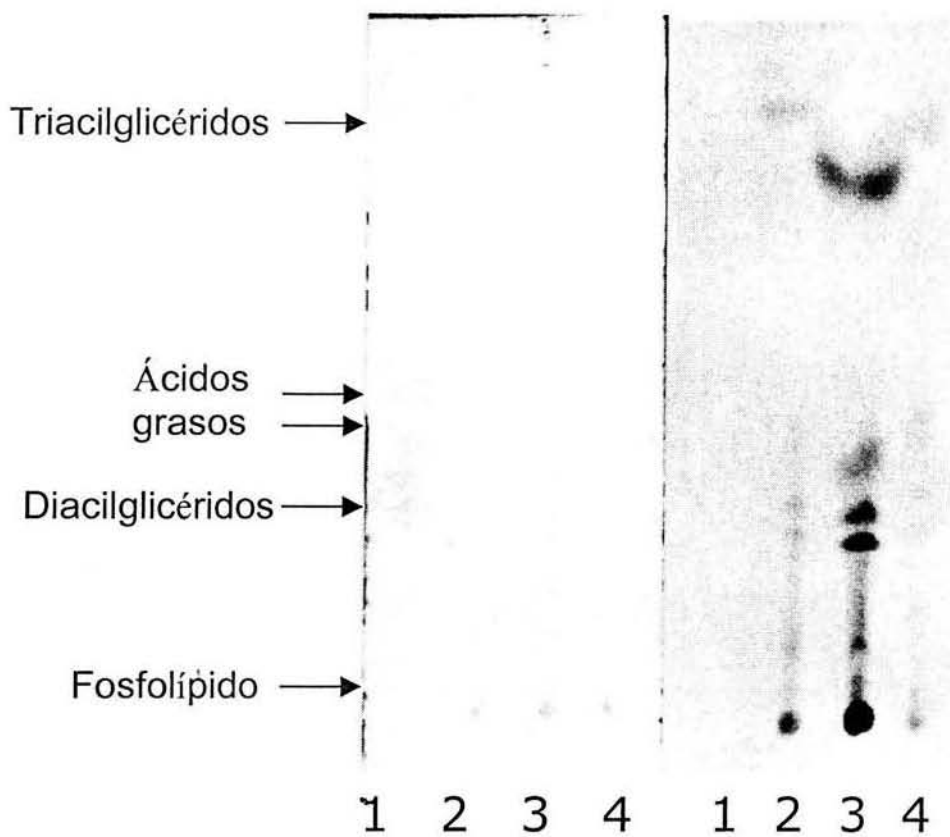


Figura 14. Cromatografía de placa fina. Lípidos en placa de sílica eluidos con hexano-éter etílico-ácido acético (75:25:1 v/v). Tres lotes de plástidos se incubaron con $[^{14}\text{C}]$ -acetato por 5 (carril 2), 15 (carril 3) y 30 minutos (carril 4) a 25 °C. Las muestras fueron tratadas como se describe en materiales y métodos (sección 8). El carril 1 contiene un estándar de aceite de oliva.

A los 15 minutos se observa una incorporación máxima. No tenemos una explicación para la pérdida de marca a los 30 minutos, pero es un aspecto que se desvía de la línea de la presente investigación y no se realizó ningún experimento adicional en este sentido.

En la Figura 14 (panel B) hay una importante cantidad de marca en ácidos grasos y también hay marca en otras clases de lípidos, que seguramente corresponden a otros glicerolípidos como diacilgliceroles, glucolípidos y fosfolípidos. El tipo de distribución corresponde a lo reportado para la actividad plastidial en otros estudios (Rawsthorne 2002, Ohlrogge y Jaworski 1997). Por otro lado, dada la complejidad del metabolismo involucrado, la habilidad de los plástidos para sintetizar ácidos grasos e incorporarlos en lípidos complejos revela la conservación de la integridad de los plástidos.

9.5.1. Incorporación de [^{14}C]-acetato y [^{14}C]-malato en lípidos y proteínas plastidiales.

A continuación se analizó más detalladamente la incorporación de malato y acetato marcados en los plástidos, determinando la cinética de incorporación de la marca tanto en la fracción lipídica como en la proteica. Para esto, se incubaron los plástidos con cada uno de los metabolitos y tras parar la reacción con una mezcla de cloroformo-metanol 1:1 (v/v) y separar la fracción acuosa, de la orgánica se cuantificó la radioactividad incorporada en la fracción lipídica y en la proteica (Figura 15). En este caso se consideraron tiempos de incubación con el metabolito marcado más cortos, acorde al tiempo de intercambio de dicarboxilatos.

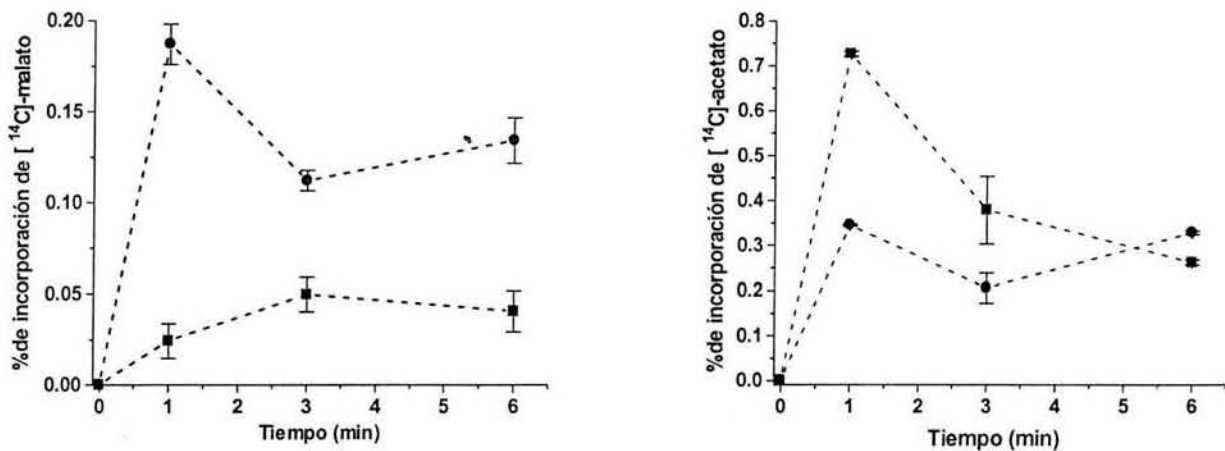


Figura 15. Cinética de incorporación de marca en la fracción lipídica (■) o en la fracción proteica (●) de plástidos incubados con [^{14}C]-malato o [^{14}C]-acetato.

Como se aprecia en la Figura 15, el tiempo óptimo para incubar los plástidos con cualquiera de los dos metabolitos marcados fue de 2 a 3, minutos debido a que se deseaba observar la incorporación de la marca en los lípidos y las proteínas y la influencia en ésta de los transportadores en estudio. En la Figura 15 se observa que hay una incorporación rápida en el primer minuto y luego decae, como es el caso de ambos compuestos de reserva cuando se incuban los plástidos con acetato, no obstante que a los 15 minutos se observa la máxima incorporación de [^{14}C]-acetato en lípidos (Figura 14).

Por las razones expuestas arriba, se decidió incubar los plástidos con cualquiera de los dos metabolitos marcados por dos minutos, cuando se deseaba observar la participación de los

transportadores directa o indirectamente en la síntesis *de novo* tanto de lípidos como de proteínas, y, además, se realizaron incubaciones con dichos metabolitos por 15 minutos cuando el interés se centraba en analizar solamente el efecto de dicho metabolito sobre la biosíntesis de lípidos y proteínas en el plástido.

9.5.2. Incorporación de acetato en relación al transporte de dicarboxilatos.

Con el fin de determinar cómo la presencia de malato afectaba la biosíntesis de ácidos grasos a partir de acetato, se incubaron los plástidos por 15 minutos, a 25 °C, con [¹⁴C]-acetato, en ausencia o presencia de L-malato, L-malato más *n*-butilmalonato u oxaloacetato (100 μM de cada uno). En la Figura 16 se muestra la incorporación de [¹⁴C]-acetato en los lípidos (panel A) y en la fracción proteica (panel B) para dicho experimento.

La presencia de L-malato reduce la incorporación de acetato en los lípidos, lo cual puede explicarse si el carbono del L-malato está incorporándose en los lípidos y desplaza parte del acetato. Pero sorpresivamente, se observa un aumento de la marca en las proteínas. La pregunta aquí es ¿de qué manera la marca de acetato puede llegar a la fracción proteica del plástido? Aclarar esta interrogante es central para poder especular sobre el efecto de los compuestos añadidos en el metabolismo plastidial. Es importante mencionar que, dado el tiempo de incubación largo, se observa sólo la influencia del metabolito como tal y podría haber poco o ningún efecto del acarreador que transporta el malato al estroma plastidial, donde tiene lugar la biosíntesis, pues al final del experimento el o los acarreadores que median el transporte de malato se encontrarían completamente en equilibrio.

Dado que no se ha demostrado que los plástidos sean muy activos en la síntesis de aminoácidos alifáticos (a los que se puede incorporar el carbono proveniente del acetato), la hipótesis más obvia es que la marca se debe a los intermediarios en la síntesis de ácidos grasos, es decir, los [¹⁴C]-acil-proteína acarreadora de acilos ([¹⁴C]-acil-ACP). Para aportar evidencia de lo anterior, la fracción proteica se separó, una parte se trató con 10 mM NaCN, en 0.1 N NaOH y la otra parte se conservó como control. Ambas fracciones se aplicaron a un gel de SDS-PAGE y se recuperaron los carriles con las bandas de proteína. La marca radiactiva en estos carriles se determinó y se encontró que el tratamiento con cianuro alcalino eliminaba más del 90% de la radiactividad. Este experimento demuestra que la marca en proteínas se encontraba unida mediante enlaces susceptibles de romperse por un tratamiento suave, que usualmente se emplea para romper puentes de disulfuro y que igualmente puede degradar tioésteres. Es decir, 90% o más de la marca corresponde a [¹⁴C]-acil-

ACPs. Por ello de aquí en adelante, se considerará que la marca en proteína indica la cantidad de marca en acil-ACPs.

Así aquellos efectos que impidan la utilización de acetato para la síntesis de lípidos tendrán el mismo efecto sobre la marca en la fracción lipídica y en la fracción de acil-ACPs. Por el contrario, si la incorporación de acetato no se bloque por completo, pero la biosíntesis de lípidos reduce su flujo por efectos regulatorios propios del sistema, es de esperarse un incremento en los intermediarios que son sustrato de aquellas enzimas sujetas a regulación. En este sentido, se ha demostrado que la acumulación de decanoil-ACP's ocurre cuando la síntesis de ácidos grasos se encuentra detenida en cloroplastos y en bacterias, debido, muy probablemente, a la inhibición por retroalimentación de una de las enzimas condensantes de las plantas (Ohlrogge y Jaworski, 1997).

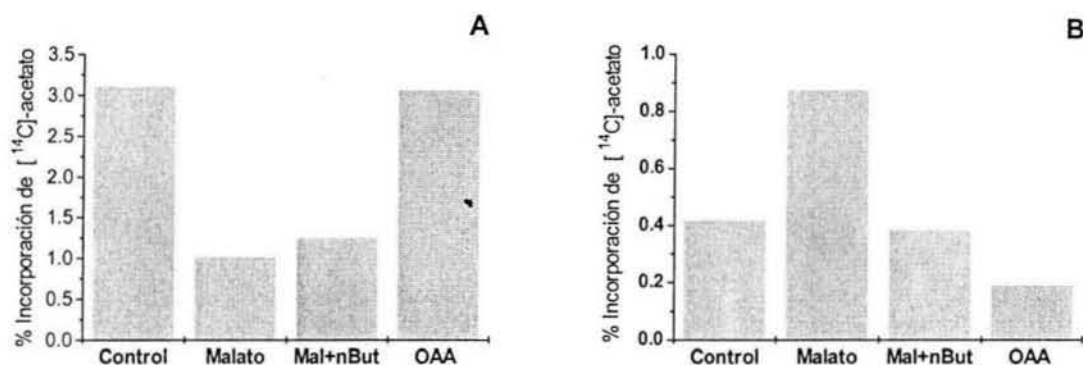


Figura 16. Plástidos incubados con acetato marcado y malato, malato más *n*-butilmalonato u oxaloacetato 100 mM por 15 minutos a 15 °C. A) Fracción lipídica; B) Fracción proteica.

Volviendo a los resultados de la Figura 16, dos aspectos pueden destacarse bajo la perspectiva anterior. El L-malato y el oxaloacetato tienen efectos opuestos, tanto a nivel de la acumulación de la marca en los lípidos como a nivel de la acumulación de la marca en las proteínas. El *n*-butilmalonato revierte el efecto de L-malato sólo a nivel de la mayor acumulación de marca en acil-ACPs.

La interpretación más simple estaría en términos del papel del L-malato y el transportador de dicarboxilatos en la provisión de equivalentes de oxidoreducción dentro del plástido, papel que es apoyado por otros reportes en el caso de los cloroplastos (Heldt, 1976). Es casi seguro que este papel sea de gran importancia regulatoria en la síntesis de ácidos grasos, porque la síntesis de lípidos es gran consumidora de poder reductor; de hecho, la regulación redox de enzimas como la acetil-CoA carboxilasas está bien documentada en el caso de los cloroplastos, aunque ha sido poco

estudiada en los plástidos no fotosintéticos (Rawsthorne 2002). Debido a lo anterior, la interpretación detallada de estos datos sería demasiado especulativa y no intentaremos profundizar en ella.

Una novedad del presente trabajo es el reporte de la existencia de un intercambio de dicarboxilatos por pirofosfato. Dada la importancia del pirofosfato en el metabolismo vegetal (vease cita del libro Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, publicado por el Departamento de Bioquímica, FQ-UNAM, 2001, Buchannans, 2000 y Farré *et al.*, 2001), nos pareció relevante investigar si la presencia de pirofosfato podría modificar el efecto del L-malato sobre la incorporación de acetato en los lípidos. Para dicho propósito se incubaron plástidos con acetato marcado en condiciones semejantes a las descritas en la Figura 16, pero ahora añadiendo malato sin marca (100 μM) y concentraciones crecientes de PPI. Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 17.

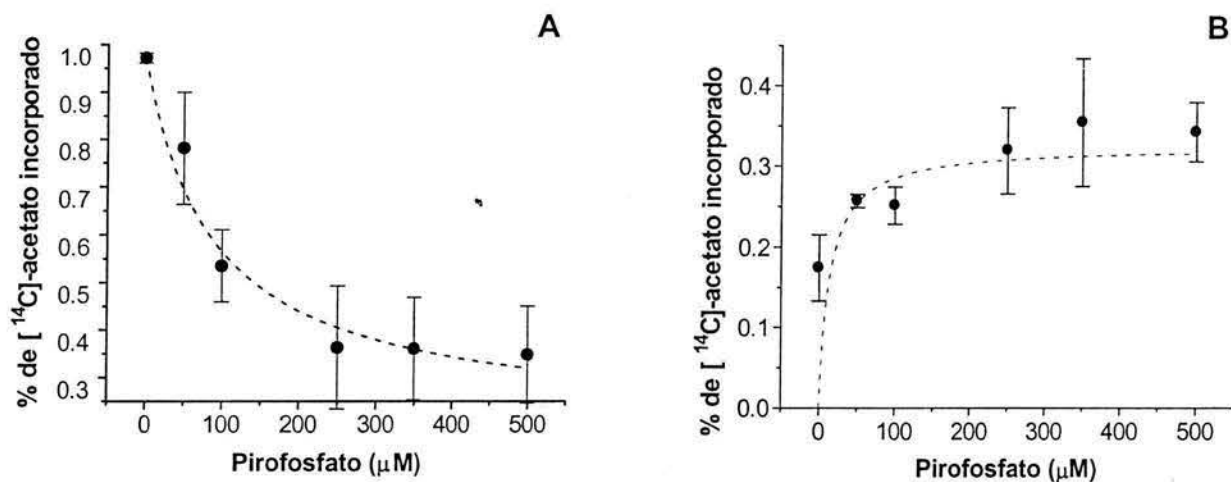


Figura 17. Plástidos incubados con [^{14}C]-acetato, malato (100 μM) y concentraciones crecientes de pirofosfato (0-500 μM) por 2 minutos a 15 $^{\circ}\text{C}$. % de incorporación de marca en: A) la fracción lipídica; B) la fracción proteica.

Consistente con los datos reportados en este trabajo, la adición de pirofosfato tiene un efecto sobre la síntesis de lípidos, cuando el malato está presente. La acumulación de acil-ACP's sería una fuerte indicación de que la síntesis de lípidos se está deteniendo y no sólo se está dejando de emplear acetato (en este último caso, ambos niveles de marca deberían disminuir). De nuevo, aunque los detalles de la respuesta no son de fácil interpretación, dado el estado actual del conocimiento del metabolismo plastidial, es evidente que los niveles de malato y pirofosfato citoplasmáticos pueden influir de manera muy importante en el funcionamiento del plástido.

Finalmente, la Figura 16 muestra que el efecto del *n*-butilmalonato en este sistema no es muy claro. Entre otras cosas, aquí se está midiendo la participación del L-malato de una manera indirecta, ya que la incorporación de acetato a los lípidos requiere de poder reductor, pero no específicamente del proveniente del L-malato. Por ello, se decidió investigar si el carbono proveniente de L-malato podía ser aprovechado por los plástidos para su incorporación en lípidos.

9.5.3 Incorporación de malato marcado en relación con el transporte de dicarboxilatos.

Contrariamente a lo reportado por Smith, la Figura 18 muestra que no hay una incorporación más eficiente de [¹⁴C] L-malato a lípidos (0.4 % de la toma) que la marca proveniente de acetato (1% de la toma, Figura 16 A). Sin embargo, la adición de cantidades crecientes de *n*-butilmalonato sí reduce de manera significativa la incorporación del L-malato en los lípidos, lo que es consistente con su papel como inhibidor del transporte. Es interesante que pequeñas cantidades del inhibidor (10 μM) no reducen por completo la síntesis de lípidos, pero sí estimulan la incorporación de la marca en las proteínas. Este doble efecto dependiente de la dosis, que resultó bastante reproducible, es acorde con un doble papel para el L-malato. Por un lado, es claro que puede aportar una fracción de carbono para la síntesis de lípidos (al menos en el sistema *in vitro*) y, como se ha documentado en otros estudios (Heldt, 1976), puede aportar poder reductor adicional y volver a salir como oxaloacetato. Así, una pequeña cantidad de inhibidor reduciría la velocidad de la lanzadera de poder reductor y limitaría la velocidad de biosíntesis de los lípidos, traduciéndose en un aumento en el nivel de los Acil-ACPs intermediarios. Niveles más altos del inhibidor impedirían notablemente la entrada del 0 % de [¹⁴C] L-malato, evitando que fuera empleado como fuente de carbono.

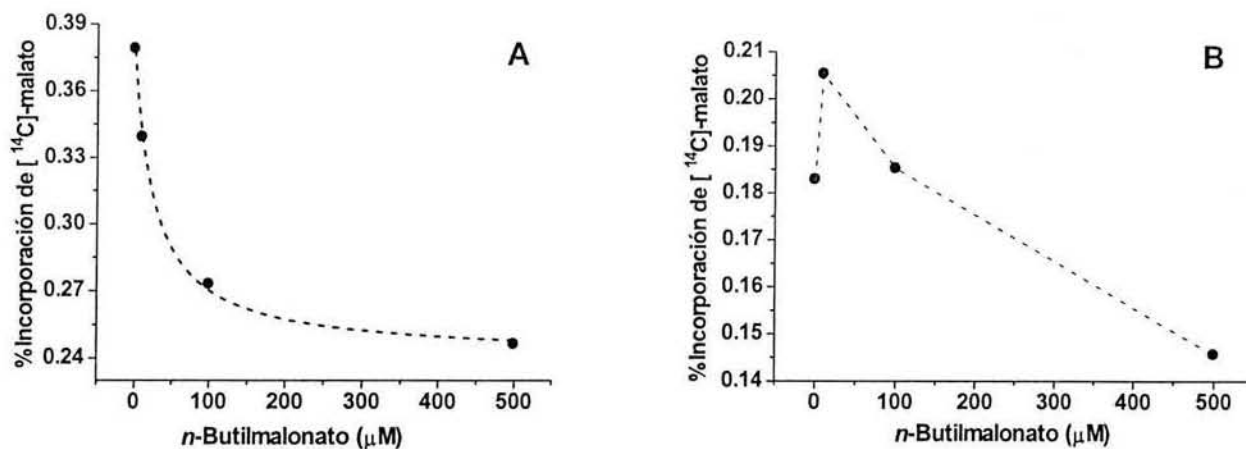


Figura 18. Plástidos incubados con [¹⁴C]-malato y concentraciones crecientes de *n*-butilmalonato (0-500 μM) por 2 minutos a 15 °C. A) Fracción lipídica extraída de cada tratamiento; B) Fracción proteica.

La curva de decaimiento de la incorporación de [¹⁴C]-L-malato puede describirse por una I_{50} de $27.1 \pm 4.7 \mu\text{M}$. Esta I_{50} es un orden de magnitud mayor que la K_i para el *n*-butilmalonato, pero debe considerarse que estos plástidos no se incubaron previamente con algún dicarboxilato y que no se está midiendo directamente la actividad del transportador.

El malato, a diferencia del acetato, puede transformarse en aspartato en el interior de los plástidos, via la enzima aspartato transaminasa. Sin embargo es poco probable que su incorporación posterior en las proteínas muy importante en el tiempo de incubación, ya que para ambos casos la puerta de entrada es el intercambiador de dicarboxilatos, no se esperaría un efecto estimulador en dicha fracción.

9.5.4 Efecto del pirofosfato en la incorporación de malato marcado en plástidos aislados.

Para complementar el experimento de la Figura 18, se analizó si el PPi tenía algún efecto en la incorporación de la marca proveniente del [¹⁴C] L-malato en los plástidos de embrión de maíz. Las condiciones del experimento fueron semejantes al descrito en la Figura 18, pero el L-malato estaba ahora marcado y no se añadió acetato radiactivo.

El resultado de la Figura 19 fue sorprendente, ya que la presencia de PPi estimula la incorporación de malato en la fracción lipídica y, paralelamente, reduce los niveles de marca en la fracción proteica.

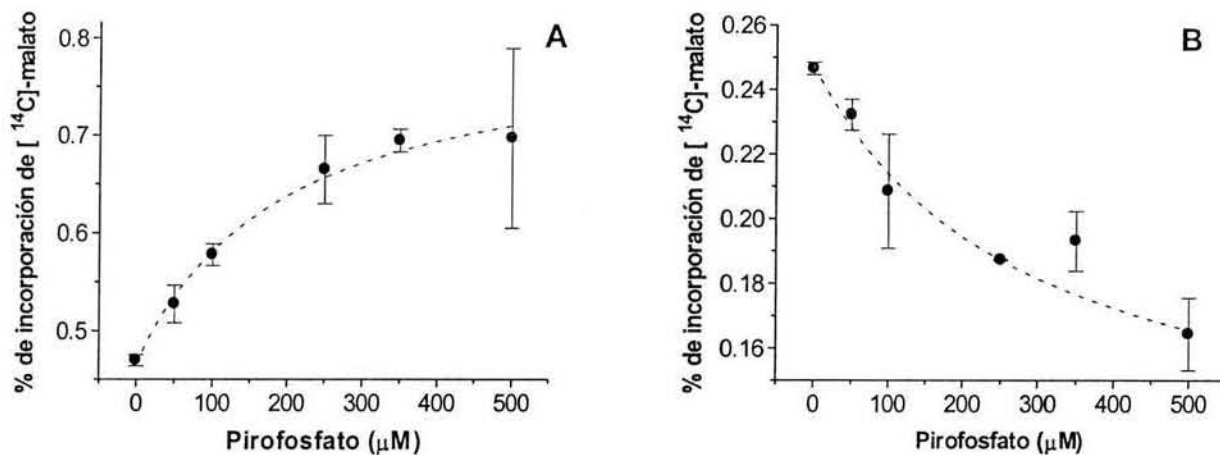


Figura 19. Pláستidos incubados con [^{14}C]-malato y concentraciones crecientes de pirofosfato (de 0 a 500 μM) por 2 minutos a 15 °C. A) fracción lipídica; B) fracción proteica.

El efecto de PPI sobre la acumulación de la marca en los lípidos se puede describir como una hipérbola con una $S_{0.5}$ de $193.1 \pm 56.1 \mu\text{M}$, la cual es intermedia en valor numérico entre las diferentes K_M 's para los intercambios malato/PPI, PPI/PPI, PPI/malato y malonato/malato. Por otro lado, el efecto sobre la acumulación de la marca en las proteínas presentó una mayor incertidumbre estadística, debido a la poca marca incorporada y a una mayor variabilidad, pero correspondería a una inhibición con una I_{50} de $285.8 \pm 154.5 \mu\text{M}$.

Una posible explicación al efecto del PPI podría encontrarse en el hecho de que el transporte de pirofosfato es más rápido que el de malato, pero ocurre con menor afinidad (vease Tabla 4), la entrada de pirofosfato podría reducir la entrada de L-malato, pero seguramente no del todo. Sin embargo, la entrada de PPI podría estimular la degradación de almidón y la vía de las pentosas (dada su participación como sustrato de la ADP-glucosa pirofosforilasa), proporcionando una excelente fuente interna de poder reductor, por lo que ahora el L-malato que entrara podría ser empleado de manera más eficiente como fuente de carbono. Alternativamente, la presencia de más de un transportador de dicarboxilatos, uno capaz de transportar L-malato con más eficiencia que pirofosfato y otro capaz de transportar ambos con buena eficiencia, permitiría la entrada de ambos metabolitos. En cualquier caso, la entrada de pirofosfato tiene un efecto positivo sobre la biosíntesis de los ácidos grasos, lo cual es un dato importante que plantea interrogantes relativas a la regulación de esta vía biosintética.

Es claro que nuestros resultados hacen evidente la necesidad de mejorar nuestro conocimiento del metabolismo del plastidio y su regulación, sugiriendo nuevos derroteros para la investigación futura.

La K_M para la incorporación de malato marcado en ácidos grasos con concentraciones crecientes de PPi fue de $23.5 \pm 3.4 \mu\text{M}$, la cual es intermedia en valor entre las diferentes K_M 's para los intercambios malato/PPi, PPi/PPi, PPi/malato y malonato/malato. El hecho de que las K_M 's sean del mismo orden de magnitud plantea la posibilidad de que sea efectivamente el transportador de dicarboxilatos quien está imponiendo la velocidad de la síntesis de ácidos grasos al limitar la entrada de sustrato en forma de malato u otro dicarboxilato. Por otro lado, el pirofosfato se encuentra en muy bajas concentraciones en el estroma plastidial debido a la presencia de pirofosfatasas con alta afinidad, mientras que la concentración del PPi en el citosol es de 2 a 3 mM (Weinar *et al.* 1987).

9.5.5. Incorporación de acetato marcado en relación a PPT.

Como ya se mencionó, no se encuentra disponible el PEP marcado comercialmente, por lo cual se decidió analizar indirectamente el papel de PPT en el metabolismo plastidial, agregando para ello [^{14}C]-acetato en el medio de incubación y diversos compuestos que pudieran incidir en el metabolismo del PEP en el interior del plástido.

Para iniciar este análisis se incubaron plástidos con [^{14}C]-acetato, PEP, fosfato y piruvato (100 μM) (Figura 20).

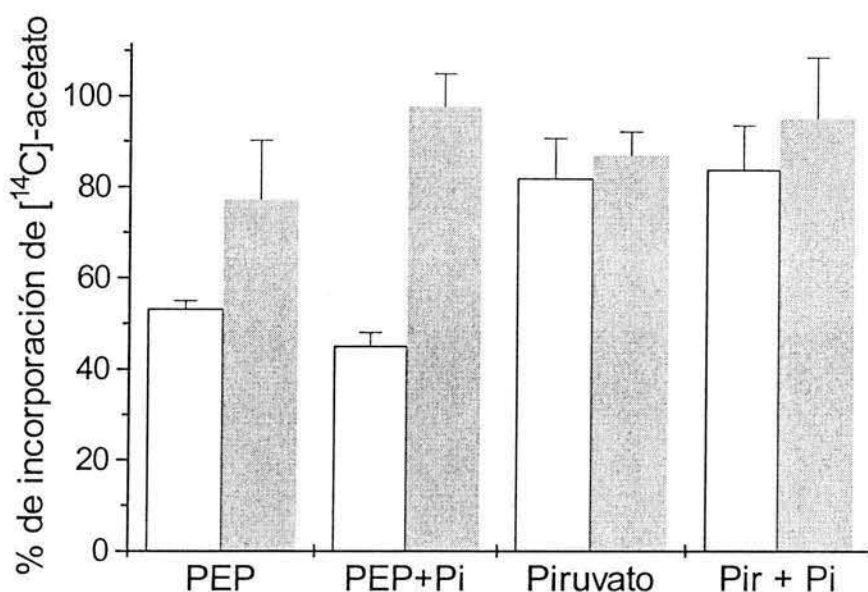


Figura 20. Porcentaje de incorporación de $[^{14}\text{C}]$ -acetato en plástidos aislados de embrión de maíz por 15 minutos a 15 °C. Como control del experimento se incubaron plástidos solamente con acetato marcado, de donde se extrajeron las fracciones lipídica y proteica. El porcentaje de radioactividad incorporado en dichas fracciones se consideró como el 100 % de incorporación. Las barras blancas corresponden a la fracción lipídica, y las barras grises a la fracción proteica. Los tratamientos indicados en la parte inferior de la gráfica corresponden al metabolito que se agregó en el medio de incubación (concentración de 100 μM); las abreviaturas Pi y Pir corresponden a fosfato y piruvato, respectivamente.

En la Figura 20 se observa que cuando se agrega PEP al medio de incubación disminuye la incorporación de acetato en ambas fracciones (lipídica y proteica), pero es más pronunciada la disminución de marca en la fracción lipídica que en la proteica, lo que sugiere que el PEP podría estar compitiendo con el acetato como precursor en la síntesis de ácidos grasos. Lo mismo se observa al agregar al medio fosfato junto con PEP, el cual es el otro sustrato del PPT, aunque cabe aclarar que existen varios intercambiadores capaces de introducir Pi en intercambio con otros sustratos fosfatados. En este caso, el tiempo de incubación de los plástidos fue largo (15 minutos) comparado con la velocidad del transportador, por lo cual al término del experimento, la concentración de fosfato y de PEP debe de estar equilibrada entre el medio de incubación y el interior del plástido. En contraste, ni el piruvato o la mezcla de piruvato y fosfato parecen tener efecto alguno sobre la incorporación de acetato marcado, o por lo menos con este tipo de

experimento no se detecta algún efecto, ya que no hay modificación importante en la incorporación de acetato en ambas fracciones con respecto al control.

La vía por la cual el PEP pueda estar entrando en la síntesis de ácidos grasos sería a través de las enzimas piruvato cinasa (PK) y la piruvato deshidrogenasa plastidial (PDH). El PEP es sustrato directo de la PK, la cual lo transforma en piruvato y simultáneamente produce una molécula de ATP, colocando al PEP en una posición ventajosa sobre el piruvato, sin embargo, el medio de incubación contiene ATP, y se ha descrito un translocador de ATP/ADP en la membrana interna plastidial que provee al plástido de ATP para satisfacer las necesidades metabólicas de este organelo. Las preguntas que necesariamente surgen es ¿por qué el ATP sintetizado *de novo* en el interior del plástido es más eficiente y provoca mayor incorporación de PEP en la síntesis tanto de lípidos como de proteínas, que el ATP suministrado del exterior? y ¿por qué el piruvato no compite con el acetato en la síntesis de lípidos, mientras que el PEP sí lo hace? Al respecto, Boyle y colaboradores (1990) estudiaron la incorporación de acetato marcado en ácidos grasos en leucoplastos de semillas de ricino en desarrollo y descubrieron que el PEP estimula cuatro veces la incorporación de marca en estas biomoléculas, comparado con controles sin PEP. En ambos casos se adicionó en el medio ATP. Estos autores propusieron que el ATP generado internamente en el plástido es más efectivo para mantener la síntesis de ácidos grasos que el ATP suministrado externamente al plástido. Para tratar de responder estas preguntas y entender mejor el papel del PPT en el metabolismo del plástido, se realizaron los experimentos que a continuación se describen.

Por otro lado, se ha reportado la existencia de un transportador de piruvato en cloroplastos de mesófilo de plantas C₄, el cual es activado por la luz y por un gradiente de protones (Flügge *et al.*, 1985), pero se desconoce si este transportador se encuentra en plástidos no fotosintéticos, ya que de no ser así, la entrada de piruvato al plástido sería a través de difusión pasiva, lo cual explicaría la falta de competencia de este metabolito con el acetato y el hecho de que el PEP, cuya entrada si está mediada por intercambiadores, sí afecte la síntesis tanto de ácidos grasos como de proteínas.

A continuación se incubaron plástidos de nuevo con acetato marcado y PEP (100 μM), pero ahora con concentraciones crecientes de fosfomicina, dado que ya se vio que este compuesto inhibe al PPT. En este caso, la incubación fue por 2 minutos a 15 °C, puesto que en experimentos a 15 minutos el inhibidor no sería tan efectivo y su efecto sería difícil de analizar. La gráfica resultante de la incorporación de marca en las dos fracciones se muestran en la Figura 21.

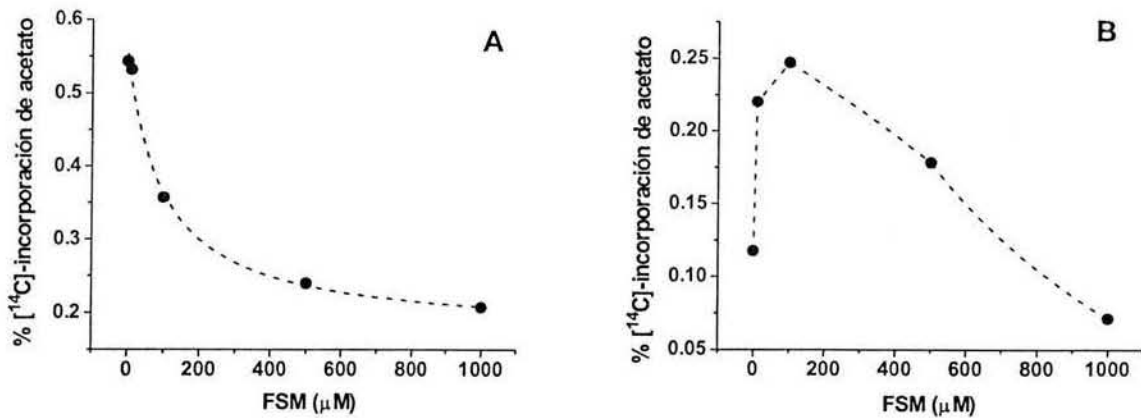


Figura 21. Plástidos incubados con [^{14}C]-acetato, PEP 100 μM y concentraciones crecientes de fosfomicina por 2 minutos a 15°C. Panel A) fracción lipídica; panel B) fracción proteica.

En contraste con el experimento descrito anteriormente, a tiempos más cortos el PEP estimula la incorporación de acetato en ácidos grasos. En este caso, la diferencia puede explicarse dado que se incubaron los plástidos por un periodo de tiempo mucho más corto, durante el cual el PEP que entró a los plástidos podría estar aportando ATP pero la acumulación de piruvato no sería aún tan alta y el acetato se seguiría incorporando activamente, e incluso más rápido, gracias, posiblemente, a la provisión de energía, o bien, a otro efecto regulatorio aún no conocido. Consistente con lo anterior, si se impide la entrada de PEP adicionando fosfomicina, la incorporación de acetato marcado en ácidos grasos decae. La curva resultante se ajustó a un patrón de inhibición, siendo la I_{50} para éste de $99 \pm 20.2 \mu\text{M}$.

Por otra parte, también se observa estimulación de la incorporación de acetato marcado en la fracción proteica y, a semejanza de lo observado en la Figura 18, hay una estimulación inicial en la incorporación de marca en la fracción proteica al agregar el inhibidor, pero conforme aumenta la concentración de éste decae la marca (Figura 21, panel B). Nuevamente se puede explicar este fenómeno en términos de la enzima acetil coenzima A carboxilasa, pero en este caso, al suspenderse la aportación energética de ATP resultante de la transformación de PEP en piruvato, en respuesta a la inhibición impuesta por FSM, hay una acumulación transitoria de cadenas nacientes marcadas al inicio de la inhibición, mismas que se liberan conforme se aumenta la concentración del inhibidor, y posteriormente va disminuyendo gradualmente la entrada de PEP y con ello la energía para generar más cadenas de ácidos grasos unidas a la proteína acarreadora de acilos.

10. Discusión

En este trabajo se caracterizaron cinéticamente dos transportadores de la membrana interna plastidial y se realizaron experimentos con plástidos íntegros, analizándose la biosíntesis *de novo* de lípidos y proteínas, con el propósito de asignar el posible papel fisiológico que ambos transportadores pudiesen tener en dichas rutas.

Se encontraron varios rasgos distintivos que sugieren diferencias importantes en las necesidades de transporte en plástidos no fotosintéticos y cloroplastos:

El primero en caracterizarse, el intercambiador de dicarboxilatos, presentó características cinéticas similares a las reportadas anteriormente para intercambiadores de este tipo en cloroplastos de diferentes especies; entre los más estudiados se encuentran los cloroplastos de hoja de espinaca (Menzlaff y Flügge, 1992; Woo *et al.*, 1987; Lehner y Heldt, 1978) y chícharo (Proudlove *et al.* 1984). Se encontraron varios rasgos distintivos que sugieren diferencias importantes en ambos tipos de plástidos: i) las K_M 's reportadas aquí son 10 veces menores que las reportadas para cloroplastos; ii) el ión amonio no afecta al intercambiador reportado aquí, a diferencia del clonado por Woo (1987), que se inhibe con este compuesto; iii) en plástidos no fotosintéticos el sistema es capaz de intercambiar malonato por otros dicarboxilatos, mientras que el intercambiador de cloroplastos de hoja de espinaca estudiado por Lehner y Heldt (1978), no tiene esa capacidad; iv) el intercambiador plastidial puede intercambiar dicarboxilatos por un tricarboxilato, el citrato, siendo que el intercambiador de cloroplastos no presenta esta capacidad. En este sentido es semejante al intercambiador de dicarboxilatos y tricarboxilatos de mitocondria de *Arabidopsis* y *Nicotiana tabacum* (Picault *et al.*, 2002) y v) el transportador que se describe en este trabajo tiene la capacidad de intercambiar pirofosfato por un dicarboxilato, hecho nunca antes reportado en la literatura, ya que aunque Lunn y Douce (1992) encontraron una actividad de transporte de pirofosfato en cloroplastos de hoja de espinaca, en ese trabajo no se identificó la naturaleza de dicho transporte.

La función de este transportador puede ser la de mantener el balance de poder reductor entre el plástido y el citosol a través de la circulación de distintos dicarboxilatos oxidados y reducidos en tejidos no fotosintéticos. En cloroplastos se ha propuesto que la función principal de este tipo de transportadores es la de participar en la asimilación de nitrógeno proveyendo para ello al cloroplasto de 2-oxoglutarato y exportando glutamato (Flügge, *et al.*, 1988). Sin embargo, nuestros estudios no abordaron este aspecto y no podemos decir si dicha función es o no relevante para los plástidos aislados de los embriones inmaduros.

Dadas las características aquí reportadas, no es posible esclarecer si la actividad de transporte tanto de los distintos dicarboxilatos como del tricarboxilato y el pirofosfato sea mediada por una o más proteínas. El hecho de que el *n*-butilmalonato pueda inhibir todas estas actividades de intercambio, y que el mecanismo de inhibición sea competitivo, sugiere la posibilidad de que se trate de un solo tipo de proteína mediadora o de dos o más proteínas con características cinéticas similares. Al respecto, se requiere más trabajo a nivel molecular para identificar la proteína o proteínas responsables de los intercambios estudiados.

Adicionalmente, el intercambiador de dicarboxilatos puede contribuir con carbono neto al introducir malato u otros dicarboxilatos o por citrato en intercambio por pirofosfato y de esta manera alimentar la síntesis de ácidos grasos y probablemente otras rutas en el interior del plástido. Por otro lado, recientemente se reportó que el contenido de pirofosfato en el plástido se modifica al alterarse el contenido de almidón en papas transgénicas que expresan una invertasa, lo que sugiere un papel relevante del PPI en la síntesis de almidón (Farré *et al.*, 2000). Aún falta mucha investigación para poder entender cabalmente el papel que el PPI juega como metabolito y como regulador en el metabolismo plastidial y en el citosólico, pero los resultados mostrados aquí sugieren que en los plástidos su papel va más allá de ser un subproducto de las reacciones de biosíntesis.

Por otro lado, mientras que la mayoría de los intercambiadores plastidiales mantienen un balance de los fosfatos que entran con respecto a los fosfatos que salen, como es el caso del PPT, capaz de intercambiar un compuesto fosfatado por un fosfato, el intercambiador de ATP por ADP genera un desbalance al permitir la entrada de ATP, molécula trifosfatada, y la salida simultánea de ADP, molécula difosfatada. El transportador aquí reportado podría contribuir a mantener el balance de fosfato evitando la deficiencia en uno u otro lado de la membrana de este compuesto al ser capaz de transportar pirofosfato dependiendo de las necesidades de la célula.

Con respecto a la incorporación de malato como sustrato directo en la síntesis de ácidos grasos, Smith (1992) propuso que el malato es el sustrato más eficientemente incorporado en dicha síntesis comparado con el acetato y el piruvato, en semillas de ricino; sin embargo, embriones de *Brassica napus* tienen la capacidad de asimilar, además de malato, Glc6P, triosas fosfato, piruvato y malato (Kang *et al.*, 1996 y Qi *et al.*, 1994). Por otra parte, Wong y Davies (1973) incubaron tejidos de las especies *Pisum sativum*, *Plantago lanceolata* y *P. major* con $^{14}\text{CO}_2$ y *n*-butilmalonato, y encontraron que el bloqueo por este inhibidor provocó acumulación de malato en el citosol, lo que conduce a la inhibición de la PEP carboxilasa. Esta acumulación de malato podría deberse a la inhibición por *n*-butilmalonato de los transportadores de dicarboxilatos tanto del plástido como de la mitocondria.

Debido a que el acetil-CoA es un metabolito central requerido para la biosíntesis de isoprenoides, ácidos grasos, aminoácidos y muchas otras estructuras, es probable que más de una ruta provea acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y la fuente puede depender del tejido y la etapa de desarrollo (Ohlrogge y Jaworski, 1997). Las vías por las cuales se puede generar acetil CoA en el plástido como precursor son las siguientes: a) a partir de acetato y CoA vía la enzima acetilCoA sintasa (ACS); b) a partir de piruvato vía la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH), c) a partir de la enzima citrato liasa, cuyo sustrato es el citrato y que en algunas especies, como la *B. napus* y espinaca, se encuentra en el interior del plástido; d) a partir de malato vía la enzima málica dependiente de NADP, y la PDH; y e) por PEP a través de las enzimas PK y PDH (Rawsthorne, 2002). El malato a su vez puede dar origen en el plástido a los aminoácidos aspartato y glutamato, mientras que el acetato puede dar origen a los aminoácidos aspartato y treonina; el oxaloacetato se deriva en aspartato y treonina, mientras que el α -cetoglutarato da origen al glutamato y a la prolina.

Con respecto al PPT, se realizó la caracterización cinética de éste transportador, poniendo especial énfasis en el efecto de la FSM sobre la actividad de este translocador. Se inició el estudio de éste determinando la K_M para el PEP y se encontró que en semillas de maíz en desarrollo hay una afinidad muy alta del PPT por PEP, la cual es de 5 órdenes de magnitud más grande que la reportada para el PPT de plástidos provenientes de brotes de coliflor (Fisher *et al.*, 1997) cuando se preincubaban los plástidos con [32 P]-Pi, y 2 órdenes de magnitud mayor cuando se incuban los plástidos con [14 C]-PEP. La afinidad del PPT por 2PGA presenta un patrón similar. La diferencia tan marcada en el valor de la K_M puede deberse a diferencias en las necesidades metabólicas entre diferentes especies o tejidos. O bien, a las importantes diferencias en las condiciones de experimentales en nuestro reporte con respecto al de Fisher y colaboradores (1997).

Los datos presentados aquí muestran que los plástidos aislados aprovechan el PEP no sólo como fuente de carbono, sino también estimulando la biosíntesis de lípidos. La diversidad de efectos encontrados indica nuevamente que las interrelaciones metabólicas al interior del plástido son complejas y es claro que no tenemos una comprensión clara de los mecanismos regulatorios que operan en este organelo.

En cualquier caso, es claro que los efectos de la fosfomicina apoyan la interpretación de que este antibiótico no sólo actúa a nivel de la actividad de la PEP carboxilasa y la piruvato cinasa citoplásmica, sino que también afecta el intercambio entre ambos compartimentos. Adicionalmente, la fosfomicina podría tener otros efectos, pero ciertamente los aquí mencionados serían de suficiente importancia como para provocar las respuestas metabólicas observadas cuando se aplica

FSM a los embriones enteros, es decir, un aumento en la síntesis de proteínas y una reducción en la síntesis de lípidos.

A la fecha existen dos reportes que describen la caracterización cinética, clonación y funcionalidad del PPT (Fischer *et al.*, 1997 y Streatfield *et al.*, 1999) en diferentes tejidos, entre ellos cloroplastos de espinaca y *Arabidopsis*, y leucoplastos de brotes de coliflor. En estos reportes se propone que la función del PPT es la de proveer PEP al plástido, el cual es precursor de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios derivados de estos aminoácidos a través de la ruta del shikimato, así como también alimentar la síntesis de isoprenoides; sin embargo, estos autores no encontraron diferencia en los niveles de lípidos en hojas o semillas de *Arabidopsis* en *cue1* (mutante que no expresa la proteína PPT) con respecto a la planta silvestre, pero Kubis y Rawsthorne (2000) demuestran que la actividad de PPT en semillas de ricino es comparable a la actividad de HPT y del transportador de piruvato, y que la velocidad de incorporación de carbono a partir de PEP en ácidos grasos en plástidos aislados de estas semillas es también comparable a la velocidad de incorporación de Glc6P y piruvato. Ohlrogge y Jaworski (1997) propusieron que los esqueletos carbonados, el ATP y el poder reductor requerido para la síntesis de ácidos grasos podían ser generados en el interior del plástido por el catabolismo del PEP a través de las enzimas PK y PDH. Finalmente, las actividades y propiedades de los transportadores pueden ser importantes en el metabolismo vegetal y, particularmente en el metabolismo plastidial, 1) al determinar la ruta metabólica por la cual el carbono es importado al plástido y utilizado para la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos y otras rutas metabólicas, y 2) al proveer un punto para la regulación por retroalimentación en dichas síntesis.

11. Conclusiones

- La función del TD puede ser la de mantener el balance de poder reductor mediante el intercambio neto de dicarboxilatos (L-malato/oxaloacetato), aportar carbono para mantener la biosíntesis plastidial a través de los intercambios PPI/L-malato o L-malato/citrato, ó mantener el balance de fosfato (intercambio L-malato/PPI).
- El PPT transporta PEP al interior del plástido, el cual puede aportar energía en forma de ATP vía la enzima piruvato cinasa.

Bibliografía

1. Allard RW. 1999. History of Plant Population Genetics. *Annual Review of Genetics*. 33:1-27.
2. Bowsher CG, Boulton EL, Rose J, Nayagam S, Emes MJ. 1992. Reductant for glutamate synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic plastids. *Plant J*. 2:893-98.
3. Bowsher CG, Hucklesby DP, Emes MJ. 1989. Nitrite reduction and carbohydrate metabolism in non-photosynthetic plastids of higher plants. *C.R Acad. Sci*. 319:853-60.
4. Batz O, Scheibe R, Neuhaus HE. 1992. Transport processes and corresponding changes in metabolite levels in relation to starch synthesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) etioplasts. *Plant Physiol*. 100 184-190.
5. Benz BF, Long A. 2000. Prehistoric maize evolution in the Tehuacan Valley, *Current Anthropology*. 41(3):459-465.
6. Bewley JD, Black M. 1994. Seeds: Physiology of development and germination. Plenum Press, New York, London.
7. Bielecki RL. 1973. Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 24:225-252.
8. Brulfert J, Kluge M, Queirosz O. 1983. Phosphoenolpyruvate carboxylase: a key enzyme in plants. *Physiol Veg*. 21:803-804.
9. Boesenwinkel FD, Bouman F. 1995. The seed: structure and function. De: Seed development and germination. Editado por Kiegel J y Galili G. Marcel Dekker Inc. pp 1-24.
10. Boyle SA, Hemmingsen SM, Dennis DT. 1990. Energy requirement proteins from developing endosperm of *Ricinus communis* L. *Plant Physiol*. 92:151-54.
11. Buchanan B B, Gruissem W y Jones R L (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. Editado por American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. pp 37-45, 605-610, 787-796, 824-845, 1227-1229.
12. Bucher T y Pfliegerer G. 1955. Pyruvate kinase from muscle. Rn Colowick SP y Kaplan NO (eds). *Methods in Enzymology*. Academic Press, London. Vol 1, pp 435-440.
13. Buckler E.S., Pearsall, D.M., Holtsford, T.P. (1998) Climate, Plant Ecology, and Central Mexican Archaic Subsistence. *Current Anthropology*, 39(1):152-164.
14. Camarasa C, Bidard F, Bony M, Barre P, Dequin S. 2001. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Malate Permease by Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol*. 67 (9): 4144-4151.
15. Cheffings CM, Pantoja O, Ashcroft FM, Snith JAC. 1997. Malate transport and vacuolar ion channels in CAM plants. *J. Exp Bot*. 48:623-631.
16. Chen X, Schnell DJ. 1999. Protein import into chloroplasts. *Trends in Cell Biol*. 9(6):222-227.
17. Davies DD. 1979. The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism. *Ann Rev. Plant Physiol*. 30:131-58.
18. Eastmond PJ, Dennis DT, Rawsthorne S. 1997. Evidence that a malate/inorganic phosphate translocator imports carbon across the leucoplasts envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm. *Plant Physiol*. 114: 851-856.
19. Eastmond PJ y Rawsthorne S. 2000. Coordinate changes in carbon partitioning and plastidial metabolism during the development of oilseed rape embryos. *Plant Physiol* 122:767-774.

20. Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flügge UI, Fisher K. 2002. The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol.* 128:512-522.
21. Emes MJ, Dennis DT. 1997. Regulation by compartamentalization. En: Plant metabolism. Editado por Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD y Layzell DB. 2da edición. Addison Wesley Longmann, Inglaterra.
22. Farré EM, Geigenberg P, Willmitzer L, Trethewey RN. 2000. A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber. *Plant Physiol* 123 (2):681-688.
23. Fiermonte G, Palmieri L, Dolce V, Larosa FM, Palmieri F, Runswick MJ. *et al.* 1998. The secuencia, bacterial expresion and functional reconstitution of the rat mitochondrial dicarboxylate transporter cloned via distant homologs in yeast and *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 273:24754-24759.
24. Fisher K, Kammerer B, Gutensohn M, Arbinge B, Weber A, Häusler R, Flügge UI. 1997. A new class of plastidic phosphate translocator a link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter. *Plant Cell.* 9:543-562.
25. Flügge U I. 1999. Phosphate translocators in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:27-45.
26. Flügge I U, Woo K C y Heldt H W. 1988. Characteristics of 2-oxoglutarate and glutamate transport in spinach chloroplasts. *Planta* 174:534-541.
27. Fuks B, Homblé F. 1999. Passive anion transport through the chloroplast inner envelope membrane measured by ormotic swelling of intact chloroplasts. *Biochem. et Biophys. Acta.* 1416:361-369.
28. Genchi G, Spagnoletta A, De Santis A, Stefanizzi L, Palmieru F. 1999. Purification and characterization of the reconstitutively active citrate carrier from maize mitochondria. *Plant Physiol* 119 (2): 743-754, 1999
29. Givan CV, 1999, Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress. *Biol. Rev.* 74: 277-309.
30. Glawischnig E, Griel A, Tomas A, Bacher A, Eisenreich W. 2001. Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of aminoacid biosymthesis and intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize Kernels. *Plant Physiol.* 125:1178-1189.
31. Hatch MD. 1978. A simple spectrophotometric assay for fumarate hydrase in crude tissue extracts. *Anal Biochem* 85:271-275
32. Hatch MD, Dröscher L, Flügge UI, Held HW. 1984. A specific translocator for oxaloacetate transport in chloroplasts. *FEBS Lett.* 178:15-19.
33. Heinonen JK. 2001. Biological role of inorganic pyrophosphate. Kluwer Academic Publishers. 53-60; 93-111.
34. Heldt, H.W.:1976. Transfer of substrates across the chloroplast envelope, *Horizons Biochem. Biophys.* 2:199-219
35. Herrmann KM, Weaver LM. The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 50:473-503.
36. Huang AHC, Tzen JTC, Lee K, Bih FY, Ting JTL, Ratnayake C. 1993. Seed oil bodies in maize and other species. *Bot Bulletin of Academia Sinica.* 34(4):289-297.
37. Jacques J, Teyssier E, Miège C, Berny-Seigneurin D, Maréchal E, Block MA, Dorne AJ, Rolland N, Ajlani G, Douce R. 1998. The biochemical machinery of plastids. Envelope Membranes. *Plant Physiol* 118: 715-723.
38. Joyard J, Teyssier E, Miego C, Berny-Seigneurin D, Marechal E, Block M A, Dorne A J, Rolland N, Ajlani G y Douce R (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. *Plant Physiol* 118:715-723.

39. Kampfenkel K, Möhlmann T, Batz O, van Montagu M, Inés D, Neuhaus HE. 1995. Molécula characterization of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. *FEBS Lett.* 374:351-355.
40. Kang F, Rawsthorne S. Metabolism of glucose-6-phosphate and utilization of multiple metabolites for fatty acid synthesis by plastids from developing oilseed rape embryos. *Planta* 199(2):321-27.
41. Kubis SE, Rawsthorne S. 2000. Fatty acid biosynthesis: control of fatty acid and lipid biosynthesis. *Biochem Soc Trans.* 122:665-666.
42. Kurkjian A, Guern J. 1989. Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 40: 271-303.
43. Laloi M, 1999. Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol. Life Sci.* 56: 918-944.
44. Lara-Núñez A, Chávez-Montes R A, Hernández-Domínguez E E y Rodríguez-Sotres R. 2001 Partición del carbono en las semillas de cereales durante la fase de llenado. En: *Bioquímica y biología molecular de plantas*. Editoras: Bernal-Lugo y Loza-Talavera. México D.F. pp 147-166.
45. Lara-Núñez A. 1999. Respuesta de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa de semillas de maíz en desarrollo al ácido abscísico y al potencial osmótico. Facultad de química. Tesis de licenciatura.
46. Lehner K, Heldt HW. 1978. Dicarboxylate transport across the inner membrane of the chloroplasts envelope. *Biochim. Biophys Acta.* 501: 531-544.
47. Lunn JE y Douce R. 1992. Transport of inorganic pyrophosphatase across the spinach chloroplast envelope. *Biochem J.* 290:375-379.
48. Luck H. 1965. Catalase. In HU Bergmeyer, ed, *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, pp 885-894
49. Moreno Casasola, P. 1966. Vida y obra de granos y semillas 1ª ed., serie La Ciencia desde México, vol. 146, Fondo de Cultura Económica, SEP, CONACyT, México, D.F., ISBN 968-16-4369-0.
50. Menzlaff E, Flügge UI. 1993. Purification and functional reconstitution of the ϵ -oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. *Biochim Biophys. Acta* 1147:13-18.
51. Negm FB, Cornel FA, Plaxton WC. 1995. Suborganellar localization and molecular characterization of nonproteolytic degraded leukoplast pyruvate kinase from developing castor oil seeds. *Plant Physiol.* 109:1461-1469.
52. Nesius KK, Fletcher JS. 1975. Contribution of nonautotrophic carbon dioxide fixation to protein synthesis in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Plant Physiol.* 55:643-645.
53. Neuhaus H E y Emes M J. 2000. Nonphotosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol* 51:111-40.
54. Neuhaus H E y Wagner R. 2000. Solute pores, ion channels, and metabolite transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. *Biochim Biophys Acta* 1465(1-2):307-323.
55. Ohlrogge JB, Jaworski JG. 1997. Regulation of fatty acid synthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 48: 109-136.
56. O'Leary ME. 1982. Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Annu Rev. Plant Physiol.* 33:297-315.
57. Palmieri L, Voza A, Agrimi G, De Marco V, Runswick MJ, Palmieri F, Walkers JE. 1999. Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate. *J. Biol. Chem.* 272 (32)6:22184-22190.
58. Picault N, Palmieri L, Pisano I, Hodges M, Palmieri F. 2002. Identificatin of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria. *J. Biol Chem.* 277(27):24204-24211.

59. Plaxton W C. 1996. The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185-214.
60. Proudlove MO, Thurman DA, Salisbury J. 1983. Kinetic studies on the transport of 2-oxoglutarate and L-malate into isolated pea chloroplasts. *New Phytol.* 96:1-5
61. Qi Q, Kleppinger-Sparace KF, Sparace SA. 1995. The utilization of glycolytic intermediates as precursors for fatty acid biosynthesis by pea root plastids. *Plant Physiol* 107:413-9
62. Rawsthorne S. 2002. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress Lipid Research.* 41: 182-196.
63. Reyes Castañeda P. El maíz y su cultivo. Editorial AG editor. 1990 pp 23-100
64. Salvador, R. J. 1997. Maize En: The Encyclopedia of Mexico: History, Culture and Society, Fitzroy Dearborn Publishers, Inglaterra.
65. Sheery RP. 1995. Cereal seed storage proteins. En: Seed development and germination. Editores Kigel K y Galili G. Pp 42- 72. Marcel Dekker Inc.
66. Smith KP, Krohn IH, Hermanson tg, Mallia GHF, ProvenzanodM, Fijumoto KE, Goek MN, Olson JB, Klenk CD. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
67. Smith R G, Gauthier D A, Dennis D T, Turpin D H. 1992. Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm. *Plant Physiol* 98:1233-1238.
68. Stahl, Sparace. 1991. Characterization of fatty acid biosynthesis in isolated pea root plastids. *Plant Physiol.* 96: 602-608.
69. Sttit M. 1997. The flux of carbon between the chloroplast and cytoplasm. En Plant Metabolism. Editado por Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD y Layzell DB. 2da edición. Addison Wesley Longmann, Inglaterra.
70. Streatfield SJ, Weber A, Kinsman EA, Häusler RE, Li J, Post-Beittenmiller D, Kaiser WM, Pyke KA, Flüge UI, Chory J. 1999. The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression. *Plant Cell.* 11:1609-1621.
71. Taniguchi M, Taniguchi Y, Kawasaki M, Takeda S, Kato T, Sato S, Tabata S, Miyake H y Sugiyama T. 2002. Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43:706-717.
72. Ullmann R, Gross R, Simon J, Unden G, Kröger A. 2000. Transport of C₄-dicarboxylates in *Wolinella succingenes*. *J. Bacteriol.* 182(20):5757-5764.
73. Uedam K y sugiyama T. 1976. Purificaton and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leave. *Plant Physiol.* 57:906-910.
74. Versaw WK, Harrison MJ. 2002. A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell.* 14:1751-1766.
75. Warman, A. 1988. La Historia de un Bastardo: Maíz y Capitalismo. 1st ed., Obras de Historia, México D. F. Fondo de Cultura Económica,
76. Weber A, Menzlaff E, Arbinge B, Gutensohn M, Eckerskorn C, Flüge UI. 1995. The 2-oxoglutarate/malate translocator of chloroplasts envelope membranes: molecular cloning of a transporter containing a 1q2-helix motif and expression of the functional protein in yeast cells. *Biochem* 34: 2621-2627.
77. Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Hebbeker U, Flüge UI. 2000. Identification, purification and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plan Cell.* 12: 787-801.
78. Weiner H, Stitt M, Heldt MW. 1987. Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim Biophys Acta.* 893:13-21

79. Woo, KC, Flüge UI, Heldt HW. 1987a. A two translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in the light. *Plant Physiol.* 84: 624-632.
80. Woo KC, Boyle FA, Flüge UI, Heldt HW. 1987b. ¹⁵N-ammonia assimilation, 2-oxoglutarate transport and glutamate export in spinach chloroplasts in the presence of dicarboxylates in the light. *Plant Physiol.* 85: 621-625.

Characterization of a dicarboxylate exchange system able to exchange pyrophosphate for L-malate in non-photosynthetic plastids from developing maize embryos

Aurora Lara-Núñez, Rogelio Rodríguez-Sotres*

Department of Biochemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, Mexico

Received 10 December 2003; received in revised form 20 January 2004; accepted 21 January 2004

Abstract

Non-photosynthetic plastids from plant tissues are unable to fix carbon dioxide into carbohydrates, and so, they depend on carriers of the inner plastid membrane. Spinach chloroplasts are known to have a dicarboxylate translocator (DL) system able to exchange L-malate for other dicarboxylates. This paper presents evidence for the existence of a similar, but not equal system in non-photosynthetic plastids, isolated from developing maize embryos. Plastids were isolated by Percoll gradient centrifugation. Dicarboxylate uptake or release was determined by centrifugation through a single silicone layer. We found a dicarboxylate translocating activity able to exchange L-malate, for either succinate, glutamate, oxaloacetate, 2-oxoglutarate or aspartate, and also malonate and the tricarboxylate, citrate. Surprisingly, this activity also exchanged malate for pyrophosphate and in addition, pyrophosphate inhibited the dicarboxylate exchange. We found a competitive inhibition pattern of the L-malate/malonate exchange by *n*-butylmalonate, and this compound also inhibited the L-malate/pyrophosphate exchange. Our results are consistent with the participation of, at least, one common component in the L-malate/malonate and L-malate/pyrophosphate carrier systems. We discuss the possible role of the dicarboxylate exchange in the plastidial and cytoplasm metabolism in developing maize embryos.

© 2004 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Plastid; Dicarboxylate translocator; Pyrophosphate; *Zea mays*

1. Introduction

Several translocators which reside on the inner membrane of the plastid envelope, coordinate the exchange of metabolites between the cytosol and the plastid stroma [1].

Plastids from developing embryos do not photosynthesize, but the metabolism of fatty acids, some amino acids and other important metabolites is active in their stroma [1].

Therefore, they depend on metabolite exchange with the cytosol to support all of these activities. Up to now, at

least six specific metabolite-exchange mediators have been identified in the envelope of non-photosynthetic plastids from several plant species: the triose phosphate/phosphate translocator (TPT) [2], the adenine nucleotides translocator [3], the hexose phosphate/phosphate translocator (HPT) [4], the phosphoenolpyruvate/phosphate translocator (PPT) [5,6], the pentose-phosphate/phosphate translocator [7], and the malate/Pi translocator [8].

In the case of spinach leaf chloroplasts, a malate/oxaloacetate shuttle may be required for the regulation of the redox balance, and a glutamate/malate and a 2-oxoglutarate/malate shuttles could help to sustain stromal amino acid synthesis [9,10]. Both translocators participate in a 2-oxoglutarate/glutamate exchange, with no net malate transport required during photorespiration [9,10]. Although the data presented by Taniguchi et al. [11] indicates that dicarboxylate translocators (DT) are expressed in photosynthetic and non-photosynthetic tissues in Arabidopsis plants, the properties of the system fulfilling such functions have not been documented in leucoplasts, or in other non-photosynthetic plastids.

Abbreviations: TPT, triose phosphate/phosphate translocator; HPT, hexose phosphate/phosphate translocator; PPT, phosphoenolpyruvate/phosphate translocator; XPT, pentose-phosphate/phosphate translocator; DT, dicarboxylate translocator; HEPES, [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid]; NADP-ME, NADP-dependent malic enzyme; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; DTT, dithiothreitol; Pi, phosphate; PPi, pyrophosphate

* Corresponding author. Present address: Ciudad Universitaria, Insurgentes sur Copilco, Coyoacán México City, Mexico
Tel.: +52-55-5622-5285; fax: +52-55-5622-5329.

E-mail address: sotres@servidor.unam.mx (R. Rodríguez-Sotres).

In this paper, we present the characterization of a dicarboxylate translocator system from developing maize embryos with similar, but not identical properties to the one described for chloroplast envelopes. In contrast to previous reports [9,10], we found a competitive pattern of inhibition of the DT by *n*-butylmalonate and, in addition, we report a novel exchange of L-malate for pyrophosphate, along with evidence for the participation of, at least, a common transporter in the exchange of both L-malate/malonate and L-malate/pyrophosphate.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Freshly harvested (1–2 days) ears of maize (*Zea mays*) were obtained from a local grower. The embryos were dissected from kernels and kept in 0.5 M mannitol at 4 °C for less than 2 h, until utilization.

2.2. Plastid isolation

Maize embryos were carefully squashed with a pestle in a mortar with Buffer (1:2, w/v) containing 50 mM HEPES–KOH (pH 7.5), 0.4 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1% (w/v) Ficoll and 1% (w/v) bovine serum albumin. The homogenate was pipetted into the upper layer of a discontinuous Percoll gradient and centrifuged as reported by Negm et al. [12]. The enriched plastid band in between the 22–35% Percoll phases was recovered and the plastid fraction was collected by centrifugation in a microfuge (at 12,000 rpm for 5 min). The pellet was washed twice with 2 ml buffer B containing 50 mM HEPES–KOH, pH 7.5 (except where otherwise indicated), 0.4 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 1 mM DTT, and finally resuspended in 1–2 ml of this buffer. These procedures were carried out at 4 °C.

Plastid purity was evaluated by measuring the activity of the following enzymes: catalase [13], as a peroxysome marker, fumarase [14], as a mitochondrial marker, and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEP carboxylase) [15], as a cytosolic marker. Plastid intactness was tested by measuring the activity of NADP-dependent malic enzyme (NADP–ME) before and after the addition of 0.1% Triton X-100 to the assay cuvette [16]. All determinations were carried out at 25 °C.

2.3. Plastid preloading

Where indicated, the plastids were preloaded by preincubation with the appropriate metabolite for 10 min at 15 °C. The treated plastids were collected by centrifugation at full speed in a microfuge, washed with 5 vol. of Buffer B and pelleted again. The pellet was resuspended in 1 ml buffer B and used immediately for uptake studies.

2.4. Transport measurement

The dicarboxylate uptake was determined by the technique of centrifugation through a single silicone oil layer [17,18].

Briefly, 50 µl aliquots of the plastid homogenate (80–150 µg of protein) were mixed with buffer B containing the [¹⁴C]- or [³²P]-labeled substrates (0.2–1 µCi) plus the indicated metabolites or inhibitors to give a final volume of 100 µl. This was done in 0.25 ml microfuge tubes on top of a layer of 75 µl silicon oil AR200 which was floating over a bottom layer of 20 µl of quenching solution (perchloric acid 10%, v/v in saturated Na₂SO₄). Transport was started by the addition of the plastids and stopped after 1 min at 15 °C by centrifugation at 12,000 rpm for 1 min. The radioactivity in the bottom layer was determined by liquid scintillation. The acid and salts in the quenching medium had a small effect on the counting efficiency, which was corrected by the software in the Scintillation counter, after calibration, as recommended by the manufacturer (Packard instruments).

With the conditions used to isolate the plastids, the radioactivity in the [¹⁴C]-sorbitol permeable space was estimated to be 10.6 ± 1.9% of the total ³H₂O permeable space, and transport values were corrected for this non-specific uptake.

When saturation by several metabolites was studied, we found a slow, non-saturating component that was linear up to 1 mM L-malate, which we ascribed to a passive diffusion component. The rate of this component turned out to be fairly reproducible and was estimated from the slope of the straight line found, at high concentrations of L-malate (the slope in the presence of 100 µM *n*-butylmalonate was similar and almost linear in the entire range of concentration tested). Then the maximum carrier-mediated flux (J_{MAX}), and its Michaelis constant K_M were estimated by non-linear fit to Eq. (1):

$$J = \frac{J_{MAX}M}{K_M + M} + D_P M \quad (1)$$

where J is the transport rate, M the varied metabolite concentration, and D_P was fixed to the passive diffusion coefficient previously found. Due to the numerical propagation of errors between J_{MAX} , K_M and D_P in Eq. (1) the simultaneous estimation of all parameters by non-linear regression was avoided.

Inhibition curves were fitted by non-linear regression to the hyperbolic simple inhibition model given by Eq. (2):

$$J = \frac{J_0 I_{50}}{I_{50} + I} \quad (2)$$

where J_0 is the transport rate (J) in the absence of inhibitor and I_{50} is the concentration of inhibitor (I) which gives 50% inhibition.

To calculate the K_I of a competitive inhibition data were adjusted to a model given by Eq. (3) [19]:

$$J = \frac{J_{MAX}M}{K_M(1 + I/K_I) + M} \quad (3)$$

Non-linear regression was performed using the SigmaStat package (Jendel Corporation, San Rafael, CA, USA).

2.5. Protein determination

Protein concentration was determined with the Bicinchoninic acid method as reported by Smith et al. [20].

3. Results

3.1. The kinetics of the L-malate or malonate transport has an active and a passive component

Plastids isolated from the maize embryos were 70% intact and all preparations used in the experiments were almost free of cytosolic, mitochondrial and peroxisomal contamination. (Table 1).

Isolated plastids did rapidly uptake [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate when incubated with these dicarboxylates (Fig. 1), uptake was linear up to 7 min for [¹⁴C]-L-malate (Fig. 2), and up to 3 min for [¹⁴C]-malonate (not shown). The transport rate showed a rapid initial slope which decreased to a slower non-saturating component (Fig. 1). Since a similar behavior has been reported in other similar systems [21], we consider this to be the sum of a hyperbolic component and a passive diffusion component given by Eq. (1) (see Section 2).

Thus, the diffusive coefficient (D_P) was calculated from the slope at high dicarboxylate concentration (Table 2; for malonate see also the inset in Fig. 1), and, the maximum rate (J_{MAX}) and the half saturating concentration (K_M) were estimated by non-linear regression by fitting the rates (J) to Eq. (1) at several metabolite concentrations (M). For non-preloaded plastids, D_P was three times faster with malonate than with L-malate (Table 2) and showed variations of less than 35% between plastid preparations (not shown). Fig. 1 also shows the result of preloading the plastids with an internal metabolite. In this case, a marked increase in J_{MAX} made the D_P contribution almost negligible in the range

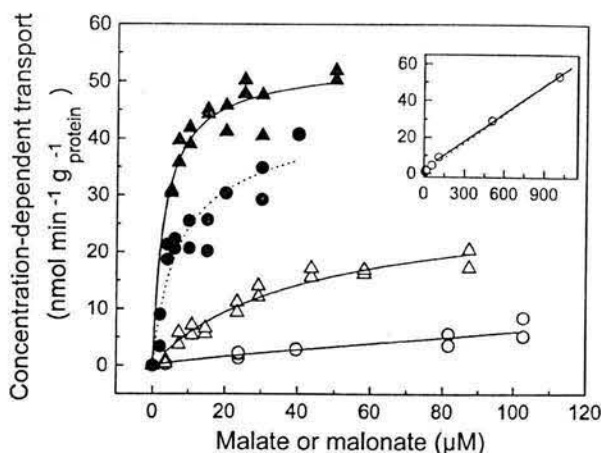


Fig. 1. [¹⁴C]-L-malate (▲, △) or [¹⁴C]-malonate (●, ○) concentration-dependent transport by purified plastids from maize developing embryos. The rate was measured with non-preloaded plastids (△, ○), or with plastids that were preloaded with 10 mM L-malate (▲) or 10 mM malonate (●). Transport was allowed to proceed for 1 min at 15 °C. Lines were drawn from Eq. (1) using the parameter values reported in Table 2. The inset shows the observed uptake rate of the plastids before preincubation and at concentrations of malonate up to 1 mM.

of concentrations employed. However, at higher metabolite concentrations (up to 10 mM), the diffusive component was also evident (not shown). Accordingly, for measurements of ¹⁴C uptake performed with saturating concentrations of malonate or L-malate (0.25 mM), after correcting for the [¹⁴C]-sorbitol permeable space, the passive diffusion component (calculated from the corresponding D_P value) was subtracted from the [¹⁴C]-uptake rates.

For determinations involving the ¹⁴C release rates from plastids preloaded with a fixed concentration of [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate, controls in the absence of external metabolites were subtracted to correct for the ¹⁴C leakage due to the passive component and other non-specific effects. Therefore, when analyzing saturation curves, measurements of the ¹⁴C release from preloaded plastids at varying external concentration of the metabolite of interest was preferred. In addition, this last procedure minimizes the problems associated with uncertainty in the true internal concentration achieved during preloading, which are due to differences in the approach to equilibrium, variations in the

Table 1
Plastidial intactness, recovery and contamination by cellular fractions

Enzyme	Intactness ^a (%)	Activity recovery ^b (%)	Contamination ^c (%)	Total activity (nmol min ⁻¹ g _{protein} ⁻¹)
NADP-ME	73 ± 3	29.3 ± 2	–	250 ± 59
PEP Carboxylase	–	1.0 ± 0.3	3.41	53 ± 20
Catalase	–	0.40 ± 0.02	1.36	47 ± 30
Fumarase	–	0.70 ± 0.43	2.34	11 ± 8

Plastids were isolated and purified from developing maize embryos, as described in Section 2.

^a Intactness was calculated as the activity of NADP-malic enzyme (NADP-ME) release by addition of 0.1% Triton-X100, relative to the total activity.

^b The activities of PEP carboxylase, catalase and fumarase were used as markers of cytosol, peroxisome and mitochondria, respectively, here, as percentage of the total activity of each enzyme recovered in plastid preparation relative to the activity found in the crude extract.

^c The ratio of each enzyme activity to that of NADP-ME in the plastid preparation, relative to the same ratio in the crude extract.

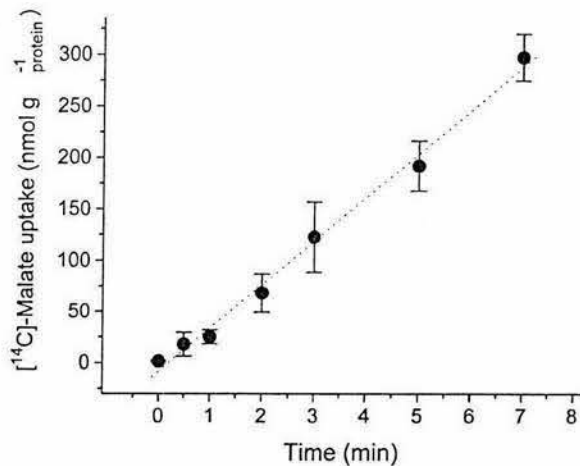


Fig. 2. Time-dependent [¹⁴C]-L-malate uptake by non-preloaded plastid purified from maize developing embryos.

starting internal plastid content, and changes in the plastid turgor caused by the isolation, the preloading, or the dilution after preloading. The metabolism of L-malate in plastids incubated at 15 °C for 1 min was found to be negligible since the separation of the quenching medium by thin layer chromatography revealed only one radioactive spot co-migrating with the commercial U-[¹⁴C]-L-malate (not shown).

3.2. Plastids from maize developing embryos are able to exchange L-malate or malonate with other dicarboxylates and a tricarboxylate

Results in Table 3 show a stimulation of the [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate uptake when plastids were preloaded with L-malate or malonate. We also observed stimulation of the [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate uptake when plastids were preloaded with the dicarboxylate maleate, and with the tricarboxylate citrate (Table 3). In contrast, we found no stimulation of the transport rate by the addition of D-malate, sodium or potassium ions, phosphate, sulfate or when preloading and transport measurements were per-

Table 3

Properties of the dicarboxylate transport in isolated plastids from maize embryos as a function of the preloading conditions

Preloaded metabolite or condition	[¹⁴ C]-Malonate uptake (nmol min ⁻¹ g ⁻¹ protein ⁻¹)	[¹⁴ C]-L-Malate uptake (nmol min ⁻¹ g ⁻¹ protein ⁻¹)
None	0.96 ± 0.17 ^a	26.1 ± 2.6 ^a
L-Malate	39.7 ± 3.6 ^a	52.0 ± 1.6 ^a
malonate	57.5 ± 3.2	47.2 ± 18.8
citrate	57.7 ± 13.1	39.0 ± 2.3
maleate	23.4 ± 4.6	61.0 ± 17.8
D-Malate	nd	16.3 ± 6.4
NaCl	8.7 ± 2.4	5.2 ± 0.8
KCl	8.5 ± 6.9	nd
Sulfate	5.7 ± 0.8	nd
Phosphate	nd	7.7 ± 4.4
pH 7	1.6 ± 3.3	5.2 ± 2.7
pH 8	1.6 ± 3.2	nd

Plastids were preloaded at pH 7.5 and 15 °C with various substrates, or ions (at 5 mM), or at the indicated pH condition. The transport was started at pH 7.5 and 15 °C by the external addition of 0.25 mM [¹⁴C]-malonate or [¹⁴C]-L-malate and terminated after 1 min. Results are the mean of three independent experiments, each performed in duplicate. Data were corrected for the [¹⁴C]-sorbitol permeable space and for the passive diffusion rate. nd: not determined.

^a These values are the corresponding J_{MAX} values taken from Table 2 and had been included here in order to aid comparisons.

formed in media at different pH (Table 3). This last result indicates that there is not an exchange of proton/malate or proton/malonate in this kind of plastids.

3.3. Dicarboxylate exchange specificity

The radioactivity uptake by plastids preloaded with L-malate or malonate was stimulated two- to three-fold when the [¹⁴C]-dicarboxylates were added to the external transport medium (Table 2), and, the [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate uptake was also stimulated two- or three-fold when plastids were preloaded with various dicarboxylates (Table 3). This indicates the presence in maize plastids of a dicarboxylate transporter system (DT) partly resembling the one reported in spinach chloroplasts [9,17].

Table 2

Transport characteristics of L-malate or malonate uptake

External metabolite	Preloaded metabolite	K_M (μM)	J_{MAX} (nmol min ⁻¹ g ⁻¹ protein ⁻¹)	D_p^c	J_{MAX}/K_M^c
[¹⁴ C]-L-Malate ^a	None	37.4 ± 7.9	26.1 ± 2.6	0.017 ± 0.013	0.70 ± 0.13
[¹⁴ C]-Malonate ^a	None	13.9 ± 8.3	0.96 ± 0.17	0.06 ± 0.02	0.069 ± 0.037
[¹⁴ C]-L-Malate ^b	L-Malate	3.1 ± 0.5	52.0 ± 1.6	nd	17.0 ± 2.6
[¹⁴ C]-Malonate ^b	L-Malate	6.7 ± 1.9	39.7 ± 3.6	nd	5.93 ± 1.46
Malonate ^d	[¹⁴ C]-Malonate	4.5 ± 3.2	17.6 ± 4.9	nd ^d	4.0 ± 2.5

^a J_{MAX} and K_M were obtained from fitting the data to Eq. (1) with a fixed D_p value of 0.017 ml min⁻¹ g⁻¹ protein⁻¹ for L-malate, and 0.06 ml min⁻¹ g⁻¹ protein⁻¹ for malonate. The values of D_p were obtained from the slope of data at high concentration (up to 1 mM) of L-malate (not shown), or malonate (see Fig. 1 inset), respectively.

^b J_{MAX} and K_M were obtained from fitting the data to Eq. (1) with a fixed D_p set to zero; setting it fixed to the value obtained without preloading the plastids gave almost the same final fit.

^c Resulting units are ml min⁻¹ g⁻¹ protein⁻¹.

^d Rates were corrected by subtraction of the control rates in the absence of external malonate, which cancels out the passive diffusion component.

Table 4
Kinetic parameters of the dicarboxylate translocator in plastids isolated from developing maize embryos, with several substrate pairs

External metabolite ^a	J_{MAX} ($\text{nmol min}^{-1} \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$)	K_M (μM)	J_{MAX}/K_M ^b
Succinate	233.7 ± 18.4	4.4 ± 2.2	53 ± 25
Oxaloacetate	110.9 ± 5.9	2.1 ± 0.8	53 ± 19
Glutamate	80.3 ± 5.7	5.2 ± 1.8	15 ± 5
Oxoglutarate	93.75 ± 8.74	11.58 ± 3.2	8.1
Aspartate	73.4 ± 14.1	25.8 ± 8.4	2.8 ± 0.8
Pyrophosphate	226.1 ± 17.8	180 ± 38	1.3 ± 0.2

Plastids preloaded with [¹⁴C]-L-malate (0.25 mM, 2 μCi , for 10 min at 15 °C) were pelleted and resuspended in buffer B (see Section 2). The transport was started immediately after resuspension by the addition of plastids to the tubes containing buffer B and the indicated metabolite. The transport rate was determined as indicated in Section 2. The [¹⁴C] outflow in the absence of external metabolites was used as a blank to correct for the non-specific leak.

^a Increasing concentrations of external metabolite were from 0 to 30 μM with the exception of pyrophosphate which was from 0 to 300 μM , and oxoglutarate and aspartate, from 0 to 100 μM .

^b Resulting values have units of $\text{ml min}^{-1} \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$.

Unlike the spinach chloroplast DT [17], the maize plastidial DT system was able to exchange malonate with other dicarboxylates. The DT present in the plastids from maize embryos was also able to exchange malonate with citrate, a tricarboxylate, which is an indication of a broader specificity and reminiscent of the dicarboxylate mitochondrial transport systems found in plants [22] and Yeast [23].

There is evidence of, at least, two different dicarboxylate transporters with overlapping specificities in Spinach chloroplast [9,17]. To gain some insight into the specificity of the translocator system reported here, its saturation kinetics was tested. We analyzed the outflow of [¹⁴C]-L-malate or [¹⁴C]-malonate against some dicarboxylates, or pyrophosphate, at pH 7.5. For these experiments, the plastids were preloaded at 15 °C with 0.25 mM [¹⁴C]-L-malate, then the rate of [¹⁴C] release was determined against the concentration of the metabolite in the external medium, and the control rates in the absence of external metabolites were subtracted.

Table 4 shows J_{MAX} and K_M of the dicarboxylate translocator when plastids were preloaded with 0.25 mM [¹⁴C]-L-malate and the [¹⁴C]-outflow was followed in media with increasing concentrations of several external metabolites.

The best two substrates for DT were succinate and oxaloacetate, both intermediates of Krebs cycle and amino acid precursors. The maize plastidial DT was also able to exchange aspartate and glutamate for malate, the later with 5-fold higher efficiency (Table 4, J_{MAX}/K_M) than the aspartate/malate exchange.

Citrate was also found to stimulate the [¹⁴C]-malonate release in preloaded plastids with a J_{MAX} of $57.7 \pm 13.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{g}_{\text{protein}}^{-1}$ and a K_M of $41.7 \pm 22.8 \mu\text{M}$ (J_{MAX}/K_M 1.4 ± 0.7), but isocitrate was a poor substrate

(not shown). In contrast, and as mentioned before, inorganic acids such as phosphate and sulfate did not stimulate the [¹⁴C]-malate release (Table 3) or uptake (data not shown).

Surprisingly, this translocator exchanged malate for pyrophosphate, which is not a dicarboxylate. At pH 7.5, close to the cytoplasm pH of maize embryos cells, 90% of pyrophosphate is ionized as $\text{HP}_2\text{O}_5^{3-}$, 7% of this mineral has the same ionic charge of -2 as most dicarboxylates, and roughly 3% would be as $\text{P}_2\text{O}_5^{4-}$ (other forms would be negligible). At this pH, and in the absence of Mg^{2+} , Ca^{2+} or other cations, 99.8% of total L-malate bears a -2 charge.

3.4. Dicarboxylate exchange inhibition

n-Butylmalonate is a potent inhibitor of dicarboxylate translocator in pea and spinach mitochondria [24], while the DT from spinach chloroplasts was not sensitive to this inhibitor [17]. We determined the dose-response to *n*-butylmalonate of the [¹⁴C]-L-malate outflow from preloaded plastids from maize embryos at four concentrations of external malonate. *n*-Butylmalonate inhibition of the L-malate/malonate exchange was competitive against malonate with a K_I of 6.7 ± 2.4 (from non-linear regression fit of the data in Fig. 3 to the complete competitive inhibition equation (Eq. (3)).

This inhibitor was also effective in reducing the citrate-dependent release of [¹⁴C]-malonate from the isolated maize plastids with a I_{50} of $5.11 \pm 0.77 \mu\text{M}$ at 50 μM external citrate (data not shown).

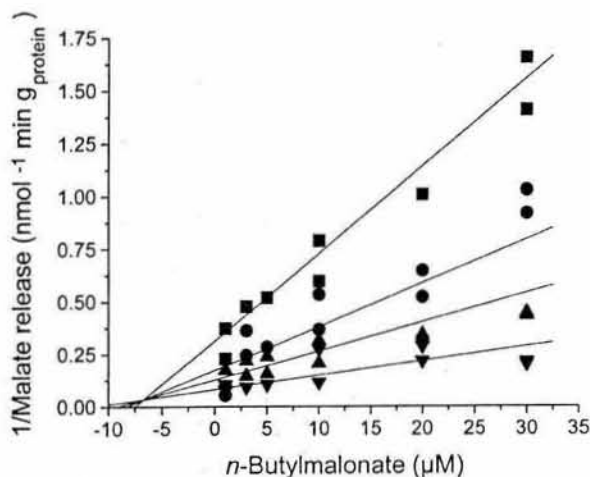


Fig. 3. Malonate/L-malate exchange inhibition by *n*-butylmalonate. Plastids were preloaded in buffer B with 0.25 mM [¹⁴C]-L-malate, and its outflow rate was measured in buffer B at malonate concentrations of 2 μM (■), 4 μM (●), 6 μM (▲) or 12 μM (▼), and varying concentrations of *n*-butylmalonate in the μM range. Rates in the absence of malonate and at each *n*-butylmalonate concentration, were used to correct for the passive diffusion rate. The lines drawn correspond to the global fit of data to the full competitive inhibition Eq. (3) adjusted by non-linear regression (see Section 2).

Table 5
Uptake of [32 P]-pyrophosphate by isolated plastids from developing maize embryos

Internal preloaded substrate ^a	[32 P]-Pyrophosphate uptake (nmol min ⁻¹ g ⁻¹ protein ⁻¹)
None	21.6 ± 7.2
Pyrophosphate	134.5 ± 47.2
Oxaloacetate	75.9 ± 20.4
Succinate	69.3 ± 23.2
L-Malate	63.5 ± 8.2
Glutamate	39.0 ± 6.6
Aspartate	31.7 ± 16.5

Plastids were preloaded for 5 min at 15°C in buffer B (see Section 2) plus the indicated metabolite (1 mM), and the transport was initiated with the addition of [32 P]-pyrophosphate (180 μM and 0.6 μCi/nmol, final concentration) in buffer B. The transport rate was determined as indicated in Section 2. The [32 P]-pyrophosphate uptake rate was corrected for the [14 C]-sorbitol permeable space.

^a Plastids were preloaded with 1 mM of the indicated metabolite, except for basal treatment, where plastids were not preloaded.

3.5. Pyrophosphate exchange by DT

The pyrophosphate/L-malate carriers reported in Table 4 could be mediated by the same DT or by a system of two or more exchanges, sharing one intermediate substrate. To clarify this issue, we took advantage of the sensitivity of the DT to *n*-butylmalonate. The pyrophosphate-dependent [14 C]-L-malate release in plastids preloaded with 0.25 mM [14 C]-L-malate, and in the presence of 300 μM pyrophosphate as external metabolite, was determined at several concentrations of *n*-butylmalonate. Fig. 4A shows how the pyrophosphate/L-malate exchange was inhibited by *n*-butylmalonate with a I_{50} of 6.5 ± 2.1 μM. Furthermore, increasing concentrations of pyrophosphate inhibited the [14 C]-malonate (10 or 30 μM) uptake in plastids preloaded with malate 0.25 mM (Fig. 4B), extrapolating to total inhibition. Actually, lines in Fig. 4B were drawn by fitting the data to a competitive equation (Eq. (3)).

Taking together, our data are consistent with one carrier or a coupled-carrier system able to exchange L-malate/malonate or pyrophosphate/L-malate.

Additional support for the above proposal was obtained by measuring the stimulation of the [32 P]-pyrophosphate uptake by plastids preloaded with either unlabeled pyrophosphate, or unlabeled L-malate (Table 5). Table 5 also shows the relative stimulation of [32 P]-pyrophosphate uptake obtained by the preloading of the plastids with various dicarboxylates. The highest rate was obtained for the pyrophosphate/pyrophosphate exchange, but succinate, L-malate and oxaloacetate gave over three-fold stimulation over the control rate in non-preloaded plastids, while the amino acids aspartate and glutamate resulted only in poor stimulation. The trend in the relative rates found here is similar to the J_{MAX} rates reported in Table 4, with the exception of that for succinate. Lower values in J_{MAX} reported in Table 5 could be due to the smaller preloading concentration employed in these experiment, with respect to those in Table 4.

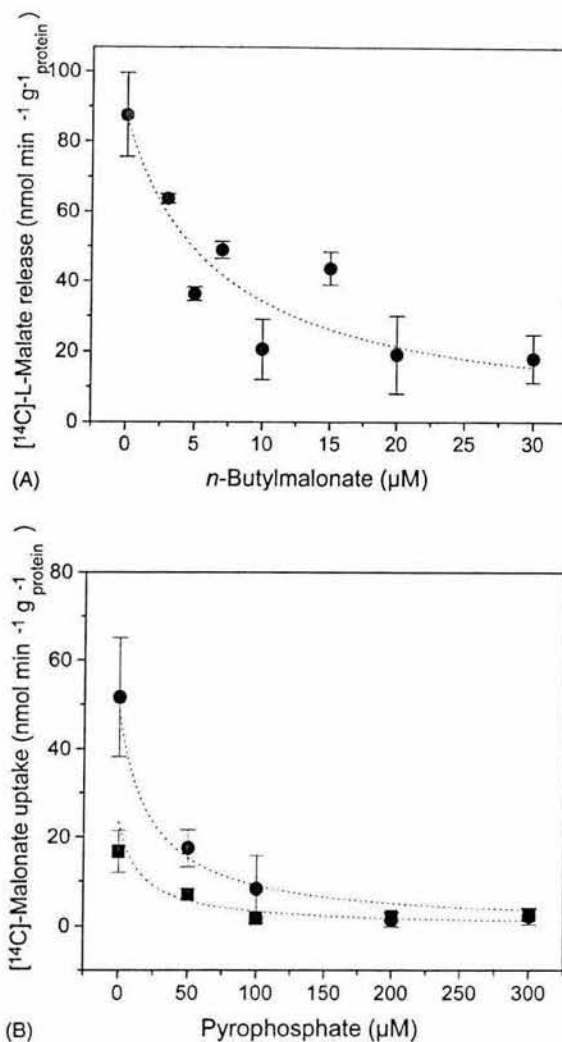


Fig. 4. (A) Inhibition of pyrophosphate/L-malate exchange by *n*-butylmalonate. Plastids were preloaded with 0.25 mM [14 C]-L-malate and the rate of 14 C release was determined in buffer B with 0.3 mM pyrophosphate and increasing *n*-butylmalonate concentrations (The line corresponds to a non-linear regression fit to Eq. (2) with an I_{50} of 6.5 ± 2.1 μM). (B) Inhibition of the malonate/L-malate exchange by pyrophosphate. Plastids were preloaded with 0.25 mM L-malate and the rate of 14 C uptake was determined in buffer B, with 10 μM (■) or 30 μM (●) [14 C]-malonate and in the presence of the indicated amounts of pyrophosphate. The lines were drawn by non-linear regression fitting of data to Eq. (3). From the fit, I_{50} values of 25.9 ± 9.6 , and 19.9 ± 7.3 μM were calculated for 10 and 30 μM malonate, respectively.

The transport rate of [32 P]-pyrophosphate showed a saturation curve that depended on the metabolite used to preload the plastids (Fig. 5A). The kinetic parameters with L-malate preloaded plastids were 207.8 ± 14.76 nmol min⁻¹ g⁻¹ protein⁻¹ for J_{MAX} and 98 ± 30.12 μM for K_M , and with pyrophosphate preloaded plastids the values were 632 ± 70 nmol min⁻¹ g⁻¹ protein⁻¹ and 319 ± 76 μM. Despite the important differences for J_{MAX} and K_M values found for both exchanges, the transport efficiency (J_{MAX}/K_M)

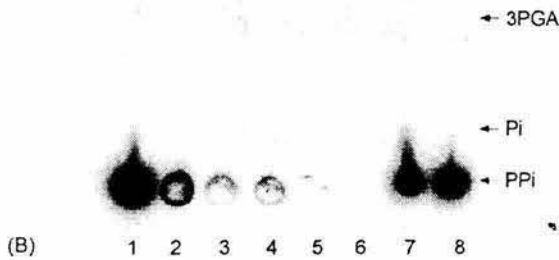
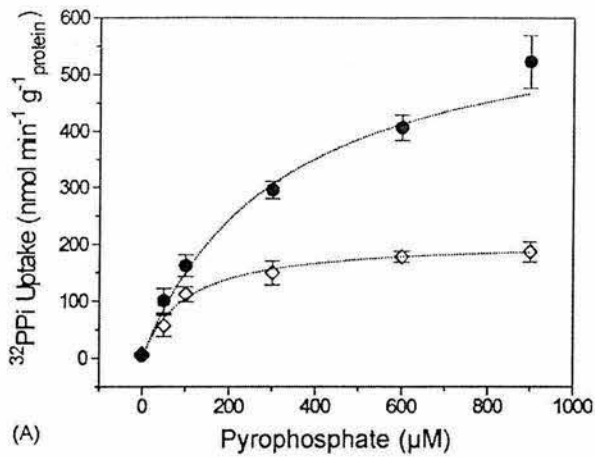


Fig. 5. (A) ^{32}P -Pyrophosphate uptake by purified plastids isolated from maize embryos preloaded with 10 mM malate (\diamond) or 10 mM unlabelled pyrophosphate (\bullet). The lines were drawn by non-linear regression fits to a rectangular hyperbolae (Eq. (1) with a D_p of 0) with kinetic parameters of: K_M $98.1 \pm 30.1 \mu\text{M}$ and J_{MAX} $207.9 \pm 14.8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ protein}$ for the PPI/malate exchange, and K_M $319.1 \pm 76 \mu\text{M}$ and J_{MAX} $632.9 \pm 70.6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ protein}$ for the PPI/PPi exchange. The data represent the mean \pm S.D. of two independent experiments performed on two separate preparations each (the four readings were considered independent estimates). (B) Stability of pyrophosphate in the transport assay. PPI release was assayed using plastids preloaded with $180 \mu\text{M}$ ^{32}P -pyrophosphate for 10 min at 15°C . The transport was allowed to proceed for 1 min at 15°C in the presence of $180 \mu\text{M}$ unlabelled pyrophosphate and stopped by centrifugation at 12,000 rpm. The different phases of the assay were collected and spotted onto a TLC plate. The plate was eluted with a mixture of methanol:concentrated ammonia:10% aqueous TCA:water (50:15:5:30), dried and the radioactivity was visualized with a stored phosphorescence screen (BioRad). Lanes 1 and 8 are commercial ^{32}P -PPI, lane 2 lower quenching phase, lane 3 silicone oil (lower half), lane 4 silicone oil (upper half), lane 7 upper transport assay medium. Lane 5 the lower phase from an experiment performed with plastids broken by dilution before the assay. Lane 6, the lower quenching phase from a tube without plastids. Arrows indicate the position of standards detected by spraying with 1% ammonium molybdate and 0.034% malachite green in 3N HCl: Pi, dihydrogen ammonium phosphate; PGA, 3-phosphoglyceric acid; PPI, sodium pyrophosphate.

was strikingly similar (2.11 ± 0.32 and $1.98 \pm 0.14 \text{ nmol min}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ protein} \mu\text{M}^{-1}$, respectively).

Two lines of evidence support a role of true pyrophosphate as the exchanging substrate in the above experiments. Though plastid pyrophosphatase activity is known to be high, its level was below that required to convert a substantial amount of the pyrophosphate taken by the plas-

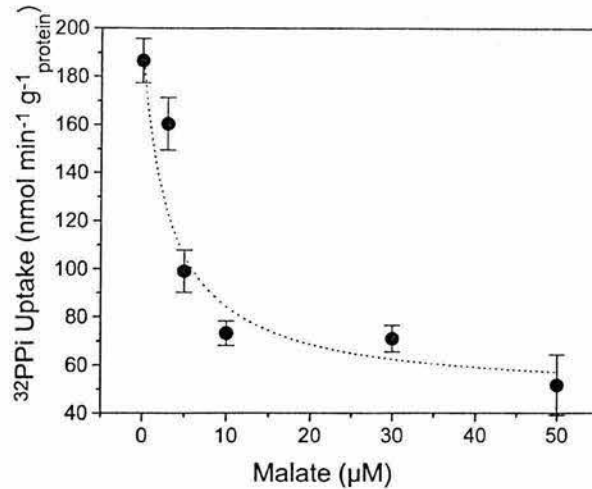


Fig. 6. Inhibition of the PPI/PPi exchange by L-malate. Plastids were preloaded with PPI 10 mM and the exchange was performed with $180 \mu\text{M}$ ^{32}P -PPI ($0.6 \mu\text{Ci/nmol}$) and increasing concentrations of L-malate. The line represents the fit to Eq. (2) with an I_{50} value of $3.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$. The data represent the mean \pm S.D. of two independent experiments performed on two separate preparations each (the four readings were considered independent estimates).

tids to free phosphate or other organic phosphates, during a 10 min at 15°C preloading or during the 1 min transport assay (Fig. 5B, lane 2), under the conditions here employed. Neither, pyrophosphatase activity from broken plastids, or from other sources of contamination, did degrade the pyrophosphate released to the plastid assay medium under our conditions (Fig. 5B, lane 7). Finally, as previously mentioned, the ^{14}C -L-malate uptake was not stimulated when the plastids were preloaded with phosphate (Table 3), nor the ^{14}C -L-malate release of preloaded plastids was stimulated by the addition of phosphate to the transport assay (not shown).

Fig. 6 shows the PPI/PPi exchange inhibition by increasing external L-malate concentrations in plastids preloaded with non-radiolabelled PPI 10 mM. The fact that L-malate competed with PPI and vice versa indicates mutually exclusive binding and is consistent with a common binding site for both substrates. Accordingly, this inhibition presented an I_{50} value of $3.4 \pm 0.9 \mu\text{M}$, which is close to the K_M for the L-malate/L-malate exchange (Table 2).

Finally, we decided to test if the exchanges PPI/PPi and PPI/L-malate were also inhibited by *n*-butylmalonate. We found the PPI/PPi exchange was inhibited by *n*-butylmalonate with an I_{50} of $10.4 \pm 4.4 \mu\text{M}$ (Fig. 7), while the inhibition by *n*-butylmalonate of PPI/L-malate exchange showed an I_{50} of $3.5 \pm 0.3 \mu\text{M}$ (Fig. 7).

4. Discussion

We have found that there is a dicarboxylate translocator system (DT) in isolated plastids from developing maize embryos conformed by one carrier or by a coupled-carrier

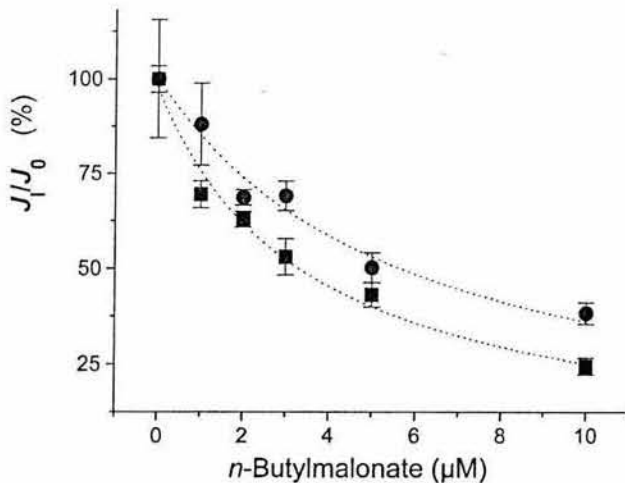


Fig. 7. Fractional inhibition of PPI/PPi and PPI/L-malate exchange by *n*-butylmalonate. Plastids were preloaded with 10 mM PPI (●) or 10 mM L-malate (■) and the [³²P]-pyrophosphate uptake was measured at 180 µM [³²P]-PPI (0.6 µCi/nmol) and increasing concentrations of *n*-butylmalonate. The lines are the result of non-linear regression fits to Eq. (3) with *I*₅₀ values of 5.6 ± 0.7 µM, for the PPI/PPi, and of 3.5 ± 0.3 µM for the PPI/L-malate. *J*₁ represents the [³²P]-PPI uptake rate in each point, while *J*₀ is the [³²P]-PPI uptake rate without *n*-butylmalonate. The data represent the mean ± S.D. of two independent experiments performed on two separate preparations each (the four readings were considered independent estimates).

system able to exchange L-malate or malonate for succinate, oxaloacetate, aspartate, glutamate, or even citrate and, surprisingly, pyrophosphate with different affinities. Succinate and oxaloacetate were the best substrates for uptake in plastids preloaded with [¹⁴C]-L-malate. Estimated affinities were 10-fold higher than those found in DT from spinach leaves [9], and the maize plastidial DT showed a broader specificity. It accepted malonate and citrate, and was sensitive to inhibition by *n*-butylmalonate, in contrast with the spinach chloroplast dicarboxylate transporter, which is insensitive to *n*-butylmalonate and does not transport malonate or citrate [17]. If the differences reported here reflect different metabolic needs between plastids and chloroplasts, or between species, remains an open question.

The translocator in developing maize embryos was unable to exchange L-malate for phosphate, as found by Eastmond et al. [8] in leucoplasts from developing castor endosperm. Based on the data reported by Šmith et al. [16] who found L-malate is the better substrate for fatty acid synthesis than pyruvate or acetate, Eastmond et al. proposed L-malate as the major source of carbon for lipid synthesis in developing Castor bean seeds. The proposal could be extended to maize embryos if the exchange of L-malate by pyrophosphate is considered, yet if this was the case, one would expect to find differences in the regulation of the processes involved between the two species. To complicate the picture, L-malate, 2-oxoglutarate and oxaloacetate could be amino acid synthesis precursors involved in ammonia assimilation [25]. Thus, the relevance of L-malate as carbon donor for the plastid is still unclear.

One important finding reported here is the L-malate/pyrophosphate exchange by these plastids. Our data are consistent with the existence of one or two carriers with very similar kinetic characteristics responsible for the L-malate/malonate and PPI/L-malate exchanges.

First, increasing concentrations of external unlabelled pyrophosphate inhibited the [¹⁴C]-L-malonate uptake (Fig. 4B) and increasing concentrations of unlabelled L-malate inhibited the [³²P]-PPI uptake (Fig. 6). Second, the exchanges [¹⁴C]-L-malate/PPi (Fig. 4A), [¹⁴C]-L-malate/malonate (Fig. 3), [³²P]-PPI/PPi, and [³²P]-PPI/L-malate (Fig. 7) were all inhibited by *n*-butylmalonate. The *I*₅₀ for *n*-butylmalonate found here was of the same order of magnitude, in agreement with the binding of *n*-butylmalonate to a common site. In fact, if the *I*₅₀ estimates for *n*-butylmalonate are corrected with the respective *K*_M values and assuming competitive inhibition [24], the estimated *K*_I values would fall within 3–15 µM, again, in agreement with the *K*_I found directly for the *n*-butylmalonate inhibition of the L-malate/malonate exchange (Fig. 3). In addition, the values of *I*₅₀ for the L-malate inhibition of the PPI/PPi exchange (Fig. 7) was close to the respective *K*_M for L-malate, which is consistent with the above proposal. Unfortunately, the results presented here can not answer if one carrier or a system of two or more carriers are involved the DT and the PPI/dicarboxylate exchange in non-green plastids. In fact, the low *I*₅₀ values found for pyrophosphate inhibition of malonate/L-malate exchange could be explained in terms of a two coupled-carriers system. This remains an open question, deserving further research, and, most likely, a different experimental approach. In any case, valuable information regarding the properties of the DT system in intact plastids is presented here.

Lunn and Douce [26] found a pyrophosphate transporter in spinach chloroplasts, however, they did not identify any metabolite being exchanged with pyrophosphate. This last transporter and the DT we report here are similar in affinity for PPI and flux rate [26], though it is feasible that the DT was also responsible for the pyrophosphate transport in spinach chloroplasts, further research would be required to test this possibility.

Pyrophosphate is an important metabolite in plastids regulating starch synthesis in chloroplasts [27] but there is an active pyrophosphatase in the plastid stroma [28]. In addition, Pi is the counter ion of PPT, TPT, HPT and XPT. Thus, through the dicarboxylate/PPi exchange, DT not only could participate in the balance of carboxylic acids and reducing power between the stroma and the cytosol, but also may affect the phosphorus content via PPi import or export. In fact, PPi transport can help to compensate for the imbalance in phosphate caused by the adenine nucleotide translocator [26]. To this respect, reports of net uptake of phosphate into plastids are inconclusive. While Versaw and Harrison [29] report a phosphate transporter in Arabidopsis chloroplasts, Fuks and Homblé [30], found that spinach chloroplasts were impermeable to phosphate and sulfate anions. The reason

for this could be due to differences in the experimental approach employed by these authors, but clearly additional experimental work on the matter is still required.

In conclusion, in this paper we report the existence of a DT activity in developing maize embryos with similar, though not identical, characteristics to the 2-oxoglutarate translocator and dicarboxylate translocator in spinach chloroplasts. The function could be to mediate and regulate the carboxylic acid and reducing power balance, but may also contribute to the maintenance of the phosphorus/carbon balance between plastid stroma and cytosol.

Acknowledgements

This work was supported by PAPIIT-DGAPA-UNAM-IN201102 and PAEP-UNAM-203314. ALN was a recipient of a CONACYT-138455 and DGEP-UNAM-5992510 doctoral fellowships. We thank Dr. DW Krogmann from Purdue University and Dr. Sobeida Sánchez-Nieto from Faculty of chemistry, UNAM for helpful and critical reading of the manuscript. We thank Lilian Valencia-Turcotte for her technical assistance. We specially thank Dr. Phillip Guy from Monsanto at Dekalb, IL, for his helpful observations and the correction of this manuscript.

References

- [1] M.J. Emes, H.E. Neuhaus, Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids, *J. Exp. Bot.* 48 (1998) 1995–2005.
- [2] U.I. Flügge, K. Fisher, A. Gross, W. Sebald, F. Lottspeich, C. Eckerskorn, The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: nucleic acid sequence of a full length cDNA clone, *EMBO J.* 8 (1989) 39–46.
- [3] D. Schünemann, S. Borchert, U.I. Flügge, H.W. Heldt, ATP/ADP translocator from pea-root plastids. Comparison with translocators from spinach chloroplasts and pea leaf mitochondria, *Plant Physiol.* 103 (1993) 131–137.
- [4] S. Borchert, H. Große, H.W. Heldt, Specific transport of inorganic phosphate, glucose 6-phosphate, dihydroxyacetone phosphate and 3-phosphoglycerate into amyloplasts, *FEBS Lett.* 253 (1989) 183–186.
- [5] K. Fischer, B. Kammerer, M. Gutensohn, B. Arbing, A. Weber, R. Häusler, U.I. Flügge, A new class of plastidic phosphate translocator: a putative link between primary and secondary metabolism by the phosphoenolpyruvate/phosphate antiporter, *Plant Cell* 9 (1997) 543–562.
- [6] S.J. Streatfield, A. Weber, E.A. Kinsman, R.E. Häusler, J. Li, D. Post-Beittenmiller, W.M. Kaiser, K.A. Pyke, U.I. Flügge, J. Chory, The phosphoenolpyruvate/phosphate translocator is required for phenolic metabolism, palisade cell development, and plastid-dependent nuclear gene expression, *Plant Cell* 11 (1999) 1609–1621.
- [7] M. Eicks, V. Maurino, S. Knappe, U.I. Flügge, K. Fisher, The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants, *Plant Physiol.* 128 (2002) 512–522.
- [8] P.J. Eastmond, D.T. Dennis, S. Rawsthorne, Evidence that a malate/inorganic phosphate translocator imports carbon across the leucoplast envelope for fatty acid synthesis in developing castor seed endosperm, *Plant Physiol.* 114 (1997) 851–856.
- [9] K.C. Woo, U.I. Flügge, H.W. Heldt, A two-translocator model for the transport of 2-oxoglutarate and glutamate in chloroplasts during ammonia assimilation in light, *Plant Physiol.* 84 (1987) 624–632.
- [10] E. Menzlaff, U.I. Flügge, Purification and functional reconstitution of the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1147 (1993) 13–18.
- [11] M. Taniguchi, Y. Taniguchi, M. Kawasaki, S. Takeda, T. Kato, S. Sato, S. Tabata, H. Miyake, T. Sugiyama, Identifying and characterizing plastidic 2-oxoglutarate/malate and dicarboxylate transporters in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 43 (2002) 706–717.
- [12] F.B. Negm, F.A. Cornel, W.C. Plaxton, Suborganellar localization and molecular characterization of nonproteolytic degraded leucoplast pyruvate kinase from developing castor oil seeds, *Plant Physiol.* 109 (1995) 1461–1469.
- [13] H. Luck, Catalase, in: H.U. Bergmeyer (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, Academic Press, New York, 1965, pp. 885–894.
- [14] M.D. Hatch, A simple spectrophotometric assay from fumarate hydratase in crude tissue extracts, *Anal. Biochem.* 85 (1978) 271–275.
- [15] R. Chollet, J. Vidal, M.E. O'Leary, Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 47 (1996) 273–298.
- [16] R.G. Smith, D.A. Gauthier, D.T. Dennis, D.H. Turpin, Malate- and pyruvate-dependent fatty acid synthesis in leucoplasts from developing castor endosperm, *Plant Physiol.* 98 (1992) 1233–1238.
- [17] K. Lehner, H.W. Heldt, Dicarboxylate transport across the inner membrane of the chloroplast envelope, *Biochim. Biophys. Acta* 501 (1978) 531–544.
- [18] H.W. Heldt, Transfer of substrates across the chloroplast envelope, *Horizons Biochem. Biophys.* 2 (1976) 199–219.
- [19] I.H. Segel, *Enzyme Kinetics*, Wiley, New York, 1975, pp. 100–159.
- [20] K.P. Smith, I.H. Krohn, T.G. Hermanson, G.H.F. Mallia, D.M. Provenzano, K.E. Fujimoto, M.N. Goeke, J.B. Olson, C.D. Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.* 150 (1985) 76–85.
- [21] M. Schwartz, A. Gross, T. Steinkamp, U.I. Flügge, R. Wagner, Ion channel properties of the reconstituted chloroplast triose phosphate/phosphate translocator, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 29481–29489.
- [22] N. Picault, L. Palmieri, I. Pisano, M. Hodges, F. Palmieri, Identification of a novel transporter for dicarboxylates and tricarboxylates in plant mitochondria, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24204–24211.
- [23] L. Palmieri, A.L. Vozza, G. Agrimi, V. De Marco, M.J. Runswick, F. Palmieri, J.E. Walker, Identification of the yeast mitochondrial transporter for oxaloacetate and sulfate, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 22184–22190.
- [24] M. Laloi, Plant mitochondrial carriers: an overview, *Cell Mol. Life Sci.* 56 (1999) 918–944.
- [25] E. Glawischnig, A. Gierl, A. Tomas, A. Bacher, W. Eisenrich, Retrobiosynthetic nuclear magnetic resonance analysis of amino acid biosynthesis and intermediary metabolism. Metabolic flux in developing maize kernels, *Plant Physiol.* 125 (2001) 1178–1186.
- [26] J.E. Lunn, R. Douce, Transport of inorganic pyrophosphate across the spinach chloroplast envelope, *Biochem. J.* 290 (1992) 375–379.
- [27] E.M. Farré, P. Geigenberger, L. Willmitzer, R.N. Trethewey, A possible role for pyrophosphate in the coordination of cytosolic and plastidial carbon metabolism within the potato tuber, *Plant Physiol.* 123 (2000) 681–688.
- [28] H. Weiner, M. Stitt, W. Heldt, Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves, *Biochim. Biophys. Acta* 893 (1987) 13–21.
- [29] W.K. Versaw, M.J. Harrison, A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses, *Plant Cell* 14 (2002) 1751–1766.
- [30] B. Fuks, F. Homblé, Passive anion transport through the chloroplasts inner envelope membrane measured by osmotic swelling of intact chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta* 1416 (1999) 361–369.