



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Análisis del Mecanismo de Activación por Protones  
del Transportador *Pv*AMT1;1 del Frijol**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

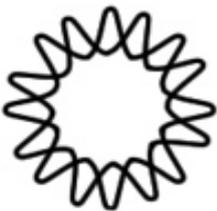
**MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**Carlos Humberto Ortiz Ramírez**

ASESOR DE TESIS:

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala



Cuernavaca, Mor.

Noviembre de 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

# Índice general

<b>1. Resumen</b>	1
<b>2. Introducción</b>	2
2.1 Metabolismo y fijación de nitrógeno.	3
2.2 Transportadores de amonio: importancia y función.	4
2.3 Las familias de los transportadores de amonio.	6
2.4 Sistemas de caracterización.	8
<b>3. Antecedentes</b>	9
<b>4. Justificación</b>	12
<b>5. Hipótesis</b>	13
<b>6. Objetivos</b>	13
6.1 Objetivo general.	13
6.2 Objetivos particulares.	13
<b>7. Metodología</b>	14
7.1 Modelación por homología.	14
7.1.1 Búsqueda y elección de la estructura templado para la elaboración del modelo del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	14
7.1.2 Alineación de las secuencias de los templados y el transportador <i>PvAMT1;1</i> , y cálculo del modelo.	15
7.1.3 Evaluación por minimización energética y obtención de la estructura trimérica.	17
7.1.4 Evaluación de los modelos obtenidos.	18
7.2 Expresión heteróloga del transportador <i>PvAMT1;1</i> en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	19
7.2.1 Extracción del ADN plasmídico de las células bacterianas ( <i>E.coli</i> ) que contienen el ADNc del transportador <i>PvAMT1;1</i> en sus versiones silvestre y mutantes.	19
7.2.2 Transcripción in vitro del ADNc del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	20
7.2.3 Extracción y defoliculación de los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	22
7.2.4 Mircoinyección del ARNc del transportador <i>PvAMT1;1</i> en los ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .	24
7.2.5 Registros electrofisiológicos del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	24
7.3 Mutagénesis dirigida del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	26
7.3.1 Diseño de oligonucleótidos y amplificación del ADN plasmídico mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	26
7.3.2 Digestión de los productos de amplificación.	28
7.3.3 Transformación de Células bacterianas con el ADN plasmídico mutante.	28
7.4 Verificación del proceso de mutagénesis mediante secuenciación.	29

7.4.1 Extracción y purificación de ADN plasmídico mediante el uso de columnas.	30
7.4.2 Secuenciación.	30
7.5 Mediciones de pH intracelular en ovocitos de <i>Xenopus leavis</i> .	31
7.5.1 Silanización de las micropipetas.	31
7.5.2 Llenado y calibración de los microelectrodos selectivos.	32
7.5.3 Mediciones de pH intracelular.	33
7.6 Determinación de la expresión del transportador <i>PvAMT1;1</i> en los diferentes tejidos del frijol.	34
7.6.1 Aislamiento y purificación de ARN de tejidos de frijol.	34
7.6.2 Transcripción reversa para la obtención del ADNc.	36
7.6.3 Amplificación por PCR.	37
<b>8. Resultados</b>	39
8.1 Modelación por homología del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	39
8.2 Generación de mutantes del transportador <i>PvAMT1;1</i> .	46
8.3 Registros electrofisiológicos del transportador <i>PvAMT1;1</i>	48
8.3.1 Caracterización de la versión silvestre de <i>PvAMT1;1</i> .	48
8.3.2 Caracterización de las versiones mutantes de <i>PvAMT1;1</i> .	54
8.4 Mediciones de pH intracelular.	62
8.5 Determinación de la expresión del transportador <i>PvAMT1;1</i> en los diferentes tejidos del frijol.	67
<b>9. Discusión</b>	71
9.1 Diferencias estructurales entre <i>PvAMT1;1</i> y <i>EcAMTB</i> .	71
9.2 Propiedades electrofisiológicas de <i>PvAMT1;1</i> y mediciones de pH intracelular.	74
9.2.1 La histidina 211 es uno de los aminoácidos involucrados en la sensibilidad al pH.	79
9.2.2 Mutantes D404A y E399A: el efecto de residuos polares presentes en el asa extracelular localizada entre los dominios transmembranales 10 y 11.	82
9.2.3 Acidificación intracelular en ovocitos provocada por <i>PvAMT1;1</i> .	85
9.3 Expresión de <i>PvAMT1;1</i> en los tejidos de la planta y su posible papel fisiológico.	92
<b>10. Conclusiones.</b>	95
<b>11. Perspectivas.</b>	96
<b>12. Bibliografía.</b>	98

## Índice de tablas y figuras

<b>Tabla 1.</b>	Amplificación del ADN plasmídico.	27
<b>Tabla 2.</b>	Secuencias de oligonucleótidos conteniendo mutaciones.	28
<b>Tabla 3.</b>	Ciclos para la amplificación del transcrito de <i>PvAMT1;1</i> y actina.	37
<b>Tabla 4.</b>	Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de <i>PvAMT1;1</i> y actina.	37
<b>Tabla 5.</b>	Servidores para modelación por homología.	39
<b>Figura 1.</b>	Evaluación del modelo <i>PvAMT1;1</i> .	41
<b>Figura 2.</b>	Comparación de los modelos estructurales de los transportadores <i>PvAMT1;1</i> y AMTB de <i>E.coli</i> .	43
<b>Figura 3.</b>	Estructura calculada del trímero y aminoácidos importantes en el transportador <i>PvAMT1;1</i> .	45
<b>Figura 4 .</b>	Comparación entre las secuencias del DNA de las versiones mutantes y el DNA del gen silvestre.	47
<b>Figura 5.</b>	Corrientes entrantes provocadas por la expresión de <i>PvAMT1;1</i> .	49
<b>Figura 6.</b>	La magnitud de las corrientes entrantes de amonio y el potencial de inversión son dependientes del pH externo.	51
<b>Figura 7.</b>	El potencial de inversión y la afinidad del transportador por el amonio son dependientes del pH.	52
<b>Figura 8.</b>	La actividad de la mutante <i>PvAMT1;1H211E</i> es independiente del pH extracelular.	55
<b>Figura 9.</b>	La mutante <i>PvAMT1;1H211E</i> pierde afinidad por el amonio.	56
<b>Figura 10.</b>	La actividad de la mutante E399A es muy similar a la registrada en la silvestre.	58
<b>Figura 11.</b>	La mutante <i>PvAMT1;1D404A</i> es parcialmente dependiente del pH extracelular.	60
<b>Figura 12.</b>	La afinidad de la mutante <i>PvAMT1;1D404A</i> es menos dependiente del potencial de membrana.	61
<b>Figura 13.</b>	<i>PvAMT1;1</i> provoca la acidificación del pH intracelular de ovocitos expuestos a amonio.	64
<b>Figura 14.</b>	La acidificación del citoplasma fue de menor magnitud cuando los ovocitos fueron expuestos a un pH extracelular de 5.5.	65
<b>Figura 15.</b>	Los cambios en el pH intracelular de ovocitos expresando la mutante <i>PvAMT1;1H211E</i> fueron menores en respuesta al $\text{NH}_4^+$ .	66
<b>Figura 16.</b>	Cambios en el pH intracelular y en el potencial de membrana de ovocitos expresando <i>PvAMT1;1</i> o a la mutante <i>PvAMT1;1H211E</i> en respuesta al $\text{NH}_4^+$ .	68
<b>Figura 17.</b>	Expresión del transcrito <i>PvAMT1;1</i> en los diferentes tejidos del frijol.	70
<b>Figura 18.</b>	Modelo del mecanismo de transporte de <i>PvAMT1;1</i> .	90

## 1. Resumen

En las plantas, los transportadores de amonio son muy importantes para la adquisición de nitrógeno del suelo. Este nutriente mineral es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas, clorofila y algunos metabolitos secundarios, por lo que su disponibilidad es uno de los factores limitantes para el crecimiento vegetal. Con la caracterización de varios transportadores de amonio ha sido posible determinar algunas de sus propiedades de transporte, la mayoría posee una alta afinidad y una fuerte selectividad hacia su sustrato; sin embargo, aún existen muchas dudas acerca del mecanismo exacto por el cual el  $\text{NH}_4^+$  es translocado a través del poro de estas proteínas. Se ha sugerido la posibilidad de que algunos transportadores de amonio puedan funcionar como co-transportadores  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ , aunque no existen suficientes evidencias para comprobar dicha hipótesis. En este trabajo se utilizó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* para expresar y caracterizar eletrofisiológicamente al transportador de amonio *PvAMT1;1* de *Phaseolus vulgaris*. Se encontró que existe una fuerte dependencia entre la actividad del transportador y la concentración extracelular de protones. Dicha actividad aumenta conforme el pH externo se acidifica, lo que sugiere un posible mecanismo de co-transporte acoplado a protones. Para explorar esta posibilidad se realizaron mediciones de pH intracelular en ovocitos expresando la proteína que fueron expuestos a soluciones con  $\text{NH}_4^+$ , y se observó una acidificación de 0.2 unidades de pH; esto sugiere que *PvAMT1;1* efectivamente funciona como un simportador  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ . Así mismo, se determinó mediante la generación de mutantes puntuales del transportador, que la histidina 211 es uno de los aminoácidos que define el mecanismo de transporte y que su presencia es necesaria para observar la dependencia del pH extracelular. Finalmente, mediante el uso de RT-PCRs, fue posible observar la expresión del transcrito de *PvAMT1;1* principalmente en la raíz y nódulos del frijol, en donde su presencia puede ser requerida para la adquisición del amonio cuando éste se encuentra en bajas concentraciones.

## 2. Introducción

### 2.1 Metabolismo y fijación del nitrógeno

El nitrógeno es un nutriente esencial para todos los sistemas biológicos. Es un componente estructural básico de todos los aminoácidos, así como de las bases nitrogenadas que son usadas en la síntesis de los ácidos nucleicos y otros nucleótidos como el ATP y GTP. Debido a su papel esencial, la obtención de cantidades adecuadas de este elemento es una prioridad para los seres vivos. En el caso particular de las plantas, el nitrógeno es el nutriente mineral requerido en mayor proporción (Taiz & Zeiger, 2006), y para su aprovechamiento, es especialmente importante la conversión del nitrógeno molecular ( $N_2$ ) a su forma reducida como amoníaco ( $NH_3$ ) o amonio ( $NH_4^+$ ).

Debido a la alta energía de activación necesaria para romper el triple enlace del nitrógeno molecular y llevar a cabo su reducción, en la naturaleza existen pocas vías para la formación de amonio *de novo*. La más común, responsable de por lo menos el 60% del nitrógeno que se agrega a los ecosistemas cada año es la fijación biológica, que hace uso de enzimas con alta capacidad reductora, producidas por algunos microorganismos como cianobacterias, bacterias y unas pocas especies de hongos (Berg, Tymoczko & Stryer, 2002). En muchos casos dichos microorganismos viven en simbiosis con las plantas, como sucede en la mayoría de las leguminosas. Bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* son incorporadas dentro de las células vegetales en la raíz, y en algunos casos, en el tallo, donde forman compartimentos especiales que las contienen llamados simbiosomas. La planta es la encargada de formar la membrana del simbiosoma a través de la cual se intercambian diversos metabolitos, principalmente malato como fuente de carbono para el bacteriote y  $NH_4^+$  producido por estos microorganismos como suplemento para la planta (Taiz & Zeiger, 2006).

El proceso de simbiosis es relevante no sólo en términos biológicos, sino también en términos ecológicos y económicos. Por ejemplo, actualmente se añaden a cultivos de temporal, como el maíz, una cantidad aproximada de 200 kg de  $\text{NH}_4^+$  en forma de fertilizantes por hectárea cada año; esto representa un tercio del costo energético total generado por dicho cultivo. Por otro lado, en los climas templados el cultivo de leguminosas puede llevar a la fijación de hasta 400 kg de  $\text{NH}_4^+$  por hectárea en un año, por lo que se les ha considerado como “abono verde” (Held, 2005).

Sin embargo, debido a que el costo energético del proceso de fijación biológica de nitrógeno es extremadamente elevado (la reacción química consume 16 moléculas de ATP, 8 electrones y 18  $\text{H}^+$  para sintetizar dos moléculas de  $\text{NH}_4^+$ ), la formación de nódulos es regulada de acuerdo a la disponibilidad de compuestos nitrogenados presentes en el suelo. Cuando estos se encuentran en cantidad suficiente, la planta no es susceptible a ser infectada por bacterias fijadoras de nitrógeno, eliminando así el gasto energético que implica producir los tejidos y metabolitos necesarios para la simbiosis. En dichas condiciones el nitrógeno puede ser adquirido directamente del suelo como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o amonio; ambos compuestos son originados por la descomposición de la materia orgánica. El amonio es liberado como producto de la ruptura de los aminoácidos y en presencia de oxígeno es oxidado a nitrato por bacterias nitrificantes (Heldt, 2005).

La proporción  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  varía considerablemente dependiendo del tipo de suelo y ecosistema. En un suelo cultivable promedio, por ejemplo, la concentración de  $\text{NH}_4^+$  es cercana a 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la concentración de nitrato es aproximadamente 60 veces mayor (3100  $\mu\text{M}$ ), por lo que este último excede en gran medida al primero, y en cuanto a su asimilación a nivel de las raíces, se vuelve la especie química más relevante. Sin embargo, en algunos suelos con alto contenido de humedad, poca aireación y un pH ácido, como los que encontramos en bosques y selvas que han alcanzado cierta “madurez” y que cuentan con un

ambiente húmedo, la oxidación no se lleva a cabo y el amonio es la especie química dominante (Forde & Clarkson, 1999).

En los casos en que ambos compuestos nitrogenados se encuentran presentes, las plantas favorecen la absorción de amonio, ya que el nitrato tiene que ser reducido a amonio en las células corticales y epidérmicas de la raíz para poder ser metabolizado. Esta reacción es sumamente costosa en términos energéticos y procede en dos pasos: la reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que se lleva a cabo principalmente en el citoplasma por la nitrato reductasa y que consiste en la transferencia de electrones provenientes del NADH hacia el nitrato. Y como segundo paso, la subsecuente reducción del nitrito a amonio en los cloroplastos y leucoplastos por la enzima nitrito reductasa. En esta última reacción se requieren 6 electrones por cada molécula de amonio y se utiliza a la ferredoxina como donador de electrones, los cuales son generados por el fotosistema I, en el caso de los cloroplastos, y por la oxidación de las pentosas fosfato, en el caso de los leucoplastos (Heldt, 2005).

## **2.2 Transportadores de amonio: importancia y función**

Cualquiera que sea la vía involucrada en la adquisición de compuestos nitrogenados, proteínas de transporte presentes en las membranas celulares son responsables de la absorción de dichos compuestos. El transporte de amonio no sólo se da a través de la membrana plasmática, también ocurre en las membranas de cloroplastos, mitocondrias, vacuola y simbiosomas (Howitt & Udvardi, 1999). Las concentraciones de amonio varían considerablemente en los diferentes espacios intra y extracelulares, lo cual resulta relevante ya que dichas variaciones determinan la velocidad y la forma en la que se lleva a cabo su transporte.

En el caso de la membrana plasmática, por ejemplo, se propone que el transporte de amonio se da de manera activa en contra de su gradiente químico, ya que la concentración de amonio en el citoplasma se ha calculado alrededor de 1 mM,

mientras que las concentraciones de amonio en el exterior son de 3 – 10  $\mu\text{M}$ . Lo mismo ocurre en el caso del transporte al interior de la vacuola, ya que la concentración de amonio en este espacio es de 2 a 5 veces mayor que la del citoplasma circundante; además debido a que la vacuola tiene una carga eléctrica positiva la acumulación de amonio se haría también en contra de su gradiente eléctrico (Britto & Glass, 2001).

Así mismo, la mitocondria es otro organelo en el cual la entrada y salida de amonio es de gran importancia, particularmente durante el proceso de fotorrespiración. En la fotorrespiración, la desaminación de la glicina genera grandes cantidades de amonio, el cual tiene que ser transportado hacia el cloroplasto para incorporarlo en forma de aminoácidos por medio de la glutamina sintasa. Se ha calculado que la concentración de amonio en mitocondrias de maíz es de 3.6 a 5 mM, por lo que es probable que su transporte fuera de la mitocondria se lleve a cabo de manera pasiva (Howitt & Udvardi, 1999).

En el caso del cloroplasto, se sabe muy poco sobre el transporte y las concentraciones de amonio que se acumulan en el estroma, pero debido a que es el principal sitio en el que éste se asimila para ser incorporado a los aminoácidos, es evidente la necesidad de importar dicho compuesto del citoplasma de forma rápida y eficiente; sobre todo si consideramos que su acumulación excesiva en el citoplasma resulta muy tóxica para la célula.

Todo este movimiento del amonio dentro y fuera de la célula vegetal y sus organelos, sugiere claramente una diversidad en los mecanismos de transporte específicos involucrados en dicha tarea; por lo tanto, es probable que la cinética observada en los distintos transportadores sea también muy variable. Por ejemplo, con base al uso de protonoforos e inhibidores de la bomba de  $\text{H}^+$  de la membrana plasmática (P-ATPasa), se ha sugerido que el transporte de amonio es un proceso de transporte activo, relacionado con el potencial de membrana y su gradiente de protones (Williams & Miller, 2001). Sin embargo, el empleo de estos inhibidores, al

modificar tanto al potencial de membrana como al gradiente de protones, podrían afectar a otro tipo de transportadores como los canales iónicos o uniportadores.

Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de transporte pueden ser diversos. De acuerdo a las concentraciones extra e intracelulares de amonio reportadas (ver arriba), y considerando un potencial de membrana normal de -120 mV, el transporte de amonio estaría muy cercano al equilibrio por lo que se ha sugerido que este puede ser realizado por un co-transportador amonio/protones. Alternativamente, si la concentración intracelular de amonio es significativamente menor a 1 mM o el potencial de membrana es más negativo a -120 mV, el transporte de amonio podría ocurrir por la actividad de un canal iónico o un uniportador.

### **2.3 Las familias de los transportadores de amonio**

Los transportadores de amonio están altamente conservados a lo largo de la escala filogenética, lo que confirma su relevancia biológica. Hasta el momento, estas proteínas se han encontrado en los grupos eubacteria, archaea, fungi, nemátodos, insectos, peces y primates, con alrededor de 200 transportadores identificados. En muchos organismos se han identificado varias copias de genes que codifican para transportadores de amonio. Las bacterias y archaeas cuentan, por lo regular, con dos o más genes; las levaduras, por su parte, cuentan con tres; la planta modelo *Arabidopsis thaliana* posee 8 genes, y en el arroz se han encontrado hasta 10 genes (Wirén & Merrick, 2004). Múltiples copias génicas sugieren la presencia de transportadores con afinidades y características diferentes pero complementarias, que le permiten al organismo reaccionar ante los cambios y exigencias ambientales.

En general los transportadores de amonio se agrupan dentro de las familias de proteínas Amt, MEP y Rh (Zeng et al, 2004). Aquellos transportadores caracterizados dentro de la familia Amt pertenecen a plantas (Amt1 y Amt2) y

bacterias (AmtB); mientras que en la familia MEP y Rh encontramos aquellos presentes en levaduras y humanos, respectivamente (Khademi et al., 2004). La nomenclatura actual para los transportadores de plantas incluye, primero, las iniciales que indican el género y especie, seguidos del nombre de la familia y del número del gen/proteína de la cual se trate.

En lo que se refiere a la familia Amt1 en plantas, se ha observado que los transportadores que la conforman poseen distintas afinidades por sus sustrato: se ha determinado una  $K_m$  de 8  $\mu\text{M}$ , 24  $\mu\text{M}$  y 11  $\mu\text{M}$  para los transportadores AtAMT 1;1, AtAMT 1;2 y AtAMT1;3 respectivamente en *Arabidopsis thaliana*, por lo que se trata de sistemas de transporte de alta afinidad y alta selectividad, como se ha comprobado cuando son expuestos a una variedad de otros cationes similares como es el caso del  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Li}^+$ . Todos los transportadores que se han identificado en plantas son homólogos, con una identidad mínima de 70%, con la excepción del transportador AtAMT2;1 de *Arabidopsis*, el cual sólo tiene un 25% de identidad y es más parecido a los transportadores de bacterias y levaduras. Por esta razón se ha clasificado dentro de otra familia llamada AMT2, la cual aun no está caracterizada respecto a sus características de transporte (Williams & Miller, 2001).

Existen muchas similitudes estructurales y funcionales entre los transportadores de plantas, bacterias, hongos y animales; son proteínas integrales de membrana que poseen 11  $\alpha$  hélices transmembranales, un dominio N terminal extracitoplásmico y un dominio C terminal citoplásmico que cuenta con por lo menos 30 residuos, de los cuales sólo los primeros 25 se encuentran altamente conservados, mientras que los restantes parecen ser específicos de cada especie. Algunas proteínas pueden llegar a tener hasta 150 residuos en dicho dominio (Wirén & Merrick, 2004). La única excepción a esta topología general son los transportadores Rh, que al parecer cuentan con 12 hélices transmembranales y un dominio N terminal citoplásmico. En la membrana estas proteínas existen como oligómeros, formando trímeros en la mayoría de los casos. Se ha comprobado que

los monómeros pueden interaccionar entre sí mediante su dominio C terminal, provocando así la inactivación de toda la estructura trimérica (Loqué et al, 2007).

## **2.4 Sistemas de caracterización**

La caracterización funcional de los transportadores de amonio se ha realizado en su mayor parte utilizando el sistema de expresión heteróloga en levaduras, utilizando cepas cuyos transportadores endógenos han sido suprimidos (*mep1Δ mep2Δ mep3Δ*); cabe resaltar que en estos estudios se utiliza metilamonio como análogo del amonio, ya que el grupo metilo puede ser marcado radioactivamente facilitando su cuantificación (Howitt & Udvardi, 1999). En otros casos, la caracterización se ha hecho mediante técnicas electrofisiológicas, utilizando el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*; con la ventaja de que es posible detectar directamente el transporte de amonio, así como caracterizar algunas de sus propiedades electroquímicas y cinéticas (Mayer et al, 2006).

La reciente clonación del primer transportador de amonio en *Phaseolus vulgaris* (*PvAMT1;1*) y su parcial caracterización en el sistema de expresión heteróloga en *Xenopus laevis* ha demostrado que este transportador posee una alta afinidad por el amonio ( $K_m = 28 \mu\text{M}$ ) y es estimulado por la acidificación del pH extracelular, lo que sugiere que funciona como un transportador acoplado a protones. La determinación del mecanismo específico por el que *PvAMT1;1* transporta al amonio puede contribuir a despejar algunas dudas sobre el funcionamiento de los transportadores de amonio en general, y de la familia de transportadores AMT de plantas, en particular.

### 3. Antecedentes

Se han llevado a cabo diversos estudios en los cuales se pretende describir el mecanismo específico de transporte de amonio en los AMT's; particularmente enfocándose en el papel que juegan los distintos aminoácidos presentes en regiones clave del transportador. Existen controversias particulares en torno a la identidad química de la especie transportada a través del supuesto poro (amonio o amoniaco), así como en el tipo de transporte involucrado; esto es: si funciona como un canal, un uniportador o un co-transportador.

Con base en la estructura cristalográfica del transportador AmtB de *E. coli*, se sugiere que dicho transportador es de hecho un canal que recluta preferentemente al catión amonio en la región periplasmática, el cual es subsecuentemente desprotonado a amoniaco por un par de histidinas altamente conservadas en la región media del poro, y finalmente liberado al citoplasma celular donde se protona rápidamente debido al pH intracelular que oscila entre 7.2-7.5 (Khademi *et al*; 2007). Por otra parte Zheng y colaboradores reportaron en el 2004 otra estructura cristalográfica también de AmtB y coinciden en que la especie química más probable en ser reclutada es el catión amonio, para lo cual proponen a dos fenilalaninas, un triptófano y una serina, residuos altamente conservados en la familia AMT, como los aminoácidos implicados en dicha unión. Este grupo, en cambio, propone que AmtB es un transportador, ya que los valores calculados para el transporte de amonio/amoniaco por segundo son muy bajos para ser el resultado de la actividad de un canal.

La desprotonación del  $\text{NH}_4^+$  y el transporte de  $\text{NH}_3$  a través del poro es un mecanismo que algunos grupos han cuestionado fuertemente. Mayer y colaboradores en el 2006, utilizando el sistema de expresión en ovocitos reportan corrientes entrantes para el transportador *LeAMT1;1* de tomate al fluir soluciones de amonio, lo que claramente indica el transporte de un catión que puede ser

$\text{NH}_4^+$ , o alternativamente el co-transporte de  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$  (el  $\text{NH}_3$  es electroneutro y su movimiento a través de la membrana no provocaría corriente alguna). Estos resultados se han complementado con mediciones del pH intracelular, el cual se acidifica cuando el ovocito es expuesto a concentraciones altas de amonio, reforzando la hipótesis que sugiere al  $\text{NH}_4^+$  como la especie transportada. Si por el contrario, fuera  $\text{NH}_3$  la especie química que es transportada a través de la membrana, éste se protonaría rápidamente en el citoplasma a pH fisiológico y provocaría la alcalinización del ambiente intracelular. Este mismo grupo, así como Ninnemann, Jauniaux y Frommer (1994) proponen la posibilidad de un mecanismo de co-transporte  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ .

Los resultados hasta ahora obtenidos en nuestro grupo sobre la caracterización del transportador de frijol *PvAMT1;1* concuerdan con los obtenidos por Meyer y colaboradores en el 2006, ya que también hemos observado corrientes entrantes en respuesta al  $\text{NH}_4^+$  cuando el transportador es expresado en el sistema de ovocitos. Además, este transportador muestra dependencia del pH extracelular, lo que sugiere que efectivamente *PvAMT1;1* puede funcionar como un co-transportador  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ . *PvAMT1;1* presenta cierta homología con los otros AMTs de plantas y de *E. coli*. El transportador de *Lotus japonicus* (una leguminosa), por ejemplo, es el más cercano con 72% de identidad en su secuencia de aminoácidos, mientras que el de *A. thaliana* es idéntico en un 68%. En el caso del transportador AmtB de *E. coli* la identidad disminuye a 28%; sin embargo, la región del poro parece estar altamente conservada para todos los AMTs, donde los aminoácidos que se proponen participan en la unión al amonio, y las histidinas que actúan como donadores o aceptores de protones se encuentran altamente conservados.

A pesar de que se ha sugerido que el paso del  $\text{NH}_4^+$  a través de las dos histidinas localizadas en el poro es energéticamente desfavorable (Khademi et al., 2007), Lamoureux y colaboradores en el 2007 propusieron en base a simulaciones de dinámica molecular, la posibilidad de que ambos aminoácidos actúen como

donadores de protones en la formación de enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, formando así una cadena de agua que atraviese el poro. Esto permitiría el paso del catión  $\text{NH}_4^+$  así como la translocación de protones mediante el mecanismo de Grotthuss, que consiste en la difusión de un protón a través de una “cadena” de moléculas de agua cuya orientación le permite a sus oxígenos recibir y donar al mismo tiempo uno de sus protones (Decoursey, 2008). Este tipo de transporte probablemente implicaría la participación de aminoácidos que permitan la concentración de protones en el “vestíbulo” extracelular del poro, así como residuos que detecten los cambios en el pH y regulen la entrada del amonio. Por lo tanto, es necesario un estudio más detallado del transportador *PvAMT1:1*, tomando en cuenta dichas consideraciones, para explicar los datos electrofisiológicos que se han obtenido hasta ahora en el grupo.

## 4. Justificación

El alto grado de conservación de los transportadores de amonio a lo largo de la escala filogenética evidencia su enorme importancia para los sistemas biológicos. En el caso de las plantas, la adquisición y transporte de compuestos nitrogenados es un proceso esencial para su crecimiento y desarrollo. Desde el punto de vista agropecuario, el impacto tanto económico como ecológico que implica la aplicación de grandes cantidades de fertilizantes para suplementar dichos requerimientos nutricionales hace evidente la necesidad de profundizar más en el conocimiento de los mecanismos implicados en su absorción y metabolismo.

Por otra parte, existen numerosas controversias en cuanto al mecanismo de transporte y fisiología de estas proteínas; y aunque se han sugerido modelos en base a la estructura cristalográfica del AmtB de *E. coli*, trabajos realizados con transportadores de plantas muestran resultados contradictorios. En este contexto, la caracterización del transportador PvAMT1;1 contribuirá a ampliar el conocimiento que se tiene sobre su funcionamiento general, y posiblemente ayude a proponer o corroborar mecanismos de transporte aún inciertos. Este transportador resulta de particular interés, ya que es el único que responde a variaciones en las concentraciones externas de protones. Identificar los aminoácidos implicados en ésta y otras funciones es importante para entender el papel fisiológico de este grupo de transportadores, incluidos los presentes en humanos.

## 5. Hipótesis

El transportador *PvAMT1:1* presenta una fuerte dependencia de la concentración extracelular de protones, por lo que posiblemente pueda presentar un mecanismo de co-transporte  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  ó  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ .

## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Caracterizar funcionalmente al transportador *PvAMT1;1*

### 6.2 Objetivos particulares

- Modelar la estructura cuaternaria del transportador *PvAMT1;1* en base a la estructura cristalográfica del transportador homólogo AmtB de *E. coli*.
- Identificar los aminoácidos implicados en la posible activación por pH.
- Realizar mutagénesis dirigida de los aminoácidos candidatos para comprobar su relación con la sensibilidad del transportador a la concentración extracelular de protones.
- Caracterizar electrofisiológicamente al transportador *PvAMT1;1* y sus versiones mutantes mediante su expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.
- Identificar la especie química que atraviesa la membrana mediante mediciones del pH intracelular en ovocitos expuestos a soluciones con amonio.

## 7. Metodología

### 7.1 Modelación por homología

El proceso para la obtención del modelo estructural por homología de cualquier proteína se puede resumir en 4 etapas: búsqueda de estructuras homólogas a la proteína de interés (templado), migración de la secuencia de aminoácidos de la proteína de interés a las coordenadas tridimensionales del templado, cálculo del modelo, minimización energética y evaluación de dicho modelo.

#### 7.1.1 Búsqueda y elección de la estructura templado para la elaboración del modelo del transportador PvAMT1;1

Inicialmente se hizo un búsqueda de las estructuras disponibles utilizando la herramienta de “Basic Local Alignment Search Tool” o BLAST por sus siglas en ingles, seleccionando como base de datos para dicha búsqueda al “*Protein data bank*” o PDB por sus siglas en ingles. Esto nos permitió localizar las estructuras cristalográficas disponibles de otros miembros de esta familia de transportadores. Se encontraron las estructuras de dos transportadores de amonio: el AMTB de *E. coli* y el AMT1 de *Archaeoglobus fulgidus*. Además, se encontraron algunas estructuras depositadas de cristales obtenidos con modificaciones como mutaciones, la presencia de proteínas anexas y cambios de sustrato. El BLAST identifico un total de 28 estructuras depositadas en el PDB, las cuales tenían una identidad significativa a nivel de secuencia (del 27% al 40%). Sin embargo, muchas de estas estructuras sólo tenían similitud con pequeños fragmentos peptídicos de nuestra proteína (20 a 60 residuos), por lo que no fueron tomadas en cuenta. El valor de similitud más alto, con 28% de identidad y 45% de similitud, correspondió al transportador AmtB de *E. coli* cuyo cristal fue obtenido en conjunto con la proteína de transducción de señales GlnK, y cuyo código de acceso en el PDB es 2NS1. En cuanto al transportador de *A. fulgidus* también

tiene un 28% de identidad pero un 44% de similitud, por lo que se sugiere como la segunda mejor opción. Cabe señalar que la molécula GlnK se encuentra unida al transportador AmtB desde la región citoplásmica y no interfiere con la estructura que es de nuestro interés.

El *software* y los servidores utilizados para la elaboración de los modelos se eligieron tomando en cuenta varios criterios. Debido a que la similitud entre el transportador AmtB de *E. coli* y el transportador PvAMT1;1 está en el límite de lo recomendable para la elaboración de un modelo por homología (28-30%), se requieren métodos específicos para la alineación de las secuencias de aminoácidos y cálculos de los modelos que permitan tener una mayor confiabilidad en el resultado final. Se tomaron en cuenta recomendaciones previamente reportadas para dichos casos (Eswar *et al*; 2006). Se modelaron 3 estructuras del transportador PvAMT1;1 utilizando los servidores *ModWeb*, *CPHmodels* y *Swiss Model*.

#### 7.1.2 Alineación de las secuencias de los templados y el transportador PvAMT1;1, y cálculo del modelo

En dos de los tres modelos generados se utilizó un alineamiento de secuencias *perfil-perfil*, el cual genera un “perfil” de la secuencia de la proteína de interés en base a un alineamiento múltiple de secuencias y a la matriz de datos que se genera de éste. Dicha matriz asigna una posición por cada aminoácido en las secuencias alineadas y calcula la proporción en la que encuentra a un mismo residuo en esa posición, el perfil es constituido por estas “proporciones” y no por aminoácidos específicos, lo que disminuye la presencia de huecos “gaps” en las alineaciones (Gribskov *et al*, 1987). Una vez generado este perfil se compara contra una base de datos que contiene otros perfiles, los cuales se utilizan como templado. Además de permitir la identificación de un mayor número de estructuras templado, este método es capaz de alinear correctamente un 68% de los residuos en la secuencia, lo cual significa más del doble que con los métodos de alineación

convencionales (pairwise alignment) (Marti-Renom et al, 2004). En el caso del tercer modelo se realizó un alineamiento estructura-secuencia, en el cual se utiliza información estructural de los templados para deducir el plegamiento de la proteína, por lo que la alineación de las secuencias no depende exclusivamente de su similitud a nivel de aminoácidos. Esta aproximación se recomienda para los casos en los que el porcentaje de identidad entre la proteína de interés y el templado está por debajo del límite de confiabilidad (28% a 30%).

Las alineaciones *perfil-perfil* se llevaron a cabo utilizando los servidores CPHmodels 3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>) y el modulo SALIGN de la aplicación MODELLER que utiliza de forma automatizada el servidor Modweb (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html>), ambas metodologías se han descrito previamente (Nielsen *et al*; 2008 & Marti-Renom *et al*; 2004). El alineamiento de tipo estructura-secuencia se realizó utilizando el software Swiss-PdbViewer 4.0 descargado gratuitamente de la página de internet del Instituto Suizo de Bioinformática (<http://spdbv.vital-it.ch/>). El protocolo que se siguió para dicha alineación puede consultarse en la página de internet de ese mismo instituto ([http://spdbv.vital-it.ch/modeling\\_tut.html](http://spdbv.vital-it.ch/modeling_tut.html)).

El cálculo de los modelos se llevó a cabo de forma automatizada utilizando los servidores antes mencionados. CPHmodels y Swiss Model llevan a cabo el cálculo del modelo identificando y separando distintas secciones dentro de la proteína de acuerdo a su grado de conservación. Se genera un “marco” de la proteína con base en las coordenadas de los átomos de los carbonos alfa que componen las regiones más conservadas del templado, para posteriormente superponer los carbonos de la cadena principal de la proteína a modelar con los correspondientes en el marco previamente generado. Las asas, por ser segmentos que presentan una gran variación, se modelan de forma distinta y no son considerados en los cálculos anteriores. Estos son creados mediante búsquedas de posibles conformaciones en bases de datos; así mismo, los grupos laterales de los aminoácidos se modelan en base a sus preferencias de conformación intrínseca y

comparándolos con las conformaciones de los mismos residuos en el templado. Dicha metodología se denomina “ensamblaje de cuerpos rígidos” (Eswar *et al*; 2006).

Finalmente, el servidor ModWeb utiliza la aplicación MODELLER para realizar los cálculos del modelo. En este caso se genera una serie de restricciones para la estructura de la proteína a modelar con base en el alineamiento de su secuencia con el templado. Se asume que las distancias que separan a los diferentes residuos del templado y la proteína de interés son similares, aunque la identidad de los aminoácidos no sea exacta. Estas restricciones se complementan con otras de tipo estereoquímico (ángulos diaedrales, extensión y ángulo de enlaces) y contactos átomo-átomo obtenidos de campos de fuerza de mecánica molecular. Finalmente el modelo se deriva minimizando las violaciones de todas estas restricciones (Fiser *et al*; 2000).

### *7.1.3 Evaluación por minimización energética y obtención de la estructura trimérica*

Para llevar a cabo la minimización energética, se utilizó el programa CNS versión 1.2 (<http://cns.csb.yale.edu/v1.2/>). No obstante que este programa está diseñado para ajustar modelos cristalográficos, es posible minimizar energéticamente la posición de los confórmers de cada aminoácido fijando previamente la posición de los carbonos alfa. Esto permite que los grupos laterales se ubiquen en posiciones energéticamente más favorables. En una segunda etapa, se liberó la restricción de movimiento sobre los carbonos alfa en las regiones de los loops que presentaban grandes variaciones entre los modelos. Dichas regiones contienen a los siguientes residuos: his125 – asp130, pro183 – asn193, gly230 – thr 235, phe268 – tyr281, y glu395 – gly403; todos se encuentran en la cara periplásmica del transportador *PvAMT1*;1. Se decidió minimizar esta zona, incluyendo los carbonos alfa, debido a que contiene la menor identidad con el templado estructural, por lo que se sabe *a priori* que las coordenadas correspondientes del

modelo no tienen sustento en el templado. De esta manera se obtuvo un modelo tridimensional monomérico de la proteína PvAMT1;1.

Finalmente, con el fin de generar la estructura trimérica, se utilizó la estructura cristalográfica del depósito 2NS1. Una vez ensamblado el trímero se corroboró que la trimerización no diese lugar a colisiones entre los monómeros. Debido a que estas colisiones no se presentaron en la traza de carbonos alfa, pero sí en ciertas cadenas laterales, se procedió a minimizar la posición de las cadenas laterales para evitarlas. El resultado fue un modelo teórico del trímero del transportador PvAMT1;1.

#### *7.1.4 Evaluación de los modelos obtenidos*

Los modelos se evaluaron visualmente al superponerlos con la estructura de la proteína templado (el cristal del transportador AMTB de *E. coli*) con el objetivo de advertir posibles cambios estructural bruscos entre ellos. De la misma manera, se evaluaron las diferencias entre los tres modelos al compararlos entre sí. También se utilizó la aplicación PROCHECK, la cual determina que tan normal es la geometría de los residuos en una estructura comparada con parámetros estereoquímicos obtenidos de estructuras cristalográficas de alta resolución. Así mismo, se utilizó QMEAN, a través del servidor del Instituto Suizo de Bioinformática, para evaluar la calidad global del modelo teniendo en cuenta factores como el potencial de los ángulos de torsión, el potencial de solvatación y el potencial de distancia entre residuos para analizar interacciones “lejanas”. En base a la inspección visual y a los valores obtenidos de dichos análisis se seleccionó el modelo que parecía más estable y que mejor se ajustaba a la estructura cristalográfica que se utilizó como templado.

## **7.2 Expresión heteróloga del transportador PvAMT1;1 en ovocitos de *Xenopus laevis***

Para analizar las propiedades de transporte de PvAMT1;1 se empleó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* el cual requiere de la transcripción *in vitro* del ADN complementario (ADNc) que codifica para el transportador PvAMT1;1, de tal forma, que se obtenga una cantidad suficiente de ARNc para microinyectar dichos ovocitos, provocando una sobreexpresión de la proteína en la membrana que permita llevar a cabo los registros electrofisiológicos de su actividad.

### *7.2.1 Extracción del ADN plasmídico de las células bacterianas (E.coli) que contienen el ADNc del transportador PvAMT1;1 en sus versiones silvestre y mutantes*

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el protocolo de lisis alcalina como lo describe Sambrook y colaboradores en 1989 con ligeras modificaciones. Se transfirió una sola colonia de *E. coli* (XL1-Blue) conteniendo el plásmido de interés en 50 ml de medio LB líquido (triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y pH ajustado a 7.0 con NaOH) con 50 µg/ml de ampicilina como antibiótico de selección y se incubó toda la noche (aproximadamente 12 horas) a 37 °C en agitación continua. Posteriormente se transfirieron los 50 ml del cultivo a tubos eppendorf de 1.5 ml. Se centrifugaron a 12,000 g por 30 s a 4 °C (centrífuga Beckman GS-15R) para sedimentar las células. A continuación se removió el sobrenadante por aspiración dejando el precipitado de células lo más seco posible, para lo cual se utilizó un mecanismo de vacío conectado a una pipeta de punta fina. El precipitado se resuspendió en 100 µl de solución I (50mM de glucosa, 25mM de Tris-HCL pH 8.0, 10mM de EDTA pH 8.0 y 0.5 µg/µl de enzima RNAasa) enfriada en hielo, teniendo cuidado de mezclar bien. Posteriormente se agregaron 200 µl de solución II (0.2 N de NaOH y dodecilsulfato sódico (SDS) al

1%) y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron 150 µl de Acetato de amonio (NH<sub>4</sub>Ac) almacenado a -20°C a una concentración de 7.5 M. Se agitaron los tubos 3 veces y se colocaron en hielo por 10 min (esto permitió precipitar el ADN genómico). A continuación se centrifugaron los tubos a 12,000 g por 15 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Finalmente, se precipitó el ADN plasmídico de doble cadena con 2 volúmenes del etanol frío al 100%, incubando por 2 min para después centrifugar a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se lavó el precipitado con un 1ml de etanol frío al 70%.

### 7.2.2 Transcripción *in vitro* del ADNc del transportador PvAMT1;1

La construcción del plásmido pOO2 conteniendo al ADNc del transportador PvAMT1;1 en sus versiones silvestre y mutantes se digirió utilizando la enzima de restricción Bbr PI siguiendo las recomendaciones del proveedor (Roche, México), la cual tiene su sitio de restricción inmediatamente “corriente abajo” del inserto. La digestión lineariza el plásmido evitando que la RNA polimerasa continúe transcribiendo mas allá de la terminación del ADNc haciendo un transcrito demasiado largo con secuencias innecesarias. La digestión se detuvo agregando 1/20 del volumen de EDTA 0.5 M, 1/10 del volumen de Acetato de Sodio (NaAc) 3 M y 2 volúmenes de Etanol frío. Se mezcló bien y se dejó enfriar a -20 °C por 30 min. A continuación se precipitó el ADN centrifugando a 14,000 rpm a 4 °C. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el ADN en agua libre de nucleasas tratada con DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.05%.

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo utilizando el paquete mMessage mMachine (Ambion 2130, Woodward St. Austin TX USA), para lo cual se utilizó 1 µg de ADNc linearizado. La reacción se preparó de la siguiente manera:

En un tubo de 1.5 ml se agregó primero agua libre de nucleasas para un volumen final de 20  $\mu$ l. A continuación se agregaron 10  $\mu$ l del reactivo marcado como 2X NTP/CAP el cual contiene una solución neutralizada con una mezcla de ribonucleótidos (ATP 10mM, CTP 10mM, UTP 10mM, GTP 2mM, análogo de Cap 8mM). Posteriormente se agregaron 2  $\mu$ l de buffer de reacción 10X (sales, buffer, dithiothreitol y otros ingredientes no especificados por el fabricante). Finalmente se agregó 1  $\mu$ g de ADNc linearizado y 2  $\mu$ l de Mezcla de enzimas (50 % glicerol conteniendo la polimerasa de ARN y otros componentes no especificados por el fabricante). Se mezcló todo cuidadosamente y se centrifugó brevemente para colectar todos los reactivos en el fondo del tubo. La mezcla se incubó a 37°C toda la noche. Una vez transcurrido este tiempo se agregó 1  $\mu$ l de ADNasa (2U/ $\mu$ l) y se incubó por otros 15 min a 37°C.

La reacción se detuvo añadiendo 30  $\mu$ l de agua libre de nucleasas y 30  $\mu$ l de LiCl 7.5 M, el cual también se utiliza para precipitar el ARN recién sintetizado. Se mezcló bien y se incubó a -20°C por 40 min, para después centrifugar a 14,000 rpm por 15 min a 4°C. Se removió todo el sobrenadante cuidadosamente y se lavó el precipitado con etanol frío al 70 %, centrifugando nuevamente por dos min antes de removerlo completamente. Finalmente se resuspendió el ARN en 10-20  $\mu$ l dependiendo de la abundancia del precipitado, se prepararon alícuotas de 1  $\mu$ l y se almacenaron a -80°C para evitar su degradación.

La cantidad obtenida de ARN en la reacción se cuantificó mediante un espectrofotómetro de luz UV (Hewlett Packard, México, D.F.). Tomando en cuenta que una unidad de absorbancia a  $A_{260}$  corresponde a 40  $\mu$ g/ml de ARN de una solo hebra, los cálculos se realizaron con la siguiente fórmula:

$$(A_{260}) (\text{Factor de dilución})(40) = \mu\text{g/ml ARN}$$

La integridad del ARN se comprobó mediante su separación en geles de agarosa conteniendo formaldehído de acuerdo al protocolo convencional (Sambrook *et al*; 1989). La preparación del buffer de corrida al 5X (MOPS 0.1M pH 8.0, 40mM NaAc, 5mM EDTA a pH 8) se llevó a cabo de la siguiente manera: se disolvieron 20.6 gr de ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) en 800 ml NaAc 50 mM disuelto en agua tratada con DEPC. Se ajustó el pH a 7.0 con 2N NaOH. Posteriormente se añadieron 10ml de EDTA 0.5M pH 8.0 y se ajustó el volumen de la solución a 1 l con agua tratada con DEPC. Finalmente se esterilizó el buffer de corrida mediante filtración utilizando filtros Millipore de 0.2  $\mu$ m.

El gel se preparó disolviendo agarosa en agua a una concentración de 1%, se esperó a que la solución se enfriara a 60 °C y se añadió buffer de corrida 5X y formaldehído a una concentración final de 1X y 2.2M respectivamente. El gel se vació en un contenedor apropiado para la cámara de electroforesis y se dejó enfriar por 30 minutos, todo esto dentro de una campana de extracción. Por cada  $\mu$ l de muestra de ARN se agregaron 9  $\mu$ l de Buffer de carga (5  $\mu$ l de formamida, 1  $\mu$ l de MOPS 10x, 2  $\mu$ l formaldehído, 1  $\mu$ l Buffer de carga II provisto por el paquete mMessage mMachine de Ambion y 10 mg/ml de Bromuro de Etidio). Las muestras se incubaron por 15 min a 65°C y se transfirieron inmediatamente a hielo para eliminar la formación de estructuras secundarias. Durante este lapso (aproximadamente 20 min) el gel se pre-corrió a 100 V utilizando el buffer de carga a una concentración 1X. A continuación se cargaron las muestras en los pozos del gel y se corrieron a 50 V durante 60 min. El ARN se visualizó utilizando un transiluminador de luz UV.

### *7.2.3 Extracción y defoliculación de los ovocitos de Xenopus laevis*

Para la extracción de los ovocitos, inicialmente se anestesió a la rana exponiéndola por 30 min a tricaina (Ethyl-m-aminobenzoato ácido sulfónico) (Sigma-Aldrich, Toluca, México) al 0.15 % disuelta en agua. Una vez que se

comprobó que la rana estaba totalmente anestesiada, se procedió a obtener los ovocitos. Para esto, se realizó una incisión en el abdomen de 0.5 cm con el objetivo de tener acceso a los lóbulos de los ovarios (en donde se encuentran los ovocitos). La incisión se realizó primero en la piel y después en el músculo con la ayuda de un bisturí, teniendo cuidado de no lastimar los órganos ubicados inmediatamente por debajo. Con ayuda de unas pinzas pequeñas se ubicaron y manipularon los ovocitos, los cuales generalmente son muy visibles, para ser extraídos. Una vez que se colectó un número suficiente de ovocitos, los ovarios se colocaron dentro de la cavidad abdominal y la rana se suturó. Los ovocitos así obtenidos se colocaron en una caja Petri con solución ND96 libre de calcio (NaCl 82.5 mM, KCl 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, a 0.240-0.260 osmol/kg y un pH de 7.5 ajustado con NaOH) y se separaron manualmente. Para facilitar la remoción de las células foliculares que envuelven a los ovocitos, estos se incubaron en la misma solución conteniendo colagenasa (0.5 mg/ml; Sigma-Aldrich, Toluca, México) por 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron varias veces con la solución ND96 libre de calcio. Posteriormente los ovocitos se dejaron reposar durante 4 h. Pasado este tiempo, las células foliculares fueron removidas manualmente bajo un microscopio estereoscópico y con ayuda de unas pinzas de punta muy fina. Los ovocitos seleccionados, fueron de tamaño grande (estados V-VI) mostrando los polos animal y vegetal bien definidos, es decir, bien coloreados (negro y amarillo, respectivamente) y con un borde bien definido entre ambos polos. Finalmente, los ovocitos fueron colocados en solución ND-96 con calcio (NaCl 96 mM, KCl 2 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, HEPES 5 mM, Gentamicina 50 µg/ml, a 0.240-0.260 osmol/kg y pH de 7.6 ajustado con NaOH) y se incubaron a 15 °C durante toda la noche.

#### *7.2.4 Microinyección del ARNc del transportador PvAMT1;1 en los ovocitos de *Xenopus laevis**

Para la microinyección del ARNc del transportador PvAMT1;1 en sus versiones silvestre y mutantes fue necesario utilizar micropipetas (Drummond Scientific company, Broomall, P.A. U.S.A Cat. No. 3-000-204) de 10  $\mu$ l, cuya punta fue moldeada con un formador de micropipetas KOPF (David KOPF Instruments, California U.S.A. Modelo 730). La punta de la pipeta se rompió de tal manera que quedara abierta a un diámetro de 10-20  $\mu$ m y se llenó completamente de aceite mineral evitando la formación de burbujas. Una vez hecho esto, la pipeta se colocó en el embolo de un microinyector (Nanoject II, Drummond Scientific Company) montado en un micromanipulador mecánico (MMN8 Narishige, Japón). Se succionó 1  $\mu$ l de ARNc colocado previamente en parafilm (Pechiney, Chicago, USA) con ayuda de un microscopio estereoscópico (SMZ645 Nikon, Japón) para mejor visualización. Posteriormente los ovocitos se colocaron en una caja de petri conteniendo medio ND96, la superficie de la caja de petri se rayó de forma cuadrangular para evitar que los ovocitos se deslizaran. Finalmente, la pipeta se introdujo cuidadosamente en la membrana de los ovocitos y se inyectaron 30 ng de de ARN en un volumen no mayor a 50 nl. Una vez inyectados, los ovocitos se colocaron en medio ND96, el cual era reemplazado diariamente por medio fresco y se incubaron a 15°C hasta su utilización en los registros electrofisiológicos. Los ovocitos saludables y extraídos en estas condiciones pueden conservarse vivos y en buen estado hasta por 12 días.

#### *7.2.5 Registros electrofisiológicos del transportador PvAMT1;1*

El registro de las corrientes provocadas por la expresión del transportador PvAMT1;1 en sus versiones silvestre y mutantes se realizó de 4 a 7 días después de la microinyección del ARNc. La técnica que se utilizó fue la de fijación de voltaje con dos electrodos empleando el amplificador GeneClamp 500 (Molecular

Devices, Sunnyvale, CA U.S.A.). Los microelectrodos de registro se obtuvieron elaborando micropipetas a partir de capilares de 100  $\mu$ l (Sigma-Aldrich, Toluca, México) con el formador de pipetas KOPF. Estos microelectrodos se llenaron con una solución de KCl 1M y se insertaron en los portaelectrodos que contenían un alambre de Ag/AgKCl; estos portaelectrodos a su vez, se montaron por separado en los cabezales HS-24 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA U.S.A.). Una vez montados, los microelectrodos se sumergieron en la solución de registro (MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.8 mM y MES-Tris 10 mM pH 7.5) y se midió la resistencia en cada una de las puntas, la cual varió de 0.5 a 5 M $\Omega$ . Para el registro de las corrientes eléctricas, el ovocito se colocó dentro de una cámara de acrílico, los electrodos se posicionaron en proximidad al ovocito y el potencial medido en cada una de las puntas se igualó a cero. Inicialmente se introdujo el electrodo de Voltaje en la membrana del ovocito, y a continuación el electrodo de Corriente. Se permitió el flujo de la solución de registro, se esperó hasta que el potencial de membrana se estabilizara. Una vez estable, el potencial de membrana se fijo en el punto en que la corriente fuera cero, mediante el programa Clampex del paquete pClamp10 instalado en una computadora personal (Hewlett Packard Pavillion). El registro y el análisis de los resultados, se realizaron empleando los programas Clampex y Clampfit, respectivamente, incluidos en el paquete pClamp10.

Las soluciones conteniendo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se prepararon tomando a la solución de registro como base y agregando NH<sub>4</sub>Cl en las concentraciones deseadas. En los experimentos que se realizaron para determinar el cambio de la magnitud de corriente en respuesta a distintos pH, las soluciones de registro se ajustaron al pH deseado utilizando Mes(2-N-morfolina ácido etanosulfónico) y Tris (hydroxymethyl amino metano). La osmolaridad de la solución se mantuvo entre 230-250 mOsmol utilizando sorbitol o manitol.

### 7.3 Mutagénesis dirigida del transportador PvAMT1;1

La mutagénesis dirigida se llevó a cabo utilizando el paquete “QuickChange site-directed mutagenesis kit” (Stratagene 200518, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla CA) y consistió de cuatro pasos generales: la preparación del ADN plasmídico conteniendo el ADNc del transportador, la amplificación de dicho ADN utilizando oligonucleótidos que contienen la mutación deseada, la digestión de las hebras parentales y la transformación de células bacterianas competentes con el plásmido conteniendo la nueva mutación.

La extracción y purificación del ADN plasmídico conteniendo el ADNc del transportador PvAMT1;1 se realizó como se describe anteriormente (en la sección *expresión heteróloga del transportador PvAMT1;1 en ovocitos de Xenopus laevis*), mientras que el resto del protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera:

#### *7.3.1 Diseño de oligonucleótidos y amplificación del ADN plasmídico mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*

Los oligonucleótidos deben de contener el cambio de bases nucleotídicas correspondiente a la mutación deseada en la región media de su secuencia. Ambos oligonucleótidos deben alinearse a la misma secuencia pero en regiones opuestas del plásmido; de esta manera se hace una copia de dicho plásmido, la cual contiene ahora la mutación. Los oligonucleótidos se diseñan con una longitud de entre 25 y 45 bases y la mutación deseada se ubica al centro flanqueada por 10-15 bases en ambos extremos. Su temperatura de fusión debe ser mayor o igual a 78 °C y con un contenido mínimo de bases guanina y citocina del 40%.

Para llevar a cabo la reacción de PCR se preparó una mezcla de reacción en un tubo de 200 µl conteniendo lo siguiente: 5µl de buffer de reacción 10x, el cual contiene sales y otros elementos no especificados por el proveedor, 20 ng de

ADN templado, 15 picomoles (1 $\mu$ l) de ambos oligonucleótidos, 1  $\mu$ l de mezcla de dNTP's, y agua bidestilada para un volumen final de 50  $\mu$ l. Como paso final se agrega a la mezcla de reacción 1  $\mu$ l de la enzima Pfu (2.5 U/  $\mu$ l), la cual es una turbo ADN polimerasa de alta fidelidad. A continuación los tubos conteniendo la mezcla de reacción se colocaron en un termociclador que se programó de la siguiente manera:

**Tabla 1.** Amplificación del ADN plasmídico.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	30 s
2	16	95 °C	30 s
		55 °C	1 min
		68 °C	5 min (1 min/ kb del plásmido)

Una vez concluidos los ciclos de la reacción de PCR, se retiraron los tubos del termociclador y se colocaron en hielo por 2 min para enfriarlos a 37 °C aproximadamente.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes:

**Tabla 2.** Secuencias de oligonucleótidos conteniendo mutaciones.

<b>Mutación</b>	<b>Oligonucleótido sentido</b>	<b>Oligonucleótido antisentido</b>
Q63W	5'-cctcgtgttctc gatgtggctcggcttcgccatg-3'	5'-catggcgaagccgagccacatcgagaacacgagg-3'
D404A	5'-cttacgggggagctgcctcgaggcc-3'	5'-ggcctcgagcgcagctccccgtaag-3'
H409A	5'-atgcgtcgaggccggccgggtgttcattg-3'	5'-ccatgaacaaccggccggcctcgacgcat-3'
E399A	5'-gaaggagtacgtattgctggcttacgggggag-3'	5'-ctccccgtaagccgcaaatacgtactccttc-3'
H211R	5'-ccggcgtgtccgtatggctcggcgg-3'	5'-ccgccgaccatacggacaacgccgg-3'

### 7.3.2 Digestión de los productos de amplificación

Una vez sintetizadas las hebras de ADN plasmídico conteniendo la mutación deseada se procedió a digerir las hebras parentales, las cuales no contienen la mutación. Para realizar la digestión se utilizó 1 µl de la enzima de restricción DpnI (10 U/ µl), ésta se añadió directamente al tubo con la mezcla de reacción para posteriormente incubarse por 1 hora a 37 °C. La enzima es específica para ADN metilado y hemimetilado, por lo que sólo degrada al ADN parental el cual proviene de las células bacterianas.

### 7.3.3 Transformación de Células bacterianas con el ADN plasmídico mutante

Para el proceso de transformación se utilizaron células XL1-Blue suministradas por el proveedor, las cuales tienen una alta eficiencia de transformación. Se utilizaron 50 µl de dichas células para cada muestra obtenida de la reacción de amplificación anterior. Éstas se colocaron en un tubo de 1.5 ml previamente

enfriado en hielo. A continuación se transfirió 1  $\mu$ l del ADN tratado con DpnI (mezcla de reacción) al tubo con las células bacterianas, se mezcló cuidadosamente y se incubó en hielo por 30 min. Posteriormente el tubo se retiró del hielo y se le dió un pulso de calor por 45 s a 42 °C utilizando un baño con agua precalentada. Una vez transcurridos los 45 s los tubos se regresan al hielo por 2 min para después añadir .5 ml de medio NZY<sup>+</sup> (NZ amina (caseína hidrolizada) 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 85 mM, MgCl<sub>2</sub> 12.5 mM, MgSO<sub>4</sub> 12.5 mM, glucosa 20mM) precalentado a 42 °C y finalmente se incubó a 37 °C por una hora en agitación continua (225 – 250 rpm).

Por último se tomaron 250  $\mu$ l de la solución contiendo las células bacterianas y se distribuyeron en una caja de petri con medio LB y antibiótico de selección (ampicilina 50  $\mu$ g/ml). Las cajas se incuban a 37 °C por 16 h. Para conservar las células que fueron exitosamente transformadas se tomó una colonia de crecimiento y se colocó en 3 ml de medio LB líquido con antibiótico de selección. El medio se incubó a 37 °C para posteriormente tomar 250  $\mu$ l y colocarlo en un tubo de 1.5 ml, al cual se añadió un volumen igual de glicerol y se mezcló bien. Por último el tubo se sumergió en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C por tiempo indefinido.

#### **7.4 Verificación del proceso de mutagénesis mediante secuenciación**

Para comprobar que las mutaciones puntuales fueron generadas de manera correcta se mandó secuenciar a la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM una región del ADN plasmídico (aquella dentro de la cual se esperaba la mutación) y la secuencia obtenida se alineó y comparó con la secuencia original de la proteína silvestre para comprobar los cambios provocados por el proceso de mutagénesis.

#### *7.4.1 Extracción y purificación de ADN plasmídico mediante el uso de columnas*

Para lo anterior se extrajo ADN plasmídico conteniendo las mutaciones mediante el paquete High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche 11 754 777 001, 68298 Mannheim Germany). Este paquete incluye columnas especiales para purificar el ADN, las cuales permiten eliminar prácticamente toda clase de residuos, cuya presencia puede afectar la eficiencia del equipo de secuenciación. Las células bacterianas que contenían el plásmido de interés se incubaron en 3 ml de medio LB con antibiótico de selección por 12 h. Se tomaron 0.5 ml de cultivo y se transfirieron a un tubo de 1.5 ml para posteriormente centrifugarlas a 6,000 g por 30 s. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 250  $\mu$ l de buffer de suspensión (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH 8.0). A continuación se agregaron 200  $\mu$ l de buffer de lisis (NaOH .2 M, 1% SDS), se volteó el tubo varias veces para mezclar las soluciones y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se agregaron 350  $\mu$ l de buffer de unión (Guanidina-HCl 4 M, acetato de potasio .5 M) enfriada en hielo. Se mezcló todo invirtiendo el tubo y se dejó incubar en hielo por 5 min. Posteriormente se centrifugó el tubo por 10 min a 13,000 g y el sobrenadante se transfirió a una de las columnas para su purificación; el fluido se desechó centrifugando la columna a máxima velocidad por un minuto. A continuación se añadieron 500  $\mu$ l de buffer de lavado (NaCl 20 mM, Tris-HCl 2 mM, pH 7.5) a la columna y se repitió la centrifugación a máxima velocidad por un minuto. Finalmente, los ácidos nucleicos se recuperaron de la columna agregando 50  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O pH 8 y centrifugando.

#### *7.4.2 Secuenciación*

La secuenciación se llevó a cabo utilizando un equipo Perkin Elmer/Applied Biosystems Modelo 3730, mediante el método "Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence-Based Sequencing" y el ADN templado se proporcionó

con las características especificadas por los técnicos de la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, las cuales pueden consultarse en su página de internet (<http://www.ibt.unam.mx/sintesis/secuenciacion.html>).

## **7.5 Mediciones de pH intracelular en ovocitos de *Xenopus laevis***

La medición de pH intracelular se realizó mediante el uso de microelectrodos selectivos a protones, los cuales se introdujeron en el citoplasma de ovocitos de *Xenopus laevis* previamente inyectados con el ARNc del transportador PvAMT1;1. La preparación de dichos ovocitos y las condiciones que se utilizaron para hacer las mediciones fueron las mismas que se describen anteriormente para los registros electrofisiológicos.

### *7.5.1 Silanización de las micropipetas*

Para la fabricación de los electrodos selectivos a protones se elaboraron micropipetas a partir de capilares de 100  $\mu$ l (Sigma-Aldrich, Toluca, México) con el formador de pipetas KOPF de manera similar a las elaboradas para los registros electrofisiológicos. Debido a que las puntas de las micropipetas deben de llenarse con el ionóforo de hidrógeno I de naturaleza hidrofóbica, el vidrio debió recubrirse con bis(dimethylamino) dimethyl silano (Fluka 14755, Milwaukee, WI) para favorecer la interacción con el compuesto.

Inicialmente los capilares fueron tratados con HNO<sub>3</sub> al 60% durante 12 h antes de fabricar las pipetas. Una vez transcurrido este tiempo, los capilares se enjuagaron cuidadosamente con agua bidestilada y se colocaron en una caja de petri de vidrio para así introducirlas en una estufa a 80°C por 6 a 8 h; de esta manera las pipetas se secaron completamente (mantenerlas libres de humedad es indispensable) y posteriormente fueron “estiradas” utilizando el formador de pipetas. A continuación las pipetas se transfirieron a un “sostenedor” metálico que cuenta con orificios de

diámetro apenas superior al de las pipetas, éstas se colocaron en posición vertical con la punta hacia arriba y todo el “sostenedor” se colocó sobre la base de una caja de petri de vidrio que se cubrió con un vaso de precipitado. A continuación se colocaron todos los elementos en dicha configuración dentro de una mufla a 200°C por 4 horas, con el objetivo de deshidratar completamente el vidrio. Una vez transcurrido este tiempo se insertó una pipeta pasteur de punta larga por debajo del vaso de precipitado y se “inyectaron” 100 µl de (dimethylamino) dimethyl silano, el cual se evapora al contacto con el vidrio y cubre todas las superficies haciéndolas hidrofóbicas. Se permitió al silano reaccionar por 45 min con las pipetas, después de lo cual se levantó rápidamente el vaso de precipitado para permitir que el exceso de vapor de silano saliera. Las micropipetas silanizadas se mantuvieron a 200° C por 4-6 horas más. Finalmente las micropipetas fueron retiradas del “contenedor” metálico y guardadas en un recipiente con desecador hasta su uso.

#### *7.5.2 Llenado y calibración de los microelectrodos selectivos*

El llenado de las micropipetas se llevó a cabo momentos antes de que se realizaran los registros de pH intracelular. Las micropipetas se llenaron primero con KCl 1 M utilizando una jeringa con un capilar extremadamente delgado, el cual podía ser insertado por dentro de la micropipeta hasta la región más estrecha en la punta. Esto permitió llenar las micropipetas empezando por la punta hasta la mitad de su longitud sin formar burbujas, lo cual sucede con mucha facilidad debido al carácter hidrofóbico del vidrio. Se verificó la ausencia de burbujas con la ayuda de un estereoscopio y se procedió a cubrir la región interior de la punta con el ionóforo de hidrógeno I cocktail B (Fluka 95923); para esto, la micropipeta se colocó en un micromanipulador y con ayuda de un estereoscopio se acercó la punta hacia una gota del ionóforo previamente colocada sobre una superficie de vidrio. Cuando la punta de la micropipeta hizo contacto con la gota se fijó en esa posición durante algunos segundos para permitir que el ionóforo subiera por

capilaridad y desplazara a la solución con KCl 1 M. De esta manera la punta quedaba cubierta por el compuesto y formaba una interface continua con la solución con KCl. Finalmente, las micropipetas se insertaron en el portaelectrodo para proceder con su calibración.

Para la calibración de los electrodos se utilizaron buffers con diferentes pH's. Los buffers se prepararon utilizando agua bidestilada, Mes/Tris 10 mM para ajustar al pH deseado y KCl 125 mM para compensar por la fuerza iónica presente en el citoplasma celular. Se prepararon un total de seis buffers de calibración que cubrían un rango de pH desde 4 hasta 9. El procedimiento de calibración comenzó agregando el buffer pH 4 en una pequeña cámara y sumergiendo el electrodo selectivo a pH así como el electrodo de voltaje (referencia). Una vez sumergidos, el voltaje registrado por cada electrodo se igualó a cero, y se cambio al buffer pH 5 registrando el cambio de voltaje que sólo el electrodo selectivo detectó. Se procedió a hacer lo mismo con el resto de los buffers de calibración y de esta manera se graficó una curva de calibración.

### 7.5.3 Mediciones de pH intracelular

Para las mediciones de pH intracelular se utilizaron ovocitos de *Xenopus laevis* inyectados previamente con el ARNc del transportador *PvAMT1;1* en su versión silvestre. Se utilizaron sólo los electrodos que fueron calibrados inmediatamente antes del registro y cuyas pendientes obtenidas de la curva de calibración fueron de  $60 \pm 3\text{mV}$ , lo cual indica que se comportan de acuerdo a la ecuación de Nernst y tienen una alta selectividad a los protones. Para el registro los ovocitos se colocaron en una cámara de acrílico con solución de registro y ambos electrodos fueron introducidos en el citoplasma. A continuación se comenzó el flujo de la solución y se espero hasta que el potencial medido en ambos electrodos se estabilizara. El potencial no se fijo en ningún momento, y una vez estable, se comenzó a fluir solución de registro con  $1\text{mM NH}_4^+$ . Esto se hizo a pH extracelular 5.5 y 7, ya que la actividad del transportador es afectada por este parámetro. Para

determinar el cambio en el pH intracelular provocado por el flujo de  $\text{NH}_4^+$  se restó el potencial registrado por el electrodo de voltaje al valor del potencial registrado por el electrodo selectivo. Esta diferencia dio un valor en voltaje que se comparó con los valores correspondientes en la calibración del electrodo, con lo cual se determinó la equivalencia en unidades de pH.

## **7.6 Determinación de la expresión del transportador *PvAMT1;1* en los diferentes tejidos del frijol**

Se determinó la presencia y abundancia relativa del transcrito del transportador *PvAMT1;1* en diferentes tejidos de la planta de frijol mediante la técnica de RT-PCRs semicuantitativos, usando como control interno al gen de la actina, el cual se ha utilizado antes para este tipo de análisis en el frijol con buenos resultados (Kiu Wen, 2004).

### *7.6.1 Aislamiento y purificación de ARN de tejidos de frijol*

La planta del frijol tiene la característica de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios, principalmente fenoles, los cuales no sólo dificultan el proceso de extracción sino que son una fuente importante de contaminación, ya que pueden inhibir a la enzima transcriptasa reversa, que se utiliza en pasos posteriores, e influir en la calidad final del ADNc obtenido al final del proceso. Debido a lo anterior, se utilizó una versión modificada del protocolo de extracción por *Trizol* (Invitrogen 15596-018, Carlsbad, CA), la cual permitía eliminar de forma más efectiva a estos contaminantes. Además, para el caso del tejido de flor sólo fue posible la purificación utilizando el reactivo especial *Concert Plant RNA Reagent* (Invitrogen 12322-012, Carlsbad, CA) formulado para su uso en tejidos abundantes en pigmentos, polyfenoles y carbohidratos.

En un primer paso se colectó el tejido vegetal con la ayuda de una navaja afilada e inmediatamente después se cubrió con papel aluminio, se rotuló, y se congeló en

nitrógeno líquido para finalmente almacenarlo a -80 °C durante no más de 4 semanas. Una vez hecho esto no se permitió el descongelamiento del tejido hasta la adición del reactivo de *Trizol* o el *RNA Reagent*. El tejido se molió en nitrógeno líquido con la ayuda de un mortero de porcelana hasta obtener un polvo fino. Se transfirieron 100 mg de tejido molido a tubos Eppendorf de 1.5 ml, los cuales se mantuvieron en nitrógeno líquido para evitar el descongelamiento.

En el caso de la metodología utilizada para el reactivo *Trizol*, se añadió 1 ml de este por cada 100 mg de tejido y se dio a los tubos un pulso con vortex de aproximadamente 15 segundos para después incubarlos a temperatura ambiente por 5 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 200 µl de cloroformo / alcohol isoamílico (24:1), se mezcló el contenido del tubo con la ayuda del vortex por 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron por 15 minutos a 4 °C y 12,000 g. Se tomó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo.

A continuación, se añadieron 500 µl de isopropanol y se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente para después centrifugar por 10 minutos a 4 °C y 12,000 g. Se desechó el sobrenadante, se añadió 500 µl de LiCl a la pastilla que quedó en el fondo del tubo y se lavó los tubos volteándolos cuidadosamente de 3 a 5 veces. Se centrifugó por 10 minutos a 4 °C y 3,000 g y se removió cuidadosamente todo el sobrenadante. Posteriormente se agregaron 500 µl de buffer TE, pH 8.0, se añadieron otros 500 µl de cloroformo / alcohol isoamílico y se agitaron los tubos vigorosamente. Una vez más se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 4 °C y 3,000 g, se tomó la fase superior y se transfirió a un tubo nuevo.

Se agregaron 500 µl de isopropanol y 66 µl de acetato-Na (pH 5.2) y se mezcló el contenido del tubo con la ayuda de un vortex. Finalmente, se centrifugaron los tubos por 10 minutos a 4 °C y 12,000 g, se desechó el sobrenadante dejando secar la pastilla de ácidos nucleicos y se re suspendió en 50 – 100 µl de agua bidestilada.

En cuanto al reactivo *Concert Plant RNA Reagent* se utilizó la metodología sugerida por el proveedor.

#### *7.6.2 Transcripción reversa para la obtención del ADNc*

Para el proceso de Transcripción reversa del ARNm es importante primero eliminar todo el ADN que pudiera haber permanecido en las muestras de los diferentes tejidos durante el proceso de purificación. Para esto se mezcló en tubo libre de nucleasas lo equivalente a 1 µg de ARN, 1 µl de buffer de reacción 10X, 9 µl ddH<sub>2</sub>O libre de nucleasas y 1 µl de ADNasa. Se incubó todo a 37 °C por 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se añadió 1 µl de 25 mM EDTA para evitar que el ARNm se hidrolice durante el proceso de desactivación de la enzima ADNasa, la cual se llevó a cabo calentando el tubo a 65 °C por 10 minutos.

Completado el proceso de eliminación del ADN se agregó en un tubo de 1.5 ml libre de nucleasas y puesto en hielo 1 µg de ARN como templado, 0.5 µg (100 pmol) de oligo dT y se llevó a un volumen de 12.5 µl con agua libre de nucleasas. Se mezcló todo, se incubó a 65 °C por 5 minutos e inmediatamente después se enfrió el tubo en hielo y se mantuvo ahí. A continuación se agregó al tubo lo siguiente: 4 µl de buffer de reacción 5X, 0.5 µl (20 U) de inhibidor de ARNasas, 2 µl (1 mM concentración final) de mezcla de dNTPs a una concentración de 10 mM y 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U). Se mezcló el contenido del tubo con cuidado y se centrifugó por unos segundos para coleccionar todo en el fondo del mismo. Posteriormente, se incubó a 42 °C por 60 min, y se terminó la reacción calentando a 70 °C por 10 min. Finalmente, una vez concluido todo el proceso se diluyeron los 20 µl finales en un volumen igual de agua bidestilada libre de nucleasas con el objetivo de que el ADNc resultante no se encuentre muy concentrado para la reacción de amplificación por PCR.

### 7.6.3 Amplificación por PCR

Para amplificación y cuantificación del ADNc del transportador *PvAMT1;1* se utilizó el protocolo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento de 742 pb que se localiza en la parte final del gen, la cual está menos conservada; tratando de evitar así la amplificación inespecífica de otros posibles genes para AMTs. También se diseñaron oligonucleótidos para amplificar un fragmento de 368 pb del gen de la actina, utilizado como control. La amplificación se llevó a cabo con la ayuda de un termociclador de gradientes PTC-200 (MJ research EN00593, Hercules, Cal.) utilizando el siguiente programa de amplificación:

**Tabla 3.** Ciclos para la amplificación del transcrito de *PvAMT1;1* y actina.

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	95 °C	2 min
2	29	94 °C	1 min
		55 °C ( <i>PvAMT1;1</i> ) - 63 °C (actina)	45 s
		72 °C	1:30 min
3		4 °C	indefinido

Asimismo, las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron las siguientes:

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos para la amplificación del transcrito de *PvAMT1;1* y actina.

Gen	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido antisentido
<i>PvAMT1;1</i>	5'-aaacgggtgctgtctggt-3'	5'-ggcagtgaaaaccaacccaa-3'
Actina	5-tggacaggttatcaccattggg-3'	5'-gccagcctcatcatactcaga-3'

Para preparar la reacción se agregó en un tubo de PCR lo siguiente: 11.4  $\mu$ l de agua bidestilada, 2  $\mu$ l de Taq buffer 10X, .4  $\mu$ l de dNTP's, 1  $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos, 0.5  $\mu$ l Taq polimerasa, 2.2  $\mu$ l de 25 mM MgCl<sub>2</sub> y 1.5  $\mu$ l de ADNc templado para un volumen final 20  $\mu$ l. Una vez completa la reacción, se cargaron 6  $\mu$ l de cada muestra en un gel de agarosa al 1% para la visualización del producto de amplificación. El gel se corrió a 100V por 25 min en una cámara de electroforesis conteniendo buffer TAE al 0.5X. Posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador con rayos UV. Finalmente, se tomó una fotografía y se analizó la densidad y abundancia de las bandas obtenidas mediante el software Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland).

## 8. Resultados

### 8.1 Modelación por homología del transportador PvAMT1;1

Con el fin de tener una idea más clara sobre la proteína que nos permitiera seleccionar sólo aquellas áreas o residuos interesantes desde el punto de vista funcional, se realizó un modelo por homología de la estructura tridimensional del transportador. Para esto, tuvimos la ventaja de contar con estructuras cristalográficas de transportadores de amonio pertenecientes a las especies *E. coli* y *A. fulgidus* cuyas estructuras fueron obtenidas con una resolución alta (1.6 Å). Esto permitió modelar casi la totalidad de la proteína con una buena confiabilidad, por lo menos en lo que concierne a las regiones conformadas por los dominios transmembranales, ya que las asas periféricas tuvieron mucha variabilidad y por lo tanto carecen de utilidad predictiva.

Se obtuvieron tres modelos del transportador PvAMT1;1 mediante el uso de tres servidores bioinformáticos que emplean métodos diferentes para el proceso de cálculo:

**Tabla 5.** Servidores para modelación por homología.

Servidor	Dirección
ModWeb	<a href="http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html">http://modbase.compbio.ucsf.edu/ModWeb20-html/modweb.html</a>
CPHmodels	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels">http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels</a>
Swiss Model	<a href="http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html">http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html</a>

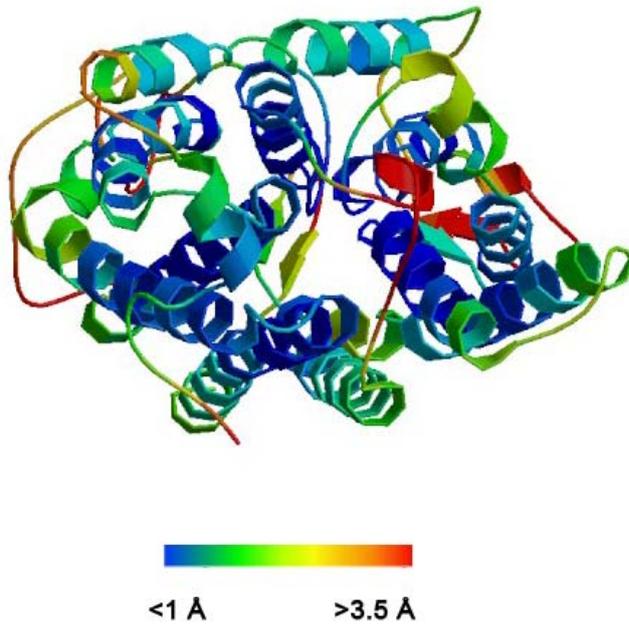
Las estructuras tridimensionales resultantes fueron muy semejantes entre sí, lo cual sugiere que el proceso de modelación se realizó correctamente; sin embargo, debido a sus características metodológicas, el servidor ModWeb parecía el más adecuado para el cálculo del modelo de este transportador en particular. Esta aplicación realiza una alineación de secuencias de tipo “perfil-perfil” y después

calcula el modelo por el método denominado “satisfacción de restricciones espaciales”, el cual es especialmente propicio para el cálculo de la estructura de proteínas cuya homología con el templado está en el límite de lo permisible (28-30%) (Eswar et al., 2006). El servidor se basa en la reconocida aplicación para modelaje estructural MODELLER, la cual ha sido utilizada anteriormente para la obtención del modelo de otro transportador de amonio presente en *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Mayer et al, 2006).

El modelo calculado por MODELLER tuvo un 88.8% de sus residuos en “regiones ampliamente favorables” y sólo 1 residuo en una “región no favorable” según el análisis obtenido de un diagrama de Ramachandran calculado por el programa Procheck (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>). Este fue el valor más alto de los tres modelos y se aproxima a la estructura cristalográfica original que tiene un 91.7% de residuos en “regiones ampliamente favorables” (Fig. 1B). Adicionalmente, los modelos se evaluaron utilizando el servidor Qmean (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>) que analiza parámetros estereoquímicos y termodinámicos para dar un valor global de confianza. En este análisis los valores obtenidos para los modelos calculados por MODELLER y CPHmodels fueron similares: 0.345 - 0.360 (los dos más altos) comparados con 0.644 del modelo original (donde 1 es el valor ideal). Como era de esperarse, los índices de confianza más bajos correspondieron a las regiones conformadas por las asas (Fig. 1A).

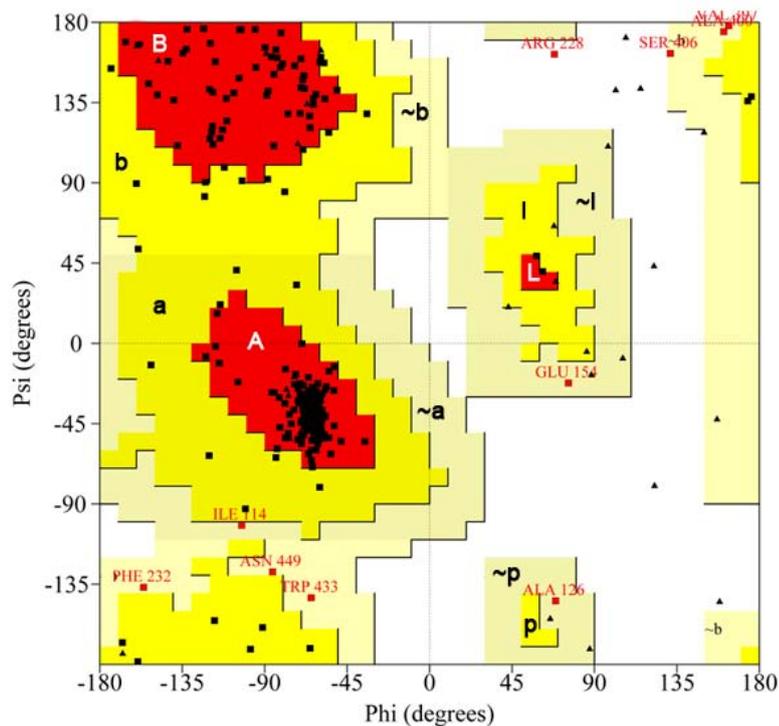
Para evaluar por un método distinto la estabilidad del modelo del transportador PvAMT1;1 y refinar su estructura, éste se sometió a una minimización energética. Inicialmente, en la simulación se le permitió el movimiento a las cadenas laterales de todos los aminoácidos, esperando que se colocaran en sus conformaciones más favorables energéticamente. Sin embargo, no se observaron cambios apreciables cuando se superpuso el modelo minimizado contra el modelo inicial, lo cual supone que los grupos laterales se encuentran en posiciones favorables. Por ser las asas las regiones menos confiables de acuerdo a las evaluaciones del

**A**



**Figura 1. Evaluación del modelo PvAMT1;1.** (A) Rango de error estimado en Amstrongs para la posición de cada aminoácido. Los tonos azules indican errores pequeños en la posición mientras que los tonos rojos indican errores más grandes (Ver la barra en la parte inferior). (B) Diagrama de Ramachandran que evalúa los ángulos de rotación de los aminoácidos en el modelo para estimar su estabilidad estereoquímica. Se presentan los porcentajes obtenidos para el modelo PvAMT1;1 en comparación con los porcentajes de la estructura cristalográfica usada como templado AMTB.

**B**



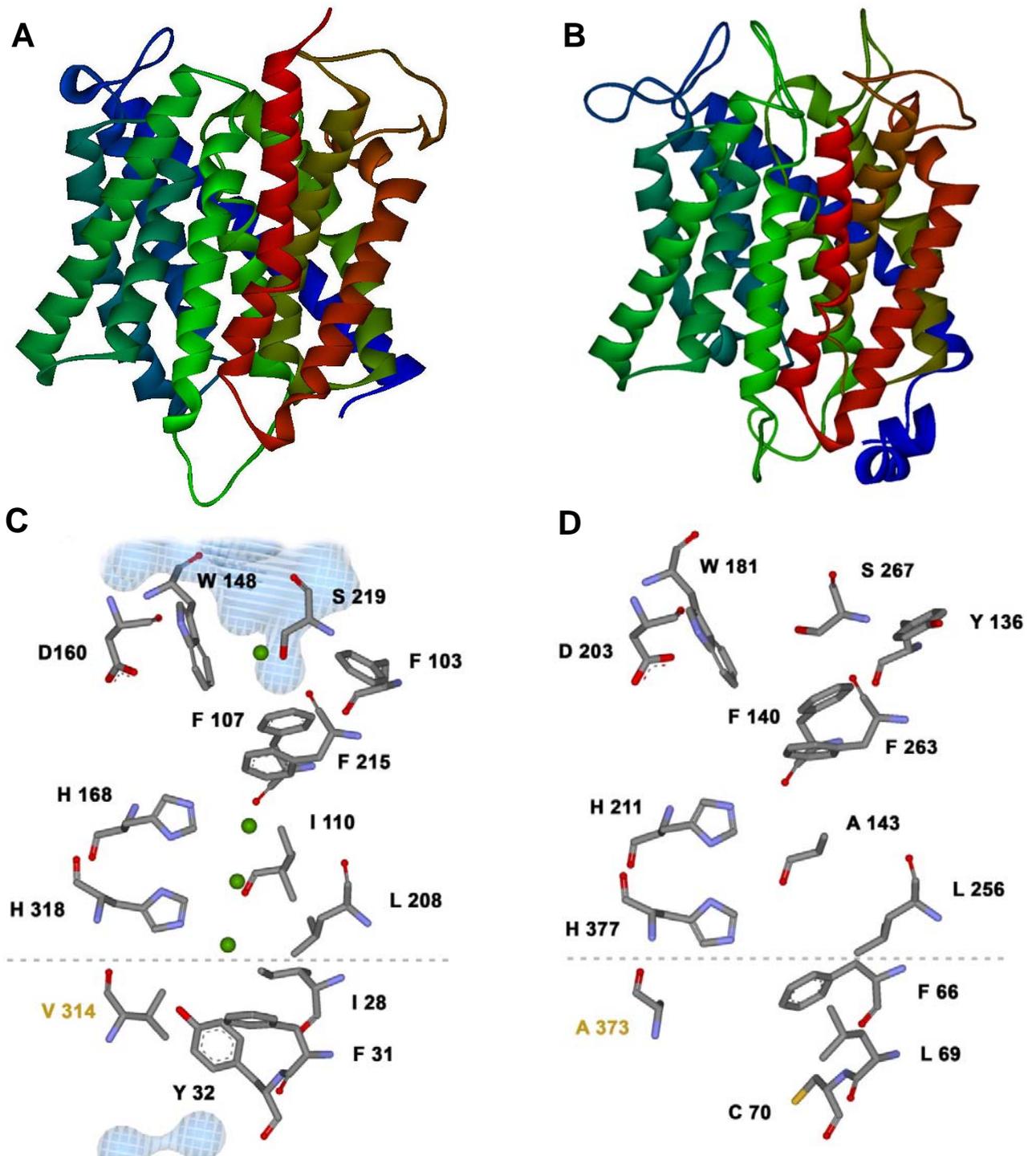
	PvAMT1;1	AMTB
Residuos en regiones ampliamente favorecidas [A,B,L]	88.8%	91.7%
Residuos en regiones adicionalmente permitidas [a,b,l,p]	8.4%	7.6%
Residuos en resgiones generosamente permitidas [~a,~b,~l,~p]	2.5%	0.7%
Residuos en regiones no permitidas	0.3%	0.0%

modelo, se llevó a cabo una minimización energética enfocada en dichas zonas y se permitió el movimiento de los carbonos alfa de la estructura. Como resultado de este análisis, sólo se observaron ligeros cambios de sus trayectorias originales, lo que significa que las asas fueron modeladas de forma correcta en cuanto a consideraciones estereoquímicas y energéticas aunque no necesariamente tienen similitud con la estructura real de *PvAMT1;1*.

Para complementar los resultados anteriores se generó una representación de la estructura trimérica del transportador (Fig. 3A). Esto nos pareció importante debido a la alta probabilidad de que esta proteína se encuentre asociada a la membrana en forma de homo trímeros, lo que sugiere la existencia de posibles interacciones con relevancia funcional entre los monómeros. Además, el obtener un ensamblaje congruente entre los monómeros de este último modelo trimérico fue una evidencia adicional de que su estructura fue calculada en forma correcta.

Se examinaron las asas periplásmicas y citoplásmicas para detectar posibles contactos entre un monómero y otro. Observamos que el asa correspondiente al carboxilo terminal parecía interactuar con el dominio transmembranal 6 del monómero vecino. Esta interacción ha sido reportada previamente por Loqué y colaboradores (2007) quienes demostraron que conducía a la inactivación alostérica del transportador, la cual dependía de la fosforilación de la tirosina 467 presente en el carboxilo terminal. El hecho de que nuestro modelo mostrara dicha interacción nos permite tener más confianza en otras posibles predicciones que surjan de su análisis. En cuanto a las asas extracelulares el modelo no implicó ningún tipo de contacto entre ellas.

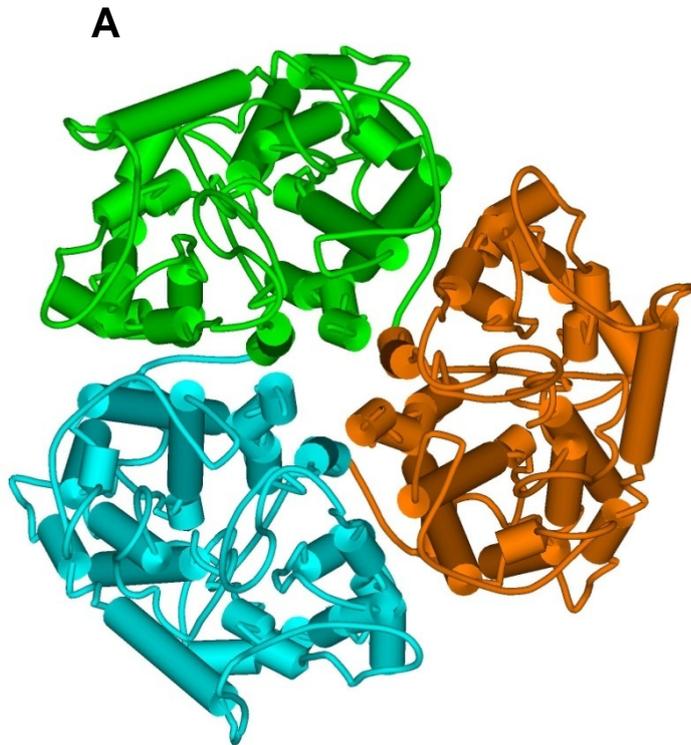
Una vez concluida la verificación del modelo, se continuó con la localización de los aminoácidos, que en trabajos previos, se habían reportado como relevantes para el funcionamiento de los transportadores de amonio, y mediante una comparación, se evaluó su presencia en *PvAMT1;1* así como su orientación y la posible variación con respecto a la orientación de los aminoácidos de la estructura



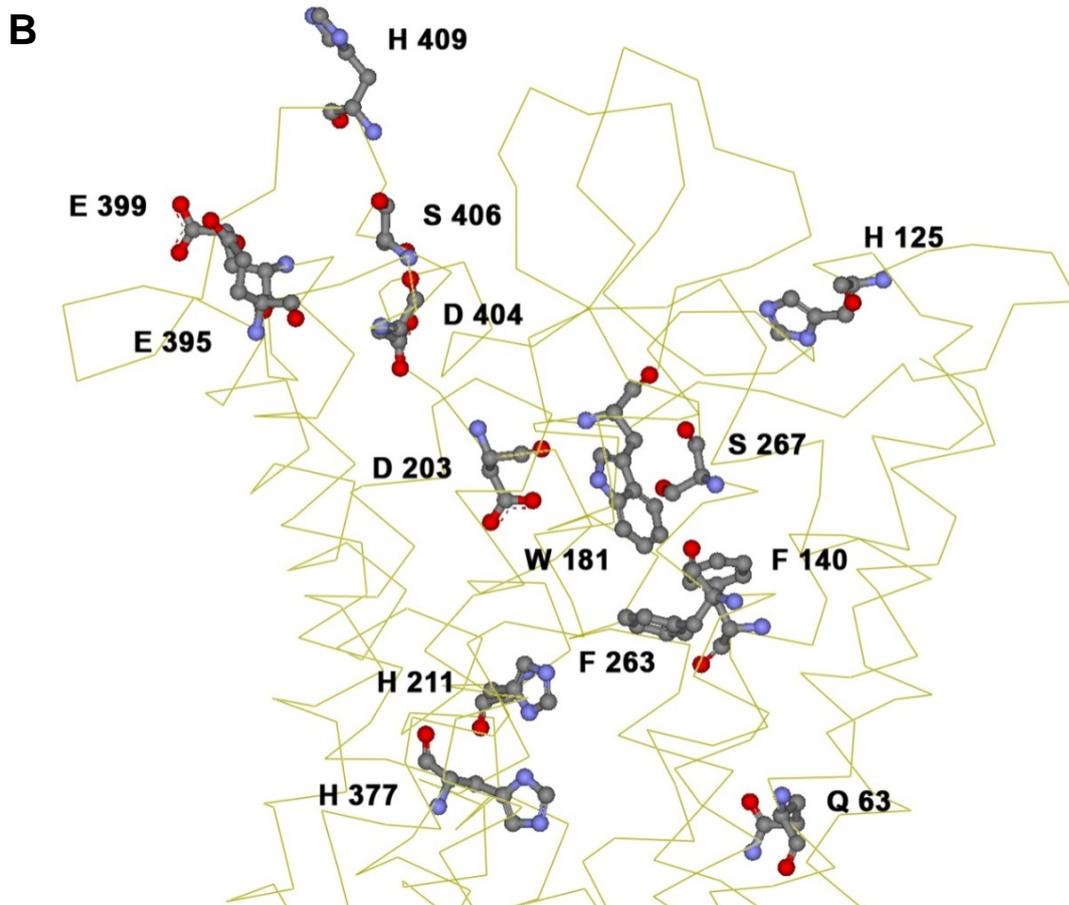
**Figura 2 Comparación de los modelos estructurales de los transportadores *PvAMT1;1* y *AMTB* de *E.coli*.** (A) Modelo tridimensional del transportador *AMTB* de *E.coli* obtenido a partir de su estructura cristalográfica. (B) Modelo calculado del transportador *PvAMT1;1* de frijol en base a su homología con *AMTB*. (C) Esquema de algunos de los amino ácidos que recubren el poro del transportador *AMTB*. Se muestran algunas moléculas de agua en azul y los iones  $\text{NH}_4^+$  en verde (identificados a partir del cristal). (D) Esquema de los amino ácidos correspondientes en *PvAMT1;1*. La línea punteada muestra donde comienza la región del poro en la cual los amino ácidos no están conservados. Se muestra también en verde el amino ácido A373 (V314 en *AMTB*) que supuestamente está involucrado en bloquear el poro desde la región citoplásmica en el estado cerrado del transportador.

utilizada como templado (Fig. 2C y D). Entre éstos residuos, están los aminoácidos responsables de reclutar al amonio: aspartato 203, triptófano 181 y serina 267 (D160, W148 y S219 en *E. coli* respectivamente), los cuales están altamente conservados y se han considerado como el sitio de unión del amonio a la región periplásmica del transportador (Lei et al, 2004); así mismo, la fenilalanina 140 y la fenilalanina 263 (F107 y F215 en *E.coli*) se proponen como los residuos que forman la “puerta” del poro que controla el acceso del  $\text{NH}_4^+$  (Khademi et al, 2007); y finalmente un par de histidinas: 211 y 377 (H168 y H318 en *E.coli*) , las cuales están localizadas en la región media del poro y se han considerado como responsables de coordinar y posiblemente desprotonar al amonio en su paso por esta región (Zheng et al, 2004). Además de estar presentes en ambos transportadores, todos los residuos mencionados anteriormente se encuentran prácticamente en la misma orientación y a la misma distancia uno de otro, lo que evidencia su importancia para el mecanismo de transporte del  $\text{NH}_4^+$  y le da confiabilidad al modelo calculado.

Fue interesante analizar otros aminoácidos que también rodean al poro del transportador pero que se encuentran cerca de la región citoplásmica, ya que en este caso difieren casi en su totalidad de aquellos presentes en AMTB de *E.coli*. En particular resulta intrigante la presencia de una cisteína (C70) cuyo grupo tiol parece estar orientado hacia el medio citoplásmico. Esta cisteína no está presente en AMTB de *E.coli* y en su lugar existe una tirosina (Y32) que por sus propiedades fisicoquímicas posiblemente lleve a cabo otra función. Vale la pena resaltar también la presencia de la valina 314 en AMTB, la cual posiblemente esté involucrada en bloquear el poro desde la cara citoplásmica ayudando en la transición hacia un posible estado “cerrado” (Zheng et al., 2004) y que en *PvAMT1;1* ha sido sustituida por la alanina 373. Esta región junto con las asas localizadas en la zona periplásmica son las que más llamaron nuestra atención debido a su gran variabilidad.



**Figura 3. Estructura calculada del trímico y aminoácidos importantes en el transportador PvAMT1;1.** (A) Modelo de la estructura trimérica del transportador PvAMT1;1 mostrado en forma esquemática. Los cilindros representan alfa helices; los tubos más delgados representan a las asas de la proteína. (B) Modelo de un monómero del transportador PvAMT1;1 en donde se resaltan aminoácidos que por su importancia han sido seleccionados como candidatos para ser sustituidos mediante mutaciones puntuales.



## 8.2 Generación de mutantes del transportador *PvAMT1;1*

A diferencia de otros transportadores de la misma familia, *PvAMT1;1* es sensible al pH extracelular, una propiedad que puede ser importante en el caso particular de las plantas ya que la absorción de  $\text{NH}_4^+$  sería favorecida por la fuerza motora de protones (fmp) que existe a través de la membrana plasmática de las células vegetales. Tomando en cuenta que la magnitud de la corriente observada en registros electrofisiológicos de ovocitos expresando *PvAMT1;1* aumenta de forma considerable cuando se incrementa el gradiente de protones (acidificación extracelular) a través de la membrana plasmática, se pensó que un mecanismo de co-transporte  $\text{H}^+/\text{NH}_4^+$  pudiera ser el responsable del comportamiento observado. Por esta razón, se utilizó el modelo obtenido para ayudar en la identificación de aminoácidos que pudieran ser responsables de la dependencia que este transportador presenta con respecto al pH extracelular. Se sabe que algunos aminoácidos poseen propiedades eléctricas y químicas particulares que les permiten participar en el transporte de protones. En base a esto, seleccionamos los residuos Asp404, H211, Glu399, His409 y Q63 (Fig. 3B) como candidatos para llevar a cabo dicha función; y por lo tanto, decidimos sustituirlos por aminoácidos con características electroquímicas distintas.

Se verificó que las mutaciones generadas tuvieran la secuencia correcta mediante la secuenciación de los productos de ADN obtenidos (Fig. 4). Las secuencias de estos fueron alineadas con la secuencia del gen silvestre para su comparación, y se comprobó que todas las mutaciones se realizaron correctamente. La mutante E399A fue un caso particular, ya que se generó un cambio extra de base nucleotídica, que correspondió al cambio de una timidina por una citocina (Fig. 4A); sin embargo, dicho cambio no afectó el sentido del triplete original ya que el nuevo triplete codifica para el mismo aminoácido.

**A**



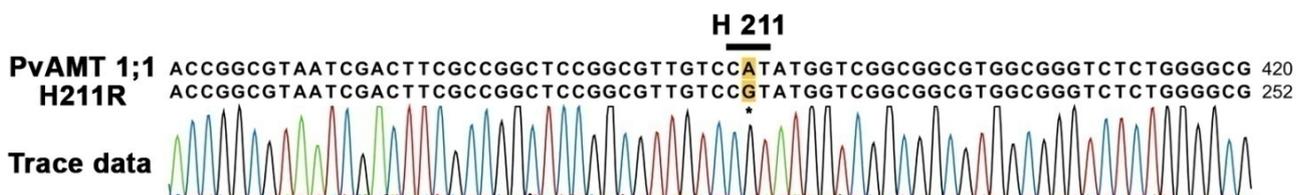
**B**



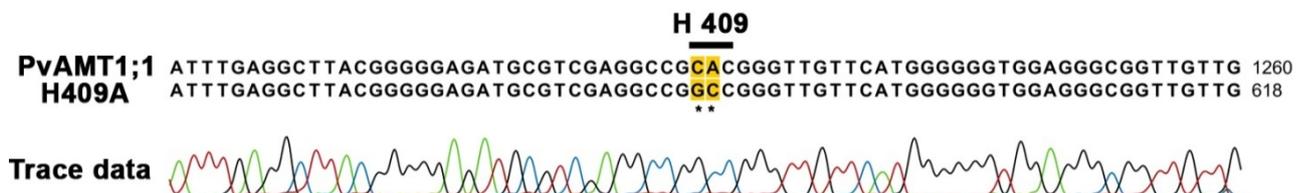
**C**



**D**



**E**



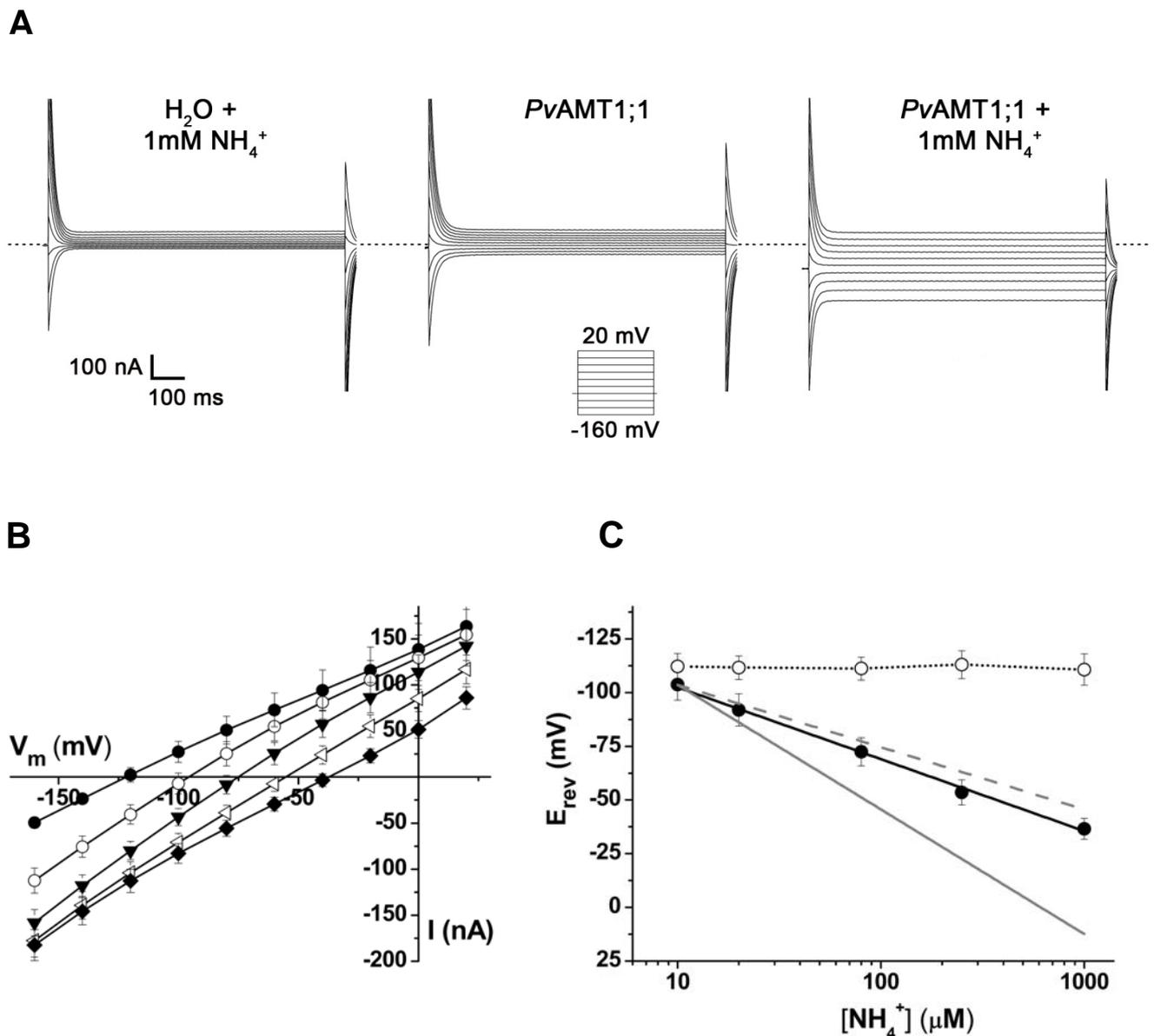
**Figura 4 . Comparación entre las secuencias del DNA de las versiones mutantes y el DNA del gen silvestre.** En cada figura se compara la secuencia del DNA silvestre (arriba) con las de las diferentes mutantes (abajo). (A) Mutante E399A. (B) Mutante H409A. (C) Mutante H211R. (D) Mutante E399A. (E) Mutante D404A.

### 8.3 Registros electrofisiológicos del transportador PvAMT1;1

#### 8.3.1 Caracterización de la versión silvestre de PvAMT1;1

El transportador PvAMT1;1 se expresó de manera heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* para llevar a cabo su caracterización electrofisiológica mediante la técnica de fijación de voltaje con dos electrodos. Para observar con mayor claridad los cambios en la magnitud de las corrientes obtenidas en presencia de  $\text{NH}_4^+$  y determinar su posible dependencia del voltaje, se utilizó un protocolo de pulsos de voltaje de 1 s de duración cuyo rango varió desde -160 mV hasta 20 mV con un aumento de 20mV entre cada pulso. Para los ovocitos expuestos a 1mM  $\text{NH}_4^+$  se observó un claro aumento de las corrientes entrantes conforme el voltaje se volvía más negativo; la magnitud de dichas corrientes fue superior a 200 nA a un potencial de -160 mV y un pH de 5.5 (Fig. 5A, derecha). Por el contrario, cuando se aplicó el protocolo de pulsos al mismo ovocito en ausencia de  $\text{NH}_4^+$  las corrientes activadas fueron de una magnitud significativamente menor (Fig 5A, centro) similares a las observadas en un ovocito control inyectado con  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 5A, izquierda). Esto indicaba que el cambio en la magnitud de las corrientes registradas fue el resultado de la expresión del transportador PvAMT1;1 y que dichas corrientes entrantes sólo se activan en presencia de  $\text{NH}_4^+$ , correspondiendo a la entrada de dicho catión hacia el citoplasma celular.

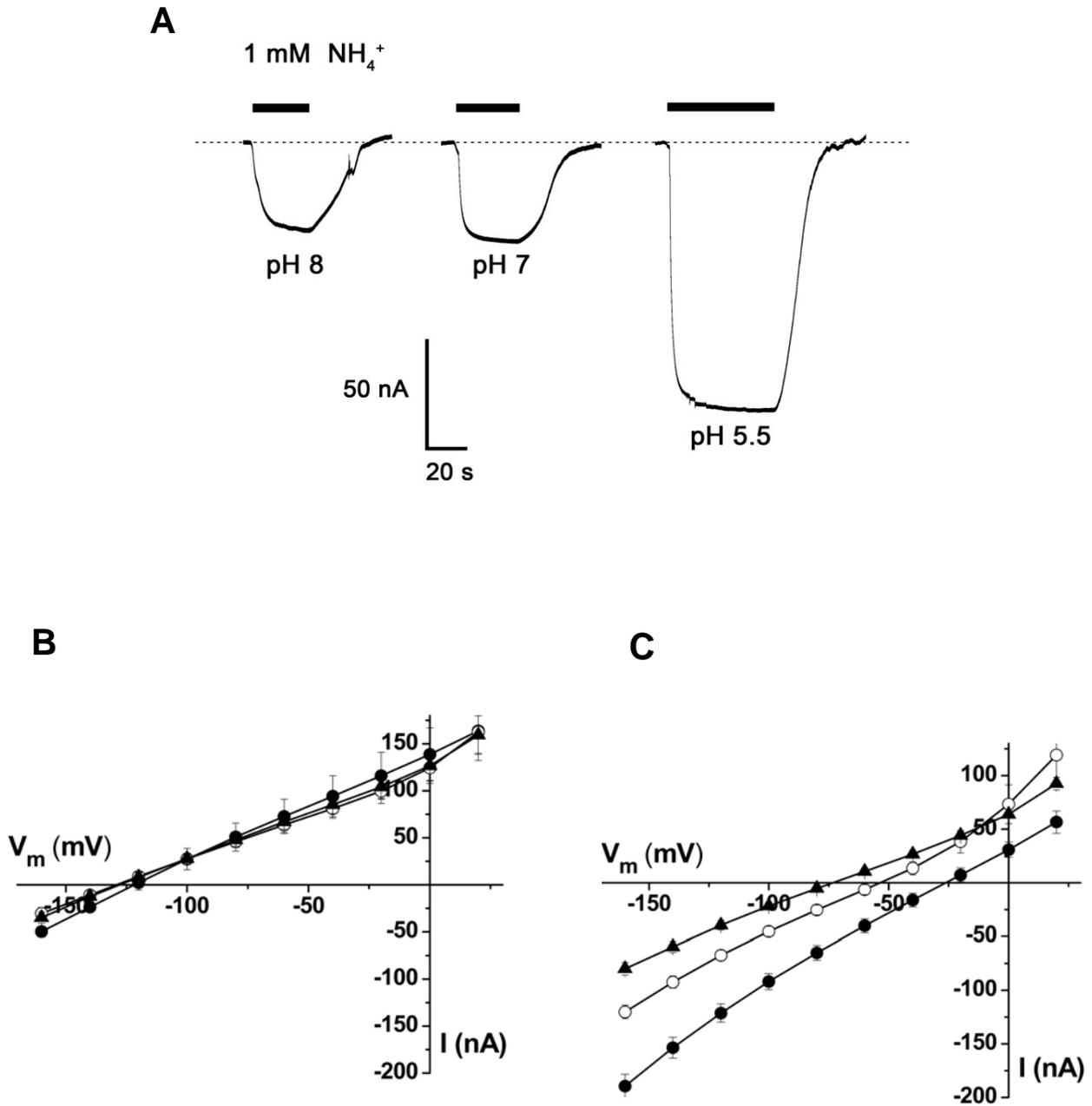
Se obtuvo información adicional sobre las propiedades de PvAMT1;1 exponiendo a los ovocitos a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  aplicando el mismo protocolo de voltaje, con el objetivo de observar su efecto en el potencial de inversión ( $E_{\text{rev}}$ ) y en la magnitud de las corrientes registradas. De los datos obtenidos se construyeron curvas corriente-voltaje (I-V) a partir de las cuales se registraron desplazamientos en el  $E_{\text{rev}}$  hacia potenciales más positivos conforme se aumentó la concentración de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 5B), lo que sugiere que efectivamente es un catión el que permea a través de las membranas de los ovocitos que expresan el transportador. Así mismo, la magnitud de las corrientes entrantes se incrementó



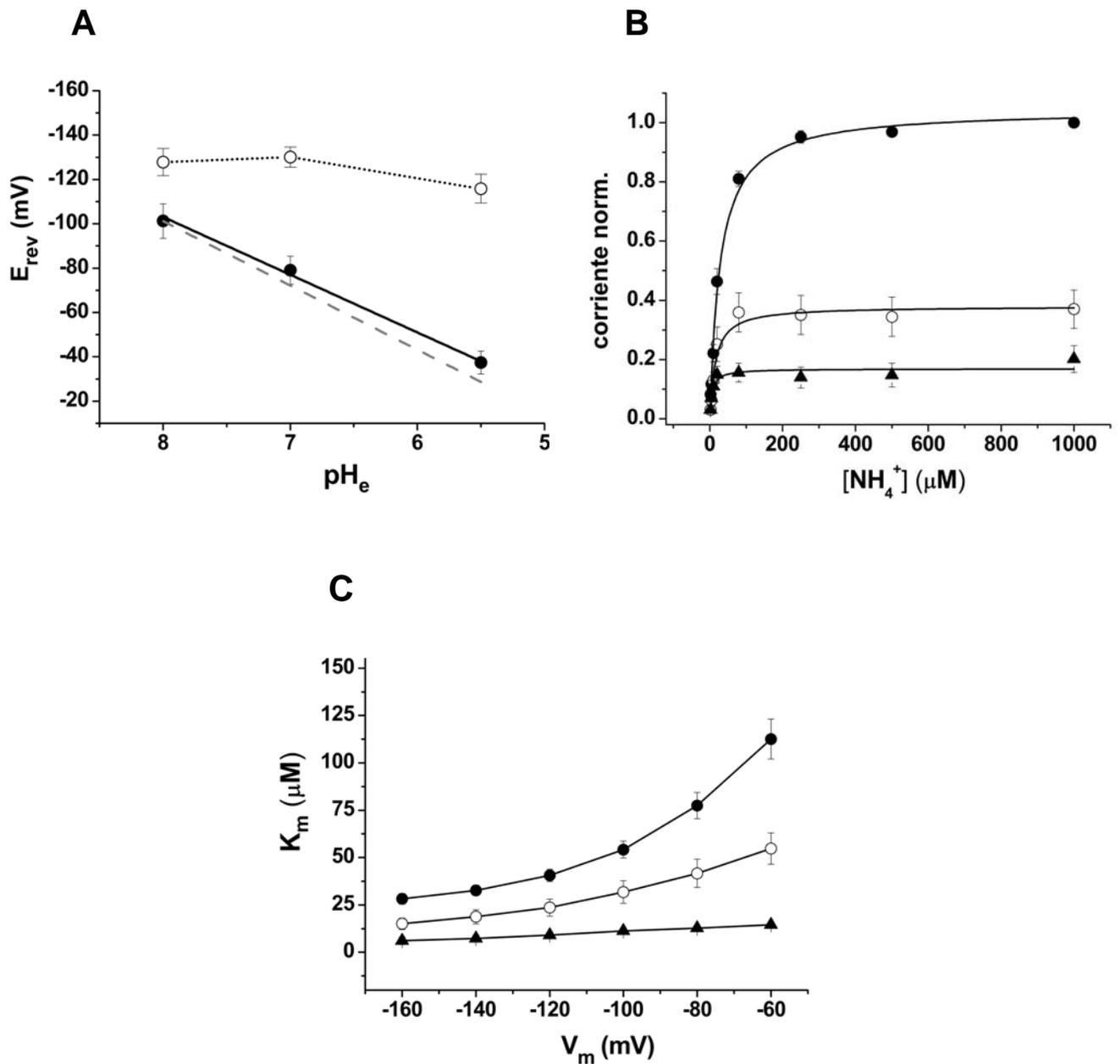
**Figura 5. Corrientes entrantes provocadas por la expresión de PvAMT1;1.** (A) Corrientes activadas por pulsos de voltaje en un ovocito inyectado con H<sub>2</sub>O (izquierda), con el transportador de amonio expuesto a solución sin NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (centro) y con el mismo transportador expuesto a solución con 1mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (derecha) el pH externo fue de 5.5 en todos los casos (el recuadro de la parte inferior muestra el protocolo de pulsos utilizado). (B) Curvas corriente-voltaje (I-V) obtenidas de ovocitos expuestos a distintas concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (● = 0, ○ = 20, ▼ = 80, ◁ = 250 and ◆ = 1000 μM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) y un pH externo de 5.5 (n = 7 ± ES). (C) Potenciales de inversión obtenidos a distintas concentraciones de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y un pH externo de 5.5. La línea negra continua representa un ajuste lineal de los datos experimentales con una pendiente de  $-33.4 \pm 3.7$  mV/decada de concentración ( $r^2 = 0.99$ ), la línea gris continua representa la pendiente hipotética de  $-58$  mV que observaríamos para un mecanismo de electrodifusión del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a través del poro de PvAMT1;1, y la línea gris discontinua representa la pendiente de  $-29$  mV esperada para un mecanismo de co-transporte (● = ovocito inyectado con PvAMT1;1, ○ = ovocito inyectado con H<sub>2</sub>O. Los datos corresponden a una media de 7 y 5 ovocitos respectivamente ± ES).

cada vez que se aumentó la concentración externa de  $\text{NH}_4^+$ , observándose una saturación aparente de la corriente en los potenciales más negativos y concentraciones cercanas a 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 5B). Al graficar los valores de  $E_{\text{rev}}$  obtenidos en presencia de diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  fue posible calcular, mediante un análisis de regresión lineal, un cambio de 33 mV por cada 10 veces el aumento de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . En contraste, el potencial de inversión de ovocitos control inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$  se mantuvo constante en el mismo rango de concentraciones. Estos resultados demuestran que la membrana de los ovocitos aumenta significativamente su permeabilidad al  $\text{NH}_4^+$  sólo cuando estos han sido inyectados con el ARNc del transportador *PvAMT1;1* (Fig. 5C).

Debido a que estudios previos realizados en el laboratorio sugerían que el transporte de  $\text{NH}_4^+$  en *PvAMT1;1* era estimulado en condiciones de pH ácido, nos enfocamos en comprobar y caracterizar más a fondo dicha respuesta. Inicialmente se utilizó un protocolo de “flujo” en el que se fijó el voltaje de la membrana de los ovocitos a -120 mV, valor que en la mayoría de los casos correspondía a su potencial de reposo, y se registraron los cambios en las corrientes generados por la presencia de 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  a diferentes valores de pH. Fue interesante observar que las corrientes entrantes provocadas por el transportador *PvAMT1;1* eran modificadas por los cambios en la concentración de protones del medio externo; su incremento fue notable cuando el ovocito se expuso a un pH ácido de 5.5 (aproximadamente 120 nA), esto es, más del doble de la corriente registrada a pH 7 (Fig. 6A). Curvas I-V obtenidas de ovocitos expuestos a los diferentes valores de pH confirmaron los cambios en la magnitud de las corrientes observados con anterioridad (Fig. 6C) e hicieron evidente que el potencial de inversión se desplazó hacia valores más positivos conforme el pH se acidificó, sugiriendo el movimiento de una especie iónica de carga positiva. La variación del  $E_{\text{rev}}$  en respuesta al pH externo mostró una relación lineal cuya pendiente fue de -26 mV por unidad de pH (Fig. 7A), y siendo los protones el único ion cuya concentración fue manipulada, estos datos sugieren que *PvAMT1;1* es capaz de transportar  $\text{H}^+$ .



**Figura 6.** La magnitud de las corrientes entrantes de amonio y el potencial de inversión son dependientes del pH externo. (A) Registro de las corrientes entrantes (negativas) activadas por 1 mM de amonio a diferentes valores de pH en un mismo ovocito inyectado con *PvAMT1;1* y fijado a un potencial de membrana de -120 mV. (B) Curvas I-V obtenidas de ovocitos expresando *PvAMT1;1* expuestos a soluciones sin  $\text{NH}_4^+$  y distintos valores de pH externo (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8) ( $n = 7 \pm \text{ES}$ ). (C) Curvas I-V obtenidas a diferentes valores de pH externo y en presencia de 1 mM  $\text{NH}_4^+$  (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8) ( $n = 8 \pm \text{SE}$ ).



**Figura 7. El potencial de inversión y la afinidad del transportador por el amonio son dependientes del pH.** (A) Potenciales de inversión obtenidos al cambiar el pH externo y manteniendo constante la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . La línea negra continua representa un ajuste lineal con una pendiente de  $-26 \pm 3.5$  mV/unidad de pH ( $r^2 = 0.99$ ), mientras que la línea gris discontinua representa la pendiente de  $-29$  mV teórica para un mecanismo de co-transporte. Valores obtenidos en presencia (●), o ausencia (○) de  $1 \text{ mM NH}_4^+$ . Los datos corresponden a la media  $\pm$  ES de 7 ovocitos. (B) Corrientes normalizadas con respecto a los valores obtenidos a  $-160$  mV (pH 5.5) graficadas en función de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Las líneas corresponden al ajuste tipo Michaelis-Menten de los datos experimentales (● = pH 5.5,  $K_m = 28.2 \pm 3 \mu\text{M}$ ; ○ = pH 7,  $K_m = 15.0 \pm 3.2 \mu\text{M}$ ; ▲ = pH 8,  $K_m = 6.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ ). (C) Valores de  $K_m$  (afinidad) para el  $\text{NH}_4^+$  en función del potencial de membrana del ovocito a diferentes valores de pH externo (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8). En B y C se han sustraído las corrientes registradas sin  $\text{NH}_4^+$ . Datos son la media  $\pm$  ES de 7 ovocitos.

Para comprobar que la modificación de las corrientes y del  $E_{rev}$  no eran consecuencia de la respuesta endógena del ovocito a las variaciones de pH, se realizaron registros similares en ovocitos inyectados con el transportador pero en ausencia de  $NH_4^+$ , obteniendo curvas I-V en las que ni la magnitud de las corrientes ni el  $E_{rev}$  fueron afectados por los mismos cambios de pH (Fig. 6B), lo cual indica que las corrientes registradas en presencia de este catión y su variación con el pH podría corresponder a la actividad de un co-transporte  $NH_4^+/H^+$ .

Otro parámetro que es importante determinar en la caracterización funcional de los transportadores es su afinidad por el sustrato. En este caso se determinaron valores de afinidad por el  $NH_4^+$  a distintos valores de pH mediante el ajuste de los datos obtenidos con la ecuación de Michaelis-Menten. De acuerdo a estos análisis *PvAMT1;1* tiene una alta afinidad por el  $NH_4^+$ , con una  $K_m$  de 15.0  $\mu M$  a -160 mV y pH 7.0, lo que concuerda con datos previamente reportados para otros transportadores de esta familia (Wood et al., 2006). Además, dicha afinidad se vio afectada por el pH extracelular. En base al análisis de los datos mostrados en la figura 7B se pudo calcular que a un potencial de -160 mV y un pH de 5.5 la  $K_m$  fue de  $28.2 \pm 3.0 \mu M$ ; la afinidad aumentó a pH 7, ya que la  $K_m$  calculada fue de  $15.0 \pm 3.0 \mu M$  y finalmente a pH 8 la afinidad fue mayor, con una  $K_m = 6.1 \pm 2 \mu M$ . Estos resultados indican que a diferencia de lo observado en otros transportadores de amonio, la afinidad de *PvAMT1;1* también es dependiente del pH extracelular, aumentando cuando éste se alcaliniza.

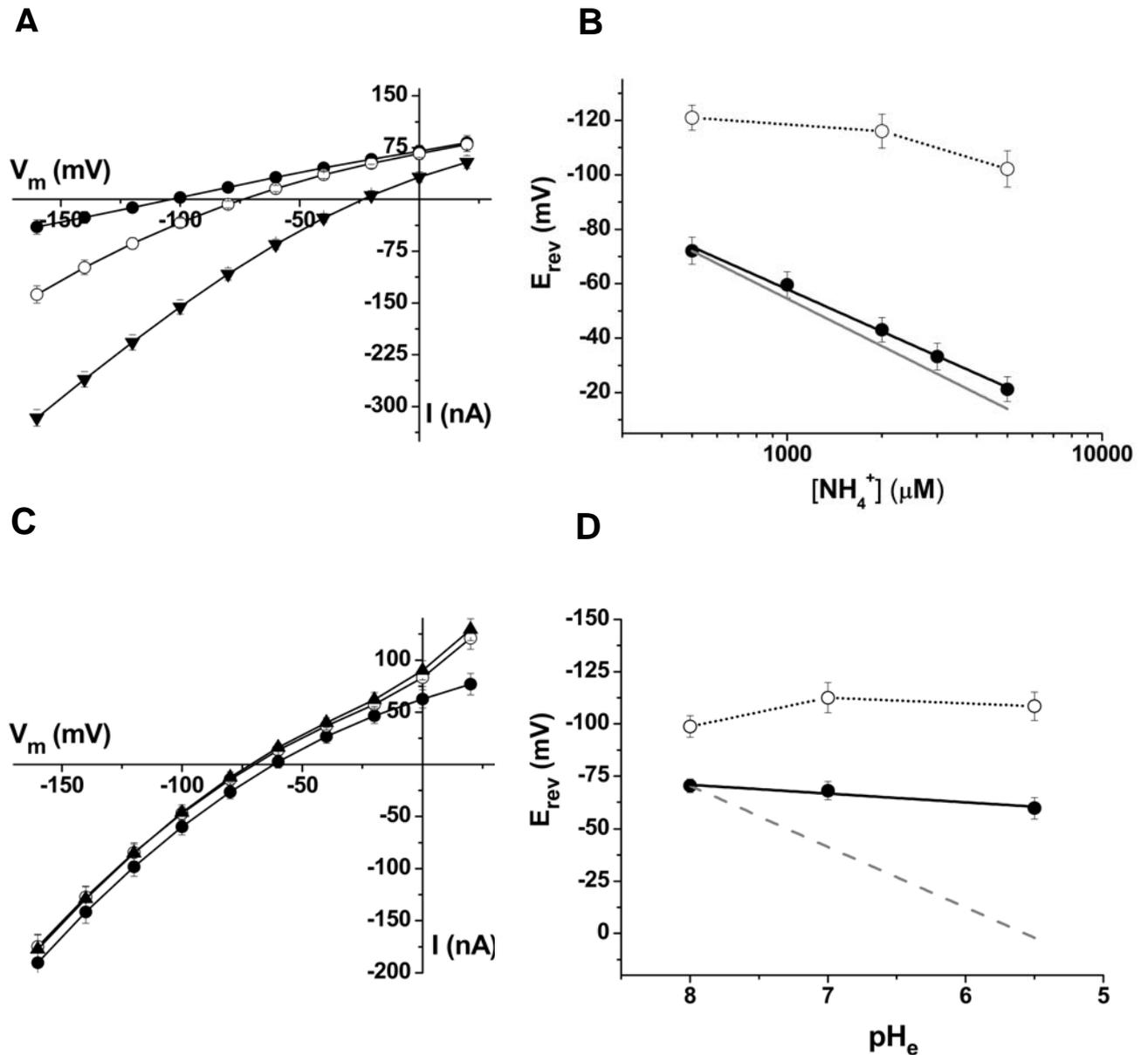
Se obtuvo mayor información sobre las propiedades de este transportador al analizar los cambios en la  $K_m$  en respuesta a las variaciones de voltaje. Fue interesante observar que la afinidad por el  $NH_4^+$  fue influida por los cambios en el potencial de membrana del ovocito, ya que mientras éste se volvía más positivo dicha afinidad disminuía de manera significativa, particularmente a pHs ácidos. Como se puede observar en la figura 7C, a pH 5.5 el valor de la  $K_m$  aumentó casi

5 veces (de 28  $\mu\text{M}$  a 115  $\mu\text{M}$ ) cuando el voltaje cambi3 de -160 mV a -60 mV, mientras que a un pH de 7.0 esta variaci3n se redujo, cambiando de 15  $\mu\text{M}$  a 50  $\mu\text{M}$  en el mismo intervalo de voltaje (Fig. 7C). En contraste, a un pH alcalino de 8.0, la afinidad por el amonio vari3 muy poco con el voltaje (Fig. 7C). Al igual que con las caracter3sticas descritas previamente, la dependencia de la afinidad por el  $\text{NH}_4^+$  con respecto del voltaje tambi3n se ve afectada por los cambios de pH extracelular. Estos datos, as3 como los mostrados en la figura 6, sugieren que el mecanismo de transporte de *PvAMT1;1* se ve afectado de manera profunda por los cambios en la concentraci3n extracelular de  $\text{H}^+$ , por lo que el transporte de  $\text{NH}_4^+$  parece ser un fen3meno m3s complejo que el esperado para un relativamente simple mecanismo de activaci3n/inactivaci3n por  $\text{H}^+$ .

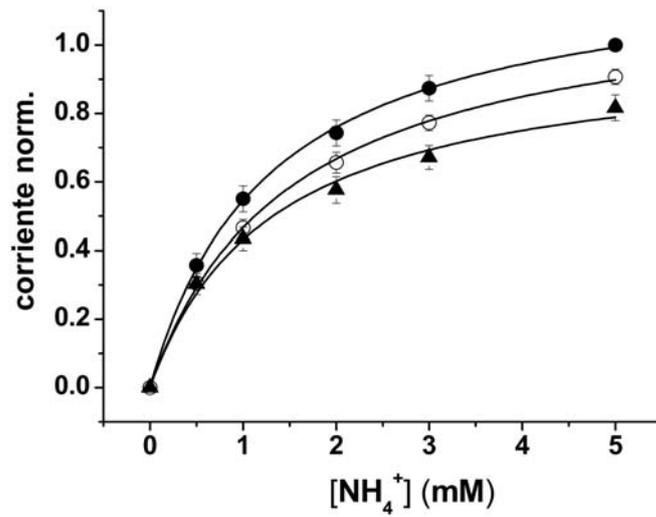
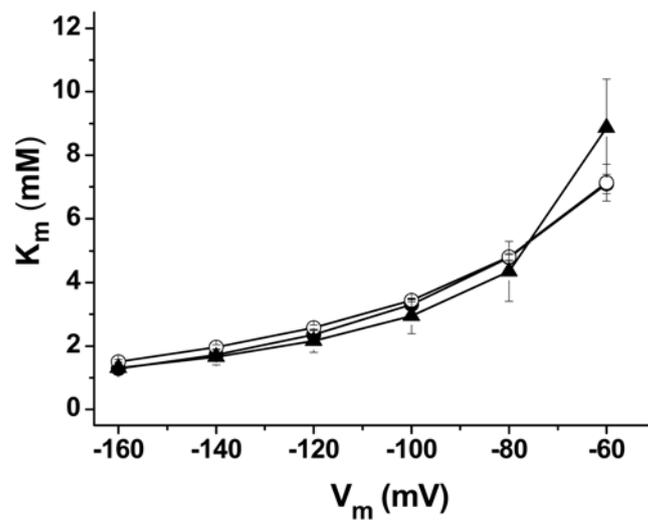
### 8.3.2 Caracterizaci3n de las versiones mutantes de *PvAMT1;1*

Con el fin de identificar cu3les amino 3cidos son los responsables de conferir la fuerte dependencia del pH extracelular observada para este transportador, se evalu3 si las mutaciones H211E, E399A y D409A modificaban las propiedades de *PvAMT1;1*, estudiando su funci3n en el sistema de ovocitos. Nos enfocamos en estos residuos debido a que E399 y D409 se localizan en una de las asas extracelulares y por lo tanto estar3an en contacto directo con este medio y expuestos a cambios en la concentraci3n de  $\text{H}^+$ . En el caso de la Histidina 211, nuestro inter3s se debi3 a que este amino 3cido se encuentra en la regi3n media del poro y es una de las dos histidinas cuya presencia se ha propuesto como esencial en el mecanismo de conducci3n; sin embargo, su funci3n ha sido muy controversial desde que se resolvi3 la estructura cristalogr3fica del transportador AMTB de *E. coli*.

Los registros electrofisiol3gicos se realizaron en las mismas condiciones que para la prote3na silvestre. En la mutante H211E se observ3 que se requer3a una concentraci3n de 0.05 mM de  $\text{NH}_4^+$  para registrar corrientes significativas



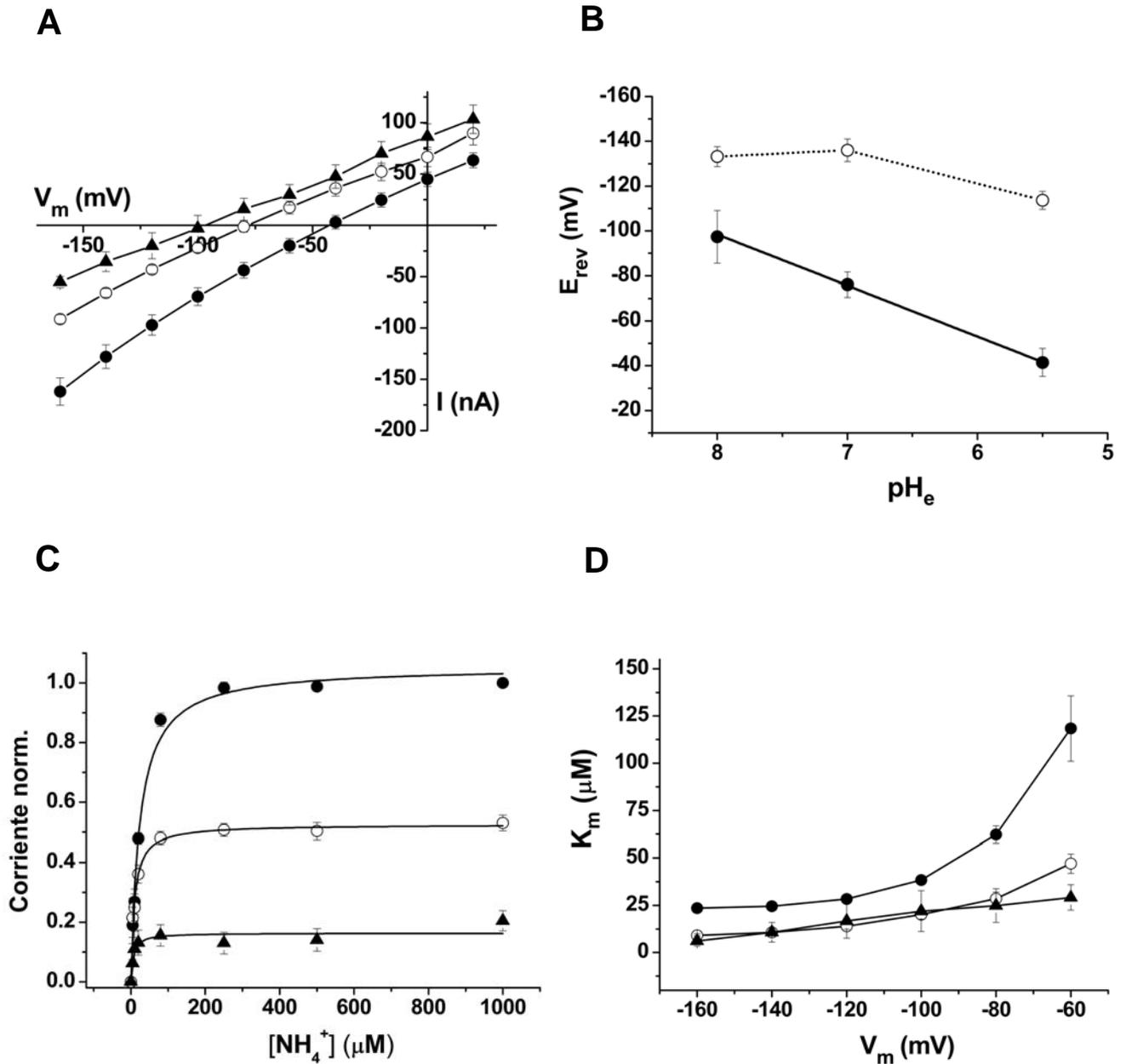
**Figura 8. La actividad de la mutante *PvAMT1;1H211E* es independiente del pH extracelular.** (A) Curvas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1H211E* expuestos a distintas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  ( $\bullet = 0$ ,  $\circ = 500$  y  $\blacktriangledown = 5000 \mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ ) y un pH externo de 5.5 (B) Potenciales de inversión obtenidos a distintas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y un pH externo de 5.5. La línea negra continua representa un ajuste lineal de los datos experimentales con una pendiente de  $-51.6 \pm 6$  mV/decada de concentración ( $r^2 = 0.99$ ), mientras que la línea gris continua representa la pendiente hipotética de  $-58$  mV predicha por la ecuación de Nernst para un canal selectivo a  $\text{NH}_4^+$  ( $\bullet =$  ovocito inyectado con *PvAMT1;1H211E*,  $\circ =$  ovocito inyectado con  $\text{H}_2\text{O}$ ). (C) Curvas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1H211E* expuestos a solución con 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  y distintos valores de pH externo ( $\bullet =$  pH 5.5,  $\circ =$  pH 7,  $\blacktriangle =$  pH 8). (D) Potenciales de inversión obtenidos al variar el pH externo en presencia ( $\bullet$ ), o en ausencia ( $\circ$ ) de 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ . La línea negra continua representa un ajuste lineal de los datos experimentales con una pendiente de  $-4.1 \pm 2.3$  mV/decada ( $r^2 = 0.91$ ), mientras que la línea gris discontinua representa la pendiente que observaríamos en un mecanismo de co-transporte.

**A****B**

**Figura 9. La mutante PvAMT1;1H211E pierde afinidad por el amonio. (A)** Corrientes normalizadas con respecto a los valores obtenidos a -160 mV (pH 5.5) y graficadas en función de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Las líneas corresponden al ajuste tipo Michaelis-Menten de los datos experimentales (● = pH 5.5,  $K_m = 1.29 \pm 0.05$  mM; ○ = pH 7,  $K_m = 1.5 \pm 0.07$  mM; ▲ = pH 8,  $K_m = 1.3 \pm 0.18$  mM). **(B)** Variaciones en la  $K_m$  para el  $\text{NH}_4^+$  en función de potencial de membrana del ovocito y a diferentes valores de pH externo (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8). Los datos son la media  $\pm$  ES de 8 ovocitos. En ambas figuras se han sustraído las corrientes registradas sin  $\text{NH}_4^+$ .

(similares a las provocadas por 10  $\mu\text{M}$  en el transportador silvestre); sin embargo, en este caso las corrientes siguieron aumentando al utilizar concentraciones mayores a 1mM de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 8A y 9A). Empleando concentraciones de hasta 5 mM no se observó una saturación aparente (Fig. 9A), contrario a lo registrado para el transportador silvestre el cual se satura a concentraciones menores a 1 mM (Fig. 7B). Debido a que el ovocito presenta un transportador endógeno de amonio activado a concentraciones mayores a 5 mM, no fue posible analizar las propiedades de la mutante H211E a estas concentraciones. El desplazamiento en el potencial de inversión registrado en el rango de concentración mencionado también fue mayor, de aproximadamente 51 mV/década de concentración (Fig. 8B). Finalmente, la magnitud de las corrientes entrantes fue similar a las registradas en la versión silvestre con 1mM de  $\text{NH}_4^+$  sin importar el pH extracelular (esta independencia del pH también se mantuvo en concentraciones superiores; Fig. 9A), indicando que esta mutante perdió su sensibilidad al pH externo (Fig. 8C). Paralelamente, el potencial de inversión prácticamente no cambió cuando se aumentó la concentración extracelular de protones, observándose un desplazamiento de sólo 4 mV por unidad de pH (Fig. 8D).

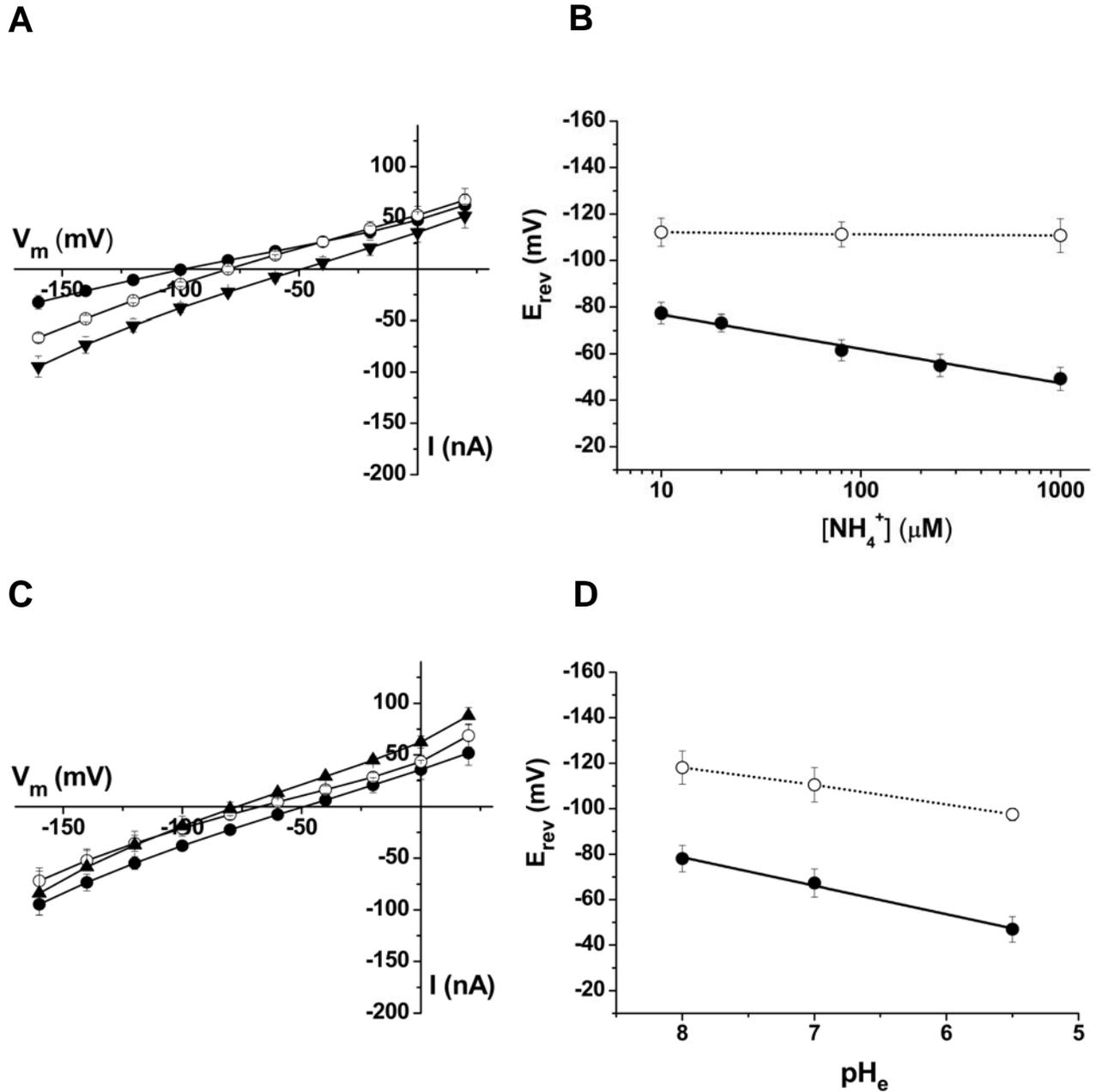
Otro cambio importante que se observó en la mutante H211E fue la pérdida de su afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ . Como se muestra en la figura 9A, el valor de la  $K_m$  aumentó a 1.3 mM en comparación con un valor de 28  $\mu\text{M}$  en el transportador silvestre. Dicho valor fue calculado a un potencial de -160 mV y un pH de 5.5, y prácticamente se mantuvo constante tanto a pH 7 ( $K_m = 1.5$ ) como a pH8 ( $K_m = 1.3$ ). Por lo tanto, la independencia de la actividad de esta mutante con respecto al pH externo también se reflejó en su afinidad por el amonio. Finalmente, la  $K_m$  al igual que en el caso del transportador silvestre, mostró una dependencia con respecto al potencial de membrana, pero dicha dependencia no se modificó con los cambios de pH extracelular (Fig. 9B).



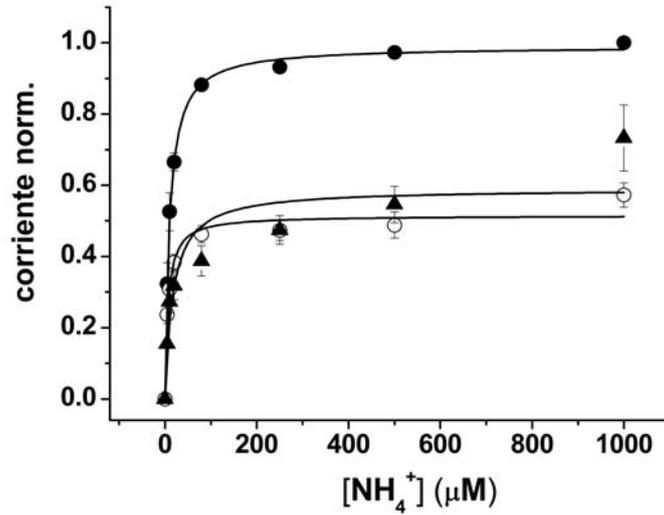
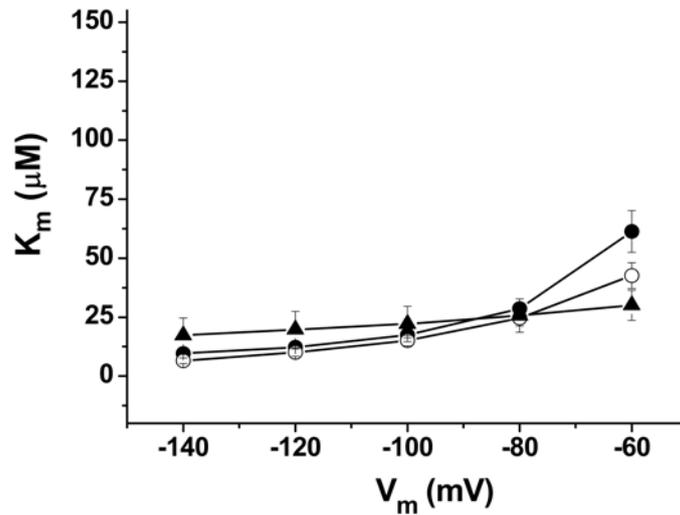
**Figura 10. La actividad de la mutante E399A es muy similar a la registrada en la silvestre.** (A) Curvas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1E399A* expuestos a solución de registro con 1 mM  $\text{NH}_4^+$  y a distintos valores de pH externo (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8). (B) Potenciales de inversión obtenidos al variar el pH externo en presencia (●), o en ausencia (○) de 1 mM  $\text{NH}_4^+$ . La línea punteada representa un ajuste lineal de los datos experimentales con una pendiente de  $-22.7 \pm 4.4$  mV/decada ( $r^2 = 0.99$ ). (C) Corrientes normalizadas con respecto a los valores obtenidos a -160 mV (pH 5.5) graficadas en función de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Las líneas muestran un ajuste tipo Michaelis-Menten de los datos experimentales (● = pH 5.5,  $K_m = 23.48 \pm 2.4$   $\mu\text{M}$ ; ○ = pH 7,  $K_m = 9.05 \pm 0.87$   $\mu\text{M}$ ; ▲ = pH 8,  $K_m = 6.13 \pm 2.7$   $\mu\text{M}$ ). (D) Variaciones en la  $K_m$  para el  $\text{NH}_4^+$  en función del potencial de membrana del ovocito a diferentes valores de pH externo (● = pH 5.5, ○ = pH 7, ▲ = pH 8). Los datos son la media  $\pm$  ES de 4 ovocitos. En C y D se han sustraído las corrientes registradas sin  $\text{NH}_4^+$ .

En el caso de las mutantes E399A y D404A, se decidió cambiar un ácido glutámico por una alanina, pensado en eliminar así su carga negativa, lo que afectaría la posible interacción entre dichos aminoácidos y los protones (o en su caso, el  $\text{NH}_4^+$ ). Los registros obtenidos de ovocitos expresando E399A mostraron que la magnitud de la corriente fue muy similar a la que se registró en el transportador silvestre, y que al igual que en éste, aumentó significativamente cuando se incrementó la concentración extracelular de protones (Fig. 10A). Así mismo, el potencial de inversión también tuvo un desplazamiento similar al registrado previamente en *PvAMT1;1*, desplazándose a valores más positivos conforme se incrementó la concentración de protones (22 mV/ unidad de pH) (Fig. 10B). En lo que se refiere a la afinidad, se observó la misma tendencia que en la proteína silvestre, con valores calculados muy similares; por ejemplo, a un potencial de -160 mV, la  $K_m$  a pH 5.5 fue de  $23.4 \pm 2 \mu\text{M}$ , mientras que a un pH de 7 fue de  $9 \pm 0.8 \mu\text{M}$ , y finalmente a pH 8 fue de  $6.7 \pm 2 \mu\text{M}$  (Fig. 10C). Por último, se determinó cómo varió dicha  $K_m$  con respecto a los cambios en el potencial de membrana. En esta mutante la respuesta también fue similar a la observada en el transportador silvestre; esto es, la afinidad por el amonio se perdió significativamente cuando el voltaje se hizo más positivo y el registro se realizó con un pH de 5.5. Cuando el mismo rango de voltaje se aplicó con un pH de 7 y 8 la afinidad se mantuvo relativamente constante (Fig. 10D). En conjunto, todos los parámetros analizados fueron prácticamente idénticos a los registrados en la proteína silvestre, por lo que la mutación en este caso parece no tener efecto sobre el mecanismo de transporte de *PvAMT1;1*.

Con respecto a la mutante D404A, se observó que su actividad es menor a la que se registro en la proteína silvestre y en las mutantes anteriores. La magnitud de la corriente activada en respuesta a 1mM de  $\text{NH}_4^+$  y a un pH de 5.5 tuvo una disminución considerable (la mitad de la observada en el transportador silvestre), y el desplazamiento en el potencial de inversión sólo fue de 14mV/década de concentración de  $\text{NH}_4^+$  a ese mismo valor de pH externo (Fig. 11A y B). Esta



**Figura 11. La mutante *PvAMT1;1D404A* es parcialmente dependiente del pH extracelular.** (A) Curvas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1D404A* expuestos a distintas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  ( $\bullet$  = 0,  $\circ$  = 10 y  $\blacktriangledown$  = 1000  $\mu\text{M}$   $\text{NH}_4^+$ ) y un pH externo de 5.5. (B) Potenciales de inversión obtenidos a distintas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y un pH externo de 5.5. La línea negra continua representa un ajuste lineal de los datos experimentales con una pendiente de  $-14.7 \pm 2.8$  mV/decada de concentración ( $r^2 = 0.97$ ) ( $\bullet$  = ovocito inyectado con *PvAMT1;1D404A*,  $\circ$  = ovocito inyectado con  $\text{H}_2\text{O}$ ). (C) Curvas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1D404A* expuestos a solución con 1 mM de  $\text{NH}_4^+$  y distintos valores de pH externo ( $\bullet$  = pH 5.5,  $\circ$  = pH 7,  $\blacktriangle$  = pH 8). (D) Potenciales de inversión obtenidos al variar el pH externo en presencia ( $\bullet$ ), o en ausencia ( $\circ$ ) de 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ . La línea negra continua representa un ajuste lineal con una pendiente de  $-12.5 \pm 3.2$  mV/decada ( $r^2 = 0.99$ ). Los datos son la media  $\pm$  ES de 4 ovocitos.

**A****B**

**Figura 12. La afinidad de la mutante *PvAMT1;1D404A* es menos dependiente del potencial de membrana. (A)** Corrientes normalizadas con respecto a los valores obtenidos a -140 mV (pH 5.5) graficadas en función de la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . Las líneas corresponden a un ajuste tipo Michaelis-Menten de los datos experimentales ( $\bullet$  = pH 5.5,  $K_m = 9.59 \pm 0.44 \mu\text{M}$ ;  $\circ$  = pH 7,  $K_m = 6.52 \pm 1.16 \mu\text{M}$ ;  $\blacktriangle$  = pH 8,  $K_m = 17.22 \pm 7.3 \mu\text{M}$ ). **(B)** Valores de  $K_m$  para el  $\text{NH}_4^+$  en función del potencial de membrana del ovocito a diferentes valores de pH externo ( $\bullet$  = pH 5.5,  $\circ$  = pH 7,  $\blacktriangle$  = pH 8). Los datos corresponden a la media  $\pm$  ES de 4 ovocitos. En ambas figuras se han sustraído las corrientes registradas sin  $\text{NH}_4^+$ .

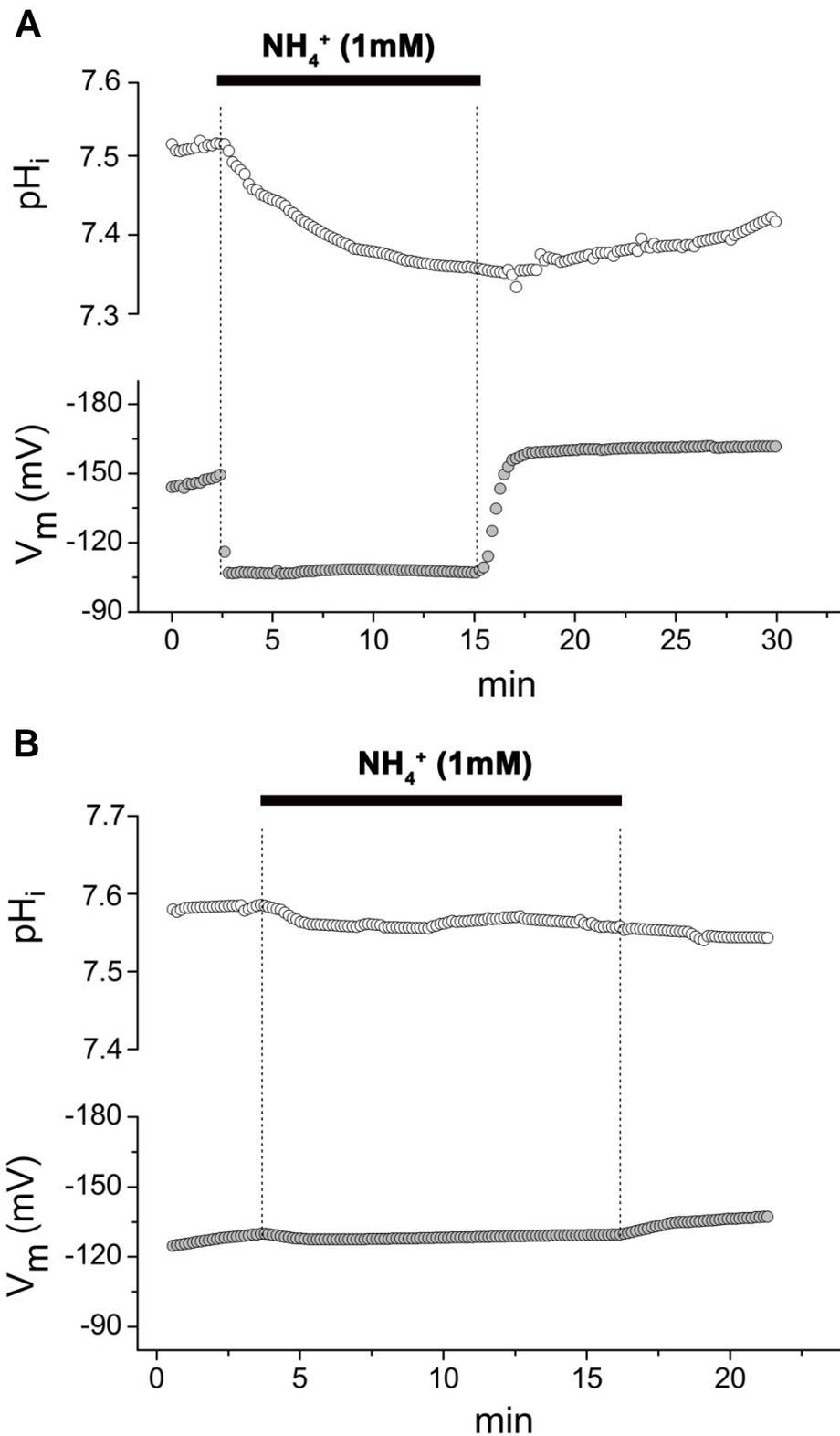
mutante perdió parcialmente su dependencia del pH. La magnitud de las corrientes registradas a pH 8, 7 y 5.5 fue similar en presencia de 1mM de  $\text{NH}_4^+$ , como se puede observar en la figura 11C; y a pesar de que el potencial de inversión se desplazó hacia valores más positivos cuando se aumentó la concentración de protones, lo hizo en menor magnitud que lo observado para la proteína silvestre, con una pendiente de 12 mV por unidad de pH (Fig. 11D). En cuanto a la afinidad, se observó una disminución en los valores calculados para la  $K_m$  (con excepción de aquellos obtenidos a pH 8), además de que dichos valores cambiaron relativamente poco cuando se modificó el pH externo y el voltaje (Fig. 12A y B). Es decir, su afinidad aumentó y se perdió parcialmente su dependencia del voltaje aplicado a la membrana y del pH.

#### **8.4 Mediciones de pH intracelular**

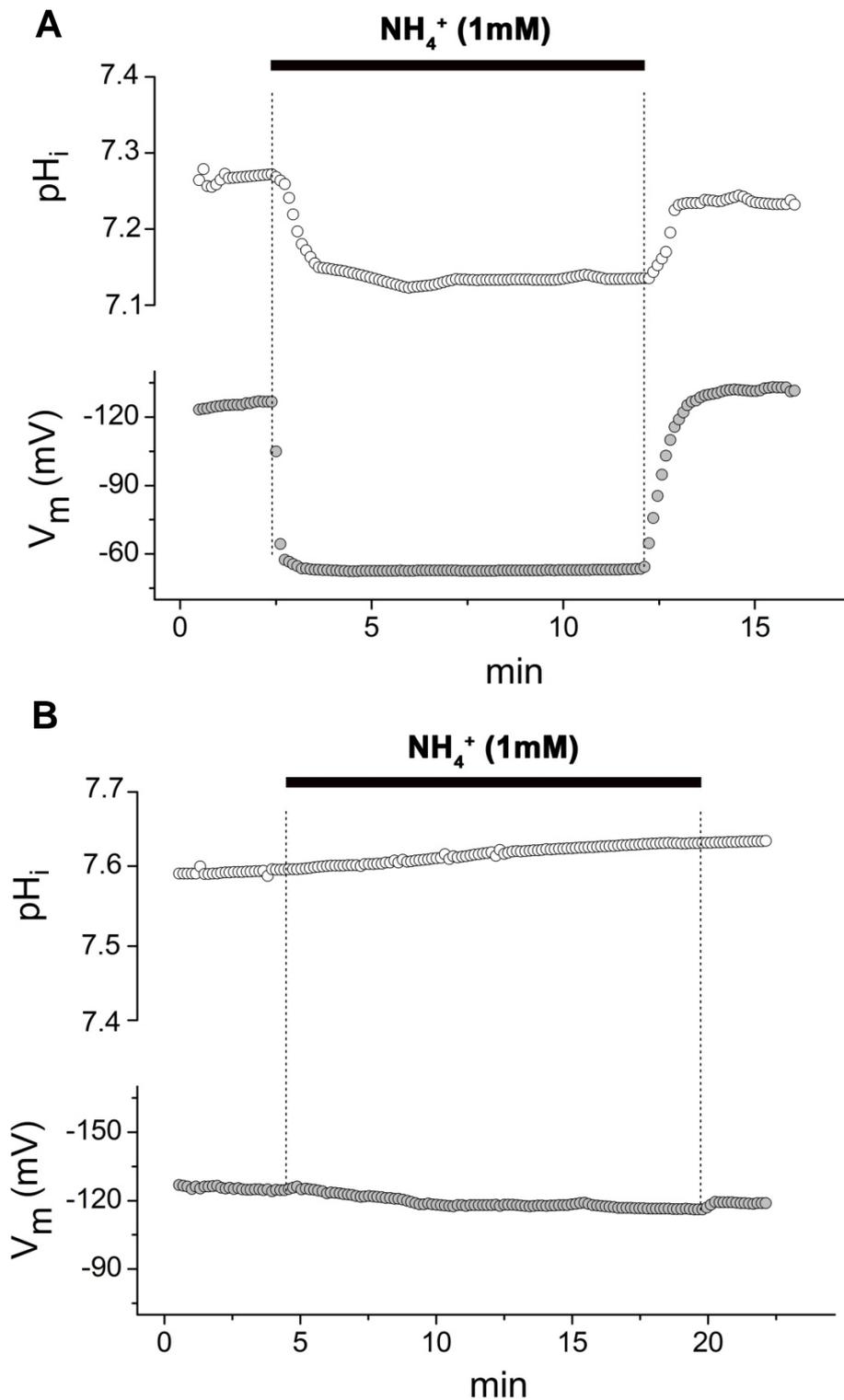
Se realizaron mediciones del pH intracelular con el fin de tener más evidencias para apoyar la hipótesis de que el transportador *PvAMT1;1* funciona como un co-transportador que utiliza el gradiente de protones para mover  $\text{NH}_4^+$  en contra de su gradiente electroquímico. Esto bajo la suposición de que la activación constante de un mecanismo de co-transporte  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  provocaría una acidificación del pH intracelular debido a la continua entrada de protones al citoplasma. Si por el contrario, el transportador únicamente moviliza  $\text{NH}_4^+$ , el pH intracelular debería de mantenerse sin cambios significativos, ya que aunque este catión puede desprotonarse para dar lugar a  $\text{NH}_3$ , su pKa es de 9.2 y por lo tanto esto ocurriría muy poco a un pH intracelular de aproximadamente 7.5. En el caso alternativo de que el mecanismo corresponda a un co-transporte  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ , los protones que ingresen reaccionarían rápidamente con el mismo  $\text{NH}_3$  y el pH intracelular tampoco cambiaría de manera significativa.

Las mediciones del pH intracelular se realizaron en ovocitos que expresaron al transportador silvestre o a la mutante H211E utilizando electrodos selectivos a protones. En un inicio, los ovocitos se expusieron a una solución de registro con un pH de 7.0. Una vez que el potencial de membrana se estabilizó, se agregó al medio 1 mM de  $\text{NH}_4^+$ . En estas condiciones fue posible registrar una acidificación lenta del citoplasma de una magnitud de aproximadamente 0.2 unidades de pH (Fig. 13A). Esta acidificación coincidió con una despolarización de la membrana, que de acuerdo con los resultados anteriores, indica la entrada de cationes como resultado de la activación del transportador. Al remover el  $\text{NH}_4^+$  del medio el potencial de membrana regresó a su valor inicial, registrándose una recuperación parcial del pH intracelular (observar las líneas punteadas) (Fig. 13A). Como control se realizó un registro similar con un ovocito inyectado con  $\text{H}_2\text{O}$ , y se observó que no hubo una acidificación intracelular significativa ni tampoco despolarización de la membrana (Fig. 13B), lo cual confirma que la acidificación registrada en los ovocitos inyectados con el transportador silvestre se debe efectivamente a la actividad y presencia de esta proteína en la membrana del ovocito.

Debido a que la actividad de la proteína parece ser mayor a pH 5.5, se realizaron registros con ovocitos expuestos a estas condiciones. En este caso también se observó una acidificación del pH intracelular que coincidió con la despolarización del potencial de membrana cuando se agregó 1mM  $\text{NH}_4^+$ ; con la diferencia de que la magnitud de dicha acidificación fue menor que la observada en ovocitos expuestos a pH 7 (Fig. 14A). Cuando se realizaron los registros de ovocitos control expuestos al mismo pH se observó una ligera alcalinización del citoplasma, tendencia contraria de aquella mostrada por los controles expuestos a pH 7 (Fig. 14B).

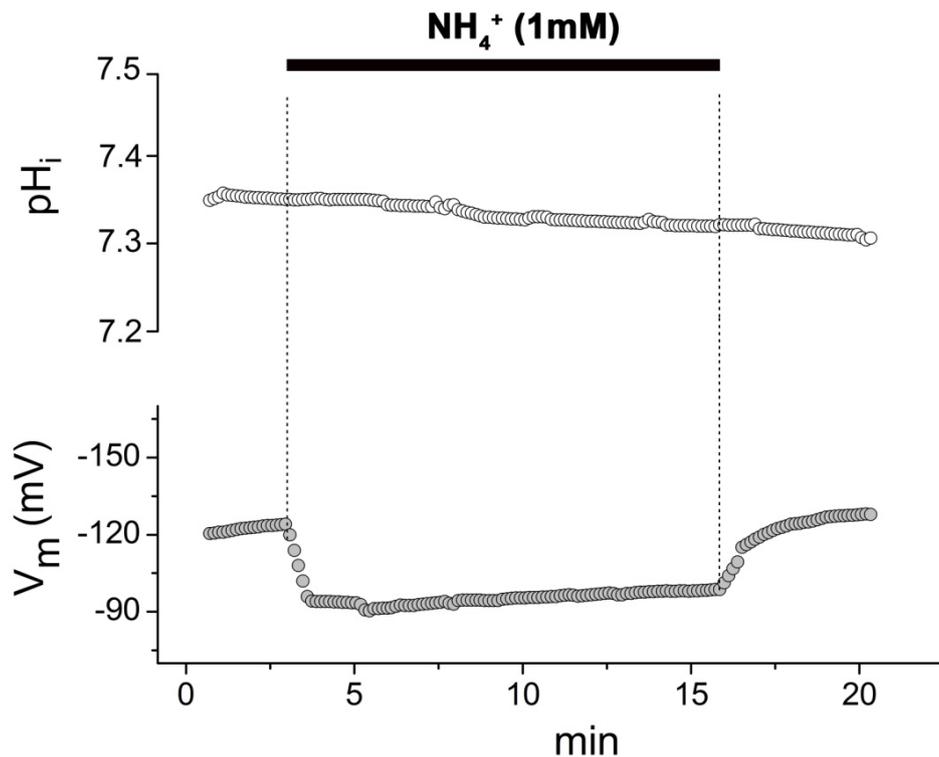


**Figura 13. PvAMT1;1 provoca la acidificación del pH intracelular de ovocitos expuestos a amonio.** (A) Exposición de un ovocito inyectado con *PvAMT1;1* a 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y pH 7.0, causó la acidificación del pH intracelular (○) y la depolarización del potencial de membrana (●). (B) En contraste, el pH intracelular (○) así como el potencial de membrana (●) de un ovocito control inyectado con H<sub>2</sub>O permanecieron prácticamente constantes cuando fueron expuestos a 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y un pH extracelular de 7.0.



**Figura 14. La acidificación del citoplasma fue de menor magnitud cuando los ovocitos fueron expuestos a un pH extracelular de 5.5. (A)** El pH intracelular (○) de un ovocito inyectado con *PvAMT1;1* expuesto a 1 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y pH extracelular de 5.5 se acidificó más rápidamente aunque con una magnitud menor que en ovocitos expuestos a un pH extracelular de 7; por otra parte, la despolarización del potencial de membrana (●) fue mayor con un pH externo de 5.5. **(B)** El pH intracelular (○) de un ovocito control se alcalinizó ligeramente mientras el potencial de membrana (●) permaneció constante cuando fue expuesto a las mismas condiciones.

Finalmente, se realizaron mediciones con ovocitos inyectados con el ARNc de la mutante *PvAMT1;1H211E*, la cual transporta  $\text{NH}_4^+$  independientemente del pH extracelular. Para esta mutante observamos una ligera acidificación (aproximadamente 0.04 unidades de pH), cuya magnitud fue muy similar a la registrada en ovocitos control a pH 7 (Fig. 15; comparar con Fig. 13A). Además, esta pequeña acidificación fue muy lenta y no coincidió con el inicio de la despolarización de la membrana, por lo que parece ser un fenómeno no relacionado con la actividad del transportador *PvAMT1;1H211E*. Independientemente de lo anterior, el hecho de que se observe la despolarización es importante porque sugiere que el transportador *PvAMT1;1H211E* cataliza el movimiento de amonio sin transportar  $\text{H}^+$ .

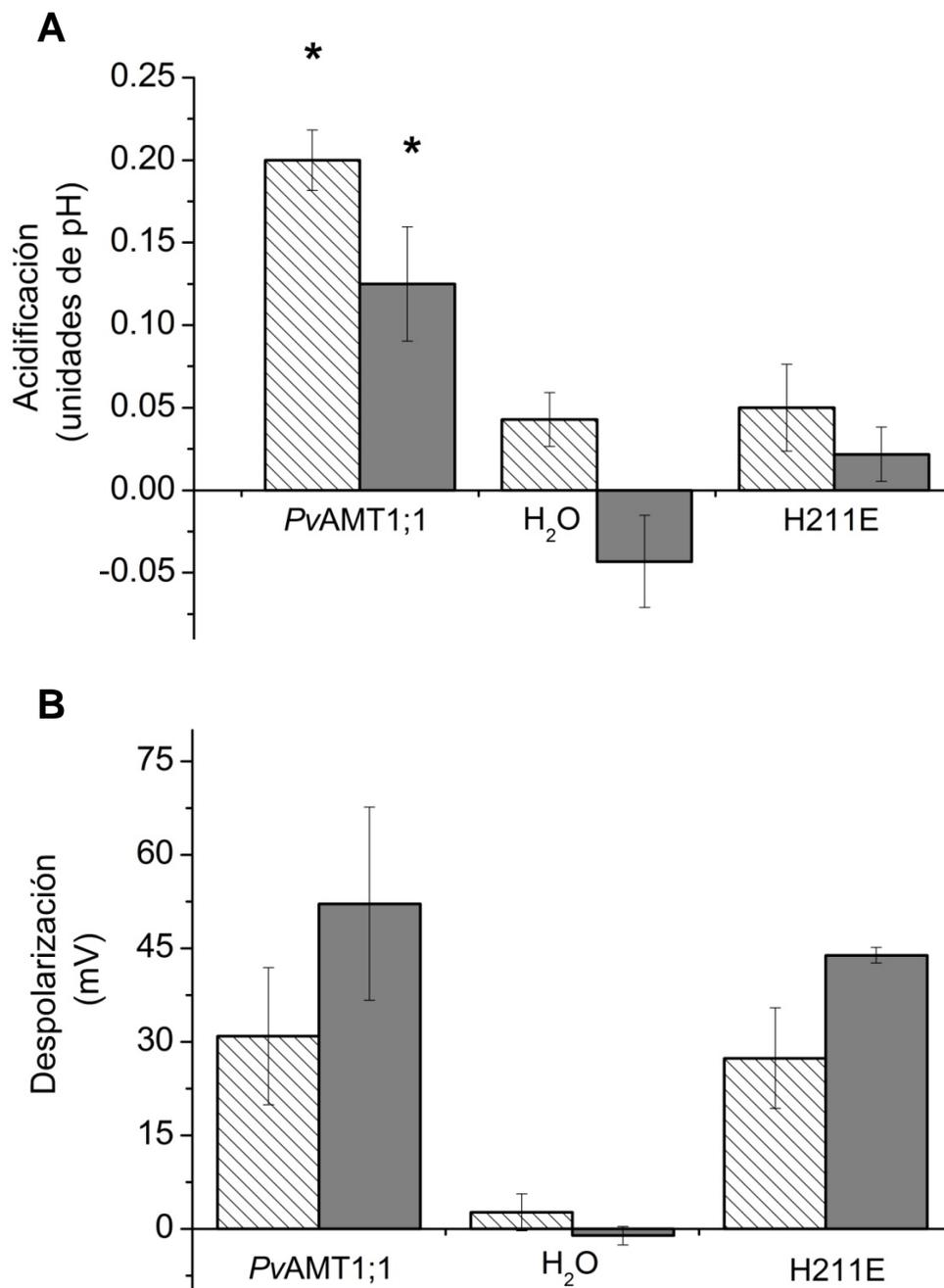


**Figura 15.** Los cambios en el pH intracelular de ovocitos expresando la mutante *PvAMT1;1H211E* fueron menores en respuesta al  $\text{NH}_4^+$ . (A) El pH intracelular (○) se acidificó ligeramente (0.05 unidades de pH) mientras el potencial de membrana (●) se despolarizó sólo 30 mV con la exposición del ovocito inyectado con *PvAMT1;1H211E* a 1 mM  $\text{NH}_4^+$  y con un pH extracelular de 7.

Las mediciones del pH intracelular se repitieron en varios ovocitos para una misma condición y los valores de acidificación y de despolarización provocados por la activación del transportador en respuesta a  $\text{NH}_4^+$  se promediaron (Fig. 16A y B). Obtuvimos una diferencia estadísticamente significativa ( $P = <0.001$ ) en la acidificación de ovocitos inyectados con el ARNc de *PvAMT1;1* a pH7 y 5.5 con respecto a los ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$ . La diferencia entre la acidificación de los ovocitos control y la acidificación de los ovocitos inyectados con el transportador silvestre a un pH 7.0 fue de 0.16 unidades de pH. En los ovocitos inyectados con el transportador y con  $\text{H}_2\text{O}$  expuestos a un pH externo de 5.5 la diferencia entre los valores de pH registrados fue de 0.17 unidades de pH. Para los ovocitos inyectados con la mutante *PvAMT1;1H211E* expuestos a pH 7 no hubo diferencia significativa entre la acidificación registrada entre éstos y el control.

### **8.5 Determinación de la expresión del transportador *PvAMT1;1* en los diferentes tejidos del frijol**

Con el fin de poder relacionar los datos obtenidos anteriormente con una función fisiológica específica del transportador *PvAMT1;1*, nos dimos a la tarea de determinar en qué tejidos se expresa el transcrito correspondiente a dicha proteína. Además de investigar cómo varían sus niveles de expresión en los distintos órganos de la planta, también determinamos dicha variación en dos condiciones nutricionales: un tratamiento en el que se suministró nitrógeno de forma abundante, añadido en forma de  $\text{KNO}_3$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  a la solución nutritiva con la que se regaron las plantas; y un segundo tratamiento en el cual no se suministró nitrógeno pero se inocularon las raíces de las plantas con *Rizobium etli* para promover la formación de nódulos y la fijación atmosférica del nitrógeno requerido para su crecimiento.

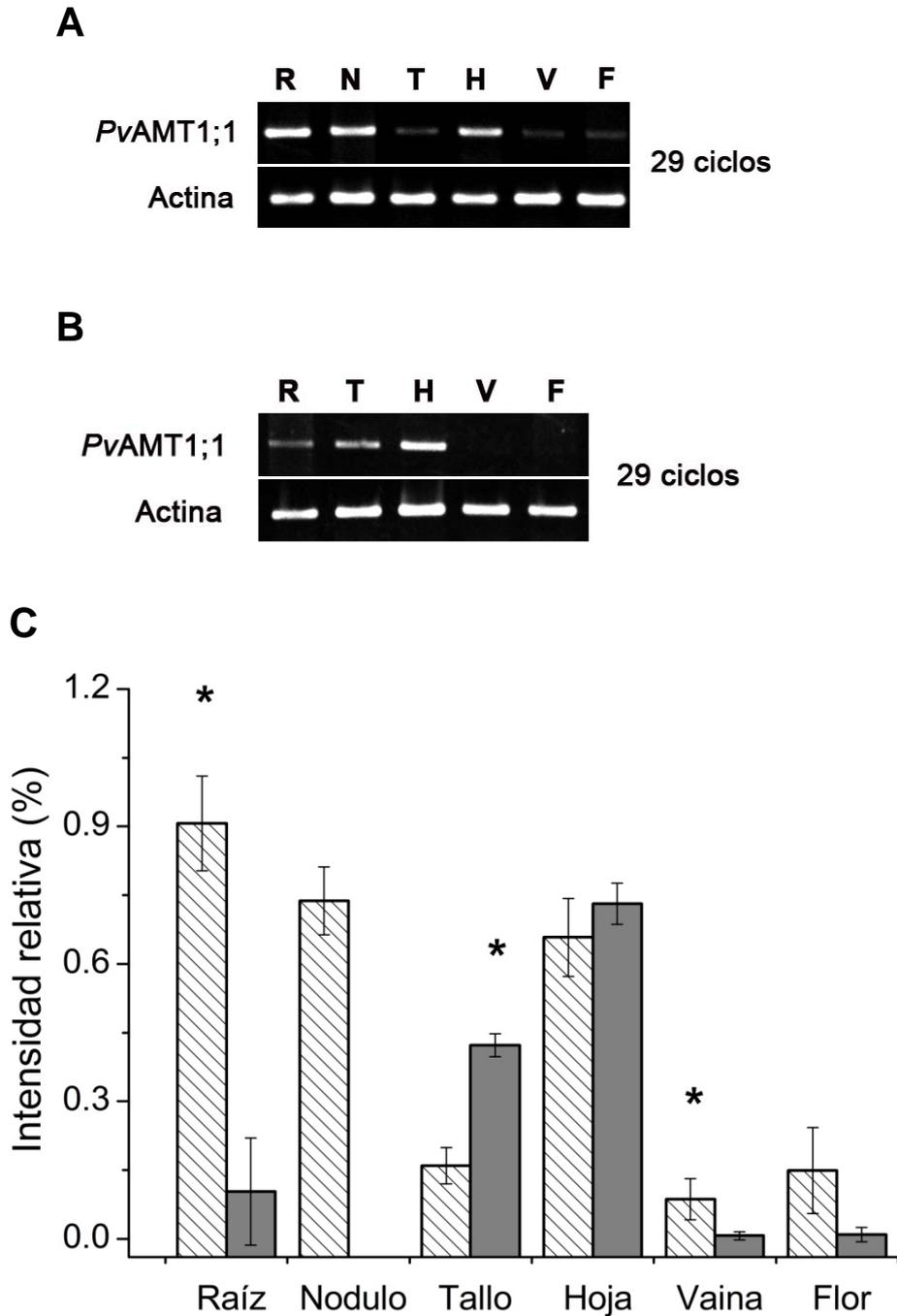


**Figura 16. Cambios en el pH intracelular y en el potencial de membrana de ovocitos expresando *PvAMT1;1* o a la mutante *PvAMT1;1H211E* en respuesta al  $\text{NH}_4^+$ .** (A) Acidificación intracelular promedio en unidades de pH de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1* a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 6) y pH 5.5 (barras grises, n = 4); ovocitos inyectados con *PvAMT1;1H211E* a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 5) y pH 5.5 (barras grises, n = 2); y H<sub>2</sub>O a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 7) y pH 5.5 (barras grises, n = 5). Los valores representan la media  $\pm$  DE; el asterisco indica diferencias significativas ( $P < 0.001$ ) entre los ovocitos inyectados con el transportador silvestre y su control respectivo. (B) Despolarización promedio de la membrana en respuesta a 1mM  $\text{NH}_4^+$  de ovocitos inyectados con *PvAMT1;1* a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 6) y pH 5.5 (barras grises, n = 4); ovocitos inyectados con *PvAMT1;1H211E* a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 5) y pH 5.5 (barras grises, n = 2); y de ovocitos inyectados con H<sub>2</sub>O a un pH extracelular de 7 (barras blancas, n = 7) y pH 5.5 (barras grises, n = 5). Los valores representan la media  $\pm$  DE.

Mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo observamos que en las plantas noduladas el transcrito se encuentra presente en mayor proporción en los tejidos de la raíz, nódulos y hojas de la planta; siendo la raíz el tejido con la mayor abundancia, seguido de los nódulos y las hojas que mostraron niveles similares. En cuanto al tallo, vaina y flor, los niveles de expresión fueron significativamente menores, y muy similares entre sí (Fig. 17A y B).

Se observaron algunos cambios significativos en las plantas no inoculadas (a las cuales se les suministraba nitrógeno en abundancia): detectamos una dramática disminución en la expresión del transcrito en la raíz comparada con la observada en las plantas inoculadas, llegando a niveles igual o más bajos que los observados en vaina y flor. También se observó un aumento significativo de la expresión del transcrito en tallo con respecto de la otra condición, y una disminución en vaina y flor (Fig. 17C). En este caso, el tejido que mostró la mayor abundancia de ARNm fue la hoja, cuyos niveles fueron considerablemente superiores a los obtenidos para el resto de los tejidos.

De manera general, observamos que en condiciones limitadas de nitrógeno la presencia del transcrito parece ser muy importante en raíz, hojas y nódulos; mientras que en presencia de nitrógeno se expresa de manera abundante en hojas y tallo, mostrando una dramática disminución de su expresión en la raíz.



**Figura 17. Expresión del transcrito *PvAMT1;1* en los diferentes tejidos del frijol.** (A). La amplificación del transcrito mediante RT-PCRs semi-cuantitativos muestra los niveles de expresión de *PvAMT1;1* y Actina en distintos tejidos de plantas de frijol inoculadas con *Rhizobium etli* (R = raíz, N = nodulos, T = tallo, H = hoja, V = vaina, F = flor). (B) Expresión de *PvAMT1;1* y Actina en distintos tejidos de plantas de frijol no inoculadas (R = raíz, T = tallo, H = hoja, V = vaina, F = flor). (C) Niveles de expresión promedio de *PvAMT1;1* de plantas inoculadas (barras blancas) y plantas no inoculadas (barras grises) normalizados con respecto a la expresión de actina. Los resultados son medias  $\pm$  DE de tres muestras biológicas y tres replicas técnicas (\* = diferencia significativa en los tejidos de raíz, tallo ( $P = <0.001$ ) y vaina ( $P = 0.039$ ) entre plantas inoculadas y no inoculadas).

## 9. Discusión

### 9.1 Diferencias estructurales entre *PvAMT1;1* y *EcAMTB*

La obtención de la estructura tridimensional de una proteína puede ser sumamente útil para hacer algunas predicciones acerca de su funcionamiento y características físico-químicas particulares. Las propiedades del poro de los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  y la función de algunos aminoácidos que lo conforman han sido aspectos controversiales en lo que se refiere a la investigación actual del tema. Su carácter altamente hidrofóbico ha obligado a distintos grupos a proponer mecanismos de transporte que no involucren el paso del catión  $\text{NH}_4^+$  por esta área, ya que aparentemente dicho proceso es energéticamente desfavorable; sin embargo, experimentos funcionales realizados con transportadores de amonio de plantas y animales (familia Rh) han revelado que pueden existir diferentes mecanismos de transporte dentro de la misma familia, y modelos estructurales calculados con base a su homología con AMTB también han revelado algunas diferencias.

Si bien un modelo tridimensional por homología no es lo mismo que contar con la estructura cristalográfica de una proteína, es posible utilizar esta herramienta para hacer algunas predicciones funcionales que orienten los futuros experimentos. El modelo de *PvAMT1;1* que se obtuvo con la aplicación Modweb del programa MODELLER mostró una estabilidad estereoquímica similar a la de AMTB, con el 89% de los aminoácidos en “regiones ampliamente favorecidas” y sólo un residuo en una región desfavorable en un diagrama de Ramachandran (Fig. 1B); además, la minimización energética confirmó que el modelaje fue bueno en cuanto a consideraciones termodinámicas. Se han calculado modelos para otros transportadores de amonio en plantas utilizando la aplicación MODELLER, y en algunos casos, como el transportador *LeAMT1;1* de tomate el análisis de estabilidad estereoquímica fue muy similar, con un 90% de sus aminoácidos en

“regiones ampliamente favorecidas” (Mayer et al., 2006). Asimismo, el modelo del transportador *TaAMT1;1* de trigo (Søgaard et al., 2009) se evaluó mediante una minimización energética con buenos resultados. Estos trabajos, en conjunto con nuestros resultados, confirman que es viable la obtención de modelos por homología confiables para los transportadores de plantas.

El modelo del transportador *PvAMT1;1* presenta diferencias notables en comparación con AMTB en las asas expuestas al medio extracelular y en la región próxima al citoplasma (Fig. 2A y B), lo que nos sugiere que los cambios estructurales en dichas áreas podrían ser responsables de las diferencias funcionales que existen entre los dos transportadores. Un análisis más detallado reveló que la mayoría de los aminoácidos polares están localizados en estas zonas, y que en particular el asa que se encuentra entre los dominios transmembranales 10 y 11, tiene varios residuos con carga negativa relativamente cercanos entre sí. Esta característica llama la atención ya que resulta lógico pensar que una concentración de cargas negativas puede atraer y reclutar cationes para posteriormente transportarlos a través del poro.

La importancia de los aminoácidos polares para el reclutamiento y coordinación de cationes se ha documentado de manera extensa en el caso de los co-transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Wiebe et al., 2001). Se ha demostrado que éstos pierden su actividad cuando se elimina la carga negativa asociada a aspartatos y glutamatos al sustituirlos por otros aminoácidos electroneutros; también se ha resaltado el papel de las histidinas como posibles sensores de los cambios de pH. Por ejemplo, la actividad del intercambiador *EcNhaA* de *E. coli* depende de la presencia de tres aspartatos ubicados en el sitio de unión putativo a  $\text{Na}^+$ , los cuales se cree están involucrados en la coordinación de dicho catión (Inoue et al., 1995). Así mismo, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de mamíferos pierde su función cuando se sustituye un glutamato (E262), cercano a la región citoplásmica, por una isoleucina (Fafournoux et al., 1991); y finalmente, Gerchman y colaboradores

(1993) demostraron que la histidina 226, localizada en una de las asas citoplásmicas, forma parte del sensor de pH del transportador.

Tomando en cuenta estas evidencias, el criterio para seleccionar aminoácidos potencialmente importantes se basó en el hecho de que estos se encontraran cercanos a la zona de contacto con el medio externo (para lo cual utilizamos el modelo), que fueran residuos ausentes en el transportador AMTB y que fueran residuos polares. Llamó la atención que en el asa mencionada anteriormente se encuentran un ácido aspártico, dos ácidos glutámicos, una serina y una histidina, por lo que nos enfocamos en esta área para planear algunos de nuestros experimentos posteriores (Fig. 3B).

De acuerdo con el modelo, otra diferencia importante entre el transportador AMTB y *PvAMT1;1* está en los aminoácidos cercanos a la región citoplásmica que conforman el poro. Prácticamente todos varían y algunos han sido sustituidos por aminoácidos de características electroquímicas muy distintas (Fig. 2 C y D). Diferencias similares se han reportado para otros modelos de transportadores de plantas que se han obtenido en base a la estructura cristalográfica de *EcAMTB*. Sóggaard y colaboradores (2009) proponen que las diferencias observadas entre el mecanismo de transporte de *TaAMT1;1* de trigo y AMTB se deben a la enorme variación que observan en su modelo tridimensional de los aminoácidos cercanos a la región citosólica; particularmente destacan la presencia de la leucina 31 en sustitución por la fenilalanina 31 en AMTB, la cual provoca que cambien sus propiedades de transporte. *PvAMT1;1* es parecido en esta región a otros transportadores de plantas; sin embargo, presenta una diferencia notable: la presencia de una cisteína que parece estar ubicada justo donde el poro termina, orientada hacia el medio citoplásmico. La presencia de esta cisteína es interesante debido a que estos residuos poseen un grupo tiol, el cual es nucleofílico y susceptible a ser oxidado. Esto sugiere que dicho residuo pudiera tener un papel funcional importante en la regulación del mecanismo de acción del transportar de

amonio del frijol en particular, lo cual sería interesante estudiar con más detalle en trabajos futuros.

Así como el modelo sugiere diferencias estructurales importantes en ciertas regiones, también fue evidente el alto grado de conservación entre los residuos presentes en la región central de poro y en el sitio putativo para el reclutamiento del  $\text{NH}_4^+$  (Fig 2D). Estos aminoácidos están presentes en toda la familia de transportadores, por lo tanto, podemos suponer que son fundamentales para el funcionamiento de estas proteínas y que el reclutamiento se lleva a cabo de manera muy similar tanto en AMTB como en *PvAMT1;1*. Así mismo, las dos fenilalaninas que forman la “puerta” de entrada al poro y las dos histidinas que coordinan al  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  en la región central del poro, se encuentran altamente conservadas y la sustitución de cualquiera de estos residuos afecta de manera importante la función del transportador (Javelle et al., 2006 & 2007). El hecho de que los aminoácidos no cambien en estas regiones nos sugiere que ciertas diferencias entre los mecanismos de transporte de los miembros de esta familia, incluido *PvAMT1;1*, se deben a la diversidad estructural que observamos tanto en las asas extracelulares como en la zona cercana al medio citosólico; estos cambios de unos pocos aminoácidos podrían traducirse en modificaciones funcionales importantes.

## **9.2 Propiedades electrofisiológicas de *PvAMT1;1* y mediciones de pH intracelular**

La electrofisiología es una herramienta muy importante para el estudio funcional de proteínas transportadoras y canales iónicos. Las técnicas utilizadas permiten determinar de forma muy precisa las propiedades eléctricas de las membranas que las contienen, y mediante el registro de parámetros como la corriente que se mueve a través de ellas, es posible inferir los movimientos de los iones que son transportados. En el caso de los transportadores de amonio, los registros electrofisiológicos obtenidos de transportadores de plantas como *PvAMT1;1* han

permitido cuestionar la teoría inicial que describe a estas proteínas como canales de  $\text{NH}_3$ , proponiendo la existencia de nuevos mecanismos (Ludewig et al., 2002; Mayer et al., 2006; Sogaard et al., 2009).

Los datos obtenidos de registros electrofisiológicos realizados a ovocitos expresando *PvAMT1;1* sugieren que este transportador mueve cationes a través de la membrana. Esto se infiere por el incremento en la magnitud de las corrientes entrantes provocado por pulsos de voltaje negativos en presencia de 1mM  $\text{NH}_4^+$  en la solución de registro (Fig. 5A, derecha). Corrientes entrantes también fueron observadas en el caso del transportador *LeAMT1;1* de tomate (donde incluso la magnitud fue similar) (Ludewig et al., 2002) y en *TaAMT1;1* (Sogaard et al., 2009) de trigo. Estas observaciones sugieren que el transporte electrogénico de  $\text{NH}_4^+$  puede ser una característica común para los transportadores de plantas.

La presencia de las corrientes mencionadas anteriormente no puede ser atribuida a mecanismos endógenos del ovocito ya que como se muestra en la figura 5A (izquierda) los ovocitos control expuestos a 1mM de  $\text{NH}_4^+$  no generan corrientes considerables. Esto nos obliga a descartar un mecanismo de transporte de  $\text{NH}_3$  en *PvAMT1;1*, ya que de ser este el caso no sería posible observar corrientes en los ovocitos inyectados con el transportador. Además, las corrientes entrantes muestran una dependencia de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  externa y del potencial de membrana (Fig. 5B) que también ha sido observada en los trabajos relativos a los transportadores de tomate y trigo (Ludewig et al., 2002; Sogaard et al., 2009). Dicha dependencia es una fuerte evidencia de que *PvAMT1;1* transporta al catión  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana como tal, o en su defecto como  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ .

Otra observación importante derivada del análisis de las curvas I-V, fue el desplazamiento positivo en el potencial de inversión (el potencial de membrana en el cual no hay un flujo neto de iones) en respuesta al aumento en las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}^+$ . En el caso de *PvAMT1;1* observamos que el

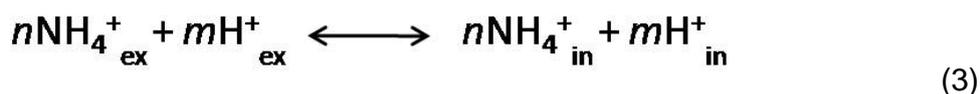
potencial de inversión se desplazó 33 mV cuando la concentración de  $\text{NH}_4^+$  aumentó 10 veces, y 26 mV en respuesta al mismo aumento en la concentración de  $\text{H}^+$  (Fig. 5C y 7A). Si bien el desplazamiento indica que la membrana de los ovocitos inyectados con *PvAMT1;1* es permeable a ambos cationes, el valor está muy por debajo de lo predicho por la ecuación de Nernst (ecuación 1) para un mecanismo de electrodifusión a través del poro del transportador (Fig. 5C, observar la línea gris).

$$E_x = - \frac{RT}{Z_x F} \ln \left( \frac{[X]_{\text{in}}}{[X]_{\text{ex}}} \right) \quad (1)$$

La ecuación de Nernst predice un desplazamiento de 58 mV por cada cambio de diez veces en la concentración del ión transportado. En donde  $E_x$  es el potencial de inversión,  $Z_x$  es la valencia del ion,  $T$  es la temperatura absoluta,  $F$  es la constante de Faraday y los paréntesis indican la concentración iónica. Dicho valor se aleja de lo observado para *PvAMT1;1*; sin embargo, si se considera un mecanismo de co-transporte, definido en términos termodinámicos por la ecuación 2 (Accardi y Miller, 2004) es posible interpretar nuestros resultados.

$$V_r = \frac{1}{1+r} [E_{x1} + rE_{x2}] \quad (2)$$

Donde  $E$  es el potencial de inversión de cada ion ( $x_1$  y  $x_2$ ) definido por la ecuación de Nernst y  $r$  es el cociente ( $n/m$ ) de la estequiometría, definida en nuestro caso por la siguiente relación (ecuación 3).



Así, la ecuación (2) predice que el desplazamiento del potencial de inversión de un co-transportador está determinado por la suma de los desplazamientos en los

potenciales de inversión de cada ión que transporta, y que el valor de dicha suma debe ser cercano a los 58 mV cuando la concentración de ambos iones aumenta diez veces. Esto quiere decir que si sólo se aumenta de manera individual la concentración de uno de los iones, el desplazamiento en el potencial de inversión debe ser inferior a dicho valor. Como se puede ver en esta ecuación, la estequiometría determina la magnitud del desplazamiento en el  $E_{rev}$  que podemos esperar cuando se aumenta 10 veces la concentración de cada ión de manera individual. Es decir, si la estequiometría es de 1:1, entonces el valor de  $r = 1$  y el desplazamiento del potencial de inversión para un ión será de la misma magnitud que para el otro ión: 29 mV/década. Si  $r = 0.5$  entonces el desplazamiento registrado para uno de los iones será el doble del registrado para el otro (aproximadamente 38 y 19 mV/década, respectivamente), y la estequiometría tendría que ser de 1:2. En el caso de *PvAMT1;1* los desplazamientos del  $E_{rev}$  provocados individualmente por cada ion ( $NH_4^+$  y  $H^+$ ) son cercanos a los 29 mV/década (Fig. 5C y 7A), por lo que concluimos que este es un mecanismo de co-transporte  $NH_4^+/H^+$  con una estequiometría de 1;1.

La posibilidad de que los protones modifiquen las propiedades del transporte de amonio en esta familia de proteínas se ha explorado con anterioridad; sin embargo, los resultados obtenidos difieren con los que aquí se presentan en varios aspectos. Ludewig y colaboradores (2002) demuestran que para el transportador de tomate *LeAMT1;1* la magnitud de las corrientes registradas en repuesta a  $NH_4^+$  es muy similar en un rango de pH que va de 5.5 a 8.5. Asimismo, estos investigadores no observan desplazamientos significativos para el potencial del inversión cuando se cambia el gradiente de  $H^+$  (manteniendo la concentración de  $NH_4^+$  constante). Por lo tanto, para *LeAMT1;1* no existen evidencias que sugieran un mecanismo de co-transporte.

Por otro lado, es interesante el caso del transportador *TaAMT1;1* de trigo, ya que la magnitud de las corrientes registradas en ovocitos expresando el transportador expuestos a 1mM de  $NH_4^+$  aumentó cuando el pH extracelular se acidificó. Sin

embargo, una diferencia importante en este trabajo es que los autores no observaron cambios en el potencial de inversión en respuesta a la variación del pH. Por esta razón, se concluye que *TaAMT1;1* es un co-transportador  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ .

Otro parámetro que nos proporciona información importante acerca del mecanismo de transporte de estas proteínas es su afinidad hacia el  $\text{NH}_4^+$ . Este parámetro está relacionado con las familias dentro de las cuales se agrupan los transportadores, de alta o baja afinidad. Particularmente en plantas, los transportadores pertenecientes a la subfamilia AMT1 tienen afinidades en el rango  $\mu\text{M}$ , mientras que en la subfamilia AMT2 encontramos ejemplos de proteínas cuya  $K_m$  está en el rango mM (Von Wirén & Merrick, 2004). Para la mayoría de los transportadores que se han caracterizado electrofisiológicamente en plantas, *LeAMT1;1*, *AtAMT1;1*, *TaAMT1;1* y ahora *PvAMT1;1*, se han determinado valores de afinidad relativamente similares de 12  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  y 28  $\mu\text{M}$  (Fig. 7B), respectivamente. También es similar la dependencia de dicha afinidad con respecto del potencial de membrana. En los cuatro casos se ha determinado que a potenciales más positivos es necesaria una mayor concentración de  $\text{NH}_4^+$  para alcanzar la mitad de la actividad máxima. Esto se puede interpretar como la existencia de un sitio de unión con cargas negativas en donde es reclutado el catión, ya que la interacción entre ambos se vería modificada por el campo eléctrico de la membrana (potenciales positivos contrarrestan el efecto de las cargas negativas y dificultan la unión del catión).

Existe, sin embargo, una diferencia importante entre *PvAMT1;1* y los transportadores antes mencionados, ya que además de variar en respuesta al voltaje, la afinidad también se modifica en respuesta a los cambios del pH externo (Fig. 7B). Dicha afinidad aumentó con la alcalinización del medio extracelular, lo cual puede deberse a una competencia entre los protones y el  $\text{NH}_4^+$  por el sitio de unión, al pKa específico de los aminoácidos que conforman dicho sitio, o alternativamente, a un cambio estructural de alguna sección de la proteína en

respuesta al cambio de pH. Aunque la razón de este aumento de la afinidad no es claro, este hecho podría compensar la disminución del sustrato que sería provocada por la mayor disociación del  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NH}_3 + \text{H}^+$  (su pKa es de 9.2) a pHs alcalinos.

El pH también afecta la dependencia de la afinidad hacia el amonio con respecto del potencial de membrana en *PvAMT1*;1. Como se muestra en la figura 7C, a un pH de 5.5 los valores de la  $K_m$  aumentan considerablemente conforme el potencial se hace más positivo; en cambio, cuando se analiza esta respuesta a un pH externo de 8 es evidente que los valores de la  $K_m$  se mantienen relativamente constantes en el mismo rango de voltaje. Esto puede deberse a que la proteína, como ya se mencionó, aumenta su afinidad por el sustrato a pH alcalino, lo que podría significar que la interacción entre el sitio de unión y el  $\text{NH}_4^+$  es más fuerte y por lo tanto menos susceptible a ser modificada por el campo eléctrico de la membrana.

### *9.2.1 La histidina 211 es uno de los aminoácidos involucrados en la sensibilidad al pH*

Trabajos previos han comprobado la importancia de las dos histidinas presentes en la región media del poro a través de la generación de proteínas en las que estos residuos se han sustituido tanto por aminoácidos polares como no polares (Javelle et al., 2006). Específicamente se ha propuesto que la histidina 211 (168 en *E. coli*) es la responsable de desprotonar al  $\text{NH}_4^+$  en su paso a través del poro (Winkler, 2006). Con el objetivo de cambiar las propiedades electroquímicas del poro sustituimos dicho residuo por un ácido glutámico, el cual tendría dos consecuencias importantes: la sustitución del imidazol, que actúa como aceptor o donador de  $\text{H}^+$  y la introducción de una carga eléctrica negativa. Teniendo en cuenta el pKa de la cadena lateral del glutamato (4.25) y suponiendo que el entorno en el poro no afectara demasiado este parámetro, podemos especular que dicho grupo lateral se encuentra desprotonado (y cargado negativamente) y que

puede interactuar con una molécula de agua o de amonio; esto disminuiría la barrera energética que supone el paso del catión  $\text{NH}_4^+$  por el poro de *PvAMT1;1*. Javelle y colaboradores (2006) determinaron la estructura cristalográfica de la mutante H168E y observaron una mayor densidad electrónica en el poro comparada con la observada en la proteína silvestre, lo cual indica que hay más moléculas de  $\text{NH}_4^+$  o agua atraídas hacia esta región gracias a la mutación.

El análisis de los registros electrofisiológicos efectuados en ovocitos expresando esta versión mutante de la proteína muestra claramente la pérdida de la dependencia del pH externo. Al contrario de lo observado en la versión silvestre, ni la magnitud de las corrientes, ni el potencial de inversión obtenido a partir de curvas I-V, ni la afinidad hacia el  $\text{NH}_4^+$  cambian de manera significativa con el cambio del pH del medio extracelular (Figuras 8 y 9), lo que sugiere que H211 está involucrada en la sensibilidad al pH en *PvAMT1;1* y confirma que tiene un papel central en la determinación del mecanismo de transporte de esta familia de proteínas.

El análisis de los cambios en el potencial de inversión generados por la mutante H211E proporciona información muy importante acerca de las modificaciones en su mecanismo de transporte. Como se puede observar en la figura 8D, el potencial de inversión prácticamente no cambia cuando se aumenta la concentración externa de  $\text{H}^+$ . Sin embargo, cuando se aumentó la concentración de  $\text{NH}_4^+$  el potencial de inversión tuvo un mayor desplazamiento que el observado en la versión silvestre. El desplazamiento fue en sentido positivo, lo que concuerda con la entrada del catión  $\text{NH}_4^+$ , y el valor obtenido es cercano a los 58 mV que predice la ecuación de Nernst para un mecanismo de electrodifusión de un catión monovalente (Fig. 8B). Por lo tanto, si en la versión silvestre de la proteína los desplazamientos en el potencial de inversión generados por los cambios en la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}^+$  sugerían que el transportador mueve ambos iones; las observaciones descritas anteriormente, sugieren en cambio, que la mutante

H211E sólo es permeable al  $\text{NH}_4^+$ ; lo que puede significar que cambia su mecanismo y se convierte en un transportador/canal de  $\text{NH}_4^+$ .

Aunque la afinidad de *PvAMT1;1H211E* hacia el  $\text{NH}_4^+$  es prácticamente independiente del pH extracelular, si hay una diferencia importante en comparación con los valores obtenidos para el transportador silvestre. Como se muestra en la figura 9A, los valores de afinidad para la mutante caen dentro del rango mM, lo que significa que la mutación H211E también provoca que el mecanismo de transporte se vuelva de baja afinidad. Similar a lo que se observó en el transportador silvestre, la  $K_m$  de la mutante H211E es dependiente del voltaje aunque independiente del pH extracelular (Fig. 9B). Esto concuerda con la menor afinidad observada en esta mutante, ya que cabría esperar que al ser menos fuerte (o más transitoria) la interacción del  $\text{NH}_4^+$  con los aminoácidos involucrados en su reclutamiento o conducción, este proceso dependiera más del campo eléctrico existente a través de la membrana.

Es difícil atribuir los cambios observados en la mutante H211E a modificaciones en el nivel de expresión de la proteína ocasionados por la mutación, ya que la magnitud de las corrientes registradas es muy similar a las generadas por el transportador silvestre a 1mM  $\text{NH}_4^+$  (comparar figuras 8A y 5B). De hecho las corrientes aumentan significativamente (de 200 a 300 nA) cuando la concentración de amonio se incrementa a 5mM (Fig. 8A), algo que no sucede con el transportador silvestre ya que éste se satura a concentraciones mucho menores (Fig. 7B). Así mismo, Javelle y colaboradores (2006) observaron que esta mutación en el transportador AMTB de *E. coli* no afectó el nivel de expresión de la proteína, su localización en la membrana, ni la estructura central del poro, aunque en este caso el transporte de metilamina fue menor (Javelle et al., 2006).

Es interesante el hecho de que la sustitución de la histidina por un ácido glutámico que se realizó en *PvAMT1;1*, existe de manera natural en el transportador Mep1 (E181), presente en algunas especies de hongos microscópicos como

*Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans*. Además de Mep1 estas especies cuentan con los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  Mep2 y Mep3, los cuales tienen propiedades distintas. Mep2 presenta las dos histidinas (H194 y H348) en la región media del poro, tiene una alta afinidad por el  $\text{NH}_4^+$  (Marini et al., 1997) y es sensible al pH extracelular; el transporte es mayor a pH 4 que a un pH externo de 7 (Boeckstaens et al., 2008). Por su parte Mep1 tiene una mayor actividad que Mep2 pero una afinidad menor (alrededor de 1.5 mM) (Biswas & Morschhäuser, 2005), lo que coincide con lo observado en PvAMT1;1H211E. En el trabajo realizado por Boeckstaens y colaboradores (2008) se demuestra que la sustitución de la histidina equivalente (H194) por un ácido glutámico en el transportador Mep2 provoca un cambio en sus propiedades de transporte, las cuales se vuelven similares a las observadas en Mep1; es decir, disminuye su afinidad por el amonio y su actividad se mantiene constante a diferentes valores de pH extracelular. Esto puede indicar la existencia de un mecanismo similar al observado en PvAMT1;1 y PvAMT1;1H211E, y confirma la importancia de la primer histidina del poro en el funcionamiento de los transportadores de amonio. Sería interesante caracterizar a Mep2 en el sistema de ovocitos.

### *9.2.2 Mutantes D404A y E399A: el efecto de residuos polares presentes en el asa extracelular localizada entre los dominios transmembranales 10 y 11.*

Observaciones realizadas a partir del modelo tridimensional del transportador PvAMT1;1 nos permitieron seleccionar la región que comprende el asa que conecta a los dominios transmembranales 10 y 11 para un estudio más detallado. Llamaron nuestra atención varios aminoácidos polares que fueron sustituidos mediante mutagénesis dirigida y de los cuales se caracterizaron electrofisiológicamente dos versiones mutantes: D404A y E399A.

Como se observa en la figura 10, la mutante E399A tiene propiedades muy similares a las observadas para la versión silvestre del transportador. La magnitud de las corrientes generadas en presencia de 1mM de  $\text{NH}_4^+$  es prácticamente

idéntica a la versión silvestre a los diferentes pHs (comparar figura 6C y 10A); también son muy similares los valores de afinidad y sus variaciones en respuesta a los cambios en el potencial de membrana (comparar figura 7B y C con 10C y D); y finalmente los desplazamientos en el potencial de inversión provocados por el aumento en la concentración de  $H^+$  son semejantes a los observados en el transportador silvestre (Fig. 10B), por lo que su dependencia del pH extracelular no cambia. Tomando en cuenta estos resultados, concluimos que la sustitución del ácido glutámico por una alanina en la posición 399 no tiene un efecto significativo en las propiedades de transporte de *PvAMT1;1* y que dicho aminoácido no parece estar involucrado en el transporte de amonio ni en su dependencia del pH extracelular.

La mutante D404A muestra algunas diferencias en sus propiedades de transporte. Se observó una disminución en la magnitud de las corrientes registradas sobre todo a pH 5.5 (Fig. 11A). También disminuyó el desplazamiento del potencial de inversión en respuesta a la concentración extracelular tanto de amonio como de protones (Fig. 11B y D), lo que sugiere que la mutación causó una pérdida parcial de su actividad y es menos eficiente. Esta mutante tiene algunas similitudes con la mutante H211E en lo que respecta a su dependencia del pH externo. La magnitud de las corrientes, la  $K_m$  y la dependencia de ésta con el potencial de membrana son independientes del pH extracelular (Fig. 12A y B), lo que posiblemente signifique que su capacidad de transportar protones ha sido afectada por la mutación.

Es interesante que el asa en donde se encuentra el aspartato 404 conecte a los dominios transmembranales 10 y 11. El primero está en contacto con el poro y contiene a la histidina 377, uno de los residuos más importantes para la conducción del amonio en estos transportadores (Javelle et al., 2006). También se ha propuesto en trabajos recientes que si el amonio es desprotonado al atravesar el poro, esta histidina podría ser la responsable de protonarlo a su salida (Lamoureux et al., 2010). Resulta tentador especular sobre un posible cambio

conformacional en el asa causado por la mutación del aspartato 404 que se tradujera en una ligera modificación de la posición del dominio transmembranal 10, y por lo tanto de la histidina 377, afectando así el mecanismo de transporte. También es posible que el aspartato, como ya se mencionó al inicio de la discusión, pudiera estar implicado en el reclutamiento de protones y/o amonio, por lo que al eliminar su carga negativa se afectaría dicho proceso. Si el transporte  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  esta acoplado en este transportador una disminución en la conducción de protones provocaría también una disminución en la conducción de  $\text{NH}_4^+$  y viceversa.

No se puede excluir la posibilidad de que algunas de las modificaciones que vemos en las características de transporte de *PvAMT1;1D404A* sean provocadas por una disminución en la expresión de la proteína o a su deficiente incorporación en la membrana. Por ejemplo, la disminución en la magnitud de las corrientes puede ser explicada por cualquiera de estos dos fenómenos; sin embargo, no es así con la pérdida de la dependencia de dichas corrientes con respecto a los cambios en el pH externo. Asimismo, los desplazamientos en el potencial de inversión disminuyeron para ambos iones, y los valores de afinidad por el  $\text{NH}_4^+$  y su dependencia del voltaje también cambian en esta mutante, siendo más similares entre sí a los diferentes pHs (Fig. 11 y 12), respuestas que también son independientes del nivel de expresión de la proteína.

Resumiendo lo anterior, es probable que algunos residuos polares en esta asa contribuyan con el reclutamiento de protones y/o amonio o que su presencia indirectamente influya la posición de residuos localizados en el poro, por lo que sería interesante caracterizar otras mutaciones puntuales generadas en esta área para identificar la importancia de esta asa o del dominio transmembranal 10 en la función de los transportadores AMT.

### 9.2.3 Acidificación intracelular en ovocitos provocada por PvAMT1;1

La información obtenida del análisis de los cambios en el potencial de inversión provocados por el  $\text{NH}_4^+$  y los  $\text{H}^+$  en PvAMT1;1 sugiere que el transportador es permeable a ambos cationes y que posiblemente funciona como un co-transportador  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ . Sin embargo, el hecho de que este mecanismo no se haya reportado anteriormente, y que la noción predominante ubique a estas proteínas como canales de  $\text{NH}_3$  ó co-transportadores  $\text{NH}_3/\text{H}^+$ , nos obliga a obtener más evidencias que apoyen nuestra hipótesis. Las mediciones de pH intracelular en ovocitos resultaron muy útiles en este sentido.

En un mecanismo de co-transporte  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  deberíamos ser capaces de observar una acidificación del medio intracelular de los ovocitos cuando la proteína está activa. En efecto, como se puede observar en la figura 13A, el pH intracelular del ovocito se acidifica de 7.5 a casi 7.3 cuando se añade al medio 1mM de  $\text{NH}_4^+$ . Es importante notar que la acidificación, y por lo tanto el transporte de protones, depende de la presencia del  $\text{NH}_4^+$ , como lo demuestra la ausencia de corrientes entrantes en un ovocito que expresa PvAMT1;1 expuesto a diferentes niveles de pH extracelular en la ausencia de amonio (Fig. 6B).

Asimismo, es importante resaltar que el inicio de la acidificación coincide con una despolarización de la membrana. Una vez que el  $\text{NH}_4^+$  es retirado y que la membrana vuelve a hiperpolarizarse el pH también comienza a recuperarse, lo que demuestra que el fenómeno es dependiente de la activación del transportador (Fig. 13A). La magnitud de la acidificación observada en los ovocitos inyectados con PvAMT1;1 expuestos a pH7 y 1mM de  $\text{NH}_4^+$  fue de 0.2 unidades de pH (Fig. 16A), lo cual es considerable si tomamos en cuenta la capacidad de amortiguar los cambios en la concentración de  $\text{H}^+$  que tiene el citoplasma del ovocito, así como su volumen. Finalmente, podemos descartar que el efecto observado sea causado solamente por el  $\text{NH}_4^+$  añadido, ya que en ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$  no es

posible apreciar una acidificación significativa cuando se exponen a 1mM  $\text{NH}_4^+$  por un periodo de tiempo similar (Fig. 13B y 16A).

Como ya se mostró anteriormente, la actividad del transportador es mayor cuando el pH externo es ácido, por lo que esperábamos una mayor acidificación del citoplasma al exponer a los ovocitos expresando *PvAMT1;1* a pH 5.5 y 1mM de  $\text{NH}_4^+$ . Fue intrigante que aún cuando la despolarización de la membrana fue mayor en los ovocitos expuestos a este pH, la magnitud de la acidificación fue ligeramente menor a la observada en los registros realizados a un pH externo de 7 (Fig. 16A y B). Sin embargo, cuando se realizaron las mismas mediciones en ovocitos control expuestos a pH 5.5, se observó una ligera alcalinización del citoplasma (Fig. 14B y 16A), efecto que pudiera contrarrestar la acidificación provocada por la actividad del transportador y de esta manera explicar la menor acidificación que se registró en ovocitos que expresaron *PvAMT1;1* expuestos a pH 5.5.

La alcalinización intracelular en respuesta a la adición de  $\text{NH}_4^+$  ha sido reportada anteriormente en distintos tipo de células (Pappas & Ransom, 1993; Pizzonia et al., 1996; Okzan & Mutharasan, 2002) y se explica por la entrada del  $\text{NH}_3$  (su pKa es de 9.2, por lo que está presente en pequeñas cantidades), el cual puede permear a través de la membrana gracias a que es electroneutro, y una vez dentro del citoplasma, es protonado provocando así la alcalinización. En ovocitos de *X. laevis* se ha reportado tanto alcalinización (Mayer et al., 2006) como acidificación del citoplasma (Buckhardt et al., 1992; Boldt et al., 2003) como consecuencia de la presencia de  $\text{NH}_4^+$ . El tipo de respuesta depende de la actividad de los transportadores endógenos, ya que cuando el  $\text{NH}_4^+$  entra a través de dichos transportadores es posible que una pequeña cantidad se disocie dentro del citoplasma para formar  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ , lo que podría causar una ligera acidificación. La razón por la cual en el presente trabajo se observa alcalinización en ovocitos expuestos a pH 5.5 y no en ovocitos expuestos a pH 7 no es clara, pero posiblemente tenga relación con el hecho de que las corrientes endógenas,

incluida la correspondiente a los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  de ovocitos, desaparecen o disminuyen a pH ácido (datos no mostrados), lo que podría explicar porqué a pH 5.5 observamos una pequeña alcalinización pero no a pH 7, condición en la que pueden existir corrientes endógenas que provoquen la reacción contraria, una ligera acidificación que se observa a este pH.

Otra diferencia entre las mediciones realizadas a pH 5.5 y pH 7 en ovocitos inyectados con *PvAMT1;1* es que la acidificación intracelular parece ser más rápida a pH 5.5 (Fig. 14A). Esto puede deberse a que el transportador es mucho más activo a este pH externo, como lo sugiere la magnitud de la despolarización observada (Fig. 14A) y la magnitud de las corrientes registradas a pH ácidos (Fig. 6C). Aunque no se puede descartar la posibilidad de que la velocidad de acidificación y recuperación del pH intracelular sea consecuencia de variaciones particulares de cada ovocito y de la velocidad del flujo de las diferentes soluciones de registro.

En vista de los resultados obtenidos con la mutante H211E que indican la independencia de su actividad del pH extracelular, y su posible cambio de función a un uniportador/canal de amonio, fue importante registrar posibles modificaciones en el pH del citoplasma de ovocitos inyectados con el cARN de esta mutante. En la figura 15A y 16A se muestra que la acidificación del pH interno de los ovocitos que expresaron *PvAMT1;1H211E* expuestos tanto a pH 7 como a pH 5.5 es mucho menor que la acidificación correspondiente en ovocitos expresando el transportador silvestre, aún cuando los niveles de despolarización de la membrana entre ambos grupos de ovocitos fueron muy similares (Fig. 16B). Esto sugiere que a pesar de que el transportador *PvAMT1;1H211E* está activo, no hay un movimiento significativo de protones hacia el citoplasma, pero sí de  $\text{NH}_4^+$ . Debido a esto y a que los valores de pH intracelular son muy similares a los obtenidos en ovocitos control inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$  (Fig. 16A), concluimos que *PvAMT1;1H211E* pierde la capacidad de transportar protones y es permeable solamente al  $\text{NH}_4^+$ .

Mayer y colaboradores (2006) también realizaron mediciones de pH intracelular utilizando el fluoróforo sensible a protones, BCECF en ovocitos inyectados con el transportador *LeAMT1;1* de tomate y reportan una acidificación del citoplasma, pero sólo en presencia de 10 mM de  $\text{NH}_4^+$ . A diferencia de *PvAMT1;1* y *TaAMT1;1* este transportador es insensible al pH extracelular (Ludewig et al., 2002), por lo que los autores explican la acidificación observada como consecuencia de la disociación de una pequeña cantidad del  $\text{NH}_4^+$  que es transportado a través de *LeAMT1;1* en  $\text{NH}_3$  y  $\text{H}^+$ . Sin embargo, debido al pH neutro del citoplasma (7.3) sólo aproximadamente el 1.5% del amonio que entra puede disociarse, y para observar una acidificación significativa causada por este fenómeno debe entrar una gran cantidad de  $\text{NH}_4^+$ . Debido a que las corrientes registradas por estos autores son muy similares a las obtenidas en este trabajo donde sí se observa una acidificación clara del citoplasma, permiten concluir que el mecanismo de acción de *PvAMT1;1* es diferente de *LeAMT1;1*. En nuestras condiciones experimentales la entrada de  $\text{NH}_4^+$  provocada por la mutante *PvAMT1;1H211E*, sólo es suficiente para acidificar el interior del ovocito aproximadamente en 0.04 unidades de pH. Debido a que su actividad es muy similar a la actividad del transportador silvestre (las corrientes entrantes y la despolarización provocada por 1mM  $\text{NH}_4^+$  son de la misma magnitud) (Fig. 7C y 16B), la mayor acidificación provocada por este último (0.2 unidades de pH) indica que existe un mecanismo de transporte adicional de protones al interior del ovocito.

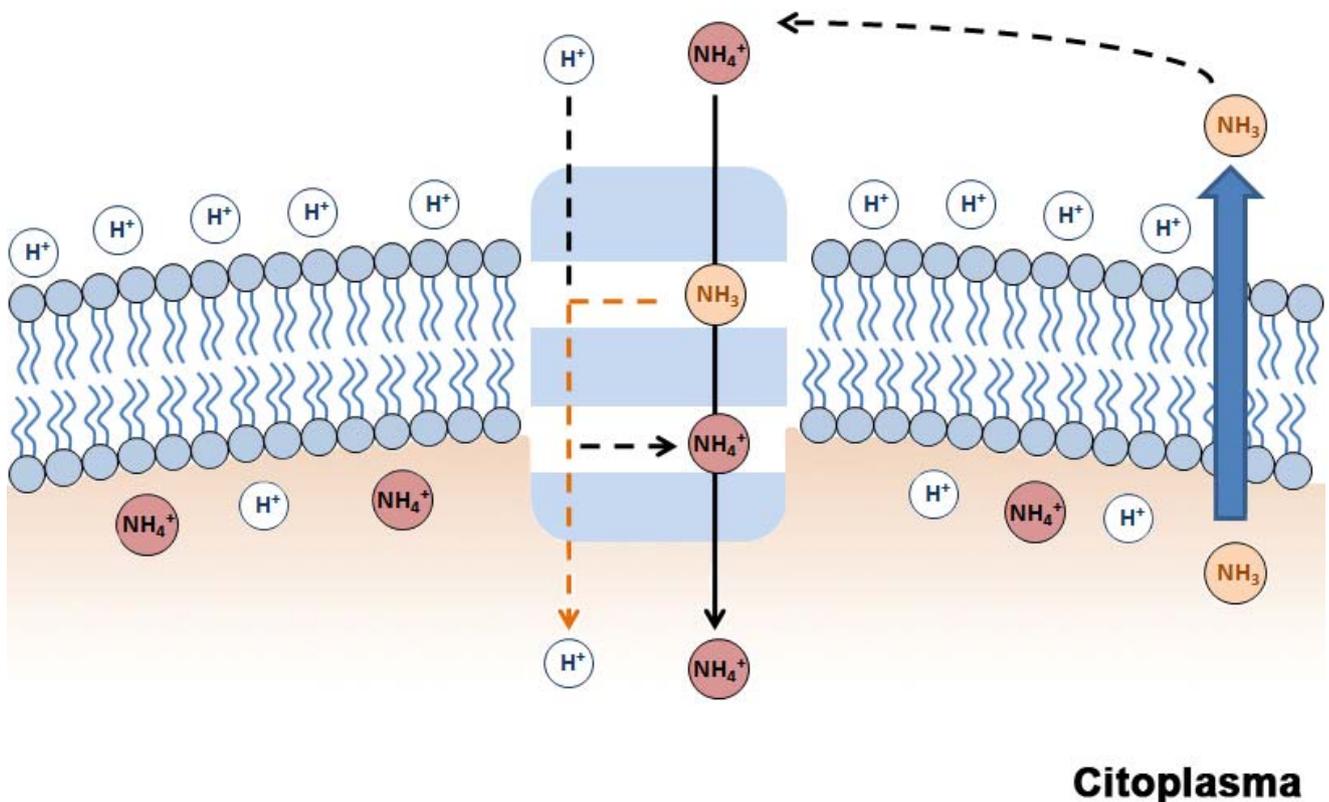
En resumen, la acidificación provocada por la expresión del transportador silvestre siempre es mayor que la registrada en ovocitos inyectados con  $\text{H}_2\text{O}$  ó con la mutante *PvAMT1;1H211E*, independientemente del pH externo utilizado, lo que representa una evidencia del transporte de protones por *PvAMT1;1*. Tomando en cuenta todos los resultados obtenidos, se propone que el mecanismo que mejor explica las características de este transportador de amonio presente en el frijol es el de un simportador  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$ .

Para reconciliar esta propuesta con las evidencias obtenidas en base al estudio estructural del poro de estos transportadores y a simulaciones de dinámica molecular que requieren de la desprotonación del amonio para que éste atraviese el poro hidrofóbico, elaboramos un modelo basado en esta información pero tomando en cuenta nuestras evidencias.

En nuestro modelo suponemos que existe una vía de conducción de protones y que dicha conducción se lleva a cabo a través de un mecanismo denominado *cadena de puentes de hidrógeno*, el cual consiste en una red de dichos puentes formada entre los grupos laterales de distintos aminoácidos, y en algunos casos por moléculas de agua (Onsager, 1969). Así, cuando un protón entra a la cadena de puentes de hidrógeno desde un lado de la membrana, todos los protones que la conforman brincan y avanzan un espacio, ocasionando que el protón terminal de la cadena la abandone del lado opuesto (mecanismo de grotthuss). Este mecanismo de conducción está ampliamente aceptado; no requiere de la presencia de un poro especial y no está limitado por las leyes físicas que limitan la difusión hidrodinámica (Decoursey, 2003).

Para explicar nuestro modelo son necesarias tres suposiciones. Primero, que las histidinas localizadas en la región media del poro formen parte de los aminoácidos que conforman la cadena de puentes de hidrógeno. Después, que la desprotonación del amonio sea necesaria para salvar la barrera energética que supone atravesar un poro hidrofóbico, y finalmente, que para abandonar el poro, el  $\text{NH}_3$  necesite reprotonarse y formar  $\text{NH}_4^+$ . Esta última suposición se fundamenta en el hecho de la hidrofobicidad del poro del transportador; es decir, si dicho poro es altamente hidrofóbico ¿cómo es que el  $\text{NH}_3$  lo abandona para entrar en un ambiente hidrofílico con el que no se atrae? La reprotonación en un punto cercano a la salida citoplásmica del poro permitiría que el amonio así formado difundiera con mayor facilidad hacia el citoplasma, llevando así al transporte electrogénico de este catión.

## Apoplasto



**Figura 18. Modelo del mecanismo de transporte de *PvAMT1;1*.** El transportador está representado como un rectángulo en color azul que atraviesa la membrana. Las divisiones blancas en el rectángulo indican las supuestas barreras energéticas que enfrenta el  $NH_4^+/NH_3$  en su paso por el poro. Es en estas mismas zonas donde se propone que es desprotonado y reprotonado por la presencia de las dos histidinas. Las líneas punteadas representan la cadena de puentes de hidrógeno que permite la conducción de protones. En naranja se indica la desprotonación del  $NH_4^+$  que provoca la entrada de un protón a la cadena de puentes de hidrógeno a través de la primera histidina y la liberación del protón que se encuentra al final de dicha cadena hacia el citoplasma; así mismo, en negro se indica la entrada de un segundo protón desde el exterior, el cual provoca la reprotonación del  $NH_3$  que se encuentra en contacto con la cadena de puentes de hidrógeno a través de la segunda histidina del poro. La flecha azul representa la difusión pasiva del  $NH_3$  a través de la membrana a favor de su gradiente. La concentración de protones es mayor en el apoplasto que en el citoplasma, lo que provoca que el  $NH_3$  que sale se protone. El gradiente de  $NH_4^+$  es inverso al de protones.

Numerosos estudios sugieren que existe una barrera energética muy grande a la altura de la región media del poro para el paso del amonio (Zheng et al., 2004; Khademi et al., 2004; Andrade et al., 2005; Lamoureux et al., 2007; Javelle et al., 2007). Sin embargo, Lamoureux y colaboradores (2010) sugieren que el  $\text{NH}_4^+$  puede llegar hasta la primera de las dos histidinas ubicadas en esta región. Se cree que este residuo interactúa con el catión, desprotonándolo y facilitando así su paso a través del poro (Javelle et al., 2006). Las evidencias obtenidas del estudio del transportador *LeAMT1;1* obligaron a los autores a asumir que en algún punto del proceso el protón es devuelto al  $\text{NH}_3$  para volver a formar  $\text{NH}_4^+$ , y así, explicar las corrientes generadas por este transportador (Mayer et al., 2006). Asimismo, el Soogard y colaboradores (2009) proponen un mecanismo similar para el transportador de amonio en trigo y sugieren que el protón retirado del  $\text{NH}_4^+$  es capaz de cruzar el poro con ayuda del gradiente de protones generado por la acidificación del medio externo, lo que implica la existencia de una ruta para la transmisión de protones que va desde el exterior hacia el interior de la membrana. Esto explica porqué el gradiente de protones influye en el transporte electrogénico del  $\text{NH}_4^+$ .

En nuestro modelo (Fig. 18) el  $\text{NH}_4^+$  llega hasta la región donde se encuentra la primera histidina del poro (H211) y es desprotonado por este residuo. Debido a que la histidina forma parte de la cadena de puentes de hidrógeno, el protón derivado del  $\text{NH}_4^+$  que entra a la "cadena" provocaría la salida inmediata de otro protón al final de ésta (ver la línea punteada naranja). El  $\text{NH}_3$  difunde a través de la región hidrofóbica hasta la segunda histidina. Más allá de este punto se propone que el poro es menos hidrofóbico y puede ser accesible al medio citosólico (Lamoureux et al., 2007), lo que representaría otra barrera energética para el avance del  $\text{NH}_3$ . Al interactuar con la segunda histidina proponemos que esta es responsable de reprotonar al  $\text{NH}_3$  gracias a la transmisión de un protón que entraría a la cadena ahora desde la región extracelular (ver la línea punteada negra). Este mecanismo explica como el  $\text{NH}_4^+$  supera las supuestas barreras

energéticas impuestas por la condición hidrofóbica del poro del transportador y establece que por cada molécula de  $\text{NH}_4^+$  un protón extra entra al citoplasma.

### **9.3 Expresión de *PvAMT1;1* en los tejidos de la planta y su posible papel fisiológico**

El análisis de la presencia del transcrito de *PvAMT1;1* muestra que éste aumenta en la raíz cuando se limita la disponibilidad de  $\text{NH}_4^+$  en el sustrato (Fig. 17A), lo que probablemente significa que la función principal del transportador en este tejido es la absorción de  $\text{NH}_4^+$  cuando éste se encuentra a concentraciones submilimolares, como lo sugiere su alta afinidad por este catión. Este efecto también ha sido observado por Gazzarrini y colaboradores (1999) con el transportador de alta afinidad *AtAMT1;1* de *Arabidopsis thaliana*, cuyo transcrito es más abundante en condiciones limitadas de nitrógeno. Existen en plantas otros transportadores de la misma familia como *LjAMT1;3* y *AtAMT1;2* cuya expresión no cambia en presencia de  $\text{NH}_4^+$  (D'Apuzzo et al., 2004; Gazzarrini et al., 1999), lo cual sugiere que los transportadores de alta afinidad como *PvAMT1;1* y *AtAMT1;1* llevan a cabo una función fisiológica específica. Se ha observado que la actividad de *AtAMT1;1* es finamente regulada; además de la disminución del transcrito, Lanquar y colaboradores (2009) demuestran un mecanismo de inactivación alostérica del transportador ocasionado por fosforilación, el cual es dependiente de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  en el medio y del tiempo de exposición. Los autores sugieren que la misma proteína detecta la presencia de su sustrato y provoca directa o indirectamente su fosforilación, lo que sugiere que algunos transportadores de alta afinidad pueden funcionar también como sensores de  $\text{NH}_4^+$ .

En el caso del frijol, esta suposición resulta muy interesante ya que la planta puede formar simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno y dicho proceso es regulado por la disponibilidad del nutriente. La expresión de *PvAMT1;1* en raíces y nódulos, específicamente en condiciones limitadas de

nitrógeno, pudiera ser parte del mecanismo que detecta dicha deficiencia, permitiendo que se inicie la respuesta fisiológica necesaria para el establecimiento de la simbiosis. Es posible suponer que cuando el  $\text{NH}_4^+$  está ausente en el suelo, la planta puede perder nitrógeno por un mecanismo de difusión de  $\text{NH}_3$  a través de la membrana, ya que su concentración sería mayor en el citoplasma de la célula que en el exterior. Una vez fuera de la célula el  $\text{NH}_3$  se reprotonaría y formaría  $\text{NH}_4^+$ , el cual podría ser tomado por el transportador de alta afinidad *PvAMT1;1*, y de esta manera, funcionar como sensor de los niveles de amonio, manteniendo así la interacción simbiótica entre la planta y las bacterias fijadoras de nitrógeno en condiciones de deficiencia nutricional.

Para apoyar la suposición anterior, vale la pena mencionar que la actividad del transportador Mep2 tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans* es necesaria para que se pueda dar el cambio morfológico a un tipo de crecimiento filamentoso en condiciones limitadas de nitrógeno (una respuesta de estos microorganismos al estrés nutricional). Mep2 es muy parecido en sus propiedades de transporte a *PvAMT1;1*, mientras que Mep1, cuyas propiedades de transporte son muy similares a las de la mutante *PvAMT1;1H221E*, posee de manera natural un glutamato en sustitución de la histidina que se encuentra en la región media del poro. Levaduras mutantes a las cuales se les elimina Mep2, pero no Mep1 y Mep3, son incapaces de llevar a cabo el cambio morfológico antes mencionado (Lorenz & Heitman, 1998; Biswas & Morschhäuser, 2005), por lo que se ha propuesto a Mep2 como un sensor de amonio en levadura y *C. albicans*.

Por otra parte, D'Apuzzo y colaboradores (2004) observan la presencia del transcrito del transportador *LjAMT1;1* en las hojas de *Lotus japonicus*. Además, demuestran que sus niveles de expresión disminuyen cuando las plantas se exponen a condiciones elevadas de  $\text{CO}_2$ , lo que limita la fotorespiración, vinculando así la expresión del transportador con este fenómeno. En la figura 16A y B se observa que la expresión del transcrito de *PvAMT1;1* en la hoja del frijol es importante y no cambia en respuesta a la disponibilidad de nitrógeno en el suelo

(Fig. 17B y C), por lo que probablemente la presencia del transcrito en este tejido también esté relacionada con la fotorespiración. Durante dicho proceso se generan cantidades considerables de amonio que son liberadas al citoplasma. Este proceso puede inducir la salida de  $\text{NH}_3$  hacia el apoplasto, donde sería protonado y retomado por *PvAMT1;1*.

Finalmente, si la función fisiológica de *PvAMT1;1* es la toma de  $\text{NH}_4^+$  a muy bajas concentraciones, ya sea para indicarle a la planta de la limitación de nitrógeno o para tratar de suplementar sus necesidades nutricionales, resulta lógico acoplar dicho transporte al movimiento de protones, y así aprovechar la fuerza motora de protones establecida por la actividad de la  $\text{H}^+$ -ATPasa (P-ATPasa) de la membrana plasmática. Esto aseguraría que aun cuando las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  fuera de la célula fuesen muy inferiores a las intracelulares, su transporte hacia el interior estaría favorecido debido a la existencia de un gradiente electroquímico de  $\text{H}^+$  cercano a los -240 mV que permitirían la acumulación de amonio aún cuando hubiera una diferencia de mil veces entre el interior y el exterior.

## 10. Conclusiones

- *PvAMT1;1* es un transportador de  $\text{NH}_4^+$  de alta afinidad cuya actividad es dependiente del pH externo.
- El transportador *PvAMT1;1* parece tener diferencias estructurales importantes con respecto del transportador *EcAMTB*, las cuales se concentran en la región que comprende a las asas extracelulares y en la región del poro que se encuentra cercana al medio citosólico.
- El residuo H211 determina el mecanismo de transporte de *PvAMT1;1*, su presencia es necesaria para que exista la dependencia del pH extracelular, pero no para el transporte de  $\text{NH}_4^+$ .
- El residuo D404 presente en el asa extracelular que conecta a los dominios transmembranales 10 y 11 es importante para el funcionamiento del transportador; afecta la eficiencia tanto del transporte de  $\text{NH}_4^+$  como de  $\text{H}^+$ .
- Las mediciones del pH intracelular y los datos electrofisiológicos sugieren que *PvAMT1;1* es un co-transportador  $\text{NH}_4^+/\text{H}^+$  con una estequiometría de 1:1 que utiliza el gradiente de protones para mover  $\text{NH}_4^+$  hacia adentro de la célula en contra de su gradiente electroquímico.
- La presencia del transcrito de *PvAMT1;1* es necesaria principalmente en las hojas y raíz de planta, y su abundancia en este último tejido es regulada de manera negativa por la presencia del  $\text{NH}_4^+$  en concentraciones milimolares. Esto sugiere que la relevancia fisiológica del transportador es la toma de  $\text{NH}_4^+$  a concentraciones micromolares.

## 11. Perspectivas

Mucho del trabajo aquí presentado está relacionado con el análisis del mecanismo de transporte de la proteína, el cual se llevó a cabo haciendo uso del sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Con todo y que se ha logrado obtener valiosa información gracias a la metodología empleada, sería muy interesante continuar con el estudio de este transportador en la planta misma y así determinar cuál es su función y relevancia dentro del conjunto de procesos que comprenden la fisiología del frijol. Aunque es razonable suponer, dadas las evidencias, que la absorción de  $\text{NH}_4^+$  del suelo es la actividad principal del transportador, vale la pena analizar la posibilidad, también sugerida por algunos estudios, de que la proteína es un sensor capaz de detectar las bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  para provocar una respuesta compensatoria en la planta. Como ya se mencionó anteriormente, el frijol es capaz de controlar de manera precisa el momento de la nodulación, la duración, así como la cantidad de dichos nódulos en base a las condiciones nutricionales del medio. Esta capacidad de regulación requeriría de un fino mecanismo que constantemente monitoree la disponibilidad de nitrógeno, y del cual *PvAMT1;1* podría formar parte. En este sentido, la generación de una línea mutante de frijol en este transportador ayudaría a determinar si dicha función es posible.

Aunque es difícil obtener plantas transgénicas de frijol, existe la posibilidad de transformar la raíz a través de la generación de “raíces peludas”, lo que en nuestro caso resulta muy conveniente. Esto nos permite sobre expresar un ARN de interferencia o un ARN antisentido de *PvAMT1;1*, lo que permitiría evaluar los efectos negativos de la ausencia del transportador en las raíces de planta; en particular, las posibles deficiencias en la nodulación. Finalmente sería interesante evaluar también los efectos de sobre expresar la mutante H211E, que de acuerdo a nuestros resultados cambia su mecanismo de

transporte, convirtiéndose en una especie de canal que pierde su afinidad por el  $\text{NH}_4^+$  y consecuentemente, su función como regulador de la nodulación. Lo anterior es interesante no sólo porque la fijación de nitrógeno atmosférico a través de la nodulación es un fenómeno de gran relevancia agronómica y ecológica, también demostraría la capacidad de algunos transportadores de poseer funciones duales que incluyen la importación de su sustrato y la detección de los niveles disponibles de éste a manera de sensor. Sin duda algo con muchas implicaciones desde el punto de vista fisiológico.

## 12. Bibliografía

- Accardi A., Miller C. 2004. Secondary Active Transport Mediated by a prokaryotic homologue of ClC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature*. 427: 803-807.
- Biswas K., Morchhäuser J. 2005. The Mep2p ammonium permease controls nitrogen starvation-induced filamentous growth in *Candida albicans*. *Molecular Microbiology*. 56 (3): 649-669.
- Boeckstaens M., André B., Marini A. 2008. Distinct Transport Mechanisms in Yeast Ammonium Transport/Sensor Proteins of the Mep/Amt/Rh Family and Impact on Filamentation. *Journal of Biological Chemistry*. 283 (31): 21362-21370.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L. 2002. *Biochemistry*, fifth edition. W.H. Freeman & Co. New York.
- Boldt M., Burckhardt G., Burckhardt C. 2003. NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Conductance in *Xenopus laevis* Oocytes. III. Effect of NH<sub>3</sub>. *European Journal of Physiology*. 446: 652-657.
- Britto D., Glass A., Kronzucker H., Siddiqi Y. 2001. Cytosolic concentrations and transmembrane fluxes of NH<sub>4</sub>/NH<sub>3</sub>. An evaluation of recent proposals. *Plant Physiology*. 125: 523-526.
- D'Apuzzo E., Rogato A., Rosin U., Alaoui H., Barbulova A., Betti M., Dimou M., Katinakis P., Marquez A., Marini A., Udvardi M., Chiurazzi M. 2004. Characterization of Three Functional High-Affinity Ammonium Transporters in *Lotus japonicus* with Differential Transcriptional Regulation and Spatial Expression. *American Society of Plant Biologists*. 134: 1763-1774.
- Decoursey T. 2003. Voltage-gated proton channels and other proton transfer pathways. *Physical Review*. 83: 475-579.
- Dutzler R., Campbell E., Roderick M. 2003. Gating the Selectivity Filter in ClC Chloride Channels. *Science*. 300: 108-112.

- Eswar N., Webb B., Marti-Renom M., Madhusudhan M., Eramian D., Shen M., Pieper U., Sali A. 2006. Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. *Current protocols in Bioinformatics*. 5.6.1-5.6.30.
- Fafournoux P., Ghysdael J., Sardet C., Pouysségur J. 1991. Functional Expression of the Human Growth Factor Activatable Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter (NHE-1) in Baculovirus-Infected Cells. *Biochemistry*. 30: 9510-9515.
- Fiser A., Do R., Sali A. 2000. Modeling of loops in protein structure. *Protein Science*. 9: 1753-1773.
- Forde B., Clarkson D. 1999. Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research*. 30: 2-90.
- Gazzarrini S., Lejay L., Gojon A., Ninnemann O., Frommer W., von Wirén N. 1999. Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnal Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into Arabidopsis Roots. 1999. *The plant Cell*. 11: 937-947.
- Gerchman Y., Olami Y., Rimon A., Taglicht D., Schuldiner S., Padan E. 1993. Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 90: 1212-1216.
- Gribskov M., McLachlan A., Eisenberg D. 1987. Profile analysis: Detection of distantly related proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 84: 4355-4358.
- Heldt H. 2005. *Plant Biochemistry*, third edition. Elsevier Academic Press. California.
- Howitt S., Udvardi M. 1999. Structure, Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. *Biochimica et Biophysica Acta*. 152-170.
- Inoue H., Noumi T., Tsuchiya T., Kanazawa H. 1995. Essential aspartic acid residues, Asp-133, Asp-163 and Asp-164, in the Transmembrane helices of a Na/H antiporter (NhaA) from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 363: 264-268.

- Javelle A., Lupo D., Zheng L., Dan Li X., Winkler F., Merrick M. 2006. An unusual Twin-His Arrangement in the Pore of Ammonia Channels Is Essential for Substrate Conductance. *The Journal of Biological Chemistry*. 281 (51): 39492-39498.
- Khademi S., O'Connell J., Remis J., Robles Y., Miercke L., Stroud R. 2004. Mechanism of Ammonia Transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*. 305: 1587- 1594.
- Lamourex G., Klein M., Berneche S. 2007. A stable water chain in the hydrophobic pore of the AmtB ammonium transporter. *Biophysical Journal: Biophysical Letters*. 92: L82-L84.
- Lanquar V., Loqué D., Hörmann F., Yuan L., Böhner A., Engelsberger W., Lalonde S., Schulze W., von Wirén N., Frommer W. 2009. Feedback Inhibition of Ammonium Uptake by a Phospho-Dependent Allosteric Mechanism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 21: 3610-3622.
- Lei Z., Kostrewa D., Berneche S., Winkler F., Li X. 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *PNAS*. 101: 17090-17095.
- Loqué D., Lalonde S., Looger L., von Wirén N., Frommer B. 2007. A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*. 446: 195-198.
- Lorenz M., Heitman J. 1998. Regulation of Pseudohyphal Differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* Identified Through Multicopy Suppressor Analysis in Ammonium Permease Mutant Strains. *Genetics*. 150: 1443-1457.
- Ludwig U., von Wirén N., Frommer W. 2002. Uniport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the Root Hair Plasma Membrane Ammonium Transporter *LeAMT1;1*. *The Journal of Biological Chemistry*. 277 (16): 13548-13555.
- Marti-Renom M., Madhusudhan M., Sali A. 2004. Alignment of protein sequences by their profile. *Protein Science*. 13: 1071-1087.

- Marti-Renom M., Stuart A., Fisher A., Sanchez R., Melo F., Sali A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular structure*. 29: 291-325.
- Mayer M., Schaaf G., Mouro I., Lopez C., Colin Y., Neumann P., Cartron J., Ludewing U. 2006. Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transporters. *The Journal of General Physiology*. 127: 133-144.
- Miller C. 2006. CIC Chloride Channels Viewed Through a transporter lens. *Nature*. 440: 484-489.
- Nielsen M., Lundegaard C., Lund O., Nordahl T. 2008. CpHModels-3.0. Remote homology modeling using structure guided profile sequence alignment and double-sided baseline corrected scoring scheme. *CASP8 Conference*. 193.
- Ninnemann O., Jauniaux J., Frommer W. 1994. Identification of a high affinity NH<sub>4</sub>C transporter from plants. *EMBOJ*. 13: 3464–71.
- Okzan P., Mutharasan R. 2002. A Rapid Method for Measuring Intracellular pH using BCECF-AM. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1572 (1): 143-148.
- Pappas C., Ransom B. 1993. A Depolarization-Stimulated, Bafilomycin-inhibitable H<sup>+</sup> Pump in Hippocampal Astrocytes. *Glia*. 9 (4): 280-291.
- Picollo A., Pusch M. 2005. Chloride/Proton Antiporter Activity of Mammalian CIC Proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature*. 436: 420-423.
- Pizzonia J., Ransom B., Pappas C. 1996. Characterization of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchange Activity in Cultured Rat Hippocampal Astrocytes. *The Journal of Neuroscience*. 44 (2): 191-198.
- Rotte A., Pasham V., Yang W., Eichenmüller M., Bhandaru M., Shumilina E., Lang F. 2010. Phosphoinositide 3-Kinase-dependent regulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger in Dendritic Cells. *Signaling and Cell Physiology*. Ahead of publish.
- Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning a Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. US.

- Sjøggard R., Alsterfjord M., MacAulay N., Zeuthen T. 2009. Ammonium Ion Transport by the AMT/Rh homolog TaAMT1;1 is Stimulated by Acidic pH. *European Journal of Physiology*. 458: 733-743.
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*, fourth edition. Sinauer Associates. Sunderland, Estados Unidos.
- Von Wirén N., Lauter F., Ninnemann O., Gillissen B., Liu P., Engels C., Jost W., Frommer W. 2000. Differential regulation of three functional ammonium transporters genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *The Plant Journal*. 21: 167-175.
- Von Wirén N., Merrick M. 2004. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics in Current Genetics*. 9: 95-120.
- Williams L., Miller A. 2001. Transporters responsible for the uptake and partitioning of nitrogenous solutes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol.* 52: 659-88.
- Winkler F. 2006. Amt/Mep/Rh Proteins Conduct Ammonia. *European Journal of Physiology*. 451: 701-707.
- Wood C., Poreé F., Dreyer I., Koehler G., Udvardi M. 2006. Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing *Arabidopsis* AtAMT1;1. *FEBS Letters*. 580: 3931-3936.
- Zheng L., Kostrewa D., Berneche S., Winkler F., Dan Li X. 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *PNAS*. 101: 17090-17095.