



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCIÓN *in situ* DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS
TRANSPORTADORES DE AZÚCARES EN LOS TEJIDOS
EMBRIONARIOS DE MAÍZ Y SU POSIBLE REGULACIÓN POR
CARBOHIDRATOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

SONIA ALELY RAMÍREZ VERDEJO



MÉXICO D.F.

2009

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

VOCAL MARIA EUGENIA TORRES MARQUEZ

SECRETARIO SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

1er. SUPLENTE JOSE IGNACIO PARAMO RAMÍREZ

2do. SUPLENTE LAURA CARMONA SALAZAR

ESTE TRABAJO SE LLEVO A CABO EN EL LABORATORIO 114, DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, EN EL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DE TESIS DE LA DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO.

DRA. SOBEIDA SANCHEZ NIETO

Q.F.B. CONSUELO ENRIQUEZ ARREDONDO

Asesor

Supervisor Técnico

SONIA ALELY RAMÍREZ VERDEJO

Sustentante

AGRADECIMIENTOS

Doy Gracias a Dios por existir, por todo cuanto tengo y por permitirme vivir rodeada de mis seres queridos.

A la UNAM agradezco por su invaluable legado de conocimientos y cultura. Por transmitir el incansable espíritu de lucha y el orgullo de ser universitaria.

Agradezco a la Facultad de Química por darme los conocimientos necesarios para desarrollarme en mi vida profesional, por ser una institución comprometida y por ser mi segunda casa durante los años que cursé mi carrera.

Gracias a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, quién además de ser mi asesora en este proyecto ha sido un gran apoyo, gracias por brindarme su confianza, paciencia y sabiduría, por transmitir sus conocimientos y por ser una maravillosa persona.

Gracias a todos mis profesores de la Facultad, quienes son excelentes profesionistas y aportaron la parte más importante durante mi formación académica.

Gracias a mis compañeros del Laboratorio 114, Norma, Tania, Aida, Víctor, Eric, Adriana y Saúl por su amistad, apoyo y comprensión.

Se agradece a la QFB María Consuelo Enríquez Arredondo por su asesoría técnica en la detección del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz.

Gracias a Dra. Marina Gavilanes y a todos mis compañeros del Laboratorio 101 por las facilidades brindadas durante la realización de este trabajo

Se agradece al MVZ Atonatiu Edmundo Gómez Martínez el apoyo técnico para la inmunización de conejos y la obtención de anticuerpos que fueron usados en este trabajo.

**Este trabajo se realizó con apoyos :
PAPIIT IN218505 y PAPIIT IN203708 DGAPA, UNAM.
PAIP 6290-12 de la Facultad de Química.**

Gracias a mi mamá por su amor infinito, por todos sus sacrificios, por que todo su esfuerzo ha sido mi principal fuerza para salir adelante, por que este logro es tan suyo como mio.

Gracias a mi Amor Fernando por todo su amor y cuidado, por cada momento juntos, por toda su ayuda y por que en realidad no existen palabras para

agradecer todo lo que haz hecho por mi, por ser parte de mi vida y de este trabajo. Te amo.

Gracias a mis Hermanas Marilú y Gaby por ayudarme a entender la vida, por entenderme y soportarme, por ser mi apoyo en todo y por su cariño.

Gracias a mi Papá por toda su generosidad, por el apoyo y cariño que siempre me ha brindado.

Gracias a mis Tías Ligia, Rosa y Rafa, por todo el apoyo y cariño que han brindado a mi y a mi familia.

Gracias a toda la familia Berdejo Centeno por toda su ayuda y cariño

Gracias a mis amigos de toda la vida Alondra y Fidel por su amistad y por estar siempre conmigo.

Gracias a mis amigos y compañeros de toda la carrera por su amistad y por todos los momentos compartidos: Abigail, Lorena, Zuzuki, Judith, Erika, Daniel, Eder, Paullete, Kenia, y los demás que no mencioné pero que igual han sido importantes.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis con todo mi amor, respeto y admiración a quienes para mí son la prueba más grande de que Dios existe:

A mis papás: La Sra. Ubalda Berdejo y el Sr. Joaquín Ramírez

A mis hermanas: Marilú y Gaby

Y a el amor de mi vida: el QFB Luis Fernando Contreras de la Cruz

CONTENIDO

	<i>Página</i>
Índice de figuras	7
Abreviaturas	8
Resumen	9
Introducción.....	11
Descripción de la semilla de maíz.....	11
Estructura	11
Contenido de reservas.....	13
Germinación.....	14
Fases de la germinación.....	15
Movilización de reservas.....	17
Transporte de carbohidratos.....	19
Transporte de carbohidratos a través de membranas.....	22
Transportador de sacarosa.....	22
Transportador de hexosas.....	25
Carbohidratos como moléculas señal.....	28
Antecedentes directos al trabajo	31
Caracterización de la toma de sacarosa en la germinación del maíz.....	31
Regulación del simportador sacarosa/H ⁺ por azúcares en la germinación del maíz.....	32
Hipótesis	34
Objetivos	34
Objetivo general.....	34
Objetivos particulares.....	34
Materiales y métodos	35
Diseño experimental.....	35

Material biológico.....	35
Crecimiento de ejes y embriones.....	36
Imbibición de tejidos (ejes embrionarios y embriones) en diferentes carbohidratos.....	36
Obtención de fracción microsomal.....	36
Determinación de proteínas.....	37
Inmunoréplica tipo Western.....	37
Anticuerpos contra los diferentes transportadores de carbohidratos de la membrana plasmática.....	38
Transportador de sacarosa.....	38
Transportador de hexosas.....	38
Detección <i>in situ</i> de los transportadores de azúcares por la técnica de <i>tissue printing</i> (Impresión sobre papel de nitrocelulosa).....	40
Resultados	42
Detección del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz.....	42
Efecto de la imbibición de tejido embrionario de maíz en diferentes carbohidratos sobre la expresión del transportador de sacarosa.....	42
Detección del transportadores de hexosas en el tejido embrionario de maíz.....	47
Efecto de los carbohidratos en la expresión del transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz.....	50
Discusión	55
Conclusiones	62
Perspectivas	63
Referencias	64
Apendice I	69
Apendice II	70

Índice de figuras

	Figura	Página
Figura 1. Sección vertical de una semilla madura de maíz mostrando sus principales partes (Modificado de Leszek y Vincent, 2002).....		13
Figura 2. Fases de la germinación de la semilla.....		16
Figura 3. Esquema del transporte de sacarosa a través del floema (Lalonde <i>et al.</i> , 2004).....		20
Figura 4. Caricaturas de la topología de los transportadores de carbohidratos de plantas.....		23
Figura 5. Diagrama de flujo que muestra el proceso experimental general que se siguió para determinar el efecto de la incubación en carbohidratos de ejes y embriones de maíz en el contenido de los transportadores de carbohidratos.....		35
Figura 6. Detección de los transportadores de carbohidratos mediante inmunoréplica tipo Western.....		39
Figura 7. Localización del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz mediante tissue printing.....		41
Figura 8. Efecto de la imbibición en diferentes carbohidratos del tejido embrionario de maíz, en la localización del transportador de sacarosa.....		43
Figura 9. Efecto de la incubación de embriones de maíz en diferentes carbohidratos.....		44
Figura 10. Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en manosa.....		46
Figura 11. Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa.....		47
Figura 12. Detección <i>in situ</i> del transportador de hexosas de la membrana plasmática en embrión (A) y eje embrionario de maíz (B).....		48
Figura 13. Inmunodetección del transportador de hexosas de la membrana plasmática en fracciones microsomales de embriones germinados.....		49
Figura 14. Efecto de diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa en la localización y cantidad del transportador de hexosas en los ejes embrionarios de maíz.....		50
Figura 15. Efecto de la incubación en sacarosa en la expresión del transportador de hexosas.		51
Figura 16. Efecto de la manosa en la localización y cantidad del transportador de hexosas en ejes embrionarios de maíz.....		52
Figura 17. Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en manosa.....		54
Figura 18. Modelo esquemático de la ruta celular del transporte de carbohidratos.....		58

ABREVIATURAS

HALC	Alta afinidad-baja capacidad
Km	Constante de Michaelis
LAHAC	Baja afinidad-alta capacidad
MFS	Superfamilia de Facilitadores Mayores
PVDF	Membrana de fluoruro de polivilideno
SDS	Dodecilsulfato de sodio
STP	Proteína transportadora de azúcares (principalmente monosacáridos)
SUT	Transportador de sacarosa
TBS	Amortiguador tris salino
TTBS	Amortiguador tris salino tween

RESUMEN

La germinación es el proceso que inicia con la entrada de agua y concluye con la salida de la radícula. Con ello se activan una serie de cambios morfológicos y bioquímicos que llevan a la transformación de un embrión en plántula. Para el desarrollo y crecimiento de esta plántula, las semillas tienen almacenados nutrimentos como almidón, proteínas y lípidos. Al inicio de la germinación el eje embrionario del maíz utilizará las moléculas más fácilmente asimilables y de corto alcance, sabemos que usa rápidamente la sacarosa y que al acabarse, el escutelo es capaz de donarle más a partir de los lípidos de reserva (Bewley, 1997).

Trabajo previo en el laboratorio demostró que la membrana del eje embrionario no tiene transportador de sacarosa, por lo que no puede importar sacarosa directamente. Las invertasas de la pared celular, enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa se encuentran activas tanto en el eje embrionario como en el escutelo, por lo que el carbono de la sacarosa puede importarse en forma de hexosas. El eje embrionario deberá contar con un sistema de transporte de hexosas durante la germinación y al menos durante el periodo temprano germinativo.

En este trabajo se comparó la expresión tejido específica, así como el efecto de carbohidratos en la expresión de los transportadores de carbohidratos en tejido embrionario de maíz germinado. Se detectaron los niveles de los transportadores de hexosas y sacarosa tanto como proteína total membranal (fracción microsomal) como en el tejido embrionario. Para la determinación los niveles de cada proteína se utilizaron anticuerpos específicos, realizando la detección de los transportadores por inmunoréplica tipo Western o bien por improntas del tejido.

Se encontró que el eje embrionario contiene transportadores de hexosas, aunque no son exclusivos del eje, ya que también se encuentran presentes en la capa de células que rodea al embrión y que es la que está en contacto con el endospermo (Greaves-Fernandez, 2001).

Probablemente sean activos los transportadores de hexosas durante la fase III de la germinación, cuando la degradación del almidón es alta. Por otro lado, al analizar el efecto de la imbibición del tejido embrionario en carbohidratos sobre el perfil de expresión de los transportadores de hexosas no se encontró ningún cambio.

Por su parte, el transportador de sacarosa si se modificó al embeberse el tejido en carbohidratos. En el embrión se reprimió por la presencia de 100 mM hexosas, contrario a lo que ocurrió en el eje embrionario que se indujo y a concentraciones de 5 a 10 mM. El aumento en la concentración de sacarosa y por tanto de hexosas en el apoplasto de los ejes embrionarios puede ocurrir *in vivo*, sobre todo cuando comienza la movilización del almidón, es entonces cuando los escutelos se encuentran más activos, utilizando los esqueletos carbonados provenientes de los lípidos de reserva o bien del almidón que se hidrolizo, lo cual corresponde al final de la fase II de la germinación y el inicio de la fase III. Debido a que no determinamos la concentración umbral a la cual existe represión del transportador de sacarosa no podemos sugerir si *in vivo* se alcanzaran concentraciones de 100 mM para que la represión se produzca.

Los efectos opuestos en la expresión del transportador de sacarosa; en ejes y embriones, a la imbibición en hexosas, esto se podría deber a que existen proteínas distintas en el mecanismo de transducción de la señal por carbohidratos en dichos tejidos. Esto debido a la función contraria de los tejidos, el escutelo como tejido fuente y el eje embrionario como tejido demanda. Así la interpretación de la abundancia de carbohidratos en el eje proponemos podría llevar a un

incremento en la toma de carbohidratos y mayor crecimiento. Mientras que para el escutelo, planteamos que, al igual como sucede con la represión de la movilización de lípidos cuando hay abundancia de sacarosa, el transportador se reprime al reducir su metabolismo biosintético.

INTRODUCCIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA SEMILLA DE MAÍZ.

Estructura

Una semilla madura de maíz (*Zea mays L.*) cuenta con tres partes principales: el pericarpio, el endospermo y el embrión. El pericarpio es la capa externa rígida y transparente y está fundida con la cubierta de la semilla para formar ambas de manera conjunta la pared del fruto. El endospermo y el embrión están unidos por el pericarpio, ambos contienen material genético de los tejidos materno y paterno y estos propiamente son los tejidos que formarán la siguiente generación (Zimmermann y errn, 2005).

El endospermo contribuye aproximadamente con el 85% del peso de la semilla y es la zona mas importante de almacenamiento de los carbohidratos y de las proteínas, ambos serán la fuente de nutrimentos para el embrión, aún por varios días después de la salida de la radícula. La estructura del endospermo del maíz es muy variable y le da al grano distintas apariencias, el contenido y estado de agregación de los carbohidratos son los que principalmente contribuyen a esta variabilidad. En los maíces denominados duros o dentados el almidón que corresponde alrededor del 80% del endospermo y se encuentra constituido de un 70% de amilopectina y 30% de amilosa, mientras que en el maíz ceroso el almidón contiene esencialmente amilopectina (Ching, 1978).

La capa externa del endospermo está constituida por células especializadas llamada capa de aleurona (Figura 1), células importantes durante la etapa posterior a la germinación de la semilla, ya que se encargarán de liberar enzimas que llevarán a cabo la hidrólisis de las reservas nutrimentales de la semilla y que están sujetas a control hormonal (Leszek y Vincent, 2002).

La arquitectura de la semilla de las monocotiledóneas como el maíz es muy compleja. El eje embrionario está colocado lateralmente en relación al escutelo (Figura 1), éste último considerado como un cotiledón modificado ya que nunca funciona como un follaje, pero sirve para absorber y digerir al endospermo durante el crecimiento del embrión y la plántula (Leszek y Vincent, 2002).

En el eje embrionario se distinguen las estructuras características de una plántula de maíz, el tallo apical del meristemo (SAM del inglés “stem apical meristem”; Figura 1) que se establece en posición lateral al sitio estado de transición del embrión y opuesto al escutelo. El tallo comprende cinco o seis internodos pequeños y cada nodo sostiene una pequeña hoja. Mientras, que en las puntas del tallo y la raíz del eje embrionario se encuentran protegidos por el coleóptilo y la coleorriza, respectivamente (Figura 1; Zimmermann y Werrn 2005).

Sección vertical de una semilla madura de maíz

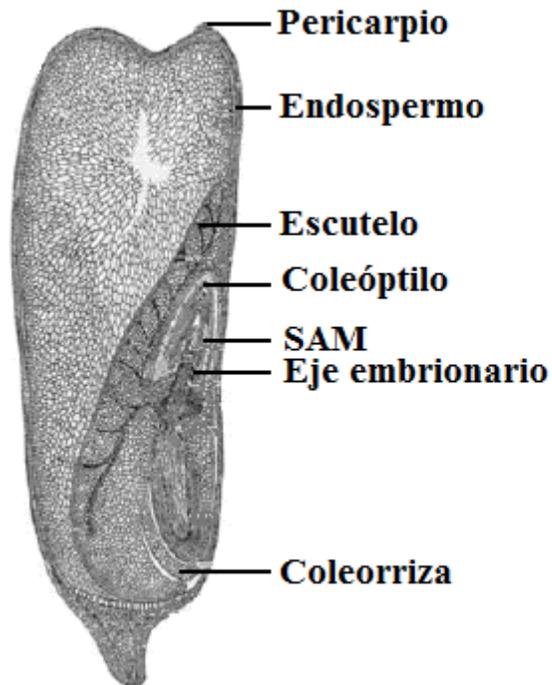


Figura 1. Sección vertical de una semilla madura de maíz mostrando sus principales partes (Modificado de Leszek y Vincent, 2002).

Contenido de reservas

La razón principal del cultivo del maíz en el mundo es la producción de grano, ya que contiene compuestos nutrimentales altos, sin embargo todas las partes de la planta: hojas, tallos, panojas y olotes- son utilizadas para diversos fines. El maíz es usado en más formas distintas que cualquier otro cereal; las formas principales en que se utiliza es como alimento humano, ya sea doméstico o industrial; alimento para animales y fermentado para varios productos industriales. Por lo que el mejoramiento de los granos de maíz ha sido motivo de estudio desde la antigüedad.

La semilla acumula reservas durante la última fase de su formación en forma de lípidos, carbohidratos y proteínas, en diferentes proporciones y tejidos, éstos

reservas se acumulan porque serán requeridas para la posterior etapa del desarrollo del embrión, la germinación. La mayor reserva nutrimental en la semilla de maíz es el almidón siendo el 80% del peso de la semilla y localizada principalmente en el endospermo, mientras que en el embrión la reserva de carbono más importante son los lípidos, siendo el 37% de su peso.

Otra reserva que encontramos en el maíz son las proteínas, las cuales son denominadas de baja capacidad nutrimental, ya que contienen bajas concentraciones de lisina, metionina y triptófano, y altas concentraciones de leucina, esto último ocasiona una disminución en la asimilación de niacina. La falta de niacina puede producir enfermedades como la pelagra. Esto ha motivado la búsqueda de variedades de maíz en donde se busca mantener su contenido de almidón, pero aumentar la calidad de sus proteínas (<http://www.botanical-online.com/maizpropiedades.htm>).

GERMINACIÓN

La germinación de una semilla es un proceso fisiológico que inicia con la toma de agua, y culmina con la salida de la raíz. La semilla madura y seca se encuentra en contenidos de humedad entre el 6 y 12%, lo que induce un estado metabólico escaso, y el contacto de la semilla con el agua da lugar primero a la hidratación de los componentes celulares y posteriormente induce la reestructuración de las membranas celulares. Después se reinicia la actividad metabólica como: la respiración para la síntesis de ATP; la glucólisis; la reparación y síntesis de los ácidos nucleicos, las proteínas y los lípidos membranales; todo ello contribuirá a la elongación y la división celular (Bewley, 1997). La serie de procesos descritos se encuentran restringidos a tiempos determinados y que coinciden con la curva de velocidad de toma de agua de la semilla y que se describirá en la siguiente sección.

Fases de la germinación

En algunas semillas las cubiertas impermeables previenen la toma de agua extendiendo el periodo en que la semilla permanece seca, hasta que la hidratación o la acción biológica de microorganismos en el suelo las vuelve permeables al agua. La velocidad inicial de imbibición puede variar en un rango muy amplio dependiendo de las características de la testa y/o el pericarpio. La toma de agua por la semilla describe tres características fases, las dos primeras corresponden al periodo germinativo, mientras que la tercera es parte del periodo temprano post-germinativo y en ella ocurre el desarrollo de la pequeña plántula para convertirse en un organismo autótrofo (Bewley, 2001).

La fase inicial de toma de agua, Fase I (Figura 2) es un proceso físico y que lleva a equilibrar el potencial hídrico de la semilla con el del medio ambiente. La entrada rápida de agua permite que se revierta la estructuración denominada de gel de la membrana al estado de líquido cristalino, tiempo en el cual se experimenta una salida de electrolitos de la semilla. La hidratación de los componentes celulares permite reanudar la actividad metabólica, un claro indicio de la actividad de la semilla es el aumento rápido en el consumo de oxígeno de las células. Seguido a la fase inicial de toma de agua, el contenido de agua en la semilla usualmente se mantiene relativamente constante o se incrementa sólo lentamente, periodo conocido como la “fase lag” o Fase II de la germinación de la semilla; durante esta fase los procesos metabólicos requeridos para la elongación celular y la posterior división celular se encuentran muy activos, se lleva a cabo la movilización de las reservas de corto alcance, es decir, las que se encuentran en el propio embrión, como la sacarosa y la rafinosa. El final de la fase II marca el final de la fase germinativa o de germinación (Bradford, 2004).

Fases de la germinación de la semilla

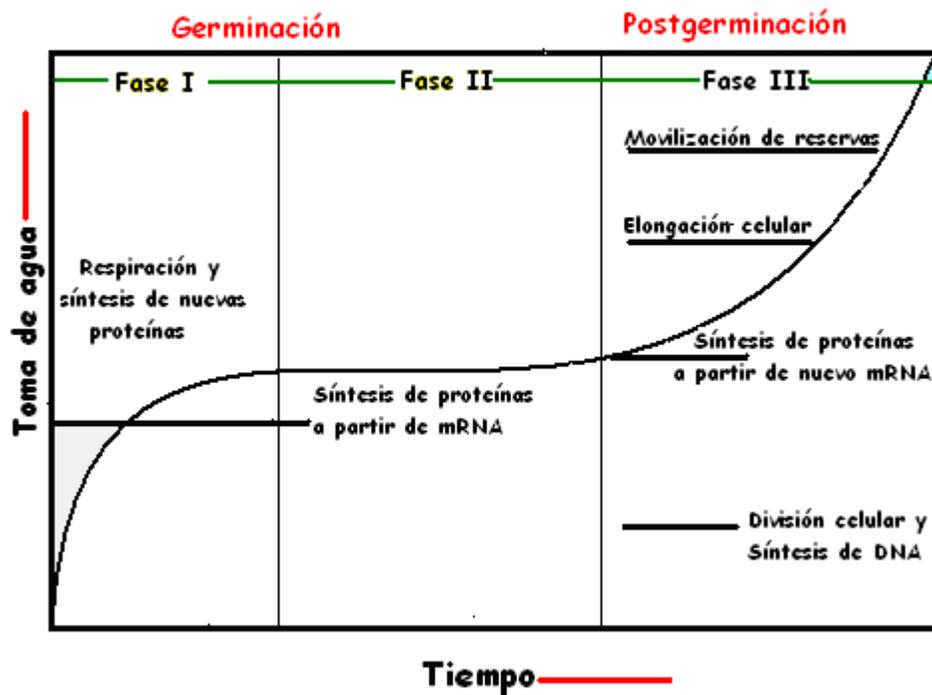


Figura 2. Fases de la germinación de la semilla. Se indican los procesos que tienen lugar durante cada una de las fases de la germinación en función del tiempo de inicio de la toma de agua (Adaptado de Bradford, 2004).

En la Fase III hay un incremento pronunciado en el contenido de agua de la semilla debido a la absorción asociada con la iniciación del crecimiento de la radícula. Una vez que el crecimiento ha iniciado, la semilla rápidamente pierde su tolerancia a la deshidratación. La emergencia de la radícula marca un punto de “no regreso” a semilla. Este es uno de los puntos más críticos de la planta por ser altamente vulnerable a las condiciones del medio ambiente. A partir de este punto los eventos son considerados post-germinativos. Los eventos subsecuentes, incluyendo la movilización de las reservas acumuladas en tejidos no embrionarios, como el almidón; están asociados con el crecimiento de la plántula (Bewley, 2001).

Mobilización de reservas

Dos etapas de movilización ocurren para que una semilla se convierta en un organismo autótrofo, la primera sucede cuando la hidratación de la semilla comienza, fase I y concluye en la fase II de la germinación. Mientras, que la segunda etapa corresponde a la movilización de las reservas localizadas fuera del embrión, en el caso del maíz provienen del endospermo (Bewley y Black, 1994). Sea que provengan del embrión o del endospermo, las reservas de carbono generalmente convierten la glucosa o los lípidos en sacarosa, la forma en la que la planta madura suele transportar el carbono desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda (Bradford, 2004).

Por ejemplo, desde el inicio de la fase I ocurre la movilización de lípidos, carbono respirable y útil en la formación de ATP o compuestos de alta energía, pero también para la formación de carbohidratos. Se ha medido la actividad de dos enzimas clave en el metabolismo de lípidos durante la germinación, la isocitrato liasa y la malato sintasa, ambas enzimas participan en el ciclo del glioxilato y es un indicador de que los lípidos están siendo utilizados para la síntesis de carbohidratos. En el maíz estas dos enzimas tienen su punto máximo de actividad a los 2.5 días de iniciada la germinación y exclusivamente en el escutelo de maíz (Longo y Longo, 1970). Además, se ha encontrado que en el maíz la movilización de sacarosa ocurre muy temprano, 8 h después de embeberse el embrión con una disminución del 60% de su contenido respecto a la semilla seca (Martínez-Marcelo, 2008).

Durante la germinación también se establecen estas relaciones fuente y demanda, en donde en la fase netamente germinativa, el eje embrionario es el tejido demanda, los nutrimentos son aportados en parte por los que almacenó el eje embrionario en forma de glucosa o sacarosa y posteriormente se los requerirá el escutelo, tejido rico en lípidos (Martínez-Marcelo, 2008). En la fase posterior, la III,

ocurre la movilización del almidón a expensas de que las señales metabólicas como la disminución en el contenido de sacarosa y el aumento en el índice ácido giberélico/ácido abscísico (Bewley, 2002). Se conoce que la regulación hormonal juega un papel importante la salida de la radícula y la promoción de la hidrólisis de las reservas como el almidón, ya que se induce la síntesis de enzimas que degradan la pared celular y el almidón como mananasas, glucanasas y extensinas y amilasas (Bradford, 2004).

La síntesis de ácido giberélico y su liberación por el embrión hacia la aleurona, lleva hacia la síntesis de un conjunto de enzimas hidrolíticas que son secretadas hacia el endospermo. La secreción usualmente inicia en el escutelo y se extiende a través de la capa de aleurona alrededor de la periferia del grano. La α -amilasa es la más estudiada de las enzimas secretadas, esta rompe los enlaces internos α -1,4 de las cadenas glucosídicas, liberando cadenas más cortas de amilosa, las cuales más adelante serán hidrolizadas a maltosa por β -amilasa. La mayoría de la β -amilasa está previamente presente en el endospermo, pero no puede actuar sobre el almidón del grano sino hasta que funciona la α -amilasa. Ni α -amilasa ni β -amilasa pueden hidrolizar los enlaces α -1,6 en las ramificaciones de la amilopectina; enzimas específicas des-ramificantes son requeridas para hidrolizar estos enlaces liberando cadenas adicionales de amilosa para su posterior degradación; la maltosa es convertida a glucosa por la α -glucosidasa, la secreción de amilasas al endospermo provoca un aumento considerable en los niveles de glucosa. La glucosa transportada al escutelo o al embrión y allí es convertida a sacarosa vía UDP-glucopirofosforilasa y la sacarosa-6-P-sintetasa (Bradford, 2004).

Aunque también las moléculas de glucosa liberadas del almidón son utilizadas por el embrión como fuente de energía. A partir de que ocurren los eventos anteriores, el embrión dispone de las moléculas estructurales y de la energía suficientes para sintetizar sus propias moléculas para convertirse en joven plántula.

TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS

Debido a que la mayor parte de los tejidos en una planta son heterotróficos, es necesario que los tejidos que llevan a cabo la fotosíntesis les provean de estos carbohidratos, por lo que se ha establecido un sistema para movilizarlos desde los tejidos fuente de nutrimentos hacia los tejidos demanda.

La acumulación de carbohidratos en el floema debido a la actividad fotosintética que ocurre en las células del mesófilo da como resultado una toma osmótica de agua proveniente del xilema y que funciona eficazmente en el reparto de carbohidratos a través del floema, teniendo como último destino las células demanda (Figura 3).

Se ha planteado que la entrada de sacarosa al floema desde las hojas depende de al menos dos mecanismos de transporte, el simplástico y el apoplástico, aunque también puede haber un tipo mixto (Lalonde *et al.*, 1999).

Esquema del transporte de sacarosa a través del floema

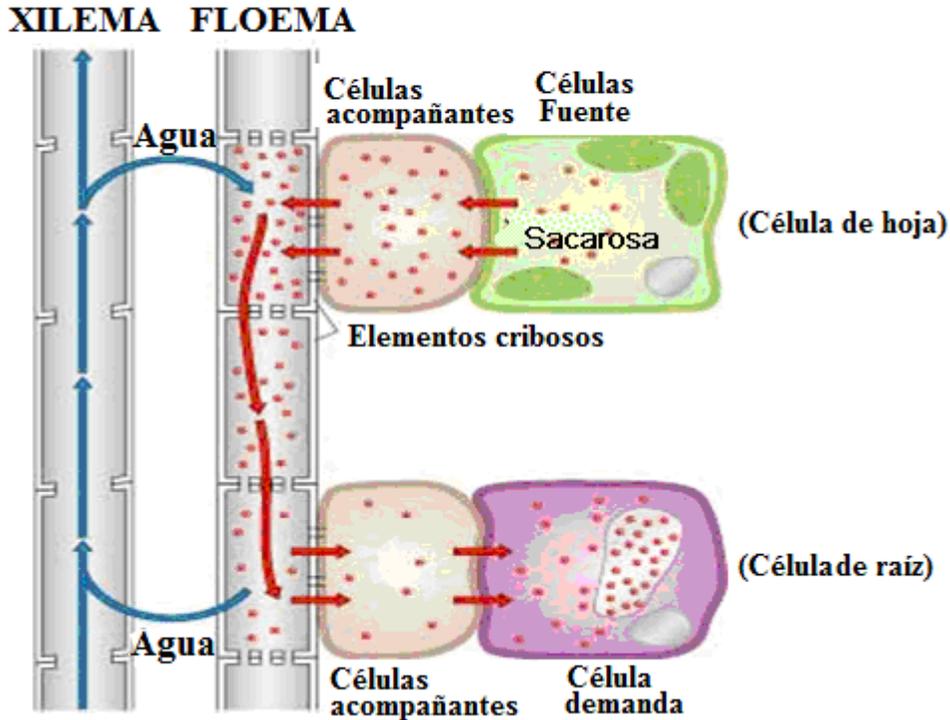


Figura 3. La sacarosa se sintetiza en las hojas, el 80% de ésta es transportada hacia las células acompañantes y los elementos cribosos del floema, la concentración alta de sacarosa en la vecindad del tejido fuente favorece el movimiento de agua desde el xilema hacia el floema, la sacarosa llega a las células demanda y el agua regresa al xilema (Adaptado de Lalonde *et al.*, 2004)..

El transporte simplástico se caracteriza por el paso de solutos a través de los plasmodesmata, que son conductos de membrana y proteínas que conectan a dos o más células para formar un solo compartimiento, así los metabolitos en el citosol pueden moverse entre varias células, por difusión, sin ver nunca el apoplasto. Los plasmodesmata permiten el paso de moléculas de una masa molecular de 800- 900 Da. Una célula sencilla puede contener de 1000 a más de 10,000 plasmodesmata, aunque no en todos los estadios del desarrollo (Hans-Walter, 1997).

Mientras que el transporte apoplástico se da entre células cercanas al floema que no poseen conexiones entre sí, generalmente las células demanda no presentan este tipo de conexiones o las pierden poco antes de una demanda alta de carbohidratos. El transporte ocurre mediante proteínas membranales, entre ellas el transportador de sacarosa y el de hexosas, ambos miembros de la Superfamilia de Facilitadores Mayores (Del inglés "Major Facilitator Superfamily", MFS). Éstos transportadores presentan como característica común doce segmentos transmembranales, con una estructura de α -hélice (Lalonde *et al.*, 1999). En 1998 la MFS se subdividió en 17 grupos con base a la secuencia de las proteínas entonces disponibles en las base de datos (Pao *et al.*, 1998). Los transportadores de sacarosa y glucosa de plantas están incluidos dentro del primer grupo formado por el uniportador de carbohidratos de animales, los simportadores carbohidrato/ H^+ de bacterias y el simportador de glucosa de levadura (Pao *et al.*, 1998).

Se pueden clasificar a los transportadores de acuerdo a la dirección y estequiometría del proceso de transporte en uniportadores, simportadores y antiportadores. El movimiento en uniporte de un soluto involucra el transporte de una molécula a la vez. El transportador de tipo simporte transporta simultáneamente dos moléculas diferentes en la misma dirección. En el transporte antiporte se transportan simultáneamente dos moléculas diferentes en direcciones opuestas. El simportador y antiportador son transportadores secundarios de tipo activo, mientras que el uniportador es de tipo pasivo. Los transportadores de carbohidratos pueden ser de cualquiera de los tipos descritos, aunque los que se han descrito en la literatura caen casi exclusivamente dentro de los transportadores en simporte con protones(Voet y Voet, 1995).

TRANSPORTE DE CARBOHIDRATOS A TRAVÉS DE MEMBRANAS

Transportador de sacarosa

La sacarosa, tiene una importancia central, ya que es la principal forma de transporte de carbono en las plantas, gracias a su naturaleza de azúcar no reductor, por lo que no reacciona con otros compuestos en su trayectoria hacia los tejidos demanda a través del floema. Además, su solubilidad es dos veces mayor que la de la glucosa y por tanto al transportar sacarosa la célula obtiene más carbono por molécula de carbohidrato.

Esquemas de la topología de los transportadores de carbohidratos en plantas

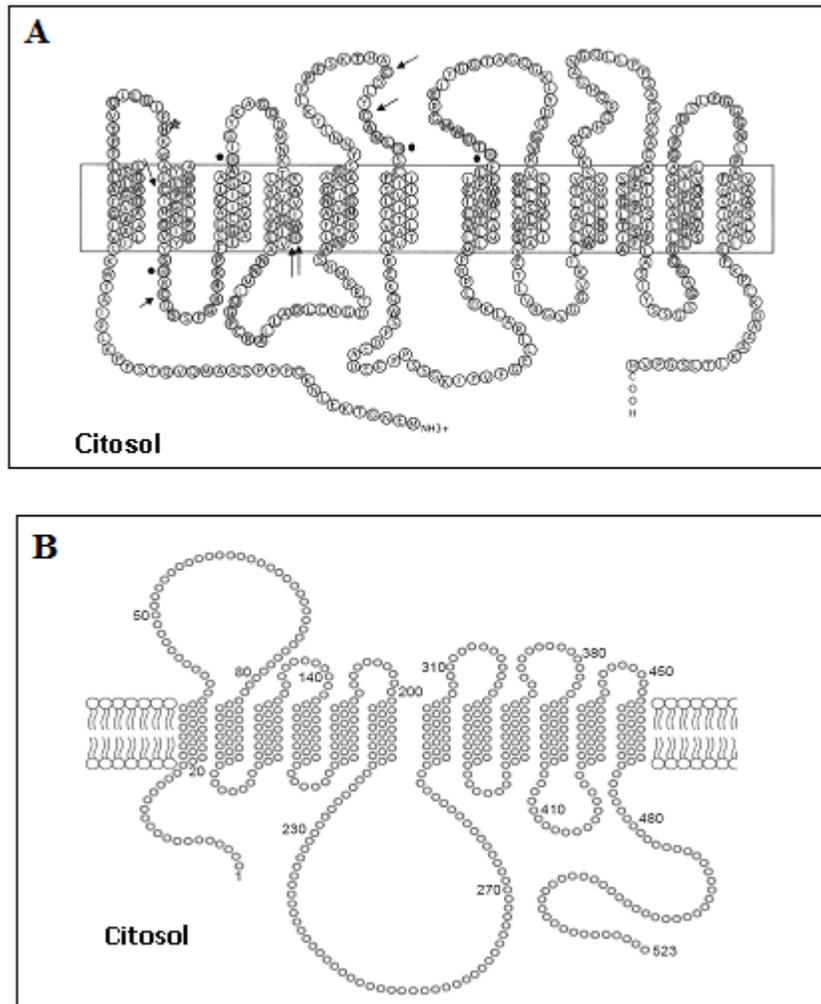


Figura 4.. A. Transportador de sacarosa de apio B. Transportador de hexosas de *Chlorella*. Ambos muestran similitudes en el número de cruces transmembrana (12), la localización citoplásmica de la región amino, carboxilo y el asa mayor que conecta a los 6 cruces transmembrana (Modificado de Lemoine, 2000).

Las proteínas transportadoras de sacarosa tienen un papel crucial en el transporte de sacarosa. Los transportadores de sacarosa (SUTs del inglés “Sucrose Transporter”) pertenecen a la MFS y se caracterizan por la presencia de doce regiones transmembranales arregladas en una configuración de 6- α -hélice + 6 α -hélice separados por una asa citoplásmica (Figura 4). La estructura del transportador de sacarosa se ha postulado que se originó por la duplicación “ancestral” y una fusión de un gen que originalmente codificaba para una proteína con seis dominios transmembranales y el asa central estaría fungiendo estrictamente como una unión (Lalonde et al, 2004).

Los SUTs son sustrato-específicos; siendo maltosa (*glucosa-glucosa*) el único disacárido susceptible de competir con la sacarosa por el sitio activo de unión (Aldape et al. 2003).

Todos los transportadores de sacarosa son sumamente sensibles al pH, muestran incremento en la velocidad de transporte a pH bajos, por ello son denominados simportadores sacarosa con protón (Weber et al. 1997). A la fecha, se conocen dos familias de simportadores sacarosa/H⁺ en plantas y son definidas como sistemas de transporte alta afinidad-baja capacidad (HALC) y baja afinidad-alta capacidad (LAHAC).

Los transportadores de sacarosa de la familia HALC poseen valores de Km en un rango entre 0.3-2 mM y se les atribuido la capacidad de descarga de sacarosa al floema y el transporte de sacarosa distancia, lo que permite mantener el gradiente de concentración de sacarosa dentro del floema, asegurando el flujo de sacarosa hacia los tejidos demanda.

El sistema de transporte LAHC se caracteriza por una débil atracción por la sacarosa, teniendo valores de Km entre 6.0 y 11.7 mM. Los valores de Km para los transportadores de carbohidratos (de ambos subgrupos) son dependientes del

pH (Weise *et al.* 2000). Es probable que los diferentes transportadores presenten diferentes funciones en la carga y descarga del floema tanto en tejidos fotosintéticos como en tejidos demanda.

Los transportadores de alta afinidad son especialmente importantes para la recuperación de carbohidratos. En contraste, podría proponerse que los transportadores de tipo LAHC están presentes sólo en zonas en las que hay una alta velocidad de transporte en el floema, como podrían ser las venas menores (Weise *et al.*, 2000).

Los cDNA clonados de diferentes especies para transportadores de sacarosa con un marco de lectura de aproximadamente 1,611bp corresponden a una proteína de 521-537 aminoácidos, los cuales predicen un peso molecular de entre 55- 56.1 kDa y un pI de 8.53 (Aoki *et al.*, 1999, Hirose *et al.*, 1997, Lemoine, 2000). Con una similitud de 76.8-82% entre los diferentes transportadores clonados.

Lalonde y colaboradores (2004) realizaron un esfuerzo por clasificar a los transportadores de carbohidratos y encontraron que para el transportador de sacarosa la familia podía dividirse en tres ramas o subfamilias.

En la subfamilia I se encuentran los transportadores de las especies de las solanáceas y que corresponden en general a transportadores de tipo SUT1/SUC2 los cuales muestran una alta afinidad por sacarosa con valores de K_m entre 0.5 y 2 mM; se localizan principalmente en hojas, pétalos, tallos, tejidos fuente y tejidos demanda a lo largo de la vía de translocación de sacarosa en la planta. La subfamilia II corresponde a los SUT4 los cuales están integrados por varios miembros que funcionan como sistemas de transporte HALC y en general se han encontrado en especies de plantas dicotiledóneas y de localización casi exclusiva en tejidos demanda. La tercera subfamilia se encuentra dividida en dos subgrupos

clasificados según la presencia o ausencia de una asa citoplásmica, debido a que su función de transporte reside en los dominios hidrofóbicos transmembranales de la proteína. La presencia de una asa citoplásmica en estos transportadores sugiere una función específica que no está relacionada con la actividad de transporte, por ejemplo la de interaccionar con otras proteínas, función postulada como sensora (Lalonde *et al.*, 2004). Los transportadores de sacarosa para maíz (ZmSUT1) de acuerdo a la clasificación anterior se encuentran dentro de ésta subfamilia.

La existencia de varios transportadores de sacarosa en plantas superiores sugieren funciones dependientes del tipo de tejido y célula en que se encuentren (Lim *et al.* 2006). A partir de la obtención de la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis* se ha obtenido un panorama global del contenido de genes de los transportadores de sacarosa, alrededor de 23 genes. Sin embargo, de ellos pocas proteínas se han caracterizado. Todas transportan sacarosa, pero difieren en sus propiedades cinéticas, especificidad hacia el sustrato y patrones de expresión.

Transportadores de hexosas

La sacarosa transportada desde los tejidos fuente hacia los tejidos demanda puede ser tomada mediante el transportador sacarosa/H⁺, sin embargo es muy posible que la sacarosa sea hidrolizada por una invertasa extracelular en sus dos hexosas; entonces el transportador de hexosas llevaría el importe de estos carbohidratos en el tejido demanda (Weschke *et al.*, 2003). El transportador de hexosas es capaz de transportar otros carbohidratos como manosa, xilosa y galactosa, lo que amplía las posibilidades de nutrición de las células vegetales (Büttner y Sauer, 2000).

La clonación del transportador de hexosas en *Chlorella kessleri* sirvió de base para obtener el gen para el transportador en *Arabidopsis thaliana* (Sauer y Tanner, 1989), actualmente se cuentan con las secuencias para una gran cantidad de

transportadores de carbohidratos en diferentes plantas, algunas dicotiledóneas como por ejemplo *Arabidopsis thaliana* presentan al menos 26 genes diferentes, 8 en *Ricinus communis* y 7 en *Chenopodium rubrum*; también se han identificado los transportadores en algunas monocotiledóneas como *Hordeum vulgare*, *Oriza sativa* y en *Zea maize* (Delrot et al, 2001). En este último el transportador es de localización vacuolar (Weber et al., 2000).

El patrón de expresión de varios de los transportadores de hexosas sugiere que su función primaria es la de introducir hexosas a los tejidos fuente, por ejemplo en *Arabidopsis thaliana*, se han analizado la localización de algunos de los miembros de los transportadores de hexosas como AtSTP2 (Transportador de azúcares tipo 2, del inglés “*Arabidopsis thaliana* sugar transporter protein”), que solamente se expresa en granos de polen durante un periodo corto del desarrollo, mientras AtSTP4 se expresa específicamente en las puntas de la raíz y en polen y AtSTP1 parece ser responsable del importe de carbohidratos en las células guarda, además de encontrarse altamente expresada en semillas en desarrollo, sugiriendo que puede ser responsable de la toma de glucosa. En otras especies como en *Ricinus communis*, HEX3 se expresa predominantemente en las raíces y las hojas inmaduras, mientras HEX1 se encuentra de preferencia en raíces, hipocotilos y hojas fuente (Bütner y Sauer, 2000).

La caracterización cinética de los transportadores de hexosas se ha logrado para 11 de ellos, la mayoría por expresión heteróloga en levadura, ya que la caracterización *in vivo* es difícil debido a la variedad de transportadores de hexosas presentes en una misma célula. Se ha demostrado que la actividad de transporte del carbohidrato depende del ΔpH o del $\Delta\psi$, además todos los transportadores caracterizados son capaces de transportar tanto hexosas como pentosas, aún cuando la afinidad del transportador por el azúcar difiere en magnitud. El transportador de sacarosa en *Arabidopsis*, AtSTP1, se obtuvo por Sherson y colaboradores en el 2000, y demuestran que una mutante deficiente en AtSTP1 no es letal, pero la semilla de *Atstp1* exhibe una disminución en la

sensibilidad a la inhibición de la germinación por manosa (epímero de la glucosa, fosforilado por la hexocinasa), además demuestra que la manosa está siendo transportada en la planta silvestre principalmente a través del transportador AtSTP1.

Los transportadores de hexosas al igual que los transportadores de sacarosa son candidatos ideales a presentar una función dual, la de transportadores y la de ser moléculas receptoras y transductoras de la señal por azúcares, debido a su similitud con los transportadores de glucosa en levadura, que tienen esa función. No obstante, no hay evidencia aún de que un transportador de carbohidratos lleve a cabo tal función.

Carbohidratos como moléculas señal.

En años recientes, se ha reconocido que, en plantas, los azúcares solubles no solo son moléculas que proveen esqueletos carbonados y energía para el metabolismo, sino también tienen un papel importante como mensajeros primarios que regulan procesos fisiológicos como el desarrollo, la floración y la fotosíntesis (Gibson 2000; Rolland *et al.*, 2002). Aún, cuando todavía no se reconocen precisamente cuáles son los procesos que son regulados por azúcares, se conocen los efectos que los azúcares tienen por ejemplo incrementando el proceso de floración, o la inhibición del efecto del ácido abscísico por sacarosa en la germinación, el establecimiento de un gradiente de azúcares y su correlación con el aumento de la actividad mitótica, o bien las evidencias de un probable control positivo o negativo de la expresión de un número significativo de genes por la presencia de sacarosa (Koch, 1996; Finkelstein y Gibson, 2001; Rolland *et al.*, 2002; Yu, 1999).

Los transportadores de carbohidratos son proteínas que pueden ser reguladas por las concentraciones de sus sustratos, lo anterior ha sido ampliamente documentado para el transportador de sacarosa y poco en el transportador de

hexosas, aunque las concentraciones de carbohidratos y el tipo modifica la expresión de manera diferente dependiendo de la isoforma y la especie de planta que se haya examinado (Delrot *et al.*, 2000; Lalonde *et al.*, 1999).

Existen evidencias a favor de que tanto glucosa como sacarosa pueden llevar a un aumento en la expresión tanto del transportador de sacarosa como el transportador de hexosas, por ejemplo la transcripción del gene para el transportador de hexosas en células en suspensión de uva se incrementa, al colocar el cultivo en 58 mM de cualquiera de los dos carbohidratos, encontrándose el nivel máximo de transcrito para el transportador de hexosas a las 24 h de incubación con glucosa y a las 48 h de incubación con sacarosa (Atassanova *et al.*, 2003). En embriones de arroz incubados con 100 mM de glucosa o sacarosa se induce el incremento en la transcripción del gene para el transportador de sacarosa OsSUT1, a partir de las 72 h, aunque el nivel de expresión es mayor cuando se incuba con glucosa que con sacarosa (Matsukura *et al.*, 2000).

Un ejemplo en contra de que los transportadores de sacarosa se regulan por sacarosa *in vivo*, lo podemos encontrar en las mutantes de *Arabidopsis thaliana* que no expresan al transportador tipo 2 de sacarosa en las membranas plasmáticas de las hojas. Las plantas mutantes experimentan cambios importantes tanto en el contenido de sacarosa como en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbono y en el metabolismo secundario, pero no hay modificación en la expresión de los otros transportadores de sacarosa en la planta (Lloyd y Zakhleniuk, 2004).

La modulación de la expresión de los transportadores de sacarosa por carbohidratos, que se han reportado en haba (VFSUT1; Weber *et al.*, 1997) y en betabel (BvSUT1; Chiou y Bush, 1998; Vaughn *et al.*, 2002), muestran un efecto supresor. VfSUT1 se expresa en el embrión en desarrollo de las semillas de haba y su nivel de transcrito disminuye por el tratamiento con una concentración alta de sacarosa o glucosa (150mM) y también a concentraciones bajas de ambos

carbohidratos (10mM). Mientras que BvSUT1 principalmente se expresa en la hoja madura de betabel y se reprime con la imbibición del tejido en 100mM de sacarosa, pero no por glucosa.

Es difícil dar una explicación inequívoca sobre la regulación de los transportadores de carbohidratos, ya que en la literatura se encuentran evidencias de que la regulación de la transcripción de los transportadores por carbohidratos puede ser insensible, reprimida o estimulada. Algunas de las causas podrían ser la existencia de múltiples isoformas para los transportadores en las membranas de plantas, cada una con una función particular en cada estadio del desarrollo y probablemente en cada órgano de la planta. El contenido de sacarosa en la hoja, en el apoplasto y en el floema puede también cambiar continuamente y esto llevar a variaciones en los niveles de los transportadores.

Adicionalmente, no se debe descartar que además de una regulación transcripcional, puede ocurrir la modificación post-traducciona. Por ejemplo, la localización del transportador de sacarosa en los elementos amorfo de la savia, células sin núcleo, involucra la transferencia de los transcritos para el transportador a través de los plasmodesmata, los que conectan a la célula acompañante con las células del elemento amorfo de la savia (Kühn *et al.*, 1997).

Se ha planteado también, la posibilidad de la regulación covalente de la proteína, ya sea por fosforilación (Roblin *et al.*, 1998; Vaughn *et al.*, 2002) o bien por las variaciones en el índice de aminoácidos en la forma de sulfuro o formando puentes disulfuro (Delrot *et al.*, 2001).

Resulta entonces interesante investigar si los carbohidratos regulan la expresión de los transportadores de carbohidratos, lo que podría influir en la capacidad metabólica del tejido o bien abre la posibilidad de la manipulación de la expresión de éstos genes para incrementar la productividad de las plantas.

Antecedentes directos al trabajo

Caracterización de la toma de sacarosa en la germinación del maíz.

En la germinación del maíz hemos caracterizado la actividad de transporte de sacarosa, y encontramos que los embriones de maíz presentan 350 veces mayor actividad que la de los ejes embrionarios. La baja actividad en los ejes embrionarios no se debe a una actividad deficiente de su bomba primaria, la ATPasa de protones, ya que la actividad de esta proteína es similar en ambos. Las diferencias en actividad en ambos tejidos en realidad se deben a un contenido distinto de sus proteínas transportadoras de sacarosa, lo anterior lo confirmamos al detectar al transportador mediante un anticuerpo específico que produjimos para un segmento de la proteína de maíz (Zavala-Zendejas, 2001). No logramos detectar al transportador de sacarosa en los ejes embrionarios, mientras que en los embriones la reacción era muy clara aún a dilución del anticuerpo de 1:10,000. El perfil de la proteína a lo largo de la germinación y en los primeros estadios postgerminativos, iba en aumento.

Con el fin de determinar con exactitud el tejido del embrión que contenía al transportador, realizamos ensayos de inmunocitocalización en los embriones germinados por 24 horas. Las imágenes claramente muestran reacción en las membranas plasmáticas del escutelo, mientras que el eje embrionario no se detecta la reacción con el anticuerpo para el transportador.

Para confirmar lo que obtuvimos con los anticuerpos y la actividad del transportador de sacarosa, determinamos los niveles de RNA para el transportador de sacarosa. Encontramos que los escutelos son los que presentan mayor abundancia de RNA para el transportador (Greaves-Fernández, 2001).

Los niveles de RNA, de proteína y la actividad del transportador indican que los escutelos se encuentran transportando sacarosa, mientras que los ejes embrionarios no la transportan. Es probable que exista una expresión regulada de estos transportadores ya sea por la disponibilidad de azúcares o por la actividad diferencial de las invertasas de pared celular, las cuales sabemos se encuentran activas para poner a disposición a las hexosas a los ejes embrionarios, entonces el eje embrionario debe contener y depende en gran medida de los transportadores de hexosas para transportar el carbono que necesita.

Regulación del simportador sacarosa/H⁺ por azúcares en la germinación del maíz.

En la literatura se encuentra una gran diversidad de reportes en los que se ha sugerido el papel regulador de los azúcares en la expresión del gen para el transportador de sacarosa, sin embargo no hay un consenso, mientras que unos encuentran que la sacarosa activa la expresión del transportador, otros encuentran un decremento en su expresión. En el laboratorio obtuvimos la proteína y el RNA de embriones que habían sido embebidos en diferentes carbohidratos encontramos que las hexosas, glucosa y fructosa reprimen 5 veces la expresión del gene y en igual magnitud la cantidad de proteína; mientras que la sacarosa no tiene efecto en la expresión del transportador (Greaves-Fernández, 2001).

Los resultados anteriores nos sugieren que en los tejidos embrionarios del maíz hay una distribución preferencial de ciertos transportadores, que hemos demostrado para el caso particular del transportador de sacarosa, sin embargo se hace necesario completar el estudio sobre como conocer la distribución y actividad de los transportadores de hexosas, así como determinar que es lo que está regulando su expresión diferencial, los datos nos sugieren que es la disponibilidad de carbohidratos, sin embargo tenemos que profundizar en el estudio para determinar el papel de los carbohidratos en la expresión de los transportadores.

Respecto a los transportadores de hexosas se tiene información sobre su localización y posible actividad de transporte durante el periodo de formación de la semilla de la dicotiledónea *Vicia faba* (Weber *et al.*, 1997 y 1998). Sin embargo durante la formación de los cotiledones, éste se comporta como tejido fuertemente demandante de fotosintatos, mientras que en la germinación cambiarían su función hacia tejidos fuente, es entonces posible postular que la localización y la actividad de los transportadores de hexosas no sea la misma en el desarrollo de la semilla que en la germinación. Adicionalmente, no se encuentra en la literatura un estudio de la ontogenia de los transportadores de hexosas en la germinación de semillas en general y por tanto no se ha explorado la regulación que los carbohidratos pudieran ejercer sobre su expresión.

HIPÓTESIS

La regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en tejido de plantas maduras ocurre por la presencia de glucosa y/o sacarosa, entonces, la imbibición de tejido embrionario de maíz en estos carbohidratos alterará los contenidos de los transportadores de sacarosa y hexosas en sus membranas plasmáticas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que produce la imbibición del tejido embrionario de maíz en diferentes carbohidratos sobre los niveles de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas en los tejidos embrionarios de maíz.

OBJETIVOS PARTICULARES

Montaje de la metodología de detección de los transportador de carbohidratos mediante improntas del tejido embrionario de maíz.

Detectar en improntas de tejido embrionario de maíz la expresión de los transportadores de carbohidratos al embeber el tejido en Agar adicionado o no con sacarosa y glucosa.

Determinar el nivel de expresión de los transportadores de sacarosa y hexosas en el tejido embebido en diferentes carbohidratos mediante inmunoréplica tipo Western.

Analizar el papel de la glucosa o sacarosa en la expresión de los transportadores de carbohidratos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Diseño experimental

El esquema general de trabajo que se siguió para el desarrollo del presente trabajo se encuentra en la Figura 5. Cabe señalar que los ensayos se realizaron por triplicado en al menos dos lotes diferentes de tejido.

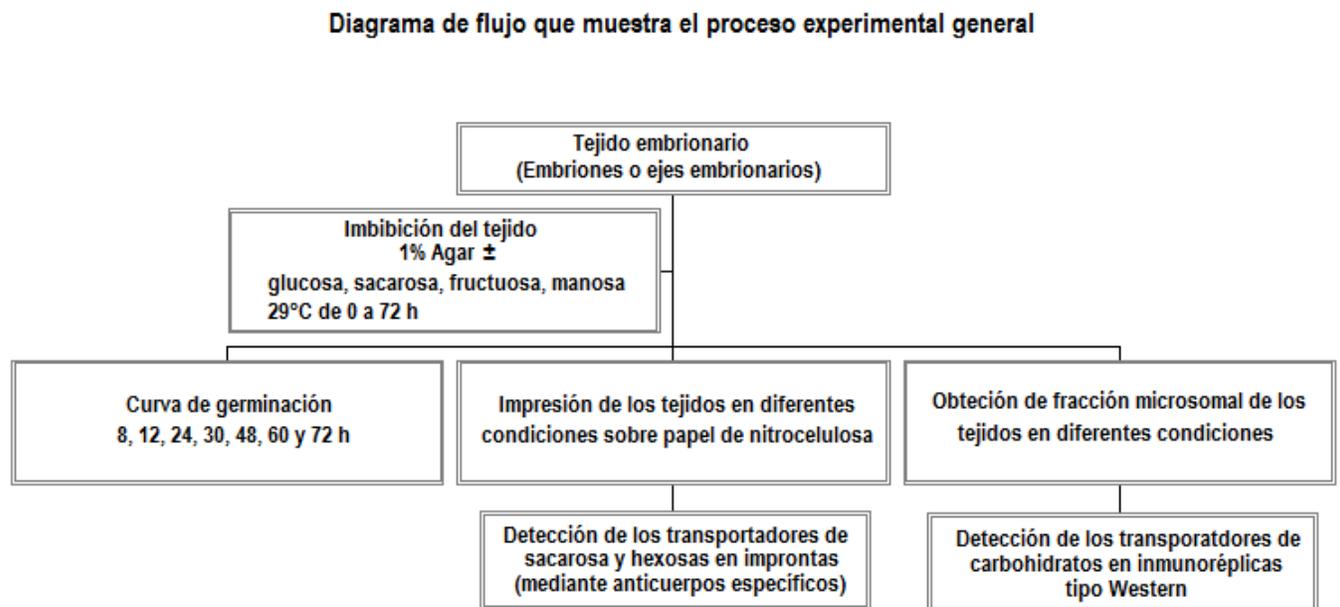


Figura 5. Diagrama de flujo que muestra el proceso experimental general que se siguió para determinar el efecto de la incubación en carbohidratos de ejes y embriones de maíz en el contenido de los transportadores de carbohidratos.

2. Material biológico

Se realizó la extracción manual de ejes y embriones de maíz (*Zea mays* var Chalqueño) mediante navaja. Se guardaron a 4°C hasta su uso.

3. Crecimiento de ejes y embriones

Los ejes y embriones se germinaron en agar al 1% a 29° C en ausencia de luz por 0, 8, 12, 24, 30, 48, 60 y 72 horas.

4. Imbibición de tejidos (ejos embrionarios y embriones) en diferentes carbohidratos.

Los ejes y los embriones se incubaron en 1% agar en diferentes carbohidratos: sacarosa, glucosa, fructosa y sorbitol en concentraciones de 5, 10, 25 y 50 mM. Mientras que manosa a concentraciones de 0.5, 1.5, 2.5 y 5 mM.

5. Obtención de la fracción microsomal

Se realizó la extracción de proteína microsomal de diferentes tejidos de plantas maduras de maíz (raíces, tallos, hojas, embrión inmaduro, espigas y pistilos), y de embriones maduros embebidos diferentes tiempos en presencia o ausencia de carbohidratos. El tejido se congeló con nitrógeno líquido se molió con un mortero y pistilo hasta formar un polvo fino, después se le añade amortiguador de homogeneización (50 mM HEPES / KOH pH 7.5, 300 mM Sacarosa, 1 mM EDTA, 2 mM DTT y 1mM PMSF), en una relación de 2 mL de amortiguador por 1 g de tejido y se homogeneizaron a velocidad media con un homogeneizador Marca Tissue Tearor. Se filtró a través de cuatro capas de gasa y el homogeneizado se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos a 4° C en la ultracentrífuga Optima TL Beckman con rotor TLA100.4. Se eliminó la capa de grasa que quedó en la parte superior y se tomó con cuidado el sobrenadante. Éste se centrifugó a 16 000 rpm por 10 minutos en el rotor TLA100.4. En este paso se eliminaron las mitocondrias (botón) y el sobrenadante se centrifugó nuevamente pero ahora a 45 000 rpm durante 1 h a 4° C. El botón obtenido se resuspendió en un volumen pequeño de amortiguador (aproximadamente 250µL) de ajuste de peso (50 mM HEPES / KOH pH 7.5, 300 mM Sacarosa, 10% de glicerol, 2 mM DTT y 1mM PMSF) y se almaceno a -80°C hasta su uso.

6. Determinación de proteínas de las fracciones microsomales.

Se determinó mediante el método reportado por Ghosh y colaboradores (1988), y se usó una curva de albúmina de suero bovino como estándar.

7. Inmunoréplica tipo Western.

Se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS cargando en cada pozo 30 μ g de proteína microsomal de los diferentes tejidos de planta madura de maíz o de tejido embrionario de maíz, se separaron las proteínas a 30mA por 90min. La electrotransferencia se llevó a cabo en una cámara húmeda con amortiguador de transferencia (0.1M de amortiguador de fosfatos, pH 6.8, 0.05% SDS, 20% Metanol). Para transferir se coloca encima del casete abierto (Marca VWR), 1 esponja, 1 papel filtro Whatman del mismo tamaño que el casete, encima se acomoda el gel de poliacrilamida-SDS, con cuidado se hace coincidir una membrana de PVDF (previamente humedecida en metanol), después se colocó 1 papel filtro, se presiona rodando un tubo está parte del sándwich para eliminar las burbujas, por último se coloca 1 esponja sobre todo lo anterior y se cierra el casete; todo se mantuvo húmedo con solución de transferencia. El casete armado se colocó en la cámara de transferencia y se transfirieron las proteínas a la membrana de PVDF a 25V toda la noche. Después se recuperó la membrana de PVDF y se bloqueó incubandola con 5% leche descremada (Svelty) en TTBS durante 1 hora. Se desechó la solución y se lavo la membrana 3 veces por 5 minutos con TTBS.

Posteriormente se incubo con el primer anticuerpo, dilución 1:1000 en TTBS y se incubó toda la noche a 4° C. Posteriormente se lava con TTBS 5 veces por 5 minutos. La membrana se incubó con el segundo anticuerpo, anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa, en dilución 1:5000 en TTBS, por 30 minutos a temperatura ambiente. Se revelaron las bandas de reacción mediante un ensayo quimiolumiscendente (Ver apéndice I). Las bandas que se revelaron en las placas fotográficas se digitalizaron en un escáner HPscanjet 3500c y se realizó la

densitometría de las mismas en el programa Quantity one (Fluor S-TM Multimager Biorad).

Anticuerpos contra los diferentes transportadores de carbohidratos.

8.1 Anticuerpo anti-transportador de sacarosa

Para detectar al transportador de sacarosa de la membrana plasmática el anticuerpo que se tiene disponible en el laboratorio fue producido al inyectar conejos con una suspensión de un péptido haptenizado con hemocianina, NH₂-TARWGRRRPFILIGC-KHL, según se detalla en Zavala-Zendejas (2001). El péptido corresponde a una secuencia localizada en el asa citoplásmica que se sugiere conectaría a los primeros dos cruces transmembrana. Los anticuerpos así obtenidos fueron posteriormente purificados mediante una columna de CNBr-Sefarosa (CNBr-activated Sepharose 4 fast flow, Amhersham biosciences), de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Ver Apéndice II).

8.2 Anticuerpo anti-transportador de hexosas de la membrana plasmática.

El anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática fue obtenida por la compañía Genscript Corporation, NJ, EU (<http://www.genscript.com/>). Se solicito a la compañía la síntesis y haptenización a hemocianina de la secuencia LGWLVPEIFPLEIRSAC, para posteriormente inyectar a dos conejos y la purificación del anticuerpo usando una columna de afinidad que contuvo 10mg de péptido. La secuencia que se solicito sintetizar se obtuvo al hacer una comparación de 12 secuencias para transportadores de hexosas de la membrana plasmática de plantas, se selecciono una región que fuera antigénica y conservada en las diferentes especies de plantas (Ramírez-Palma, 2007), la compañía GeneScript cuenta con una herramienta para encontrar las zonas antigénicas de la proteína (<http://www.genscript.com/antibody.html>). El título del anticuerpo usando al péptido

como antígeno fue de 1:32000, sin embargo en las fracciones membranales el título del anticuerpo fue de 1:1000.

Los dos anticuerpos fueron caracterizados para su reacción en las fracciones microsomales de embriones de maíz germinados 24 horas. El anticuerpo produce una banda de peso molecular alrededor 60 KDa para el transportador de sacarosa de la membrana plasmática (Figura 6B) y al menos dos bandas una de 60 y otra de 55 KDa para el transportador de hexosas de la membrana plasmática (Figura 6C).

Detección de los transportadores de carbohidratos mediante inmunoréplica tipo Western

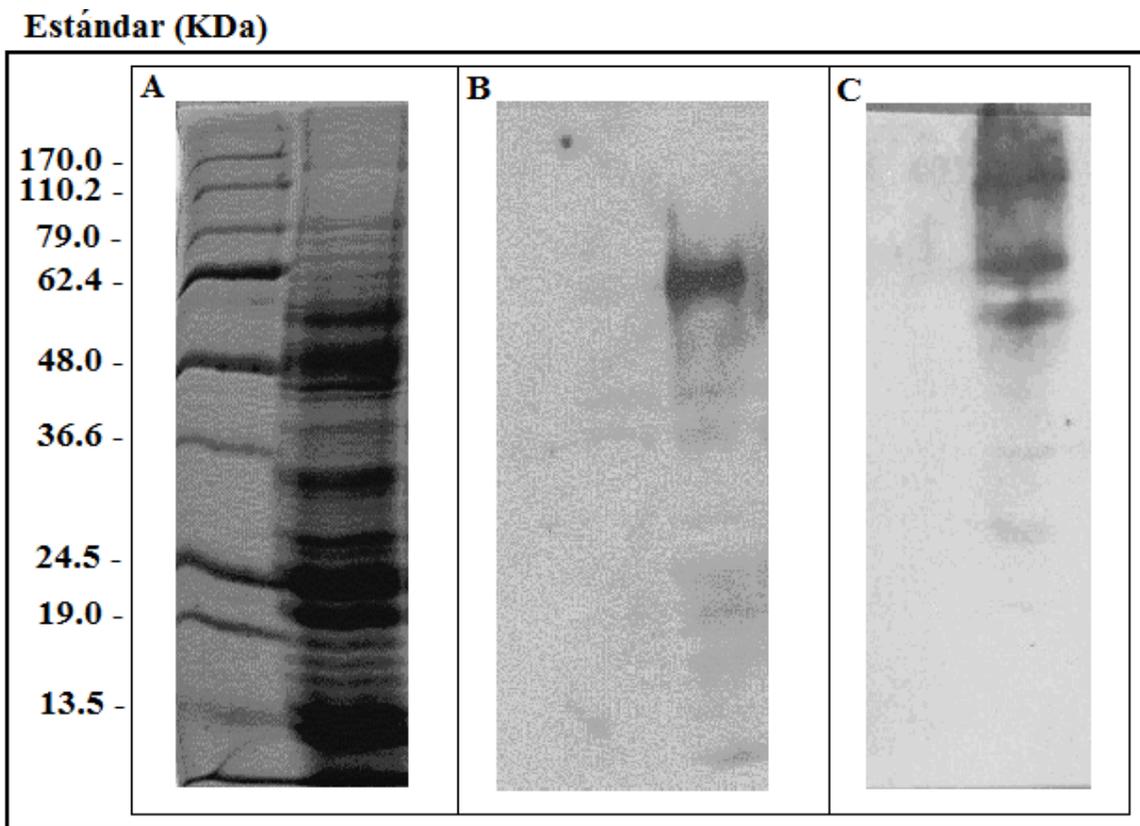


Figura 6. A. Tinción con azul de Coomassie del estándar de peso molecular y de la fracción microsomal de embriones embebidos 24 h, B. Detección del transportador de sacarosa y C. Detección del transportador de hexosas de la membrana plasmática mediante anticuerpos específicos.

Detección *in situ* de los transportadores de azúcares por la técnica de *tissue printing* (Impresión sobre papel de nitrocelulosa).

El método que se siguió fue el de Cassab 1992. El protocolo consta de tres pasos: preparación de la membrana de nitrocelulosa, segundo la impresión en papel del tejido y tercero la detección de la proteína de interés en la membrana.

Para el primer paso la membrana de nitrocelulosa se incubó en CaCl_2 0.2M por 30 min. y se dejó secar a temperatura ambiente, almacenar hasta su uso a 4°C. Posteriormente se realiza un corte a lo largo del embrión o eje embrionario y se elimina el exceso de líquido. Se coloca sobre una superficie plana un papel filtro y encima el papel de nitrocelulosa, posteriormente el corte del tejido se coloca sobre el papel y sobre este un papel no absorbente, se presiona el tejido aproximadamente 5 segundos.

En el tercer paso se bloquea la membrana con leche descremada al 5% en TTBS (Tris-HCl, pH7.5, NaCl 150mM, Tween20 0.1%) por 1 hora, al concluir el bloqueo se lava la membrana 5 veces 5 minutos por vez con TTBS. Para detectar al transportador de sacarosa o al de hexosas de la membrana plasmática, se utilizó una concentración de 1:1000 del anticuerpo, se incubó por toda la noche a 4°C y posteriormente se lavó la membrana por 5 veces 5 minutos cada vez con TTBS, se añadió el segundo anticuerpo (anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa) en una dilución 1:5000 en TTBS y se incubó por 1 h a temperatura ambiente, se lavó 5 veces por 5 minutos en TTBS y finalmente se reveló por quimioluminiscencia (Ver apéndice).

En la Figura 7A se puede observar que al presionar el tejido embrionario sobre el papel de nitrocelulosa nos produce una primera impresión en la que todas las proteínas bañan al tejido, esto por efecto del corte que se realiza del tejido, pero que la segunda y tercera impresión muestran las proteínas que son propias del tejido y no producto del derrame de proteínas celulares sobre el tejido. Cuando se

realiza la inmunodetección del transportador de sacarosa en este tipo de impresiones se observa que sólo hay zonas específicas que se tiñen.

Localización del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz mediante
tissue printing

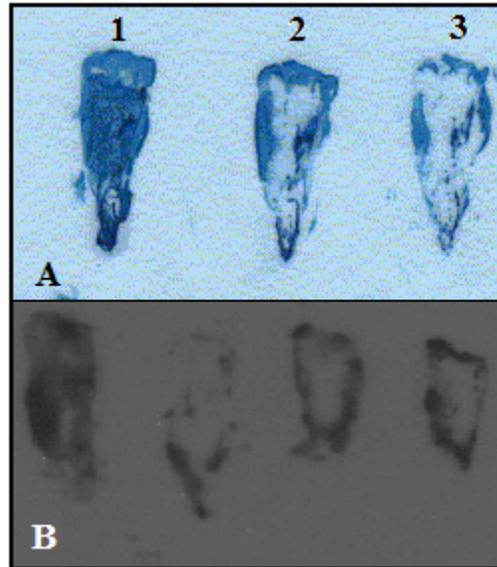


Figura 7. A. Embrión seco de maíz se presiono en papel de nitrocelulosa (1, 2 y 3 corresponden al número de veces que se presionó el tejido sobre el papel de nitrocelulosa) y las proteínas se tiñeron con Amido Black. **B.** Reacción con el anticuerpo contra el transportador de sacarosa, en embrión seco.

RESULTADOS

Detección del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz.

En experimentos previos en el laboratorio, encontramos que los transportadores de sacarosa se encuentran activos en el escutelo, pero no en el eje embrionario (Greaves-Fernández, 2001; Zavala-Zendejas, 2001), corroboramos lo anterior al realizar improntas del tejido embrionario, observando que en la semilla seca se encuentra solo en el escutelo (Figura 8B) y aún avanzada la germinación (36 h) no se detecta transportador en el eje embrionario pero sí en el escutelo (Figura 8C).

Efecto de la imbibición de tejido embrionario de maíz en diferentes carbohidratos sobre la expresión del transportador de sacarosa.

Al embeber los ejes embrionarios en agar por 24 o 36 horas se encontró que el eje no contenía transportador de sacarosa (Figura 8D) y que la imbibición del tejido en sacarosa no modifica este patrón (Figura 8E). Sin embargo, la presencia de hexosas, como fructosa (Figura 8F) y glucosa (Figura 8G) a concentraciones de 100 mM producen señal con el anticuerpo. Al usar al epímero de la glucosa, la manosa, a concentraciones de 15 mM se encontró que el tejido difícilmente germina pero contiene una cantidad importante de transportador de sacarosa sobre todo en la región de la coleorriza y el meristemo apical (Figura 8H y 8A).

Efecto de la imbibición en diferentes carbohidratos del tejido embrionario de maíz

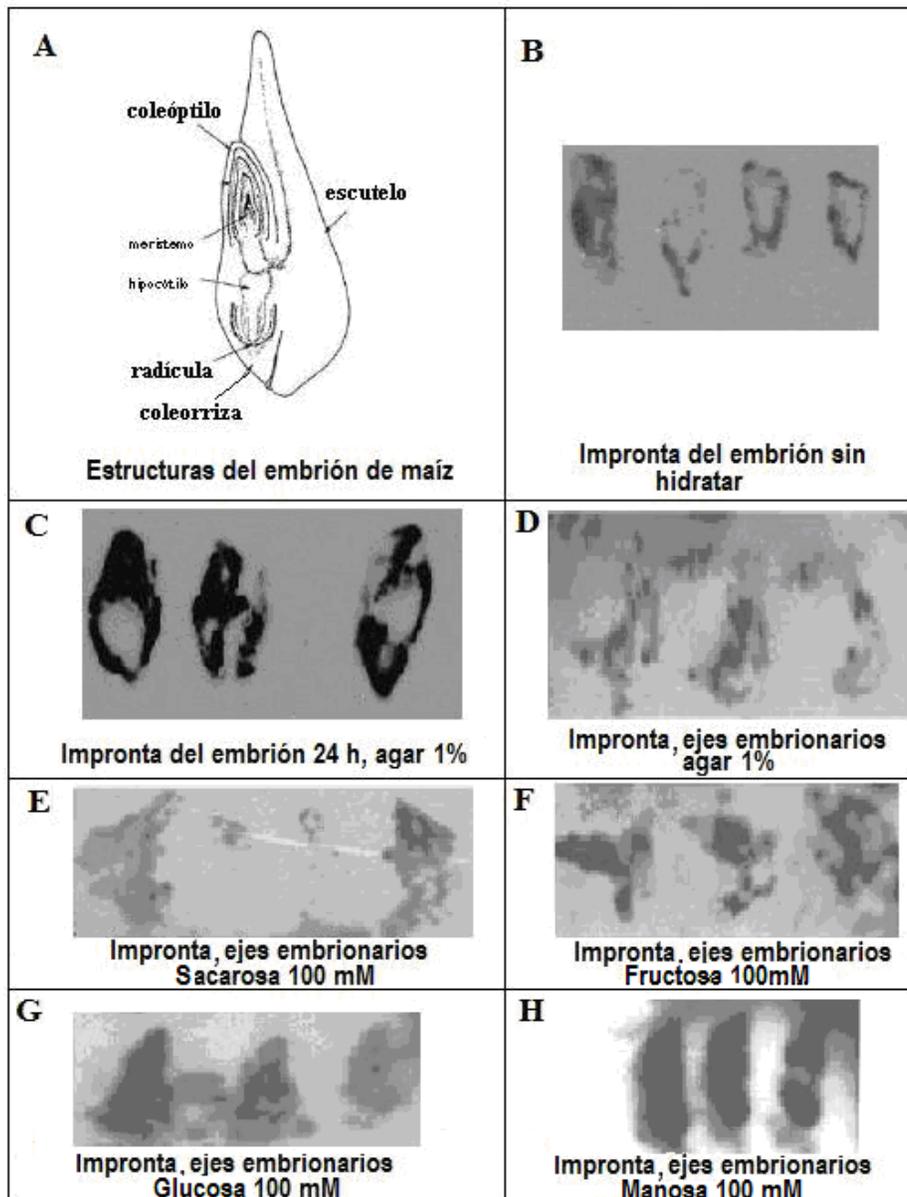


Figura 8. . A. Esquema del embrión de maíz mostrando sus estructuras, el eje embrionario está compuesto de la plúmula cubierta del coleóptilo, la radícula recubierta de la coleorriza, el meristemo apical y el hipocótilo, el escutelo le rodea (Figura adaptada de Zimmerman y Werr, 2005). B. Impronta del embrión de maíz sin hidratar, C. Impronta de embrión de maíz embebido 24 h en Agar 1%.D Improntas de los ejes embrionarios de maíz embebidos en 1% Agar o suplementado con 100 mM Sacarosa (E), 100 mM Fructosa (F), 100 mM Glucosa (G) y 15 mM Manosa (H).

Por otra parte, los embriones presentaron un comportamiento opuesto al anterior, la imbibición del tejido en glucosa y fructosa reduce la expresión del transportador de sacarosa (Figura 9) y sacarosa y sorbitol a concentraciones de 100 mM no afectan los niveles de la proteína con respecto al control (germinación en Agar 1%).

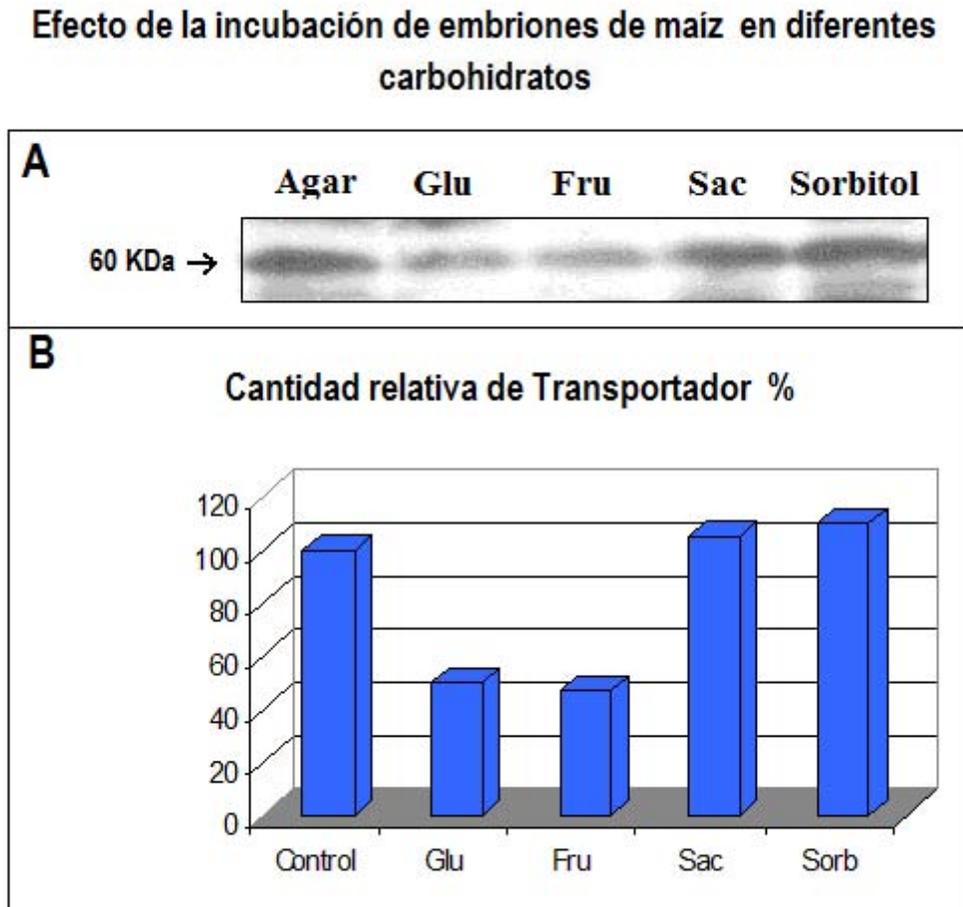


Figura 9. Efecto de la incubación de embriones de maíz en diferentes carbohidratos. Se embebieron embriones en 100mM de glucosa, fructosa, sacarosa o sorbitol, se obtuvo la fracción microsomal, se colocaron 30µg de proteína por carril y separaron en un gel de poliacrilamida SDS, se transfirió la membrana y se detectó al transportador de sacarosa mediante anticuerpos específicos según se detalla en la sección de Materiales y métodos. A)Reacción del anticuerpo B) densitometría de la proteína detectada con los anticuerpos.

Empero en lo que si coinciden es que ambos tejidos responden a la presencia de glucosa, llevando en el caso de los ejes embrionarios a aumentar la expresión del transportador de sacarosa, mientras que en el embrión a reducirla. Una de las estrategias que ha sido usada en la literatura para definir si es glucosa la señal que modifica la expresión de genes, es el uso de análogos de carbohidratos o de su epímero la manosa (Pego *et al.*, 1999). Manosa es fosforilada por la hexocinasa pero no hay una enzima que pueda usar a la Manosa-6P producida, y se asume que si la manosa produce los efectos que la glucosa ocasiona es que existe una proteína que la esta percibiendo y transduce la señal modificando la expresión de diferentes genes, de una manera similar a lo que en condiciones *in vivo* haría glucosa. Entonces se incubaron los ejes embrionarios de maíz en diferentes concentraciones de manosa desde 0.5 hasta 5.0 mM, concentraciones mayores resultan en una disminución o la no ocurrencia de la germinación. Además, para evaluar el efecto de este carbohidrato se comparo con la cantidad de transportador que se detecta al incubar el tejido en agar y sorbitol.

Lo que se encontró fue que hay una señal apenas visible de transportador de sacarosa cuando el medio de incubación contiene 0.5 mM de manosa, sin embargo aumenta la señal de 3 a 3.5 veces cuando el medio contiene 1 a 5 mM de manosa (Figura 10B y 10D). Previamente encontramos que a las 24 horas no se detectaba transportador de sacarosa en el eje, sin embargo en está ocasión logramos detectar transportador tanto al embeber en Agar o en las diferentes condiciones de sorbitol excepto en 50 mM, sin embargo su nivel es muy bajo en comparación con la que induce manosa (Figura 10).

Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en manosa

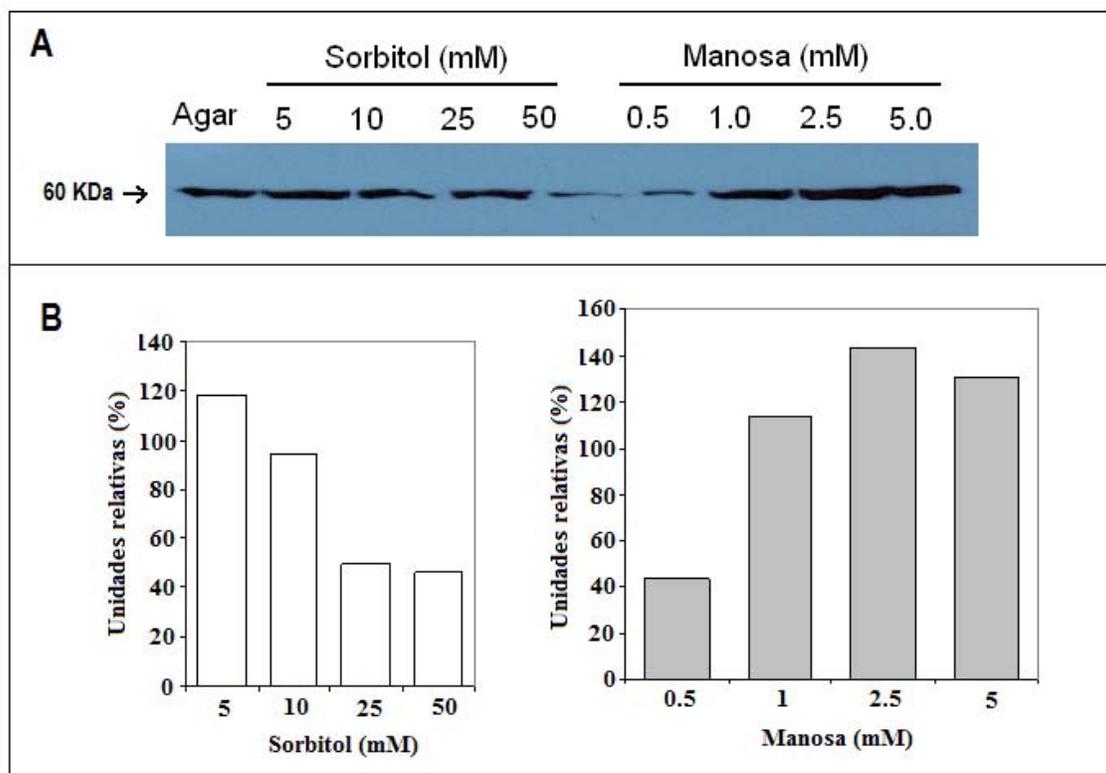


Figura 10 A) Inmuno-réplica tipo western de un del de poli-acrilamida en el que se separaron proteínas de fracciones micrisomales de ejes embrionarios de maíz embebidos en diferentes concentraciones de sorbitol y manosa y se detectó al transportador de sacarosa con anticuerpos específicos. B) perfiles densitométricos de las bandas de reacción detectadas en A, tomando como 100% la densitometría de la banda del tejido incubado en Agar.

Al incubar a los ejes embrionarios con concentraciones de 5 y 10 mM de glucosa, se logra detectar una mayor cantidad de transportador de sacarosa que lo observado a 20 a 50 mM de sacarosa o en el Agar solo esto es de 100 a 150 % más, y la sacarosa no logra aumentar su expresión su expresión (Figura 11). Lo anterior corrobora lo que observamos en las improntas del tejido embrionario de maíz (Figuras 8D a 8I), y volvemos a encontrar que la glucosa es el carbohidrato señal, y además por los datos de expresión en la inmuno-réplica sugerimos que

hay una concentración umbral entre 5 a 10 mM resultando en un incremento en la expresión de los transportadores de sacarosa.

Efecto de la imbibición de ejes embrionarios de maíz en diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa

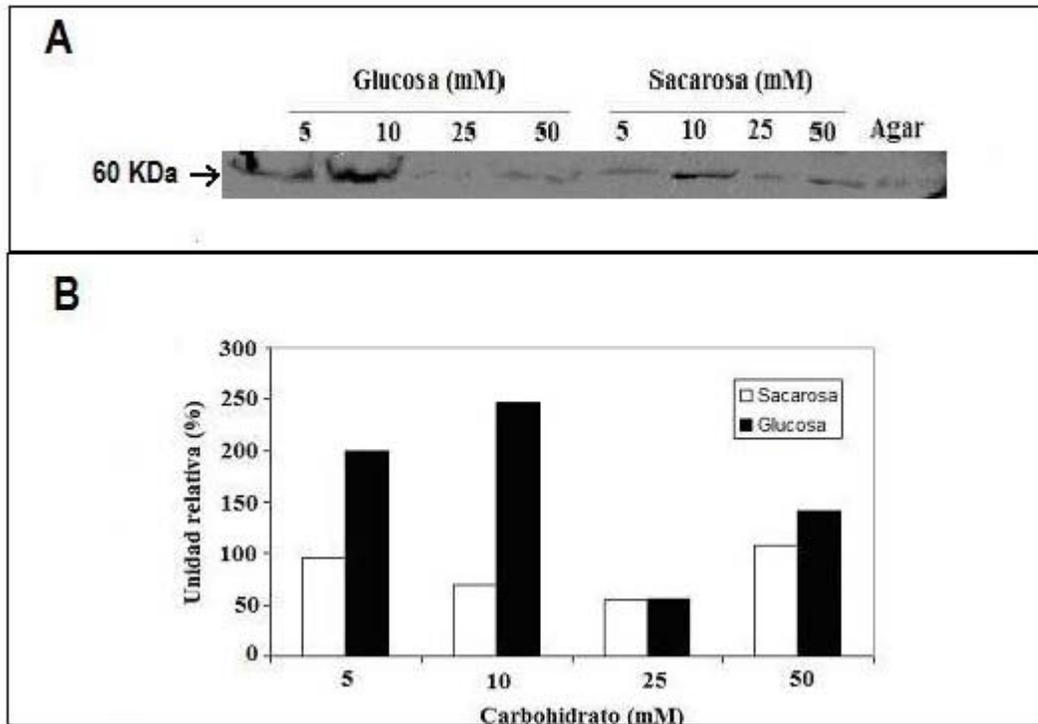


Figura 11. A) las bandas de transportador de sacarosa se revelaron con anticuerpos específicos y B) la densitometría de las bandas de A se presentan como porcentaje tomando como 100% la reacción del tejido embebido en agar.

Detección de los transportadores de hexosas en el tejido embrionario de maíz.

Debido a que el eje embrionario no cuenta con transportador de sacarosa en sus membranas, entonces la nutrición del eje embrionario debe ocurrir a expensas del transporte de hexosas. En el laboratorio se ha encontrado que las invertasas de la pared se encuentran activas pero que la actividad es mayor en el eje embrionario

desnudo más que en el embrión completo, por lo que es posible que la sacarosa se exporte del escutelo hacia los apoplastos y que aquí ocurra su hidrólisis a través de las invertasas, entonces el eje embrionario estaría en contacto con glucosa y fructosa que debe usarse para su crecimiento, siempre y cuando presente en sus membranas plasmáticas a los transportadores de hexosas.

Analizamos si el transportador de hexosas se encuentra en el tejido embrionario de maíz seco mediante improntas del tejido, encontrándose principalmente en la zona que rodea al escutelo y el eje embrionario donde existe una alta expresión de transportador (Figura 12).

Detección *in situ* del transportador de hexosas de la membrana plasmática

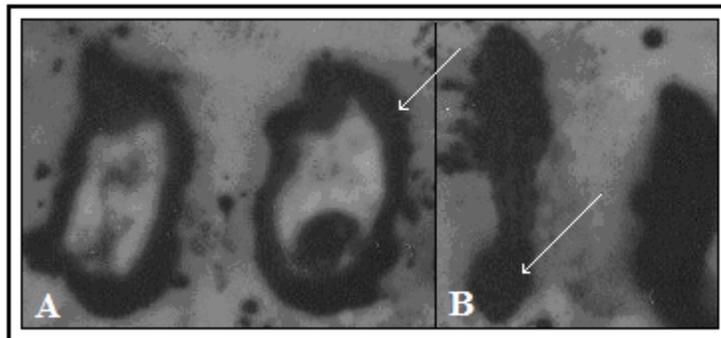


Figura 12. Detección *in situ* del transportador de hexosas de la membrana plasmática en embrión (A) y eje embrionario de maíz (B). Las flechas señalan la zona que rodea al embrión y al eje embrionario.

Inmunorélicas tipo Western de fracciones microsomales de ejes embrionarios embebidos 24, 36 y 48 horas muestran una sola banda de reacción (Figura 13) por lo que se mostrará solo la banda que reacciona en las siguientes figuras. A las 24h ya hay transportador de hexosas y la cantidad detectada de transportador es el doble a las 36 horas y sigue aumentando pero a menor velocidad para las 48h (Figura 13C). Lo anterior indica que la célula expresa transportador y que se encuentra activamente sintetizándolo conforme avanza el tiempo de germinación.

Inmunodetección del transportador de hexosas de la membrana plasmática en fracciones microsomales de embriones germinados

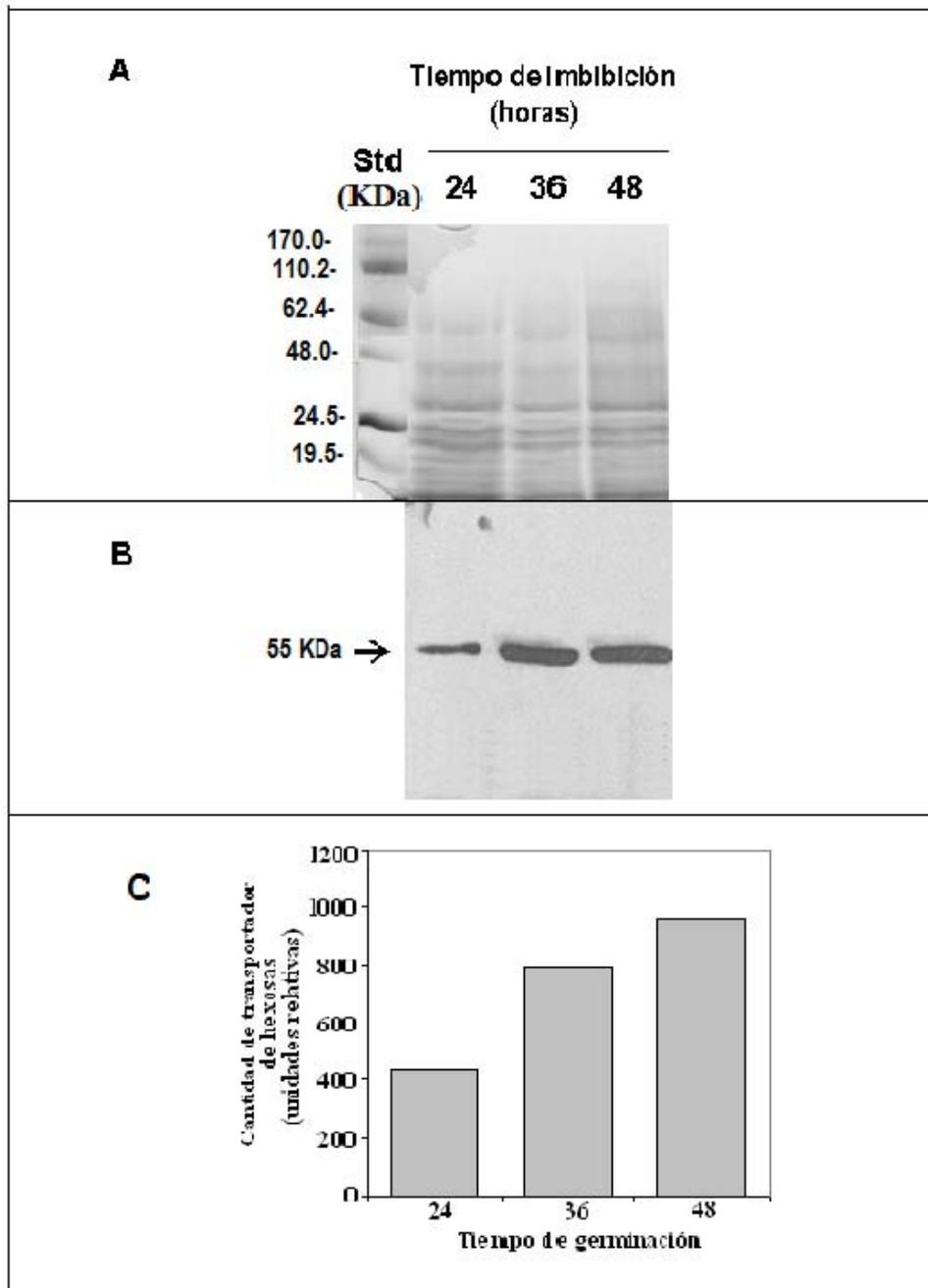


Figura 13. A) Gel de poliacrilamida-SDS en donde se muestra la separación de las proteínas de las fracciones microsomales de ejes embrionarios de maíz germinados 24, 36 y 48 h en Agar 1%, el gel se tiñó con azul de Coomassie. B) Inmuno-réplica tipo Western de un gel similar al que se muestra en A, la banda de

reacción se detecto al usar el anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática y C) Densitometría de las bandas detectadas en B.

Efecto de los carbohidratos en la expresión del transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz.

De manera similar que para el transportador de sacarosa, se analizo si la expresión del transportador de hexosas se modificaba al embeber el tejido en diferentes carbohidratos. Tanto la imbibición en glucosa (Figura 14A, 14B y 14C) como en glucosa (Figura 14D, 14D y 14E), no cambiaron la expresión del transportador de manera significativa. La intensidad de la señal con el anticuerpo es alta, a pesar de que se usaron diferentes diluciones del anticuerpo.

Efecto de diferentes concentraciones de glucosa y sacarosa en la localización y cantidad del transportador de hexosas en los ejes embrionarios de maíz.

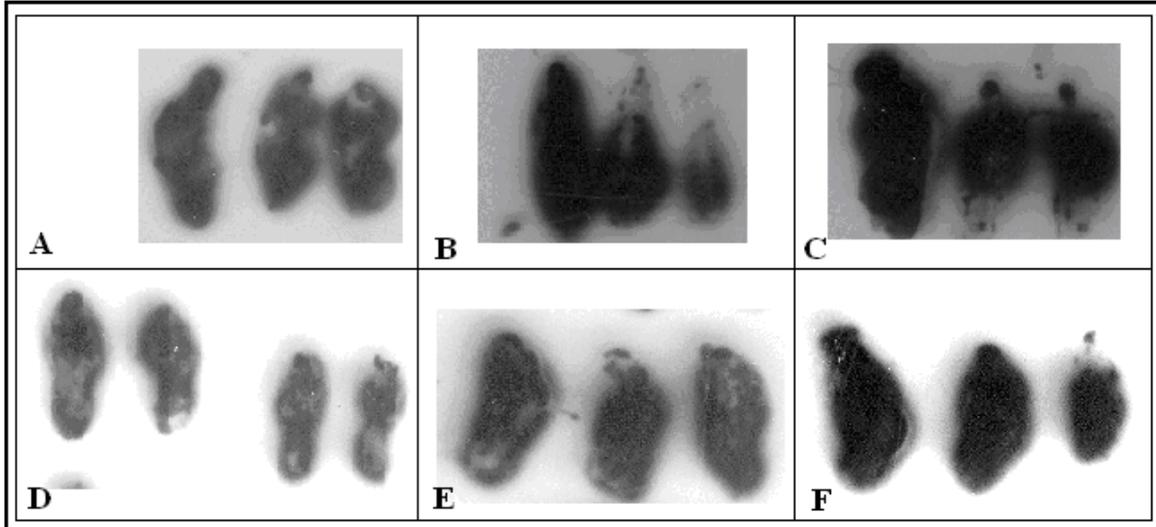


Figura 14. Se utilizaron anticuerpos específicos contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática para localizar en las improntas de los ejes embrionarios de maíz. Los ejes se incubaron en A 10 mM glucosa, B. 25 mM glucosa, C. 50mM glucosa, D 10 mM sacarosa, E 25 mM sacarosa y F 50mM sacarosa.

En inmunorélicas tipo Western corroboramos que la expresión con sacarosa era alta. Como se observa en la Figura 15 a las tres concentraciones de sacarosa 10, 25 y 50 mM hay una expresión alta y similar para todos ellos. De manera similar ocurrió con la glucosa (datos no mostrados).

Efecto de la imbibición en sacarosa sobre la expresión del transportador de hexosas

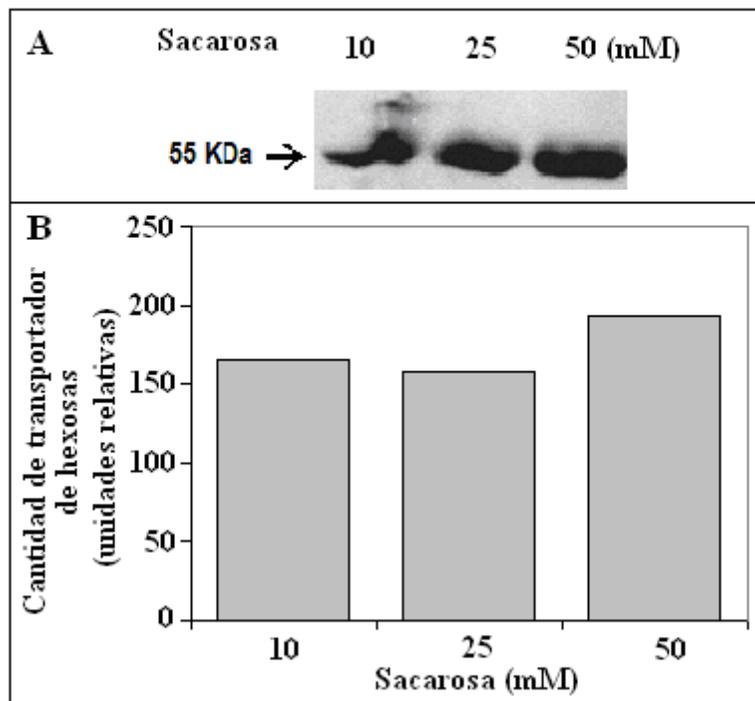


Figura 15. Efecto de la incubación en sacarosa en la expresión del transportador de hexosas. Fracciones microsomales de ejes embrionarios de maíz embebidos en diferentes concentraciones de sacarosa y separados en un gel de poliacrilamida-SDS, la proteína fue transferida a un papel de nitrocelulosa según se describió en materiales y métodos. A. Reacción del anticuerpo contra el transportador de hexosas de la membrana plasmática. B Densitometría de las bandas detectadas en A.

Aún cuando no encontramos diferencias en la intensidad detectada en el tejido y en las inmunorélicas con el transportador de hexosas, al incubar en presencia o ausencia de glucosa, quisimos corroborarlo, midiendo los niveles de transportador

de hexosas cuando los ejes embrionarios se embebieron en concentraciones crecientes de manosa.

Concentraciones desde 1 hasta 7.5 mM de manosa no modifican la expresión del transportador de hexosas en el eje embrionario, probablemente debido a que la expresión del transportador es alta y se distribuye en todo el tejido, aunque en algunos ejes se encontró que la zona que lo rodea y en la parte media, que podría ser la zona vascular son las que se presentan mayor unión al anticuerpo (Figuras 16 A-D).

Efecto de la manosa en la localización y cantidad del transportador de hexosas en ejes embrionarios de maíz.

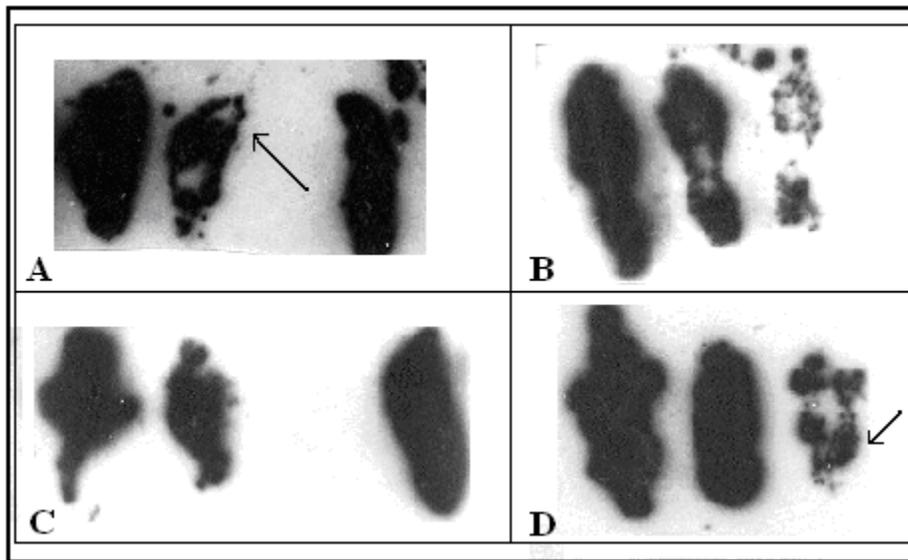


Figura 16. Se utilizaron anticuerpos específicos contra el transportador de glucosa de la membrana plasmática para localizar en las improntas de tejido embrionario de maíz. Tejido incubado en A 1 mM, B 2.5 mM C 5 mM y D 7.5 mM Manosa.

Para cuantificar el efecto de la manosa en la expresión del transportador, se obtuvieron las fracciones microsomales de ejes que fueron embebidos en manosa

o en sorbitol (Figura 17). Se encontró que la concentración de 0.5 mM de Manosa reprime la expresión del transportador y que en las otras concentraciones de 1 a 5 mM se obtiene un resultado similar al de las improntas, niveles altos de transportador de hexosas. Adicionalmente, la adición de sorbitol también tiene un efecto de disminuir la señal con el anticuerpo, sin embargo esto último podría deberse a un efecto osmótico.

Efecto de la incubación de ejes embrionarios de maíz en manosa

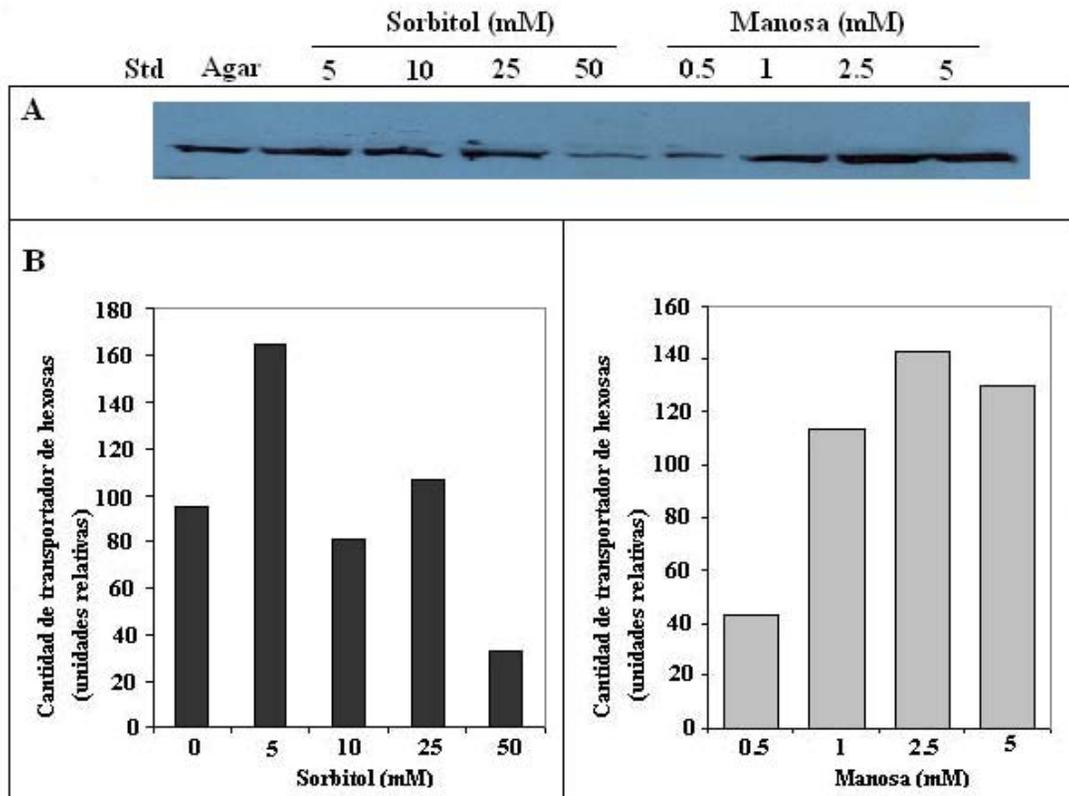


Figura 17. Inmuno-réplica tipo western de la fracción microsomal de ejes embrionarios de maíz germinados 24 horas en diferentes concentraciones de sorbitol y manosa, las bandas. A) Detección con anticuerpos específicos con el transportador de hexosas de la membrana plasmática. B) B) perfiles densitométricos de las bandas de reacción detectadas en a, tomando como 100% la densitometría de la banda del tejido incubado en Agar.

DISCUSIÓN

El crecimiento de plantas está controlado no solamente por señales del desarrollo y ambientales, sino también por su estado metabólico y fisiológico. Las plantas usan como mensajeros metabólicos a los carbohidratos, lo que coordina las actividades metabólicas en tejidos fuente o productores de carbohidratos, con los tejidos demanda o consumidores y/o almacenadores de carbohidratos. Por ejemplo, se conoce que el incremento en glucosa y en sacarosa, los productos finales de la fotosíntesis, reprimen la expresión genética en las hojas fuente de enzimas importantes en la síntesis de carbohidratos. Este mecanismo de retro-regulación es mucho más importante que la regulación debida a la inducción por luz. No obstante, desde diferentes campos de la investigación en plantas, los estudios de la expresión global de genes dejan claro que la señalización por carbohidratos no sólo controla la fotosíntesis, sino también la expresión de otros numerosos procesos metabólicos y del desarrollo (Rolland *et al.*, 2002).

Durante la germinación también se establecen relaciones fuente demanda entre tejidos muy cercanos (Thomas y Rodríguez, 1994). Relación que depende en gran medida de las señales aportadas por los cambios en la concentración y tipo de carbohidratos que se transportan o perciben en ambos tejidos. En este sentido por ejemplo, se conoce que cuando se colocan a germinar semillas en presencia de sacarosa o glucosa se reprime la expresión de las enzimas del ciclo del glioxilato, disminuyendo la utilización del carbono almacenado en los lípidos para la síntesis de carbohidratos (Longo y Longo, 1970; To *et al.*, 2002). Nuevamente un mecanismo de retro-regulación.

¿Cuáles son los cambios que ocurren en el maíz en cuanto a la movilización temprana de las reservas? Estudios en nuestro laboratorio, demuestran que en las primeras 24 h de hidratación -tiempo en el cual ocurren las dos primeras fases de la germinación- el eje embrionario del maíz consume alrededor del 75 % de la

sacarosa que tiene como reserva, y a partir de este tiempo necesita el aporte de nutrimentos del tejido externo. El escutelo a partir de las 24 h incrementa su concentración de sacarosa (Martínez-Marcelo, 2008), además de ser capaz de donar este carbono, ya que sintetiza activamente tanto al RNA como a la proteína transportadora de sacarosa, ZmSUT1 (Zea mays sugar transporter 1). Sin embargo, el eje embrionario no contiene transportador de sacarosa (Greaves-Fernández, 2001, Gómez-Calderas, 2008; Zavala-Zendejas, 2001), por lo que postulamos que el transportador de hexosas debe encontrarse presente en el tejido embrionario. El no encontrar transportador de sacarosa en el eje embrionario también es indicativo de que la regulación espacial y temporal del transportador podría ser dependiente del metabolismo del tejido, debido a que en este caso, tenemos dos tejidos con un metabolismo distinto, uno es fuente de nutrimentos y el otro es demandante de éstos, aunque no olvidamos que la regulación hormonal pudiera también estar jugando un papel en la modulación de la concentración de carbohidratos que hay a los diferentes tiempos de la germinación y en cada uno de los tejidos de la semilla (Bewley, 2001).

Con estos antecedentes decidimos investigar ¿cuál es el efecto que los carbohidratos tienen sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación del maíz?. Se utilizaron anticuerpos específicos que reconocen a los transportadores tanto de sacarosa como de hexosas y se determinaron los niveles de expresión de los transportadores como proteína. Además, con la finalidad de localizar de una manera rápida las zonas del tejido embrionario las en las que se encontraba mayormente expresado cada transportador, se realizaron improntas del tejido embrionario.

Regulación del transportador de sacarosa por carbohidratos

En la literatura, hay datos contradictorios sobre la regulación del transportador de sacarosa por carbohidratos, tanto efectos de represión como de inducción. El gen para el transportador de sacarosa en hojas remolacha se reprime por sacarosa (Chiou y Bush, 1998), mientras que el gen para un transportador de sacarosa específico de células acompañantes de células en suspensión de *Oryza sativa* (Matsukura *et al.*, 2000) es regulado positivamente por este mismo sustrato. En hojas de betabel y de jitomate, la sacarosa y la glucosa no modifican la expresión del transportador de sacarosa (Schultze *et al.*, 2000; Vaughn *et al.*, 2002).

Nosotros encontramos que la expresión del transportador de sacarosa en tejido embrionario de maíz, también produce represión o inducción. Cuando se embebieron embriones en 100 mM de fructosa o glucosa se reprime la expresión alrededor de un 60%, aunque sacarosa no tiene efecto. En contraste, los ejes embrionarios que no contenían transportador de sacarosa, al incubarlos con las hexosas se induce su expresión.

Corroboramos que la glucosa es el metabolito inductor de la expresión del transportador de sacarosa al realizar experimentos con manosa, encontrando que está hexosa que es un análogo no metabolizable de la glucosa, es una herramienta muy útil para amplificar los efectos de las hexosas sobre la expresión del transportador. Se observaron zonas determinadas del tejido en las que se incrementa la cantidad de proteína detectada por anticuerpo, como la coleorriza y el meristemo apical, el primero es el tejido que cubre y protege a la radícula y el segundo es una de las zonas de mayor crecimiento celular. Los meristemos generalmente son células que son pluripotenciales, de ellas podría emerger un organismo entero, tienen una capacidad metabólica alta y se encuentran en constante crecimiento. Dos tipos celulares definidos forman parte del meristemo apical, los protodermos que formaran la epidermis y el procambium (Quijada, 1992). En nuestro caso, se logra observar un aumento en el contenido del

transportador de sacarosa sobre todo en el procambium, las células que están formando el floema, lo que indica que el paso de solutos o transporte específico de sacarosa se localiza en esa región (Figura 18). Además, datos en nuestro laboratorio indican que la mayor actividad de invertasa es en los apoplastos del eje embrionario (Martínez-Marcelo, 2008), así que el transporte de sacarosa podría ir de la célula escutelar hacia el tejido vascular y de ahí al eje embrionario en crecimiento, que al tener activas a sus invertasas produce hexosas que inducen la expresión de transportador de sacarosa, así el tejido tendría la capacidad tanto de transportar la sacarosa que no fuera hidrolizada por las invertasas, como de transportar hexosas a través de transportadores de hexosas.

Adicionalmente, encontramos que hay un umbral para la inducción de transportador de sacarosa, ya que concentraciones de 1.0 a 5.0 mM de glucosa son capaces de inducir la expresión máxima del transportador.

Modelo esquemático de la ruta celular del transporte de carbohidratos del endospermo al eje embrionario en la germinación de semillas de maíz.

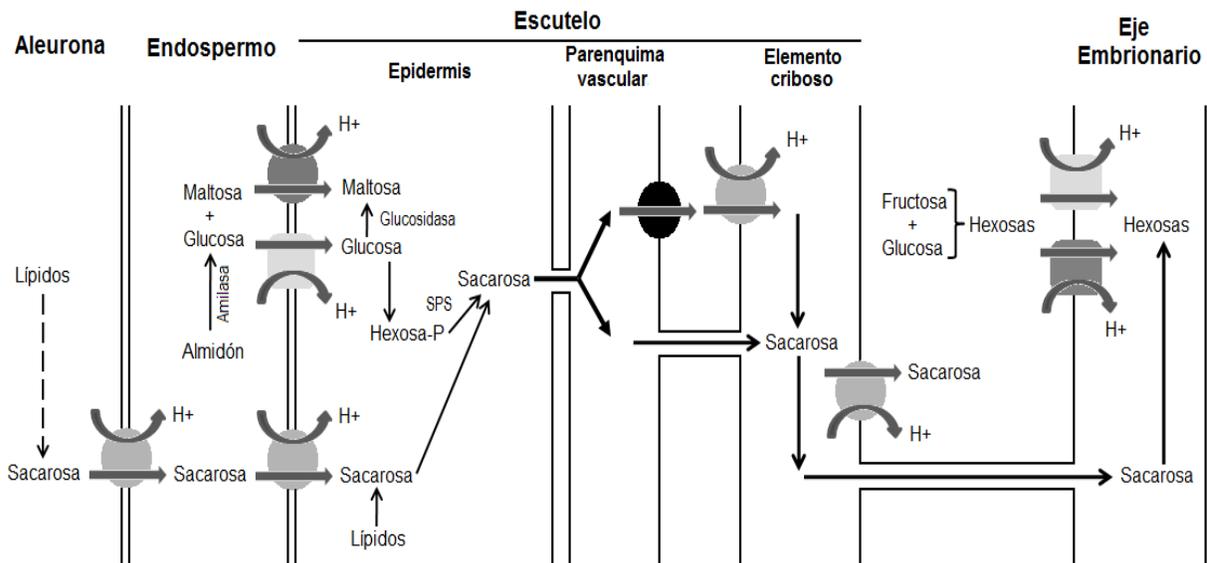


Figura 18. Se destacan la localización potencial de los transportadores de azúcares y transporte simplástico. SUT1 es representado por un círculo grande, transportadores de hexosas por cuadrados, y un exportador de sacarosa con un círculo negro. SPS, sacarosa fosfato sintasa; hexosa-P, hexosa fosfato.

Efecto de la incubación del tejido embrionario en carbohidratos sobre la expresión del transportador de hexosas.

Por otra parte, el transportador de hexosas se encontró que estaba altamente expresado tanto en la primera capa de células del escutelo, que es la que se encontraría en contacto con el endospermo del maíz, como también en el eje embrionario completo seco (Figura 18).

La presencia de transportador de hexosas en la zona cercana al endospermo se esperaba, ya que la hidrólisis del almidón lleva a la formación tanto de maltosa como de glucosa. La maltosa podría transportarse al interior del embrión mediante transportadores de sacarosa, mientras que la glucosa se introduciría mediante transportadores de hexosas (Lim *et al.*, 2006). Se ha postulado que los transportadores localizados en las células adyacentes al endospermo deben de ser transportadores difusionales, sin embargo, aún no hay evidencia experimental que la apoye, por lo que nos permitimos en el modelo proponer que es un simportador Hexosas/H⁺, pero no descartamos la posibilidad de que sea un transportador difusional (Figura 18).

Además, encontramos que en el proceso de hidratación aumenta la expresión del transportador de hexosas tanto en los embriones como en los ejes embrionarios. Estudios de expresión de los niveles de RNAm realizados recientemente en el laboratorio, corroboran la presencia de un transportador tanto en ejes como en embriones y además nos muestran que los embriones tienen al menos 2 veces más RNAm para el transportador de hexosas, que denominamos ZmHT, que los ejes embrionarios (Gómez-Calderas, 2008).

Hay evidencias en la literatura de la regulación del transportador de hexosas por carbohidratos. En *C. kessleri*, el transportador de hexosas HUP1 y el transportador de galactosa HUP2 son co-inducidos cuando se agrega glucosa al medio (Stadler

et al., 1995). En *vitis vinifera* tanto 58 mM de sacarosa como de glucosa inducen al transportador de hexosas tipo 1 (Atsanova *et al.*, 2003). A pesar de lo anterior, no encontramos un efecto de la incubación del tejido embrionario en glucosa o sacarosa, sin embargo, la incubación con 0.5 mM manosa produce una reducción en la cantidad de transportador de hexosas en la fracción microsomal de embriones.

Experimentos para detectar los RNAm para el transportador de hexosas ZmHT, muestran una reducción de la expresión del transportador con glucosa y sacarosa (Gómez-Calderas, 2008). Para explicar los datos que parecieran ser contradictorios entre éste trabajo y el de Gómez-Calderas (2008), tenemos que recordar que la detección del transportador de hexosas en el tejido embrionario fue a través de anticuerpos policlonales, que fueron hechos para detectar una zona conservada para el transportador de hexosas de varias especies de plantas, por lo que es probable que en la preparación microsomal o en el tejido se detecten más de un solo transportador de hexosas presente en esas células. Mientras, que la detección del RNAm para el transportador ZmHT fue específica, debido a que se usaron oligonucleótidos específicos para realizar la reacción de RTPCR y así detectar los niveles de RNAm para el transportador.

No tuvimos este problema con el transportador de sacarosa, ya que a pesar de que al igual que en los transportadores de hexosas se han encontrado varios en una misma célula, el transportador de sacarosa en maíz es único (Aoki *et al.*, 1999; Greaves-Fernández, 2001), así los efectos de los carbohidratos sobre la cantidad de proteína detectada con anticuerpo corresponden a un solo tipo de transportador y no ha varios, como es el caso del transportador de hexosas.

Ahora que ya contamos con una clona para detectar a un transportador de hexosas en maíz, es posible usarla como sonda en experimentos de Southern-Blot y Northern-Blot para determinar el número y los niveles de expresión de diferentes RNAm para el transportador de hexosas en tejido embrionario de maíz.

CONCLUSIONES

El uso de improntas de tejido embrionario de maíz nos permite de una manera rápida, detectar que zonas del tejido que reaccionan con los anticuerpos específicos contra los transportadores de carbohidratos.

El transportador de sacarosa se regula negativamente en el embrión cuando se embebe el tejido en glucosa, fructosa o manosa.

Mientras que se regula positivamente en el eje embrionario por glucosa y manosa.

De los resultados sugerimos que el transportador de sacarosa se encuentra regulado por glucosa, pero que lo hace de manera diferencial dependiendo si es tejido fuente o tejido demanda.

No hay transportador de sacarosa en ejes embrionarios, pero si se encuentran los transportadores de hexosas tanto en ejes embrionarios de maíz secos como germinados y es probable que estos sean los responsables de ayudar a nutrir al eje embrionario en crecimiento.

La adición de glucosa y sacarosa a concentraciones de 10 a 50 mM no afectan la expresión del transportador de hexosas.

La manosa solo a concentración de 0.5 mM disminuye los niveles de transportador de hexosas en las membranas del eje embrionario. Sin embargo, son necesarios más experimentos para poder concluir si el transportador de hexosas se regula por manosa o glucosa a concentraciones bajas.

PERSPECTIVAS

Respecto al transportador de sacarosa

Corroborar y determinar mediante inmunocitoquímica en que zonas del escutelo y el eje embrionario, se modifica la expresión del transportador de sacarosa.

Investigar si la vía de transducción de señales que se encuentra involucrada en la regulación de la expresión del transportador de sacarosa es la vía dependiente de hexocinasa.

Respecto al transportador de hexosas

Determinar si a concentraciones bajas de glucosa o sacarosa ocurre la regulación del transportador de hexosas.

Medir la actividad de transporte de hexosas en la germinación del maíz y su regulación por carbohidratos.

Determinar con exactitud las células del embrión en donde el transportador de hexosas presenta su mayor abundancia.

Realizar experimentos de Northern y Southern blot para determinar el posible número de transportadores de hexosas presentes en las células embrionarias del maíz y si sus niveles cambian cuando se expone el tejido a glucosa o sacarosa.

REFERENCIAS

- Atanassova R, Leterrier M, Gaillard C, Agasse A, Sagot E, Coutos-Thévenot P, Delrot S. 2003. Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape. *Plant Physiol.* 131, 326-334.
- Aldape MJ, Elmer AM, Chao WS, Grimes HD. 2003. Identification and characterization of a sucrose transporter isolated from the developing cotyledons of soybean. *Arch Biochem Biophys* 409, 243–250.
- Aoki N, Hirose T, Takahashi S, Ono K, Ishimaru K, Ohsugi R. 1999. Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays L.*). *Plant Cell Physiol* 40, 1072-1078.
- Bewley DJ. 2001. Seed germination and reserve mobilization. *Ency Lif Sci.* 1-3.
- Bewley DJ. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-10667.
- Bewley DJ, Black M. Seeds. Physiology of development and germination. 2° edición. Plenum Press. NY 1994.
- Bradford KJ. 2004. Germination: Imbibition, activation and reserve mobilization. *In Seed production and Quality.*
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochim Biophys Acta* 1465, 263-274.
- Cassab IG. 1992. In Tissue printing: tools for the study of anatomy, histochemistry, and gene expression. Reid PD, Pont-Lezica RF, del-Campillo E, Taylor R. (Eds) Academic Press, Inc., San Diego California.
- Ching TM. 1978. Metabolism of germinating seed. En : Seed Biology. TT Kozlowski (Ed). Vol II. Academic Press, Inc. New York.
- Chiou TJ, Bush DR. 1998. Sucrose is a signal molecule in assimilate partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4784-4788.
- Delrot S, Atanassova R, Gomés E, Coutos-Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Sci* 161, 391-404.
- Finkelstein RR, Gibson SI. 2001. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd. *Curr Opin Plant Biol* 5, 26-32

Gibson SI .2000. Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 124, 1532-1539.

Ghosh S, Gepstein S, Heikkila JJ, Dumbroff EB. 1988. Use of a scanning densitometer or an ELISA plate reader for measurement of nanogram amounts of protein in crude extracts from biological tissues. *Anal Biochem* 169, 227-33.

Gómez-Calderas A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Greaves-Fernández N. 2001. Estudio de la expresión de los RNAm del transportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Hans-Walter H. Plant biochemistry. 3^o Edition. Elsevier Academic Press. 1997.

Hirose T, Himaizumi N, Scofield G, Furbank R, Osugui R. 1997. cDNA cloning and tissue specific expression of a gene for sucrose transporter from rice. *Plant Cell Physiol* 38, 1389-1396.

Koch K. 1996. Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Mol Biol* 47, 509-540.

Kühn C, Franceschi VR, Schultz A, Lemoine R, Frommer WB. 1997. Macromolecular trafficking indicated by localization and turnover of sucrose transporters in enucleate sieve elements. *Science* 275, 1298-1300.

Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lalonde S, Boles E, Hellmann H, Barker J, Patrick J, Frommer WB. 1999. The dual function of sugar carriers: Transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11, 707-726.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB. 2004. Transport mechanism for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Ann Rev Plant Biol* 55, 341-372.

Lemoine L. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochim Biophys Acta* 1465, 246-262.

Leszek P, Vincent D. 2002. *Zea mays* (Maize, Corn). *Enc Life Sci*, 1-7.

Lim JD, Cho JII, Park Y-II, Hahn T-R, Choi S-B, Jeon J-S. 2006. Sucrose transport from source to sink seeds in rice. *Physiol Plant* 126, 572-584.

Longo CP, Longo GP. 1970. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiol* 45, 249-254.

Lloyd M, Zakhleniuk OV. 2004. Responses of primary and secondary metabolism to sugar accumulation revealed by microarray expression analysis of the *Arabidopsis* mutant, *pho3*. *J Exp Bot* 55, 1221-1230.

Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Matsukura C, Sayito T, Hirose T, Oshugi R, Perata P, Yamaguchi J. 2000. Sugar uptake and transport in rice embryo. Expression of companion cell-specific sucrose transporter (OsSUT1) induced by sugar and light. *Plant Physiol* 124, 85-94.

Pao S, Paulsen I, Saier M, JR. 1998. Major facilitator superfamily. *Microb Mol Bio. Re.* 62, 1-34.

Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM. 1999. Mannose inhibits *Arabidopsis* germination via hexokinase-mediated step. *Plant Physiol* 119, 1017-1023.

Quijada Rosas, M. 1992. Glosario de Términos de Genética, Fitogenética y Afines. Universidad de los Andes. Mérida. Venezuela.

Ramírez-Palma T. 2007. Estrés hídrico altera el reparto de carbono en tejidos fuente y demanda de plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica). Facultad de Química, UNAM.

Roblin G, Sakr S, Bonmort J, Delrot S. 1998. Regulation of a plant plasma membrane sucrose transporter by phosphorylation. *FEBS Letts* 424, 165-168.

Rolland F, Moore B, Sheen J. 2002. Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* S185-S205.

Sherson Sara M., Alford Heather, Forbes Susan M, Wallace Graham, Smith Steven M. 2003. Roles of Cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of experimental Botany* 54, 525-531

Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrtz M y Sauer N. 1995. *Plant Cell* 7, 1545-1554.

Thomas BR, Rodríguez RL. 1994. Metabolite signals regulate gene expression and source/sink relations in cereal seedlings. *Plant Physiol* 106, 1235-1239.

To JPC, Reiter W-D, Gibson SI. 2002. Mobilization of seed storage lipid by Arabidopsis seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *BMC Plant Biol* 2, 1-11.

Sauer N, Tanner W. 1989. The hexose carrier from Chlorella. CDNA cloning o a eucaryotic H⁺-cotransporter. *FEBS Lett* 259, 43-46.

Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10876-10880.

Voet D, Voet JG. Biochemistry. Segunda edición. John Wiley & Sons. 1995.

Weber H, Borisjuk L, Ute Heim, Sauer N, Wobus U. 1997. A role for sugar transporters during Seed Development: Molecular characterization of a hexose and sucrose carrier in Faba been seeds. *Plant Cell* 9, 895-908.

Weber H, Heim U, Golombek S, Borisjuk L, Wobus U. 1998. Assimilate uptake and the regulation of seed development. *Seed Sci Res* 8, 331-345.

Weber A, Servatius CJ, Geiger DR, Kofler H, Hille D, Gröner F, Heberker U, Flügge UI. 2000. Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose translocator. *Plant Cell* 12, 787-801.

Weise A, Barker L, Kühn C, Lalonde S, Bushmann H, Frommer WB, Ward JM. 2000. A new subfamily of sucrose transporters, SUT4, with low affinity/high capacity localized in enucleae sieve elements of plants. *Plant Cell* 12, 1345-1355.

Weschke W, Panitz R, Gubatz S, Wang Q, Radchuk R, Weber H, Wobus U. 2003. The role of invertases and hexose transporters ion controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. *Plant J* 33, 395-411.

Yu SM. 1999. Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 121, 687-693.

Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz: Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Zimmermann R, Werrn W. 2005. Pattern formation in the monocot embryo as revealed by NAM: and CUC3 orthologues from *Zea mays* L. *Plant Mol. Biol.* 58, 669-685

Referencia en línea

<http://www.botanical-online.com/maizpropiedades.htm> (Última fecha de consulta: febrero 2009)

APÉNDICE I

PROTOCOLO DE QUIMIOLUMISCENCIA

Preparación de las soluciones:

Solución A. Pesar 0.35 g de ácido p-cumárico (No. Catálogo SIGMA C9008) y disolver con 25 mL DMSO.

Solución B. Pesar 1.1 g de luminol (No. Catálogo BioChemika 09253) y disolver en DMSO hasta 25 mL.

Mezcla luminiscente. Preparar justo antes de usarse

25 µl de solución A

50 µL de solución B

17 µL H₂O₂

10 mL Tris-HCl, pH 8.5

Procedimiento

A una membrana que fue incubada con el segundo anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa y posteriormente lavada con TTBS, se le añade solución luminiscente suficiente para cubrir la membrana, agitar rotatoriamente por 4 minutos y trasladar la membrana a un acetato eliminando el exceso de la solución luminiscente y cuidando de no secar la membrana. La membrana se expone a una película fotográfica.

APÉNDICE II

PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS CON CNBr-SEFAROSA.

Soluciones:

Buffer de acoplamiento. 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3, 0.5 M NaCl.

1 mM HCl (1.3 µl del HCl concentrado en 15 ml de H₂O)

1 M monoetanolamina pH 7.5

TBS (no añadir TWEEN)

0.1 M glicina pH 2.4

3 M Tris/HCl pH 8.8

4 M NaCl

Preparación de la proteína

Se determinará la concentración de proteína que se va a acoplar a la resina, de tal forma que se conozca la cantidad que se añadirá de proteína a la resina.

Es común que la proteína pierda actividad biológica después de acoplarla a la sefarosa-CNBr, por lo que no se puede predecir que suceda con la actividad de la proteína y esto tiene que tomarse en cuenta para buscar el ensayo biológico apropiado.

Disolver la proteína que se va a acoplar en 0.1M NaHCO₃ pH 8.3, 0.5M NaCl (buffer de acoplamiento), 1mg/proteína/0.5 ml de buffer.

PARA EL TRANSPORTADOR USAR 500µg DE PROTEÍNA

Hidratación y activación de la resina

Pesar en un tubo de microfuga 0.06 g de resina seca, la cual al hidratarse dará un volumen de 0.2 ml y tiene la capacidad de unir cerca de 1 mg de proteína.

Lavar la resina 10 veces con 1 ml de 1 mM HCl (mezclar por inversión del tubo), centrifugar en una microfuga, usar una velocidad baja, 6000 rpm por cerca de 5 sec. Aspirar con cuidado el sobrenadante y repetir 10 veces (ES RECOMENDABLE HIDRATAR EL GEL EN MÚLTIPLES PEQUEÑOS LAVADOS, Y NO EN UNO SOLO GRANDE)

Unión del péptido y bloqueo de sitios no reactivos

Añadir la proteína a la resina. El pH de la solución queda alrededor de 7.0 (CHECAR EL pH) . Mezclar gentilmente preferentemente rotatoriamente por 6 horas o toda la noche a 4°C.

Centrifugar, guardar el sobrenadante para determinar proteína posteriormente y cuantificar cuanta proteína se unió a la resina.

Añadir a la resina 1M monoetanolamina pH 7.5 y dejarla rotando por 6 h o toda la noche. Este paso bloquea los sitios reactivos que no se unieron a las proteínas.

Lavar la resina con 10 mL de TBS.

Adición del suero inmune

Añadir el suero (cerca de 1 a 1.5ml) y 4 vol de TBS a resina y dejarla en movimiento rotatorio por 2-4 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

Centrifugar y coleccionar el sobrenadante (suero sin el anticuerpo de interés, no tirarlo).

Lavar la resina con 10 ml de TBS

Eluir el anticuerpo por adición de 0.1 M glicina pH 2.4 (el volumen pueden ser entre 100 a 500 μ l, es mejor hacerlo en un volumen pequeño y para hacerlo por ejemplo puedes añadir 100 μ l, mezclar muy bien y centrifugar, sacara el sobrenadante y añadir otros 100 μ l, mezclar y centrifugar, por último juntar ambos sobrenadantes.

Añadir inmediatamente por 1 ml de eluido coleccionado 30 μ l 3M Tris pH 8.8 y 25 μ l 4M NaCl, para que el eluido quede a pH neutro.