

REGULACIÓN DEL METABOLISMO DEL CARBONO EN PLANTAS POR TREHALOSA 6-FOSFATO

Tomás Tonetti

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Área: Ciencias Biológicas.

Sub-área: Biotecnología.

Grupo: X

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, trehalosa-6-fosfato, sacarosa.

INTRODUCCIÓN

La trehalosa 6-fosfato (Tre6P) es un metabolito señal que vincula el desarrollo de las plantas con su estado metabólico. El modelo del nexo Tre6P-sacarosa establece que la Tre6P actúa como señal y regulador negativo de los niveles de sacarosa. Este mecanismo permite mantener los niveles intracelulares de sacarosa dentro de un rango óptimo y, salvando las distancias, es análogo al sistema insulina-glucagón que opera en los mamíferos para regular los niveles sanguíneos de glucosa (Figuroa y Lunn, 2016). El modelo del nexo Tre6P-sacarosa fue establecido principalmente utilizando plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que expresan de forma constitutiva la Tre6P sintasa (TPS) y la Tre6P fosfatasa (TPP) de *Escherichia coli* (otsA y otsB, respectivamente), las que presentan niveles alterados de Tre6P y sacarosa (Yadav y col., 2014).

Para avanzar en el conocimiento del nexo Tre6P-sacarosa, se utilizó una línea transgénica de *A. thaliana* que permite la expresión controlada (inducible por etanol) de la otsA. Cuando las plantas fueron inducidas al comienzo del fotoperiodo se observó una disminución en los niveles de sacarosa y un aumento del contenido de ácidos orgánicos y aminoácidos, como consecuencia de la activación post-traduccional de la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la nitrato reductasa (Figuroa y col., 2016). También se observó una caída en los niveles de sacarosa cuando las plantas se indujeron al comienzo de la noche, en este caso como resultado de la inhibición de la degradación del almidón transitorio y la consecuente disminución en el contenido de maltosa (el principal producto de la degradación del polisacárido en hojas) (Martins y col., 2013). Estos resultados permitieron validar el modelo del nexo Tre6P-sacarosa (el aumento artificial en los niveles de Tre6P lleva a una disminución del contenido de sacarosa); sin embargo, aún desconocemos los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso de regulación.

OBJETIVOS

Estudios recientes sugieren que la Tre6P podría ejercer un rol fundamental en el proceso de carga de sacarosa en el floema y que la síntesis de Tre6P podría ocurrir en el tejido vascular (resultados no publicados). El proyecto consiste en el establecimiento y análisis de líneas transgénicas de *A. thaliana* con niveles alterados de Tre6P en el tejido vascular para estudiar el efecto de esta última sobre la partición del carbono entre almidón y sacarosa, el metabolismo de ácidos orgánicos y aminoácidos y la síntesis proteica, tanto en tejidos fuente (hojas) como en tejidos heterotróficos (hojas inmaduras).

METODOLOGÍA

Plantas transgénicas

Se utilizaron plantas de *A. thaliana* salvaje (Col-0) y líneas transgénicas homocigotas que expresan en forma constitutiva la *otsA* y la *otsB* bajo el control del promotor constitutivo 35S. También se usaron plantas heterocigotas (F1) que expresan la *otsA*, la *otsB* y la TPP de *Caenorhabditis elegans* (CeITPP) bajo el control del promotor específico de tejido vascular CoYMV.

Selección de plantas transgénicas

Las plantas F2 fueron seleccionadas mediante riego con fosfinotricina (BASTA). Aquellas plantas que resultaron resistentes al tratamiento con el herbicida se trasplantaron y luego se tomó una hoja por planta para su posterior análisis. Se cosecharon las semillas y se repitió el procedimiento para las plantas F3 hasta obtener líneas homocigotas (donde el 100% de las semillas germinadas resultaron resistentes al tratamiento con herbicida).

Análisis de la expresión

Las muestras de hojas recolectadas a partir de las plantas seleccionadas con BASTA fueron pulverizadas en un mortero con N₂ líquido. Se realizaron alícuotas de 20 mg (peso fresco) y las mismas se resuspendieron con 200 µL de *buffer* de siembra. Las muestras se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) seguida de inmunodetección (*Western blot*). Las membranas fueron incubadas con anticuerpos policlonales (dilución de uso 1:10.000) dirigidos contra las proteínas bajo estudio (*otsA*, *otsB* y CeITPP) desarrollados en conejos utilizando las proteínas recombinantes correspondientes. El revelado se realizó con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa con H₂O₂ y diaminobencidina.

Condiciones de cultivo y recolección de muestras

Las plantas homocigotas utilizadas para analizar los niveles de metabolitos y actividades enzimáticas se crecieron en macetas de 8 cm de diámetro (2 por maceta) en cámaras de cultivo utilizando un fotoperiodo de 16 h, con una intensidad lumínica de 120 µmol m⁻² s⁻¹ y una temperatura constante de 23 °C. Las muestras se cosecharon al final del día y al final de la noche dentro de la cámara (4 plantas por replicado biológico, 4 replicados por tiempo y genotipo), se congelaron inmediatamente en N₂ líquido y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Medidas de metabolitos

Los azúcares solubles (glucosa, fructosa y sacarosa) y el almidón se analizarán por métodos enzimáticos, mientras que los niveles de Tre6P, hexosas-fosfato y ácidos orgánicos serán evaluados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Figuerola y col., 2016).

RESULTADOS

Obtención de líneas homocigotas

Las plantas transgénicas (F2) fueron seleccionadas con el herbicida y aquellas líneas con una segregación consistente con la presencia de un único *locus* transgénico (3:1 resistente:sensible) se analizaron en la siguiente generación (F3). Así fue posible obtener las siguientes líneas homocigotas: CoYMV:OtsA1.5 y CoYMV:OtsA2.3; CoYMV:OtsB1.4 y CoYMV:OtsB4.10; y CoYMV:CeITPP1.1 y CoYMV:CeITPP10.5.

Análisis de la expresión

Las hojas cosechadas a partir de las plantas transgénicas (F2 y F3) fueron utilizadas para evaluar la expresión de las proteínas bajo estudio (otsA, otsB y CeITPP) mediante la técnica de *Western blot*. Como se observa en la Figura 1, las líneas seleccionadas expresan las proteínas heterólogas bajo el control del promotor CoYMV. Resulta interesante destacar que los niveles de expresión de dichas proteínas bajo el control del promotor vascular CoYMV resultaron mayores que para el promotor constitutivo 35S (Figura 1).

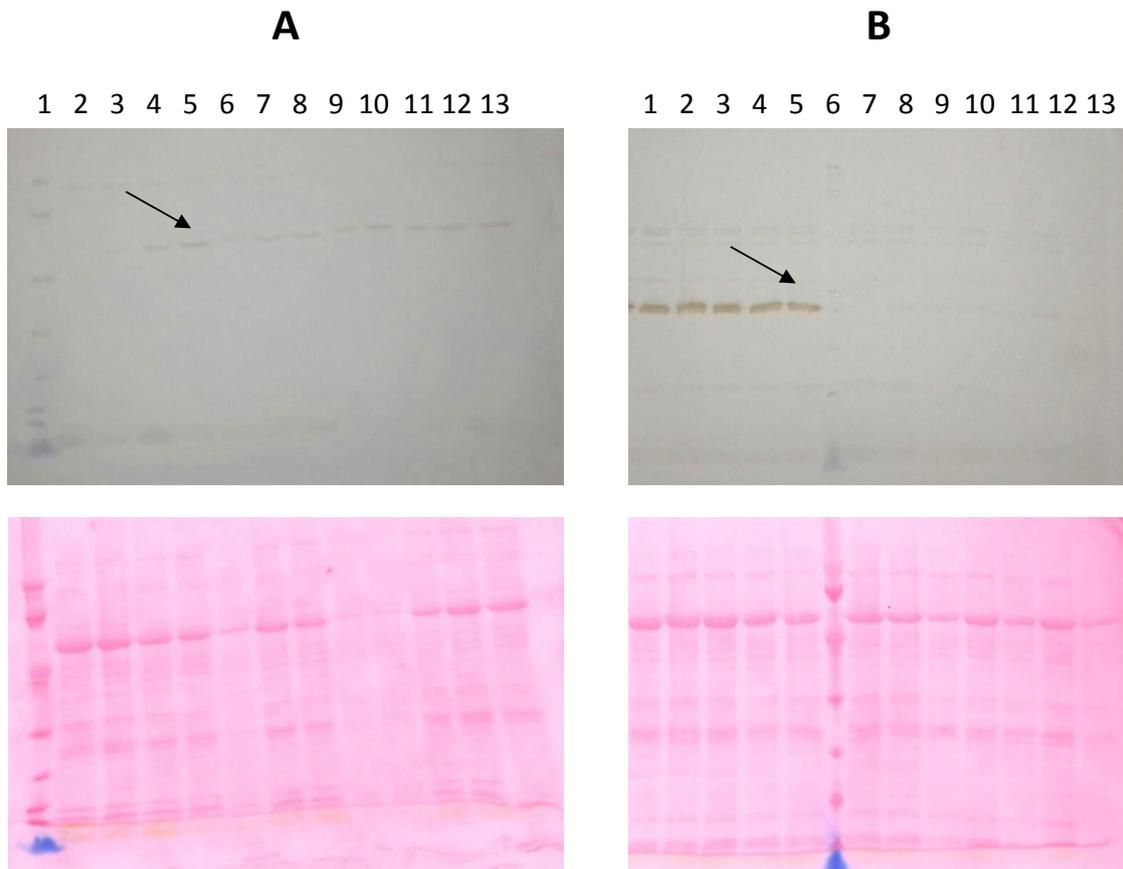


Figura 1. Inmunodetección de las proteínas otsA y otsB expresadas bajo el control del promotor CoYMV en plantas de *A. thaliana* (F2). (A) Calle 1: marcadores de masa molecular; Calle 2: Col-0 (control negativo); Calle 3: 35S:otsA (control positivo); Calles 4-8: diferentes líneas de CoYMV:otsA1; Calles 9-13: diferentes líneas de CoYMV:otsA2. (B) Calles 1-5: diferentes líneas de CoYMV:otsB4; Calle 6: marcadores de masa molecular; Calle 7: Col-0 (control negativo); Calle 8: 35S:otsB (control positivo); Calles 9-13: diferentes líneas de CoYMV:otsB1. En ambos casos se muestran las membranas teñidas con Rojo Ponceau como control de carga.

Análisis de las líneas homocigotas

Una vez obtenidas las líneas homocigotas que expresan otsA, otsB y CeITPP bajo el control del promotor CoYMV, las plantas fueron crecidas bajo condiciones ambientales estrictamente controladas de luz y temperatura y se cosecharon muestras al final del día y al final de la noche. Estas muestras serán utilizadas para analizar los niveles de metabolitos y actividades enzimáticas. Estas experiencias serán útiles para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del metabolismo del carbono por Tre6P en plantas.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Figuroa C.M., Feil R., Ishihara H., Watanabe M., Kölling K., Krause U., Höhne M., Encke B., Plaxton W.C., Zeeman S.C., Li Z., Schulze W.X., Hoefgen R., Stitt M., Lunn J.E., 2016. Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *The Plant Journal*, 85, 410-423.

Figuroa C.M., Lunn J.E., 2016. A tale of two sugars - trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology*, 172, 7-27.

Martins M.C., Hejazi M., Fettke J., Steup M., Feil R., Krause U., Arrivault S., Vosloh D., Figuroa C.M., Ivakov A., Yadav U.P., Piques M., Metzner D., Stitt M., Lunn J.E., 2013. Feedback inhibition of starch degradation in Arabidopsis leaves mediated by trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology*, 163, 1142-1163.

Yadav U.P., Ivakov A., Feil R., Duan G.Y., Walther D., Giavalisco P., Piques M., Carillo P., Hubberten H.-M., Stitt M., Lunn J.E., 2014. The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1051-1068.