



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE UN TRANSPORTADOR PUTATIVO DE HEXOSAS
DE MAÍZ**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
VIRIDIANA ZURITA VILLEGAS

Tutora:
DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA

Comité tutorial:

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA

DRA. SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F., Marzo, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo conformado por:

Dra. Soledad Funes Argüello	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra	Facultad de Química, UNAM
Dra. Sobeida Sánchez Nieto	Facultad de Química, UNAM

El proyecto fue apoyado por DGAPA-PAPIIT (IN220511) y PAIP (4290-12 y 5000-9125). Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACyT para la realización de la presente tesis. Asimismo se recibió apoyo del Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) para asistir al Congreso Nacional de Bioquímica.

El jurado de examen de maestría estuvo constituido por:

PRESIDENTE	Dr. Salvador Uribe Carvajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
VOCAL	Dr. Blas Lotina Henssen	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. José de Jesús García Valdés	Facultad de Química, UNAM
VOCAL	Dr. Eleazar Martínez Baraja	Facultad de Química, UNAM
SECRETARIO	Dr. Francisco Ruíz Terán	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM a través de los siguientes apoyos:

- DGAPA-PAPIIT IN220511
- PAIP 4290-12 y 5000-9125
- Beca de Maestría otorgada por CONACyT para Viridiana Zurita Villegas
- Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP)

Se agradece la ayuda técnica de la M. en C. Manuela Nájera Martínez (Facultad de Química, UNAM) por su asistencia en el montaje de técnicas de Biología Molecular.

Se agradece a la Dra. Carolina Peña Montes (Facultad de Química, UNAM) por su asistencia en la técnica de qPCR-Tiempo Real.

Se agradece al Dr. José de Jesús García Valdés y a la M. en C. Roxana Isela Noriega Navarro (Facultad de Química, UNAM) por su asistencia técnica en la extracción y transformación de los ovocitos de *Xenopus*.

Se agradece al M. en C. Pedro Josué Trejo Soto y al QFB Rodrigo Aguayo Ortiz (Facultad de Química, UNAM) por su asistencia en la utilización de los programas para la construcción de la estructura tridimensional del transportador y el análisis de la interacción soluto-transportador por acoplamiento molecular.

Se agradece al jurado por su tiempo en la revisión de esta tesis.

DEDICATORIAS

Dedico con todo mi cariño esta tesis a mi familia, que sigue enseñándome lo importante que es en mi vida. A mis padres por sus consejos, enseñanzas y cuidados. A mi hermano porque a pesar de ser el menor ha sido un ejemplo para mí.

A mis abuelos, tíos, primos y sobrinos, porque no importan las dificultades siempre están allí para hacerme sentir mejor y enseñarme a valorar a la gran familia en la que he crecido.

A mi compañero y amigo de vida, que me apoyado en los buenos y malos momentos, siempre con esa sonrisa característica, con quien he crecido los últimos años y espero seguir haciéndolo.

A los que no comparten la misma información genética, mis amigos. Porque cada día es una aventura con ustedes y cada anécdota vivida es toda una experiencia para mí.

Aquellas personas que más que amigos son algo especial en mi vida, que me han demostrado que no importa que suceda, siempre estarán allí cuando los necesite.

A la Doctora que creyó en mí, que me formó académicamente y que me alentó a seguir adelante. A la que por cierto también he llegado a estimar más allá de lo académico.

A todas las personas que he conocido en el camino y que me dedicaron un momento de su tiempo.

A mi amada UNAM, a la Facultad de Química y a todos los Doctores, Maestros, Profesores y colegas que conocí. Porque esta casa de estudios siempre será mi segundo hogar.

A cada uno de ustedes quiero agradecerles haber formado parte importante en esta etapa de mi vida que se traduce en la finalización de esta tesis. Gracias por hacerme sentir orgullosa de este logro.

ÍNDICE GENERAL

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
II. 1 Transporte de azúcares en plantas.....	2
II. 2 Familia de Facilitadores Mayores (MFS).....	4
II. 3 Transportadores de monosacáridos en plantas (MST)	7
III. ANTECEDENTES DIRECTOS	16
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVO GENERAL	19
VI. OBJETIVOS PARTICULARES	19
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	20
VII. 1 Análisis de la expresión de ZmHT por PCR punto final y qPCR.	21
VII. 2 Clonación.	25
VII. 3 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia para el transportador putativo de hexosas de maíz	28
VII. 4 Expresión de ZmHT en un sistema de expresión heterólogo	29
VIII. RESULTADOS	36
VIII. 1 Análisis de la expresión de ZmHT por qPCR.....	36
VIII. 2 Clonación y secuenciación	39
VIII. 3 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia traducida de nucleótidos de ZmHT	40
VIII. 4 Expresión de ZmHT en un sistema de expresión heterólogo	49
IX. DISCUSIÓN	52
IX. 1 ZmHT se expresó en tejidos fuente y demanda.	52
IX. 2 Análisis <i>in silico</i> de la secuencia traducida del gen para el presunto transportador de hexosas, ZmHT.	56
IX. 3 Infructuosa expresión de ZmHT en dos sistemas heterólogos de expresión.	58
X. CONCLUSIONES	63
XI. PERSPECTIVAS	64
XII. ANEXOS	65
Anexo 1.....	65
Anexo 2.....	67
Anexo 3.....	70
Anexo 4.....	73
XIII. REFERENCIAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte de sacarosa en el floema.....	3
Figura 2. Modelo topológico del simportador monosacárido:H ⁺ de <i>Nicotiana tabacum</i> , NtMST.....	6
Figura 3. Ovogénesis de <i>Xenopus laevis</i>	11
Figura 4. Modificación redox de un transportador de sacarosa (SUT).	14
Figura 5. Diseño experimental.....	20
Figura 6. Vectores empleados para la subclonación de ZmHT	30
Figura 7. Fotografías de la extracción de ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	34
Figura 8. Niveles de expresión de ZmHT en diferentes tejidos de una planta y en tejidos embrionarios de semillas de maíz.....	36
Figura 9. Niveles de expresión de ZmHT durante la germinación de embriones maduros de maíz.....	37
Figura 10. Comparación de los niveles de transcrito de ZmHT detectados mediante qPCR con la toma de glucosa por los embriones germinados.....	38
Figura 11. Niveles de expresión de ZmHT en embriones maduros de maíz embebidos en diferentes azúcares.....	39
Figura 12. Cortes de restricción con EcoRI de la construcción pGEM-TEasy-1800ZmHT	40
Figura 13. Secuencia de la clona ZmHT	41
Figura 14. Alineamiento en Mafft de varios transportadores de azúcares con ZmHT.....	43
Figura 15. Modelo topológico de la estructura secundaria de ZmHT.....	44
Figura 16. Superposición de los modelos construidos para ZmHT	45
Figura 17. Representación en un modelo de cintas de la presunta estructura terciaria de ZmHT	46
Figura 18. Probables aminoácidos implicados en el acoplamiento de la β-D-Glucosa con el modelo del transportador de hexosas de maíz	49
Figura 19. Geles de poliacrilamida para corroborar la expresión de ZmHT a diferentes condiciones de inducción	50
Figura 20. Monitoreo de la expresión de ZmHT en la fracción microsomal de los ovocitos de <i>Xenopus</i> en un gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie.....	51

Figura 21. Localización en la secuencia de ZmHT de codones poco frecuentes en <i>E. coli</i> . Análisis hecho en Rare Codon Calcator.....	60
Figura 22. Curva de disociación para los oligonucleótidos usados para la detección de ZmHT en qPCR	70
Figura 23. Curva estándar de amplificación usadas en el qPCR	71
Figura 24. Gráfico de Ct contra Log Concentración para determinar la eficiencia de la reacción de qPCR	71
Figura 25. Distintas conformaciones adoptadas por los transportadores FucP, XylE, GlpT, LacY, PepTso, EmrD y el transportador putativo ZmHT	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mezcla de reacción para la generación de cDNA.....	22
Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR en punto final para la expresión de ZmHT.....	23
Tabla 3. Mezcla de reacción para el PCR en tiempo real.....	24
Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR en punto final para la obtención de la clona ZmHT.....	26
Tabla 5. Condiciones para la PCR en punto final en la obtención de la clona de ZmHT	26
Tabla 6. Condiciones para la PCR para la obtención de un inserto de ZmHT de 1605 pb.	31
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la subclonación de ZmHT en el vector pET-32a(+).	31
Tabla 8. Matriz de porcentajes de identidad de las secuencias de proteínas de varios transportadores de monosacáridos y uno de sacarosa.....	43
Tabla 9. Resultados del análisis de acoplamiento molecular mediante AutoDock 4.2 y Docking Glide.	47

I. RESUMEN

Durante la germinación se necesita el aporte de azúcares desde los tejidos fuente como el endospermo y el escutelo, hacia el tejido demanda, el eje embrionario. Este proceso es necesario para su crecimiento y continuar su desarrollo hacia una planta fotosintéticamente activa.

En un estudio previo encontramos que los ejes embrionarios no expresan transportador de sacarosa, por lo que su nutrición depende de la entrada de carbono en forma de hexosas. En maíz no se han caracterizado los transportadores de hexosas, así que se buscó en la base de datos de secuencias EST de endospermos de maíz una secuencia anotada como presunto transportador de hexosas. Se encontró una con número de acceso BT018728.1 y que en este trabajo se denominó ZmHT. Se analizó su expresión en diferentes tejidos de maíz, encontrando que su expresión es alta en tejidos fuente como las hojas y los tallos, pero también hay transcritos en tejidos demanda como raíces, pistilos, embriones y ejes embrionarios. A pesar de su pobre expresión en embriones se continuó con su estudio. Se encontró que durante la germinación su patrón de expresión fue similar al de la toma de glucosa por los embriones (estudio previo) y que su transcripción aumentó al incubar los embriones en sacarosa, glucosa o fructosa. La inducción por sacarosa podría deberse a que se hidrolizó a hexosas por las invertasas del tejido.

En vista de lo anterior se clonó a ZmHT. La secuencia presentaba 7 nucleótidos distintos a la anotada, por lo que fue registrada en el GeneBank con un número de acceso KF612271. El análisis *in silico* de la secuencia 1572 nucleótidos traducida a proteína predice un posible marco de lectura de 523 aminoácidos. El arreglo topológico es de 12 segmentos transmembranales y un asa intermedia de 61 aminoácidos, estructura que coincide con los transportadores de hexosas. Además se encontraron regiones que están conservadas en otros transportadores de hexosas. Sumado a ello el análisis por acoplamiento molecular del modelo tridimensional de la proteína con diferentes azúcares sugiere que la glucosa es el azúcar que podría unirse preferentemente. Con la finalidad de caracterizar la actividad de transporte se transformaron tanto *E. coli* como ovocitos de *X. laevis*, pero no se logró obtener a la proteína recombinante. No obstante es preciso buscar alternativas para la expresión de ZmHT que permitan estudiar la función de la proteína y su posible papel en la fisiología de la planta.

II. INTRODUCCIÓN

II. 1 Transporte de azúcares en plantas

La sacarosa es el principal azúcar sintetizado durante la fotosíntesis, es fuente de carbono y energía, y la molécula señal que afecta el crecimiento de la planta. Los tejidos fotosintéticos exceden su capacidad metabólica de uso de sacarosa, por lo que el exceso es exportado a los tejidos no fotosintéticos o también llamados demanda como las hojas jóvenes, raíces, semillas, meristemos, tubos polínicos y frutos (Rolland *et al.*, 2006).

La sacarosa se moviliza a través del floema, un conducto especializado en “llenarse o cargarse” de nutrientes y también en “descargar” éstos a los tejidos demanda. El floema también moviliza RNA, factores de transcripción, minerales, compuestos de defensa y moléculas señal, entre otros (Slewinski *et al.*, 2013). Está formado esencialmente por tres tipos de células: los elementos cribosos (SE), las células acompañantes (CC) y las del parénquima (PC). Los SE están altamente modificados para crear un conducto de células contiguas que presentan baja resistencia al paso de solutos. Su viabilidad depende de las CC, debido a que carecen de núcleos y vacuolas. Las PC son las más externas al floema y las que están en contacto con las células fotosintéticas del mesófilo (Figura 1).

Una visión simplificada del mecanismo de transporte de azúcares acepta que la sacarosa producida durante la fotosíntesis se mueve esencialmente de dos maneras distintas. La primera es célula a célula por un transporte simplástico. Los solutos fluyen por un gradiente de concentración a través conexiones denominadas plasmodesmata, que son poros o conductos que conectan a las células. En el paso de llenado del floema este transporte ocurre entre las células del mesófilo y también entre el complejo CC-SE y entre los SE-SE (Figura 1A).

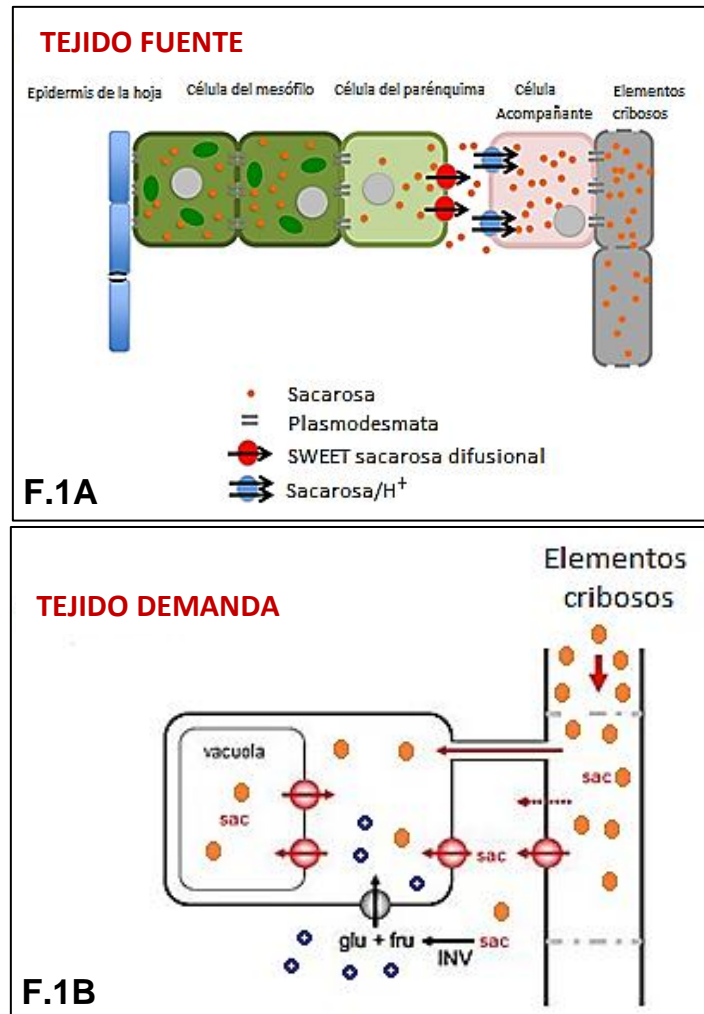


Figura 1. Transporte de sacarosa en el floema. En el tejido fuente ocurre el llenado del floema con sacarosa y en el tejido demanda la descarga de sacarosa del floema. sac, sacarosa; glu, glucosa; fru, fructosa; INV, invertasa. Modificado de Shiratake, 2007 y Chen, 2014.

El otro tipo de movimiento es a través de proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática, transporte denominado apoplástico. Durante el cargado del floema las PC exportan la sacarosa a través de los transportadores difusionales SWEET. Por su parte las CC toman la sacarosa del apoplasto mediante transportadores dependientes de la actividad de la ATPasa de protones, los simportadores sacarosa:H⁺, propiciando la acumulación de sacarosa en los SE (Figura 1A; Sjölund, 1997; Shiratake, 2007; Chen, 2014). La alta concentración de sacarosa en el floema genera el movimiento del azúcar hacia los tejidos demanda

mediante el gradiente químico e hidrostático de éste. La capacidad de la planta de usar una ruta apoplástica o simplástica para el “llenado del floema” está determinada por la abundancia de los plasmodesmata (Voitsekhovskaja *et al.*, 2006). Por ejemplo, el maíz, Arabidopsis y las plantas de la familia Solanácea como jitomate, tabaco y papa, se consideran principalmente “cargadores apoplásticos”, si bien pueden contener una cantidad reducida de plasmodesmata (Dinant y Lemoine, 2010).

El mecanismo de descarga de la sacarosa del floema hacia los tejidos demanda depende de la especie o tejido y de la etapa de desarrollo de la planta. La sacarosa puede introducirse a la célula demanda vía plasmodesmata o depositarse en el apoplasto donde los transportadores sacarosa:H⁺ la importan. Alternativamente la sacarosa puede hidrolizarse en glucosa y fructosa en el espacio extracelular por las invertasas de la pared celular. Las hexosas producidas son internalizadas por los transportadores de monosacáridos (Figura 1B; Lemoine, 2000).

A pesar de que la sacarosa es el azúcar que se mueve a distancia en la planta, el transporte de hexosas tiene un papel crítico en regular las concentraciones citosólicas de los azúcares reductores. Lo anterior es importante ya que las hexosas y sobre todo la glucosa, son reconocidas como moléculas señal que modifican la expresión de genes de la planta, en procesos tan importantes como la senescencia, el desarrollo, la respuesta a luz y a hormonas. Es por ello que la localización y concentración libre de hexosas debe ser regulada (Rolland *et al.*, 2006).

II. 2 Familia de Facilitadores Mayores (MFS)

Los transportadores de azúcares de plantas pertenecen a una de las superfamilias más grandes de transportadores relacionados evolutivamente, la Familia de Facilitadores Mayores (MFS “Major Facilitator Superfamily”) también conocida como la Familia de uniportadores-simportadores-antiportadores, ya que sus miembros muestran alguno de estos tres mecanismos de transporte.

Los uniportadores transportan un soluto a favor de su gradiente de concentración. Los simportadores y los antiportadores acoplan el transporte energéticamente desfavorable de un soluto (en contra de su gradiente de concentración) al energéticamente favorable de otro, sin hidrolizar ATP. Los solutos son transportados simultáneamente en ambos casos, sin embargo los simportadores lo hacen en la misma dirección, mientras que los antiportadores lo hacen en direcciones opuestas (Alberts *et al.*, 2004). Los solutos transportados por esta superfamilia son diversos: monosacáridos, oligosacáridos, aminoácidos, nucleótidos, péptidos, vitaminas, cofactores, fármacos, cromóforos, aniones, neurotransmisores y metabolitos del ciclo de Krebs, entre otros (Reddy *et al.*, 2012).

En 1998, Pao y colaboradores reportaron 17 familias pertenecientes a MFS con base en datos filogenéticos, estudios de secuenciación y comparación de secuencias. Un año más tarde MFS se expandió a 34 familias (Saier *et al.*, 1999; Saier, 2000) y actualmente se reconocen 74 familias. A la fecha se tienen 10,000 miembros secuenciados, provenientes de los tres reinos, que presentan ciertas características en común. Su longitud se encuentra entre los 400 y 600 aminoácidos y la mayoría posee 12 segmentos transmembranales en alfa hélice (Figura 2), aunque hay miembros con 11, 13, 14, 15, 16 y 24 alfa hélices transmembranales. Diversos análisis concuerdan que esta superfamilia viene de la triplicación y fusión de un gen primitivo de 2 segmentos transmembranales que generó una proteína de 6, gen que posteriormente se duplicó y fusionó para generar finalmente una proteína de 12. Lo anterior explica que los seis primeros segmentos transmembranales presenten cierta homología con los últimos seis (Reddy *et al.*, 2012). Otra característica de los miembros de la MFS es que las regiones N- y C- terminal se predicen de localización citoplasmática. Además poseen una asa larga que conecta las hélices transmembranales 6 y 7, que es muy variable en longitud y secuencia de aminoácidos entre las diferentes familias (McCurdy *et al.*, 2010).

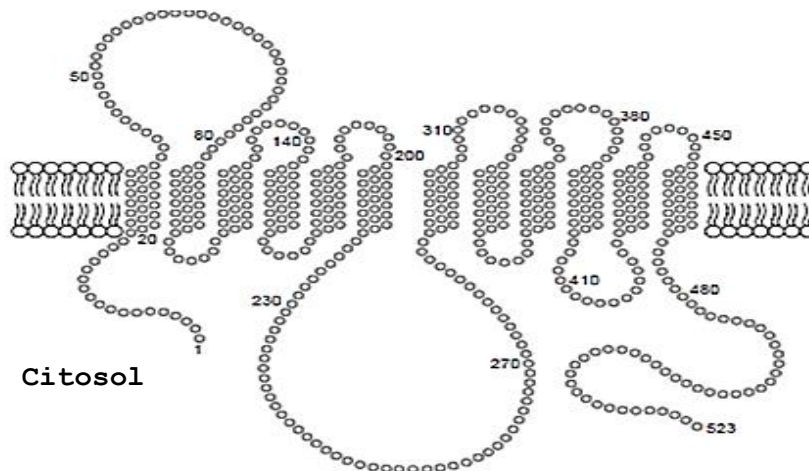


Figura 2. Modelo topológico del simportador monosacárido:H⁺ de *Nicotiana tabacum*, NtMST (Williams *et al.*, 2000). El transportador presenta las regiones amino y carboxilo en la cara citosólica de la membrana, así como un asa intracelular larga que conecta los primeros 6 segmentos transmembranales con los últimos 6.

Como superfamilia todos los transportadores aceptan una gran diversidad de tipos de sustratos y sus funciones abarcan desde la acumulación de nutrientes en bacteria hasta la recaptura de neurotransmisores a través de la membrana sináptica en humanos (Hirai *et al.*, 2003). A pesar de estas diferencias se predice que todos sus miembros conservan una estructura tridimensional similar (Law *et al.*, 2008).

Hasta ahora no existe ninguna proteína MFS de plantas cristalizada. No obstante, el modelado por homología ha permitido realizar predicciones tridimensionales de las mismas con las estructuras cristalográficas de proteínas MFS de bacteria. Entre las estrategias para la predicción de estructuras se encuentra: el modelado de *novo* y el modelado comparativo. El primero consiste en simular el plegamiento de una secuencia de aminoácidos a partir de implementar métodos estadísticos que predicen las conformaciones que adoptan los aminoácidos de la secuencia. El segundo utiliza estructuras cristalizadas como plantillas (“template”) para generar un modelo. Se basa en el principio que secuencias similares tienen estructuras similares, para así predecir el plegamiento de la secuencia en cuestión (Cavassotto y Phatak, 2009; Krieger, 2003). De los 10 000 miembros de MFS solo 6 han sido cristalizados: el transportador glicerol-3-fosfato (GlpT), la lactosa permeasa (LacY), el

simportador fucosa-protón (FucP), el simportador D-xilosa-protón (XylE), el transportador a múltiples fármacos (EmrD) de *E.coli* (Cura y Carruthers 2013) y el transportador péptido-protón (PepTso) de la bacteria *Shewanella oneidensis* (Newstead *et al.*, 2013). Las estructuras resueltas aportan ideas estructurales generales sobre la conformación y el posible mecanismo de transporte para otras proteínas no resueltas.

La función de la mayoría de los miembros de MSF es el transporte membranal de solutos. Sin embargo se han encontrado proteínas en *E. coli* y en *S. cerevisiae* que poseen secuencias de aminoácidos con una alta identidad a transportadores pero funcionan como receptores transmitiendo información de la superficie celular al material genético con la finalidad de regular la expresión de ciertos genes. Lo anterior sugiere que la función de MFS también podría ser diversa (Saier, 2000).

Existen diversas familias de MFS que transportan azúcares, la transportadora de azúcares SP (“Sugar Porter”) es la que posee un mayor número de miembros secuenciados. SP se encuentra en los tres reinos y las proteínas que la conforman son uniportadores, catión simportadores o bien soluto:soluto antiportadores. Entre los azúcares que transportan se encuentran la glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, xilosa, manitol, lactosa, α -glucosa, quinato y mioinositol (Saier, 2000).

II. 3 Transportadores de monosacáridos en plantas (MST)

En *Arabidopsis* se han encontrado 53 genes que presumiblemente codifican para transportadores de monosacáridos (MST) y que están agrupados en siete subfamilias. La clasificación denota el tipo de azúcar que transporta y/o la localización o si responde a estrés. Se denominan: proteínas de transporte de azúcares, **STP**; transportador vacuolar de glucosa, **VGT**; transportador tonoplástico de monosacáridos, **TMT**; transportador plastídico de glucosa/supresor de proteína G beta 1, **pGlcT/ SGB1**; transportador de polioles **PLT**; transportador de inositol, **INT**; y proteínas de respuesta temprana a la deshidratación, **ERD6** (Büttner, 2007).

Recientemente se reportó una clasificación en la que se incluye una nueva familia de proteínas que transportan monosacáridos, los denominados “SWEETs”. Éstos a diferencia de las 7 subfamilias descritas anteriormente se predice que presentan 7 segmentos transmembranales. Su actividad de transporte es del tipo difusional bidireccional. Algunos SWEETs presentan baja afinidad por glucosa, como el transportador AtSWEET1 de *Arabidopsis thaliana* con una K_m de 9 mM. Sin embargo, hay que mencionar que algunos SWEET prefieren transportar sacarosa (Chen *et al.*, 2012).

Como se mencionó, de MFS la familia STP es la mejor caracterizada. El primer miembro identificado fue AtSTP1, proteína capaz de transportar varias hexosas, excepto fructosa. De los 14 genes STP en *Arabidopsis*, ocho se han estudiado a detalle. Todos son simportadores azúcar: H^+ y pueden transportar diferentes hexosas con una preferencia mayoritaria por glucosa con una alta afinidad ($K_m = 100 \mu M$; Büttner, 2010).

A pesar de contar con la caracterización bioquímica de algunos de los miembros de la superfamilia MFS, no es posible determinar la especificidad de la proteína por el soluto a transportar mediante el análisis bioinformático de su secuencia, ni aún dentro de cada una de las subfamilias. Por ejemplo, AtPMT1 y AtPMT2 son capaces de transportar glucosa, fructosa, xilosa, galactosa, xilitol y sorbitol, pero AtPMT1 tiene la capacidad más alta para fructosa mientras que AtPMT2 para el xilitol (Schaadt *et al.*, 2010).

II. 3.1 Caracterización de transportadores de azúcares.

El primer gene clonado para un transportador de monosacáridos de un organismo fotosintético fue CkHUP1, del alga unicelular *Chlorella kessleri*. Dicho gen reveló cierta homología con los transportadores difusionales de monosacáridos en animales y levaduras y con los simportadores de monosacáridos: H^+ en bacterias (Büttner y Sauer, 2000). Desde entonces y hasta la fecha se han clonado y estudiado varios transportadores en diversos sistemas de expresión heterólogos, debido a la gran

cantidad de ellos que puede contener una membrana de plantas (Delrot *et al.*, 2001). Un sistema de expresión heterólogo tiene principalmente dos funciones, la sobreexpresión de la proteína de estudio y su caracterización bioquímica y fisiológica. A continuación se describen algunos de estos sistemas (Yesilirmak y Sayers, 2009).

- **Sistemas de expresión procariontes**

Escherichia coli. Es la primera opción debido a su simplicidad, rápida tasa de crecimiento y relativamente bajo costo. Sin embargo entre las desventajas que presenta es que a menudo no realiza un correcto plegamiento de las proteínas, así como modificaciones post-traduccionales. Además la producción de proteínas estabilizadas con puentes disulfuro en *E. coli* generalmente resulta en degradación proteolítica, mal plegamiento y formación de cuerpos de inclusión. A pesar de ello este sistema es muy empleado para determinar la topología de proteínas membranales (Barbier-Brygoo *et al.*, 2001; Yesilirmak y Sayers, 2009).

- **Sistemas de expresión eucariontes**

Entre los sistemas más usados para la producción en general de proteínas transportadoras de plantas destacan las levaduras, los ovocitos de *Xenopus laevis* y las líneas celulares de insectos y mamíferos. Para simportadores azúcar:H⁺, los dos primeros son los más empleados. Todos estos sistemas tienen la ventaja sobre los sistemas procariontes que pueden realizar modificaciones post-traduccionales (Dreyer *et al.*, 1999).

Levaduras. Las más comúnmente usadas son ***Saccharomyces cerevisiae*** y ***Schizosaccharomyces pombe***. Como organismos unicelulares eucariontes poseen características moleculares, genéticas y bioquímicas similares a los eucariontes superiores como las plantas. Su crecimiento es rápido con grandes densidades de cultivos celulares, su manipulación es sencilla y su costo es bajo. Son sistemas excelentes para estudiar las características funcionales y cinéticas, ya que su ventaja radica en que se pueden producir cepas viables deficientes de transportadores

específicos o bien en vías específicas de transporte. Como ejemplo se encuentra *Saccharomyces cerevisiae* cepa EBY.VW4000, deficiente en el transporte de glucosa, donde la actividad funcional de diferentes transportadores de hexosas se ha medido, como VvHT3, VvHT4 y VvHT5 de uva y los transportadores SWEET de *Arabidopsis*. Otra ventaja de las levaduras es que se puede medir el transporte y determinar la especificidad de sustrato de un transportador en particular. Entre sus limitaciones se encuentran bajos rendimientos y estrés celular debido a la presencia de un gene extraño (Dreyer *et al.*, 1999; Barbier-Brygoo *et al.*, 2001; Yesilirmak y Sayers, 2009; Chen *et al.*, 2010 y 2012).

Xenopus laevis. Los ovocitos provenientes de la rana africana de uñas también son una excelente herramienta para la identificación de la función de proteínas y canales de diferentes especies. Estos ovocitos expresan un bajo número de canales por ser independientes de nutrientes exógenos. Son de bajo costo y sobreviven largo tiempo fuera del cuerpo donde son producidos. Además, debido a que son células grandes (1 mm de diámetro aproximadamente), el material genético puede introducirse fácilmente por micro-inyección y su manipulación resulta sencilla. Entre las desventajas que este sistema proporciona es la baja cantidad de proteína recombinante que produce y la expresión de la misma por un corto tiempo. La purificación de la proteína resulta un poco más complicada en comparación con los demás sistemas y si ésta es tóxica para los ovocitos puede afectar su viabilidad. Los ovocitos logran sintetizar y ensamblar una proteína a partir de DNA o RNA exógeno. Posteriormente se detecta el transporte mediante el empleo de técnicas electrofisiológicas como “Patch-clamp” siempre y cuando el transportador genere un movimiento de carga durante su actividad de transporte. De no ser así, se emplean técnicas de marcaje radioactivo del soluto a transportar y se mide la incorporación de marca radioactiva (Bianchi y Driscoll, 2006; Markovich, 2008). Para realizar éste tipo de estudios es muy importante que los ovocitos se encuentren en la etapa V o VI de su desarrollo, donde son fácilmente distinguibles debido a su tamaño y al contraste de coloración que presentan. Se puede distinguir un hemisferio color negro/café denominado animal, que contiene la mayoría del núcleo y un hemisferio color beige

denominado vegetal (Figura 3) que prácticamente se encuentra lleno de plaquetas de vitelio, las cuales contienen el 80% de las proteínas del ovocito en forma de lipoproteínas y glucoproteínas. Estas proteínas tienen la función de nutrir al ovocito una vez que éste llegue a su madurez y sea fecundado y explica el hecho que puedan sobrevivir fuera el ovario por varios días. Además contiene mRNA, tRNA, organelos, histonas, lípidos de membrana, ribosomas y sobre todo una cantidad importante de aminoácidos, algunos liberados de la degradación de las proteínas de las plaquetas del vitelio. Los ovocitos en la etapa VI contienen los componentes necesarios para producir proteínas (Miller y Zhou, 2000; Keiper, 2002; Rasar y Hammes, 2006).

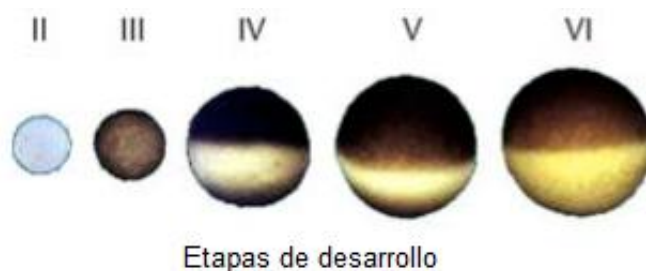


Figura 3. Ovogénesis de *Xenopus laevis* (Keiper, 2002).

II. 3.2 Regulación de MST

Los MST se encuentran mayormente expresados en los tejidos no heterotróficos. Ésto sugiere que su función primaria es la descarga de los azúcares del floema y el abasto de carbono a los tejidos no fotosintéticos (Delrot *et al.*, 2001; Büttner, 2010).

La presencia de MST es determinante para el crecimiento de los tejidos demandantes que carecen de transportadores de sacarosa o de conexiones plasmodesmata. En el fruto de jitomate aún verde, las células presentan numerosas conexiones plasmodesmata, nutriéndose principalmente de sacarosa que llega el floema. Al comienzo de la etapa maduración (fruto color naranja a rojo) dichas conexiones disminuyen y las membranas de las células del fruto comienzan a

expresar una cantidad abundante de transportadores de hexosas. Plantas mutantes en MST disminuyen un 80 a 90% los niveles de transportadores y su tasa de acumulación de hexosas a un 55% (McCurdy *et al.*, 2010).

Los MST también se localizan en la membrana de la vacuola y del cloroplasto. Se sugiere que su función es regular la cantidad de hexosas en estos compartimentos y/o en el citosol. En *Arabidopsis* la proteína ESL1 (MST tipo ERD) trabaja coordinadamente con la invertasa vacuolar. Se encontró que el aumento de la expresión de ESL1 está ligado al incremento de la expresión de la invertasa durante condiciones de estrés hídrico. Probablemente la acumulación de hexosas en la vacuola es usada por ESL1 para lograr que éstas fluyan al citoplasma, como un mecanismo para regular la re-movilización de azúcares (Yamanda *et al.*, 2010).

La cantidad de los MST debe regularse para cubrir la demanda de azúcares no solo en los diversos tejidos, también en diferentes etapas de desarrollo y bajo distintas condiciones ambientales (Williams *et al.*, 2000; Barbier-Brygoo *et al.*, 2001). Tratamientos como daño mecánico, luz, estrés hídrico y salino, fitohormonas y ataque por patógenos modifican la expresión de los transportadores de azúcares de plantas (Williams *et al.*, 2000).

La regulación de la expresión de los transportadores puede ser a varios niveles. Indirectamente por la actividad de la ATPasa de H⁺. Concentraciones altas de carbono en la planta inducen la expresión de los genes para la ATPasa de H⁺ e influyen en la cinética de transporte de los simportadores. La otra forma de regulación es directa, sobre la transcripción, post-transcripción y la post-traducción. Se conoce este tipo de control en la expresión de los transportadores de sacarosa pero poco para los transportadores de hexosas (Delrot *et al.*, 2001; Slewinski, 2011).

- **Regulación transcripcional y post-transcripcional**

Se han encontrado elementos en la región promotora de varios genes que codifican para transportadores (Inbraheem *et al.*, 2010). En uva, el gene para el transportador

VvHT1 contiene 2 cajas para respuesta a azúcares y su actividad es inducida por sacarosa y glucosa. Además, el factor de transcripción VvMSA (proteína homóloga a las ASR “ABA stress ripening induced protein”) inducible por la hormona ácido abscísico (ABA), se une también a la caja de azúcares en el promotor de VvHT1. Lo anterior es una regulación común de las vías de transducción de señales por la hormona del estrés ABA y la vía de señalización dependiente de azúcares (Çakir *et al.*, 2003). Para los transportadores de sacarosa se demostró que la adición de auxinas y citocinas en hojas induce la acumulación de transcrito para el SUT1 de *Arabidopsis* (Lalonde *et al.*, 1999). En cuanto a regulación post-transcripcional se estima que la vida media de los mRNA de los transportadores de sacarosa es de 60 a 130 min y que algunos de estos mRNA se protegen mediante la unión de proteínas al RNA (Vaughn *et al.*, 2000; He *et al.*, 2008).

- **Regulación post-traducciona**

A nivel post-traducciona existen varios mecanismos de regulación descritos para transportadores de sacarosa (Vaughn *et al.*, 2000). El más común es la fosforilación/desfosforilación. A través del análisis del fosfoproteoma se identificó un probable sitio de fosforilación para el transportador AtSTP1. Estudios con activadores de cinasas sugieren que AtSTP13 también es regulado negativamente por fosforilación (Hayes *et al.*, 2010).

- **Regulación redox**

En presencia de agentes oxidantes como el glutatión, el transportador de sacarosa StSUT1 de *Solanum tuberosum* forma un puente disulfuro con otro transportador y aumenta su actividad (Figura 4). Un alineamiento de transportadores de sacarosa de la familia Solanaceae (tomate y papa) con el de sacarosa de maíz mostró que existen 4 cisteínas conservadas, probablemente importantes para este tipo de regulación. Por otra parte se encontró que el ambiente redox también influye en la localización de los transportadores. La expresión de SUT1-GFP bajo condiciones reductoras, lleva a la proteína a distribuirse en toda la membrana plasmática. Sin embargo, bajo condiciones oxidantes, se localiza en balsas lipídicas, donde se

propone que ocurre su oligomerización (Slewinski y Braun, 2010). Una asociación a estos dominios lipídicos parece ser importante para el reciclamiento constante de los SUTs vía endocitosis (Liesche *et al.*, 2010).



Figura 4. Modificación redox de un transportador de sacarosa (SUT). En condiciones reductoras se encuentra en su forma no dimérica y es menos activo, mientras que en condiciones oxidativas se encuentra predominantemente es un forma dimérica y es más activo. (Tomado y modificado de Slewinski y Braun, 2010).

- **Regulación por estrés biótico y abiótico**

Durante la interacción entre plantas y patógenos se establece una competencia por nutrientes entre hospedero y huésped. La importación de azúcares hacia los tejidos dañados se relaciona con su alta demanda para defender a la planta o para secuestrar los azúcares del apoplasto y reducir los que están disponibles para el patógeno. Se ha observado que las toxinas afectan a la ATPasa de H^+ , por ejemplo la FB1, secretada por el hongo *F. verticillioides* inhibe en un 30% su actividad (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). La inhibición de la bomba primaria afecta indirectamente el transporte en la membrana y la importación de compuestos del apoplasto. Otras toxinas influyen directamente en la expresión de los transportadores, por ejemplo evocadores de bacterias y hongos inducen la expresión de STP4 en cultivos celulares de *Arabidopsis* (Williams *et al.*, 2000).

El estrés hídrico y el salino pueden ocasionar cambios en la expresión de transportadores de azúcares. En *Arabidopsis* el estrés por deshidratación o frío induce la expresión del MST tipo ERD6 (Delrot *et al.*, 2001).

- **Regulación por azúcares**

Existe evidencia que cambios en los niveles de azúcares afectan la expresión y actividad de los transportadores. Por ejemplo, la expresión del gene VfSUT1 (transportador de sacarosa) pero no de VfSTP1 (transportador de glucosa) decrece en los cotiledones después de la exposición a altas concentraciones de sacarosa o glucosa, mientras que bajas concentraciones no afectan los niveles de transcripción para ningún transportador (Weber *et al.*, 1997).

En levaduras los azúcares regulan la estabilidad de sus transportadores de hexosas, controlando su cantidad en la membrana plasmática mediante las proteínas RGT2 y SNF3. Éstas presentan una alta identidad con los transportadores de hexosas de levadura, sin embargo carecen de actividad de transporte. Además su región carboxilo terminal es más extensa (218 y 303 aminoácidos para RGT2 y SNF3, respectivamente). La proteína SNF3 percibe bajos niveles de glucosa e induce la expresión de los transportadores de alta afinidad por glucosa. Por su parte, RGT2 percibe altas concentraciones de glucosa e induce la expresión de transportadores de baja afinidad por el azúcar. Ambas modulan la función de Rgt1p, proteína que activa o reprime la transcripción de genes de transportadores de hexosas, dependiendo de la concentración extracelular de glucosa (Lalonde *et al.*, 1999; Rolland *et al.*, 2006).

III. ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de trabajo, hemos demostrado mediante ensayos de RT-PCR, Northern blot y por inmunohistoquímica que la distribución de los transportadores de sacarosa no es homogénea en la semilla de maíz (Gómez-Calderas, 2008; Guzmán-Chávez, 2010; Sánchez-Linares *et al.*, 2012). El tejido embrionario que propiamente da lugar a las hojas y las raíces no contiene transportador de sacarosa, al menos no el SUT1, que es abundante en plantas maduras de maíz (Slewinski *et al.*, 2010). El tejido que rodea al embrión, el escutelo o cotiledón modificado, si tiene en sus células del parénquima una cantidad abundante de transportadores de sacarosa (Sánchez-Linares *et al.*, 2012).

El escutelo al inicio de la germinación, sintetiza sacarosa a partir de los lípidos de reserva (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). La cantidad excedente de sacarosa se exporta al apoplasto para nutrir al eje embrionario. La falta de transportador de sacarosa en este último tejido sugiere que se nutre a partir de hexosas. Además, el transporte de hexosas es alto en embriones maduros compuestos tanto del tejido escutelar como del eje embrionario. Esto apoya nuestra sugerencia de la toma de hexosas por el eje embrionario (Zurita-Villegas, 2011).

En la búsqueda de posibles transportadores de hexosas en tejido embrionario se encontró uno en las secuencias EST de endospermos de maíz (número de acceso BT018728.1; Lai *et al.*, 2004). La secuencia se tradujo, se comparó con la base de datos de proteínas y se encontró similar a los miembros de la familia MFS. Obtuvimos la clona para el presunto transportador de hexosas (Anexo I) al que se denominó ZmHT. Mediante el análisis por RT-PCR se detectó en varios tejidos, expresándose poco en la hoja (tejido fuente) y principalmente en tejidos demandantes como el embrión, tanto maduro como inmaduro; y el eje embrionario (Zurita-Villegas, 2011).

Con estos datos consideramos importante clonar y caracterizar al presunto transportador de hexosas y determinar si se encuentra en el eje embrionario para nutrirlo hasta que se convierte en un organismo con capacidad fotosintética.

IV. HIPÓTESIS

La carencia de transportador de sacarosa en el eje embrionario hace necesario el transporte de hexosas en ese tejido, entonces se clonará y caracterizará la expresión de un transportador de hexosas de tejido embrionario de maíz.

V. OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de un transportador de hexosas, ZmHT, en maíz.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar a ZmHT.
2. Analizar *in silico* a ZmHT y compararlo con otras secuencias de transportadores de hexosas.
3. Corroborar la expresión de los transcritos para ZmHT en diferentes tejidos de maíz y a diferentes tiempos de germinación y suplementados con distintos carbohidratos en tejido embrionario de maíz mediante RT-qPCR.
4. Sobreexpresar la proteína en un sistema heterólogo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos se diseñó un procedimiento experimental que incluyó tres partes (Figura 5). En la primera parte se cuantificó la expresión de ZmHT por PCR en tiempo real en diferentes tejidos de maíz y durante la germinación de embriones maduros de maíz. Se determinó el efecto de diferentes azúcares en la expresión del transportador en los embriones. Todo para determinar si el presunto transportador de hexosas se expresa durante la germinación del maíz y explicar la toma de hexosas por este tejido. En la segunda parte se obtuvo la clona de ZmHT y se analizó la secuencia de nucleótidos y de proteína. Finalmente en la tercera se intentó la expresión de ZmHT en un sistema heterólogo.

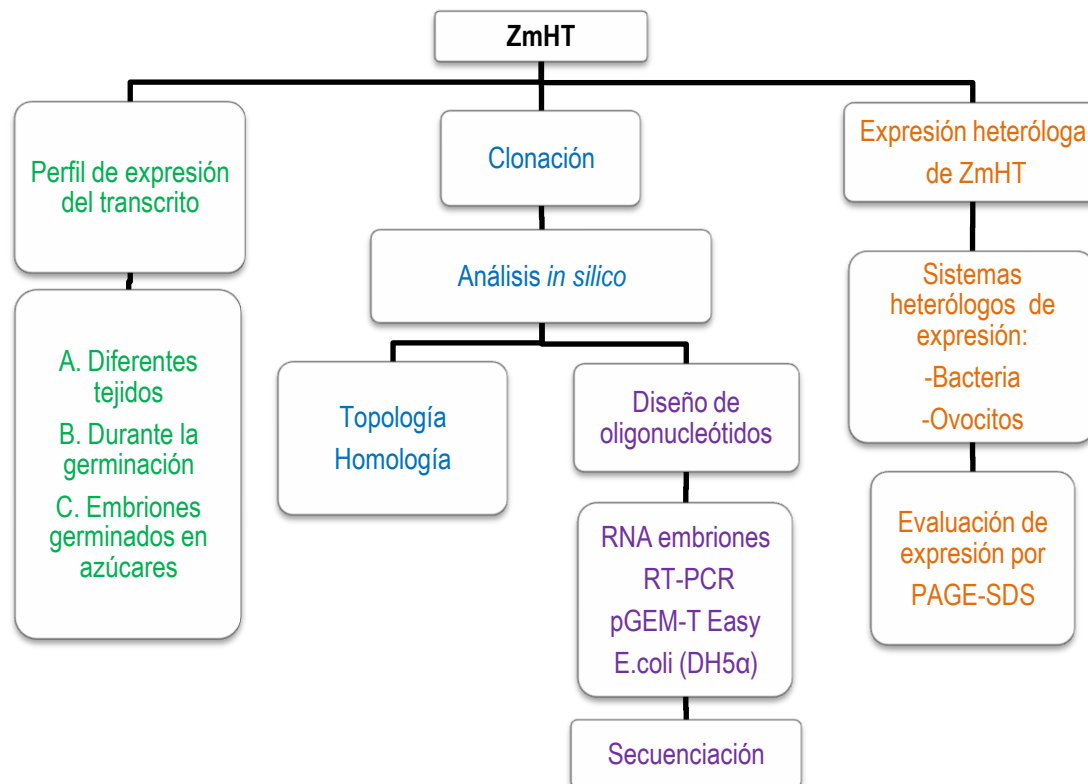


Figura 5. Diseño experimental. Se muestran las tres partes del trabajo experimental, la determinación de la expresión del transcrito tanto en los tejidos de una planta madura como en los embriones durante la germinación, seguido de la clonación a partir de embriones de maíz y la expresión heteróloga de ZmHT.

VII. 1 Análisis de la expresión de ZmHT por PCR punto final y qPCR.

Material biológico. Hojas, tallos, raíces, espigas, pistilos, embriones inmaduros, embriones maduros y ejes embrionarios de una planta de maíz fueron colectados y almacenados a -70° C hasta su uso. Los embriones maduros y los ejes embrionarios de maíz (*Zea mays* var. Chalqueño) se obtuvieron mediante extracción manual con navaja. Los embriones maduros se lavaron con hipoclorito de sodio al 2%, agitándolos vigorosamente durante 2 min. Posteriormente se enjuagaron con agua estéril desionizada hasta la desaparición del hipoclorito. Por último se secaron en papel filtro estéril. Estos embriones se embebieron en agar al 1%, por 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 y 48 h a 29°C en obscuridad. Por otro lado, se germinaron embriones maduros por 24 h a 29° C en obscuridad en agar al 1% y se suplementaron con 50 mM de sorbitol, manitol, glucosa, fructosa o sacarosa. Se usaron como control los embriones embebidos en agar. Todos los tejidos fueron sumergidos en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a -70° C hasta su uso.

Extracción y calibración del RNA en gel de agarosa. El RNA total se extrajo según la metodología descrita por Guzmán-Chávez (2010). Se cuantificó espectrofotométricamente en un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Se verificó su integridad en un gel de agarosa al 1%, con TAE 1X como amortiguador de corrida y bromuro de etidio 0.5 µL/mL. Después se determinaron los valores de densitometría de las bandas de los RNA ribosomales de las diferentes muestras. Si no coincidían, se volvían a correr volúmenes distintos de RNA en geles de agarosa hasta que todas las muestras produjeran un valor similar. Este proceso de calibración permite partir de una cantidad similar de RNA y por tanto esperar una cantidad similar de cDNA de cada muestra. Las diferencias en expresión de cada muestra corresponden al gene de interés. La densitometría se realizó en el Carestream Molecular Imaging Software v.5.0.2.30 y la imagen se capturó en un equipo KODAK Image Station 400R-PRO.

Obtención del cDNA. En un tubo de microfuga se colocó el volumen de RNA de la calibración por densitometría, 1 μ L de oligo dT y agua estéril tratada con DEPC c.b.p 10 μ L. El tubo se calentó a 70° C durante 5 min, después se enfrió en hielo 5 min y al final se adicionó la mezcla de reacción (Tabla 1). Se agitó y se incubó a 25°C por 5 min, después a 42°C por 1 h y por último a 70°C por 15 min en un termociclador Thermal Cyclor 2720 (Applied Biosystems). El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

Tabla 1. Mezcla de reacción para la generación de cDNA.

Reactivo	Volumen (μ L)
Buffer Improm II 5X	4.0
MgCl ₂	2.4
dNTP's	1.0
Transcriptasa Reversa (Promega)	1.0
Agua DEPC estéril	1.6

VII. 1.1 PCR en punto final.

La expresión cualitativa se determinó mediante PCR con la mezcla que se describe en la Tabla 2. Se usaron los oligonucleótidos directo ATCGAAGAGATGGTGCTGCT e inverso AAGTGTCCACGAAACCAACC (Anexo 1B), para amplificar un producto de 178 pb. La reacción se efectuó en un termociclador a 98° C por 3 min para la desnaturalización inicial, seguido de 40 ciclos de amplificación en donde cada ciclo incluyó 10 s de desnaturalización a 98° C, 10 s de alineamiento a 58° C y 15 s de extensión por 72° C. La extensión final fue a 72° C por 10 min. La mezcla de reacción de PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% con TAE 1X como amortiguador de corrida y bromuro de etidio 0.5 μ L/mL. El producto se observó en un transiluminador de UV (WiseUV WUV-L50) y la imagen se capturó en el KODAK Image Station.

Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR en punto final para la expresión de ZmHT.

Reactivo	Volumen (μL)
5X Advantage HD Buffer	3.0
dNTP's (10 mM)	0.3
Oligonucleótido sentido	0.6
Oligonucleótido antisentido	0.6
DNA polimerasa Advantage HD	0.15
cDNA (aproximadamente 1 μg)	0.6
Agua libre de nucleasas	9.75

VII. 1.2 PCR en tiempo real.

Estandarización de la técnica de qPCR. Se verificó la especificidad de la reacción y se establecieron los rangos dinámicos, la eficiencia, la reproducibilidad y la sensibilidad del método (Anexo 3). Para incrementar la especificidad del ensayo se utilizó un juego de oligonucleótidos que generó un producto de 178 pb. La región abarca desde el codón de paro hasta la región 3'-UTR en la secuencia de ZmHT (oligonucleótidos directo ATCGAAGAGATGGTGCTGCT e inverso AAGTGTCCACGAAACCAACC; Anexo 1B). Además se verificó que los oligonucleótidos tuvieran un contenido de GC entre el 40 y 60%, que no formaran estructuras secundarias y que no hubiera complementariedad entre ellos. Lo anterior se realizó con el programa OligoAnalyzer 3.1

Reacción de qPCR. Se empleó SYBR Green (Applied Biosystems) para la reacción de qPCR según las condiciones que se muestran en la Tabla 3. Cada muestra fue preparada por duplicado o triplicado. A su vez se prepararon las mismas reacciones para cada muestra pero usando los oligonucleótidos para amplificar al gen constitutivo, la ubiquitina (oligonucleótidos directo ATCTTTGTGAAGACCCTCAC e inverso CCTAAGGCGCAGCACCAAGT). El gen se eligió por tener el mismo grado de expresión en todas las muestras (Guzmán-Chávez, 2013; Zhang *et al.*, 2012) y se utilizó para calibrar la cantidad de cDNA añadido en cada reacción de qPCR. Las reacciones fueron distribuidas en placas de 96 pozos cubiertas con tapas plásticas

adhesivas (Applied Biosystems). La reacción se efectuó en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystem).

Tabla 3. Mezcla de reacción para el PCR en tiempo real.

Reactivo	Volumen (µL)
SYBR Green PCR Master Mix	10.0
Oligonucleótido sentido HT11F (5 µM)	0.8
Oligonucleótido antisentido HT11R (5 µM)	0.8
cDNA	1.0
Agua libre de nucleasas	7.4

Los datos obtenidos de la qPCR se analizaron con el software ABI PRISM 7000 SDS. Se fijó un valor de umbral: la fase donde la eficiencia de la reacción es cercana al 100%. Así, el programa proporcionó el valor de C_T , que es el número de ciclo donde se alcanza el umbral de emisión de fluorescencia establecido de cada reacción. Se obtuvo el valor promedio de C_T para cada muestra y se prosiguió a realizar la cuantificación relativa mediante el método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Dicho método permite calcular el cambio de expresión de un gen respecto a una muestra control y normalizarla con una referencia endógena. En la ecuación, $2^{-\Delta\Delta C_T}$:

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ muestra de interés} - C_T \Delta \text{ calibrador}$$

Donde la muestra de interés es el templado proveniente del organismo bajo las condiciones de estudio establecidas y el calibrador es la muestra de estudio en las condiciones experimentales contra las que se desea comparar las diferencias de expresión. En este caso se empleó como calibrador el cDNA proveniente de embriones maduros a las 0 h de germinación para el análisis a lo largo de la germinación de embriones y para la expresión de los diferentes tejidos. Se usó la expresión de los embriones embebidos en agar por 24 h de germinación para el análisis del efecto de la imbibición en diferentes azúcares. Al ser una semicuantificación las unidades en que se reporta la expresión son arbitrarias.

VII. 2 Clonación.

Extracción de RNA. Se extrajo RNA de embriones maduros de maíz germinados por 24 horas mediante la metodología descrita en Guzmán-Chávez (2011). El RNA total obtenido se cuantificó espectrofotométricamente en Nanodrop y se almacenó a -70°C hasta su uso. Para verificar la integridad del RNA se corrió 1 µg (mezclado con 2 µL de buffer de corrida que contenía bromuro de etidio y agua DECP c.b.p 10 µL) en un gel de agarosa al 1.5% con TAE 1X como amortiguador de corrida. El RNA se visualizó en el transiluminador de UV y la imagen se capturó en el equipo KODAK Image Station.

Obtención de cDNA. Se diseñaron oligonucleótidos utilizando la secuencia del transportador de hexosas de endospermo de maíz encontrada en la base de datos del GeneBank, con número de acceso BT018727.1 (Anexo 1A). Para el diseño se utilizó el programa Primer3PLUS. Para la obtención del cDNA se hizo una reacción de retro-transcripción oligo específica. Se tomó el volumen equivalente a 1 µg de RNA y se mezcló con 1 µL de oligonucleótido inverso (AGAATAAGCAGCCGCCTACA; Anexo 1A) 5 µM, 1 µL de una mezcla de dNTP's 10 mM y agua DEPC estéril c.b.p 13 µL. La mezcla se agitó y se calentó a 65°C durante 5 min para posteriormente colocarla en hielo por 1 min. Después se adicionó la mezcla de reacción que contenía 4 µL de Buffer 5x First-Strand, 1 µL de DTT 0.1 M y 1 µL de la enzima Super Script III RT (Invitrogen). Se agitó y se incubó a 25°C por 5 min, después 50°C por 1 h y por último 70°C por 15 min en un termociclador. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C.

PCR. Se empleó la DNA polimerasa Advantage HD (Clontech), debido a que la secuencia blanco para amplificar presenta un contenido de GC de alrededor del 70%. Dicha enzima es termoestable y produce un producto de longitud extensa con alta fidelidad, pues contiene una actividad muy robusta de exonucleasa 3'-5'. Una de las desventajas de la enzima es que genera extremos romos, por lo que la posterior adenilación del producto amplificado es necesaria.

Tabla 4. Mezcla de reacción de PCR en punto final para la obtención de la clona de ZmHT.

Reactivo	Volumen (µL)
5X Advantage HD Buffer	5.0
dNTP's (10 mM)	0.5
Oligonucleótido sentido	1.0
Oligonucleótido antisentido	1.0
DNA polimerasa Advantage HD	0.25
cDNA de embriones de maíz (1 µg)	2.6
DMSO 100%	0.75
Agua libre de nucleasas	13.9

La amplificación del DNA de interés se hizo con la mezcla de reacción de PCR que se encuentra en la Tabla 4 usando como oligonucleótido directo el TAGAGCATTGCTTCCGTGTG y el inverso AGAATAAGCAGCCGCTACA (Anexo 1A). La reacción se efectuó con las condiciones que se especifican en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones para la PCR en punto final en la obtención de la clona de ZmHT

Pre-desnaturalización	Amplificación (35 ciclos)	Extensión final
98° C por 3 min	Desnaturalización: 98° C por 10 s Alineamiento: 55° C por 1 min Extensión: 72° C por 2 min	72° C por 10 min

Purificación del producto de PCR. El producto de 1800 pb fue purificado de un gel de agarosa al 1% con el Gel Extraction Kit de QIAGEN y posteriormente cuantificado espectrofotométricamente.

Adenilación y Ligación. La mezcla de reacción para adenilación contuvo 4 µL (90 ng) del producto de PCR purificado, 2 µL de buffer GoTaq 5X, 4 µL de dATP 0.5 mM y 1 µL de polimerasa GoTaq 5 U/µL. La mezcla se calentó a 70°C por 30 min. Para la reacción de ligación se mezclaron 5 µL de Rapid Ligation Buffer, 1 µL del vector pGEM-T Easy (50 ng), 1 µL de T4 DNA Ligasa (Promega) y 4 µL del producto de PCR adenilado. La reacción se dejó toda la noche a 4°C. La relación producto adenilado (inserto):vector fue de 3:1.

Transformación. Se transformaron células DH5 α Ca²⁺ competentes, adicionando los 11 μ L de la reacción de ligación a un tubo con 100 μ L de las células e incubándolas durante 5 min en hielo. Posteriormente se les dio un choque térmico a 42°C durante 1 min y se incubaron nuevamente en hielo durante 15 min. El contenido del tubo se vertió en un tubo con 1 mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 90 min con agitación (150 rpm). Finalizado el tiempo se sembraron tres cajas con medio LB, ampicilina 100 μ g/mL, X-Gal 20 mg/mL e IPTG 0.5 mM. Las cajas se incubaron a 37°C durante 18 h. Se seleccionaron seis colonias blancas y se les hizo un PCR de colonia con las condiciones descritas en las Tablas 1 y 2. Para almacenar las colonias transformantes se crecieron en medio LB adicionado con ampicilina 100 μ g/mL, a 37°C por 18 h con agitación rotatoria constante (180 rpm). Para la conservación de la cepa, se adicionaron 0.3 mL de glicerol por cada 0.7 mL del cultivo; los tubos se congelaron a -70°C. La clona obtenida se denominó pGEM-TEasy-1800ZmHT.

Purificación del vector recombinante. La purificación se realizó con 0.6 mL de un cultivo de células transformantes crecido por 18 h en medio LB, utilizando el kit Zyppy Plasmid Miniprep de ZymoResearch de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El DNA fue cuantificado espectrofotométricamente.

Verificación de la transformación. Se digirió 1 μ L (71 ng/ μ L) del vector recombinante con EcoRI (Promega). Se preparó una mezcla con 1 μ L de Buffer 0 y 7 μ L de agua DEPC estéril. Se calentó a 100°C durante 5 min y se enfrió en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 1 μ L de la enzima, se mezcló y se incubó a 37°C por 2 h. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

Secuenciación. El vector recombinante se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular (IFC) con los oligonucleótidos SP6 y T7 que flanquean la secuencia de interés por el extremo 5' y 3' respectivamente. Debido a que la secuencia era muy larga (1735 pb), se solicitó la secuenciación de una porción interna del gene. También se envió muestra a la Unidad de Secuenciación

del Instituto de Biotecnología (IBT). La secuenciación en el IFC empleó un ABI Prism 3100 Genetic Analyzers (Applied Biosystems), mientras que en el IBT se realizó en un equipo Perkin Elmer 3730 (Applied Biosystems).

VII. 3 Análisis *in silico* de la secuencia para el transportador putativo de hexosas de maíz

El presunto transportador de hexosas de maíz se denominó ZmHT. La secuencia se alineó con la previamente reportada en GenBank, utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Anexo 2). Posteriormente se hizo un BLASTp en NCBI para compararla con otras secuencias de transportadores de hexosas y finalmente se modeló la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

VII. 3.1 Construcción de un modelo proteico para ZmHT

Predicción de la estructura primaria. La secuencia de nucleótidos se sometió al programa Translate de ExPASy. Se detectaron varios posibles codones de inicio y término y por lo tanto varios marcos de lectura. Se eligió el más probable y se hizo un alineamiento en Mafft buscando secuencias conservadas en otros transportadores de hexosas ya reportados y pertenecientes a la MFS (Lalonde *et al.*, 1999).

Predicción de la estructura secundaria. Se utilizaron los siguientes programas: PCI-SS, APSSP2, SIMPA 96, PREDATOR 2.1.2, SOMPA, GOR I, GOR III, GOR IV, JUFO 9D, PROF, HNN, MLRC, DPM, DSC, PORTER, CONCORD, PHD, SCRATH PP y NerSurfP. Se compararon los resultados para obtener la estructura más probable. Se realizó un análisis de hidrofobicidad para determinar los cruces transmembranales de la proteína y la localización de las asas intracelulares y extracelulares con los servidores: MINNOU, HMMTOP, TopPred2, SOSUI, TMHMM 2.0, Tmpred, TOPCONS, MEMSAT, OCTOPUS, PHOBIUS, SPOCTOPUS, SCAMPI, S-TMHMM, Das-Tmfilter y MEMSAT-SVM.

Predicción de la estructura terciaria. Se determinó mediante modelado por homología utilizando los servidores I-Tasser y Phyre2. I-Tasser uso como modelos varias proteínas membranales, como el del transportador de glicerol-3-fosfato de *E. coli* (PBD ID 1pw4) que es miembro de MFS, para construir un modelo. Phyre2 construyó varios modelos basándose cada uno en una proteína distinta. Se eligió el que uso como templado la estructura del simportador D-xilosa-protón (PDB ID 4gbz), que también pertenece a la MFS y que cubre el 80% de la secuencia de ZmHT, con 100% de identidad.

Con ambos modelos se construyó y optimizó una nueva estructura utilizando Schödinger Maestro Version 9.5.014 Modulo Prime. Los estudios de acomplamiento molecular se hicieron en el mismo programa además de Docking Glide y AutoDock 4.2. Las moléculas empleadas para el acoplamiento molecular con *ZmHT* fueron α -D-glucosa, β -D-glucosa, α -D-fructosa, β -D-fructosa, α -D-xilosa, Sorbitol, Manitol y Sacarosa.

VII. 4 Expresión de ZmHT en un sistema de expresión heterólogo

Se expresó heterológamente a ZmHT en *Echerichia coli* y en ovocitos de *Xenopus leavis*.

VII. 4.1 Expresión en *E. coli*.

La clona pGEM-TEasy-1800ZmHT originalmente se propagó en la cepa *E. coli* DH5 α . Para expresar la proteína de interés se subclonó el gen en el vector de alta expresión pET-32a(+) y en el vector pGEX 4t-1(Figura 6).

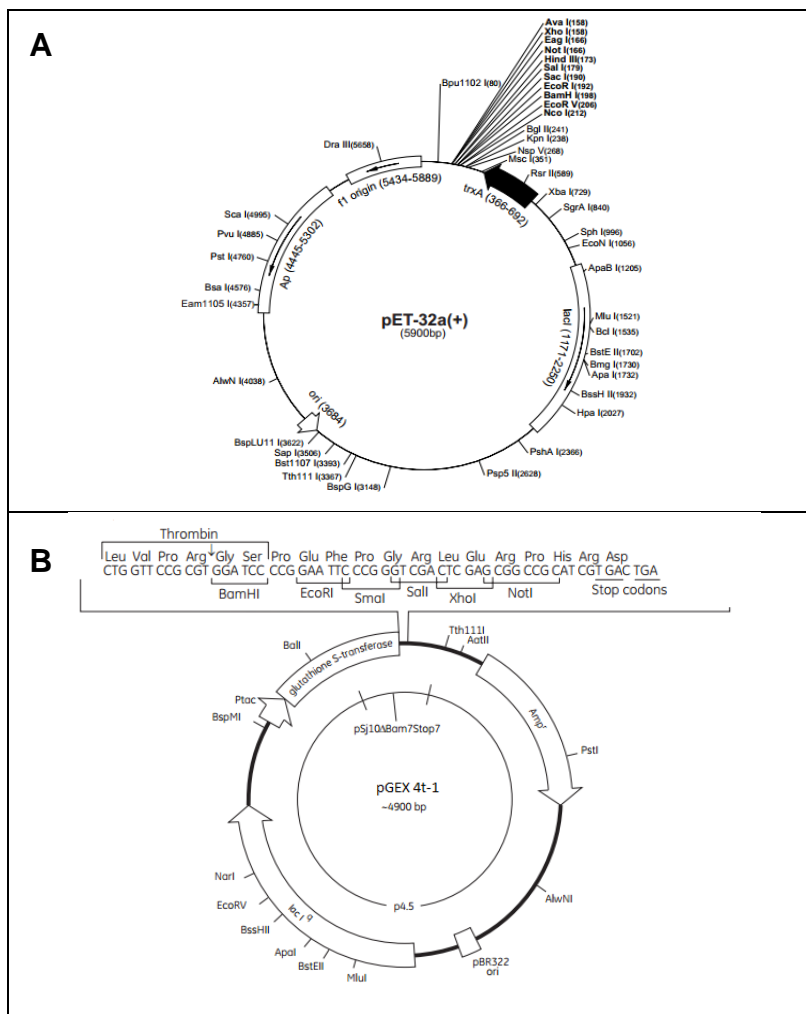


Figura 6. Vectores empleados para la subclonación de ZmHT. **A.** Vector pET-32a (+) de 5900 pb. **B.** Vector pGEX 4t-1 de 4969 pb.

Inserción de ZmHT en el vector pET-32a(+) para producir pET-32a(+)-1600ZmHT. De la clona pGEM-TEasy-1800ZmHT se subclonó la región codificante para el presunto transportador de hexosas (1572 pb) en el vector pET-32a(+).

Se efectuó una reacción de PCR (Tabla 6) empleando los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 7 (Anexo 1B). Éstos incluyen en los extremos de la secuencia sitios de corte para las enzimas EcoRI y HindIII, para que el inserto quedara direccionado río abajo del promotor T7 y la secuencia fuera leída de manera correcta para poder expresar la proteína.

Tabla 6. Condiciones para la PCR para la obtención de un inserto de ZmHT de 1605 pb.

Reactivo	Volumen (µL)
5X Advantage HD Buffer	5.0
dNTP's (10 mM)	0.5
Oligonucleótido sentido	1.0
Oligonucleótido antisentido	1.0
DNA polimerasa Advantage HD	0.25
DMSO 100%	0.75
pGEM-T Easy-ZmHT (4 µg/µL)	1.0
Agua libre de nucleasas	15.5

Las condiciones de reacción fueron: 98° C por 3 min para la pre-desnaturalización, seguido de 40 ciclos que incluyeron 98° C por 10 s de desnaturalización, 60° C por 10 s de alineamiento y 72° C por 2 min de extensión. La extensión final fue a 72° C por 10 min.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la subclonación de ZmHT en el vector pET-32a(+). En azul y subrayado se encuentra una secuencia que ayuda a estabilizar la unión de las enzimas de restricción, en rojo el sitio de corte para EcoRI en el oligonucleótido directo; en verde el sitio de corte para HindIII en el oligonucleótido inverso; y en negro la secuencia correspondiente a ZmHT.

Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	T _m (°C)	Longitud (pb)	Contenido de GC (%)
Directo	<u>AAACGT</u> GAATTCATCGGAGCCAGGAAGCAT	61.6	30	51.8
Inverso	<u>AAAGCA</u> AAGCTTCTCCAGTCCCTTGTGATT	61.9	30	51.8

El producto de PCR de 1605 pb obtenido a partir de la clona pGEM-TEasy-1800ZmHT se corrió en un gel de agarosa al 1%, se purificó (Gel Extraction Kit de QIAGEN) y se digirió. La reacción contenía 1 µL EcoRI (Promega), 1 µL HindIII (Thermo Scientific), 2 µL del buffer 10X Fast Buffer (Thermo Scientific), 2 µL (440 ng) del inserto purificado y 14 µL de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó por 2 h a 37°C e inmediatamente después las enzimas se inactivaron a 80°C por 10 min. Por otro lado el vector fue digerido empleando 2 µL EcoRI y 3 µL HindIII, 0.5 µL (2.6 µg) del vector, 3 µL del buffer, 22.5 µL de agua libre de nucleasas y se incubó por 2 h a 37°C. Se defosforiló con fosfatasa alcalina según lo indica el inserto y se hizo una

reacción de ligación en un relación inserto:vector 3:1. Se agregó 10 μL de Rapid Ligation Buffer, 2.3 μL (50 ng) del vector pET-32a(+) digerido y defosforilado, 1 μL de T4 DNA Ligasa (Promega), 2 μL del inserto purificado (44 ng) y digerido y 4.7 μL de agua libre de nucleasas. La ligación se incubó toda la noche a 4°C.

Inserción de ZmHT en el vector pGEX-4t-1. Se hizo una digestión de 6 μg del vector recombinante pET-32a(+)-1600ZmHT con 3 μL de buffer 10X Fast Digest Buffer (Thermo Scientific), 3 μL de la enzima NotI (Thermo Scientific), 3 μL de la enzima EcoRI (Promega) y 15 μL de agua libre de nucleasas con el fin de obtener la secuencia de ZmHT e insertarla en el vector. La mezcla se incubó 2 h a 37°C y después las enzimas se inactivaron a 80°C por 10 min. Asimismo 5 μL del vector pGEX-4t-1 se digirieron en 1 μL de buffer, 0.5 μL de cada enzima y 3 μL de agua libre de nucleasas, incubando e inactivando a las enzimas a las mismas condiciones. La ligación se hizo en una relación inserto:vector 3:1, añadiendo 10 μL de Rapid Ligation Buffer, 2.0 μL (125 ng) del vector pGEX-4t-1 digerido, 1 μL de T4 DNA Ligasa (Promega), 4.5 μL (123 ng) del inserto purificado y digerido y 2.5 μL de agua libre de nucleasas. La ligación se incubó toda la noche a 4°C.

Transformación. Se agregaron los vectores recombinantes a 100 μL de células Ca^{2+} competentes BL21 Codon Plus RIL. Se verificaron las transformaciones con un PCR de colonia y con una digestión. Ambas construcciones se purificaron con el kit Zyppy Plasmid Miniprep de Zymo Research y se enviaron a secuenciar en el IFC.

Expresión en BL21 Codon Plus RIL. Se sembraron las colonias transformantes en 10 mL de medio LB más ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron por 12 h a 37°C. De este cultivo se tomó 1 mL y se agregó a 10 mL de medio LB más ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubándose a 37°C con agitación vigorosa hasta que alcanzó una absorbancia a 600 nm entre 0.6 y 0.8 en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU530). Se tomó una alícuota y se le adicionó el IPTG al cultivo. Se realizaron de concentraciones de IPTG: 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 5.0 mM así como una cinética de

inducción (1, 3, 5 y 24 h). Las alícuotas obtenidas se centrifugaron 5 min a 7500 rpm a temperatura ambiente. Tanto el sobrenadante como el botón se guardaron a -20°C.

Verificación de la inducción mediante SDS-PAGE

Preparación de las muestras. Se les añadió SDS al 5% a las muestras y se calentaron a 80°C durante 10 min. Se tomaron 10 µL y se mezclaron con 10 µL de amortiguador de carga (Tris Base 0.35 M, SDS 5%, DTT 0.16 M, Glicerol 7.5% y Azul de Bromofenol 0.4%). En el caso de los sobrenadantes se usaron 15 µL y se mezclaron con 10 µL de amortiguador de carga.

Las muestras de proteína se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). Se prepararon geles de poliacrilamida al 12% (Laemmli, 1970) y se colocaron en una cámara de electroforesis Bio-Rad Mini-PROTEAN Tetra System, llenándola con el amortiguador de corrida (Tris Base 0.05 N, Glicina 0.38 M y SDS 0.1%). Las muestras se cargaron en los pozos del gel y también se cargaron 7 µL de marcador de peso molecular preteñido de BIORAD. Para la separación de las proteínas en el gel, se aplicó un voltaje de 15 mA hasta que las muestras llegaron al gel separador y después se cambió a 25 mA. El gel se tiñó (Azul de Comassie R-250 al 0.125%, Metanol 50% y Ácido acético 10%) y se destiñó (Metanol 45% y Ácido acético al 10%). Los geles fueron capturados con el equipo KODAK Image Station.

VII. 4.2 Expresión en *Xenopus leavis*

El trabajo con *Xenopus leavis* se desarrolló en el laboratorio del Dr. José de Jesús García Valdés, del Departamento de Analítica de la Facultad de Química de la UNAM.

Obtención de los ovocitos. Se anestesiaron ranas por hipotermia, es decir se colocó en hielo a la rana por 30 min o hasta observar ausencia de reflejos (Figura 7A). Después se extendió la rana en una cama de hielo y se le realizó una incisión en la zona baja del abdomen para disecar de dos a tres lóbulos ováricos (Figura 7B). Éstos se colocaron en una caja Petri (Figura 7C) con la solución ND96 (NaCl 96 mM,

KCl 2 mM, CaCl₂ 1.8 mM, MgCl₂ 1.0 mM, HEPES 5.0 mM y Gentamicina 8.0 mg/mL, ajustada a un pH de 7.4 con NaOH). Los ovocitos en estadios V-VI se separaron con pinzas de disección y se trataron con colagenasa (0.4 mg/mL; disuelta en una solución ND96 sin gentamicina) por 45 min (Figura 7D). Los ovocitos se incubaron por 12 h en solución ND96 a 19°C antes de ser inyectados.

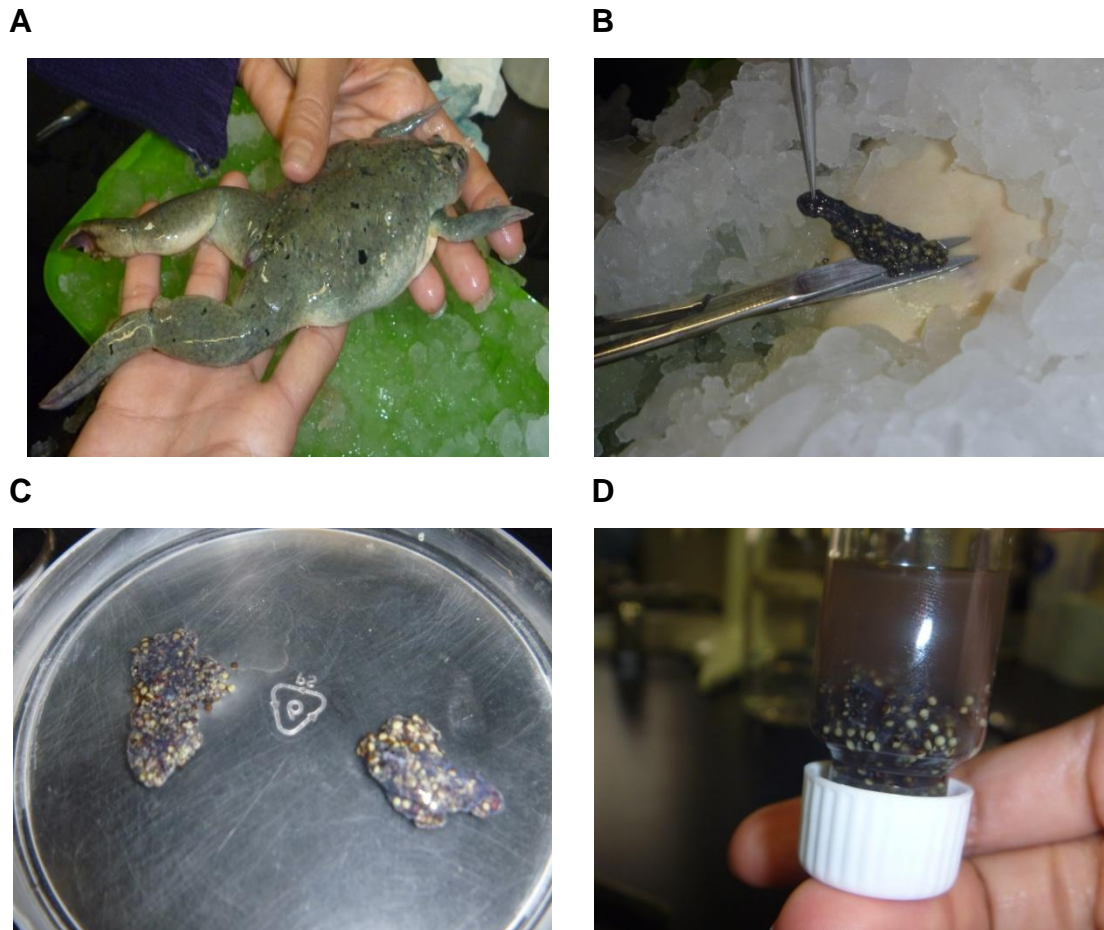


Figura 7. Fotografías de la extracción de ovocitos de *Xenopus leavis*. **A.** Rana *Xenopus leavis*. **B.** Incisión hecha en la rana para extraer los lóbulos ováricos. **C.** Lóbulos ováricos extraídos. **D.** Tratamiento con colagenasa para disgregar los ovocitos de la capa folicular.

Generación del RNA mensajero. Se purificó el vector pGEM-TEasy-1800ZmHT mediante el Maxi Kit de QIAGEN y se linealizó con la enzima Sac I (Fermentas) en una mezcla con 2 µL del vector purificado (8 µg), 4 µL de la enzima, 10 µL del buffer 10X Fast Digest (Fermentas) y 84 µL de agua libre de nucleasas. La reacción se

incubó a 37°C por 3 h y se corrieron 3 μL en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio con el fin de verificar su integridad. Al resto de la mezcla se le añadieron 250 μL de etanol absoluto 100% y 10 μL de acetato de amonio y se incubó a 4°C por toda la noche. Finalmente se hizo la transcripción empleando el kit mMessage mMachine T7 RNA transcription de Ambion, que emplea el promotor T7. No se determinó la integridad del RNA ya que la cantidad obtenida fue muy pobre, 310 ng/ μL .

Inyección del RNA mensajero en los ovocitos. Se usó un microinyector manual (Drummond digital microdispensers). Se ha reportado que la cantidad óptima de RNA inyectada al ovocito varía en un rango de 2 a 75 ng en 50 nL para producir proteínas transportadoras de membrana acopladas a iones (Preuss *et al.*, 2011). En el presente trabajo se realizaron dos ensayos. En el primero se inyectaron 60 ovocitos con 50 nL de RNA 207 ng/ μL (10 ng) cada uno y se incubaron por 2, 3 y 4 días para la expresión de la proteína, empleando 20 ovocitos para cada día (3 lotes en total). En el segundo experimento se inyectaron 25 ovocitos con 100 nL de RNA 300 ng/ μL (30 ng) en citoplasma y se incubaron por dos días y medio. Para el control se hizo lo mismo a diferencia que se inyectó agua. Los ovocitos se incubaron a 19°C en una solución ND96 que se cambiaba dos veces al día. Al concluir se congelaron a -70°C.

Obtención de membranas microsomales de ovocitos. Cada lote de ovocitos fue resuspendido en una solución de sacarosa 0.3 M, fosfato de sodio 10 mM pH 7.4, que contenía una mezcla de inhibidor de proteasas (cOmplete, Mini, EDTA-free de Roche). Se homogeneizó en hielo con 20 pases con un Teflón Potter Evelheim. Se centrifugó a 3000 Xg por 10 min a 4°C y el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 48000 Xg por una hora a 4°C. El pellet se resuspendió en 20 μL de amortiguador de carga para SDS-PAGE y se calentó a 90°C por 15 min (Bianchi y Driscoll, 2006). Por otro lado a 10 μL del sobrenadante se le agregaron 10 μL del amortiguador de carga. Las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida–SDS y se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para PAGE.

VIII. RESULTADOS

VIII. 1 Análisis de la expresión de ZmHT por qPCR.

Durante la germinación del maíz el eje embrionario necesita hexosas para su nutrición, debido a que carece del transportador de sacarosa ZmSUT1 (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). En el Genbank se encontró un presunto transportador de hexosas. Al analizar la expresión ZmHT se encontró que se expresaba en diferentes tejidos de la planta, mayoritariamente en la raíz y la hoja (Figura 8).

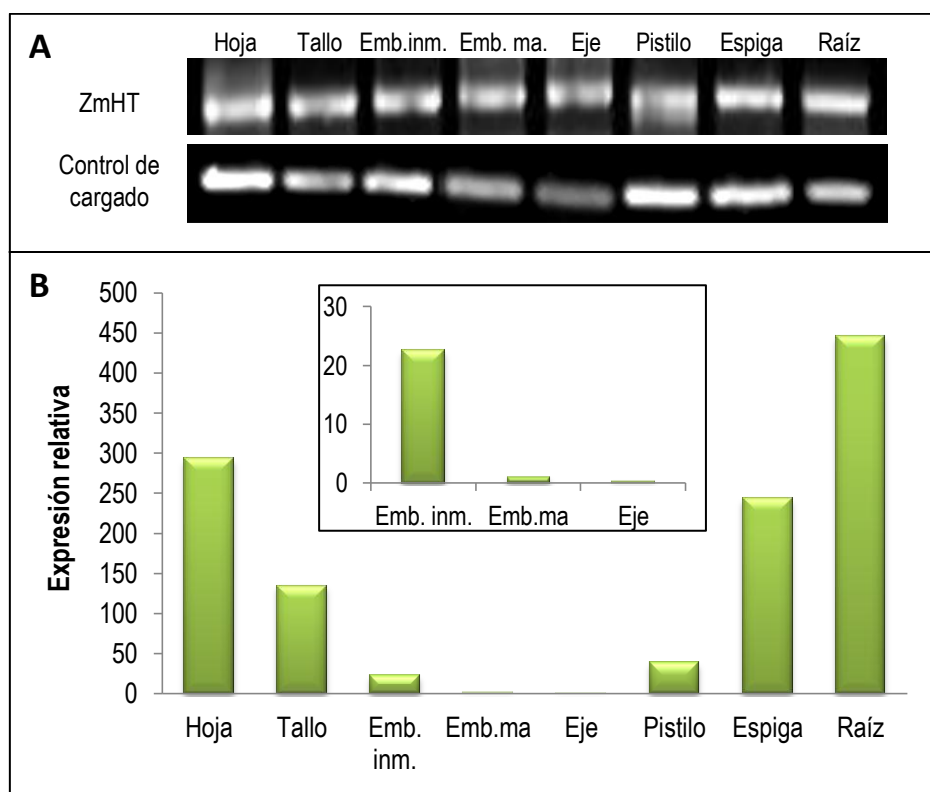


Figura 8. Niveles de expresión de ZmHT. **A.** Nivel de transcritos para ZmHT de la PCR tiempo final en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. **B.** Expresión relativa de ZmHT mediante qPCR usando como control endógeno la expresión del gen de la ubiquitina. Emb.inm., embrión inmaduro; Emb.ma., embrión maduro.

También se expresó en los tejidos embrionarios de la semilla de maíz aunque en niveles bajos, siendo los embriones maduros los que presentaron la mayor cantidad de transcrito (Figura 8 recuadro).

Debido a que la expresión era pobre en el eje embrionario, pero mayor en el embrión se determinó si durante la germinación del embrión cambiaba la expresión de ZmHT. Por PCR tiempo final se detectó que hay transcritos para ZmHT desde las 0 h y se mantiene hasta las 36 h de germinación y a las 48 h hay un ligero incremento en el nivel de transcritos.

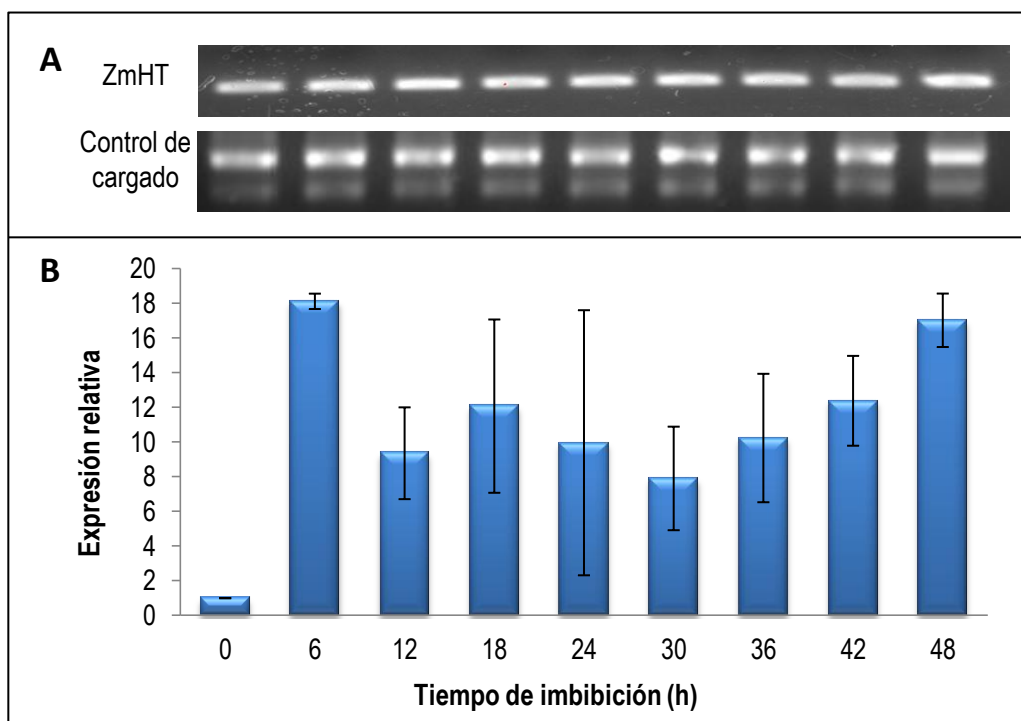


Figura 9. Niveles de expresión de ZmHT. **A.** Nivel de transcritos para ZmHT de la PCR tiempo final en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. **B.** Expresión relativa de ZmHT mediante qPCR usando como control endógeno la expresión del gen de ubiquitina.

El patrón de expresión de ZmHT también se determinó por qPCR y fue similar al del PCR tiempo final, excepto que de 0 a 6 h aumentó 18 veces la expresión y además entre las 30 y 48 h de germinación hubo un ligero incremento en el nivel de

transcritos (Figura 9). Este último perfil es similar al de la toma de glucosa de los embriones (Figura 10; Zurita-Villegas, 2011).

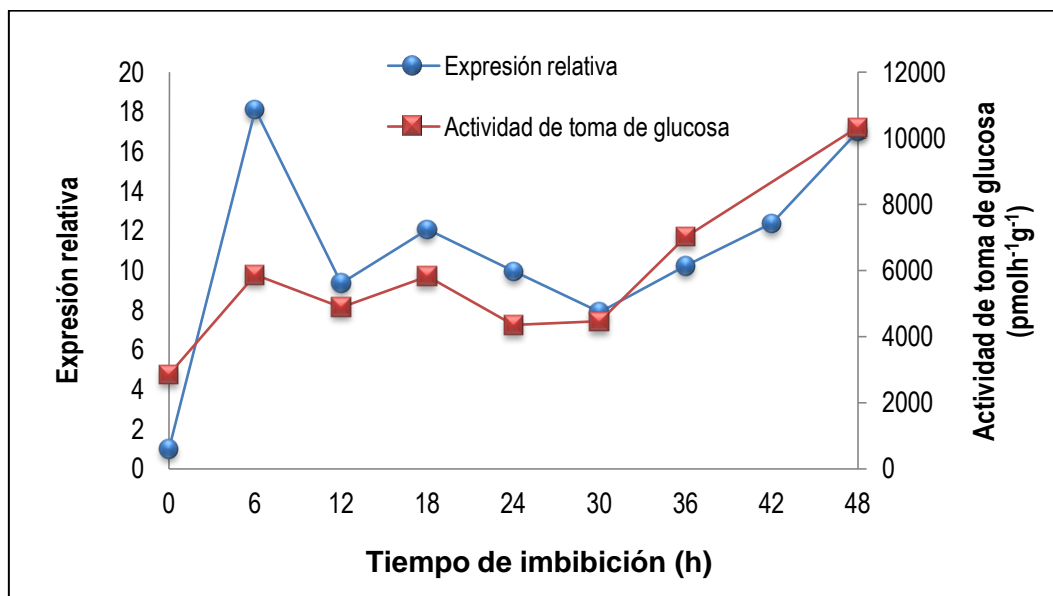


Figura 10. Comparación de los niveles de transcrito de ZmHT detectados mediante qPCR con la toma de glucosa por los embriones germinados. Datos tomados de la Figura 9B y de Zurita-Villegas, 2011.

Por lo anterior continuamos el estudio de la expresión de este transportador durante la germinación de los embriones. Durante la germinación cambian los niveles de azúcares en los diferentes tejidos embrionarios y compartimentos intracelulares (Guzmán-Chávez, 2010; Luna-Löaiza, 2011). Esta disponibilidad diferente podría afectar la expresión de sus transportadores. Por lo que examinamos si la expresión de ZmHT se modificaba por azúcares.

La imbibición por 24 h de los embriones maduros con 50 mM de fructosa, glucosa y sacarosa aumentó el nivel de transcritos para ZmHT, pero no cuando se embebieron en manitol y sorbitol (Figura 11). La medición de los transcritos por PCR tiempo final no es tan sensible como el qPCR para detectar los cambios en la expresión de ZmHT en los embriones embebidos con diferentes azúcares.

En vista de que ZmHT cambiaba su expresión con un patrón similar al de la toma de glucosa por los embriones y que los niveles de transcritos eran modulados por la presencia exógena al tejido embrionario de azúcares, se decidió realizar la clonación del presunto transportador de hexosas.

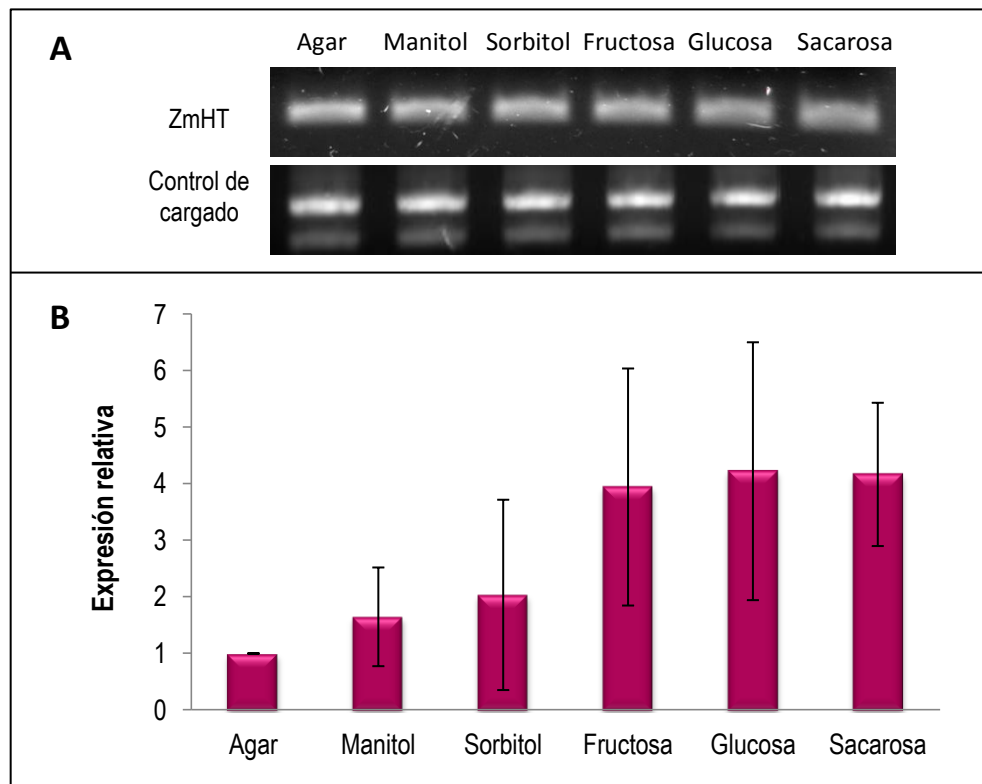


Figura 11. Niveles de expresión de ZmHT. **A.** Nivel de transcritos para ZmHT de la PCR tiempo final en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. **B.** Expresión relativa de ZmHT mediante qPCR usando como control endógeno la expresión del gen de ubiquitina.

VIII. 2 Clonación y secuenciación

Se clonó el gen para ZmHT en el vector pGEM-T Easy, clona almacenada en la cepa *E. coli* DH5 α . Se verificó que la construcción **pGEM-TEasy-1800ZmHT** contuviera al gen de interés mediante restricción (Figura 12), así como por secuenciación (Figura 13). El vector vacío tenía un peso molecular de 3015 pb mientras que el inserto

liberado del vector recombinante tenía un peso molecular de aproximadamente 2000 pb (Figura 12). La secuencia clonada fue de 1735 nucleótidos, los codones de inicio y término generan un probable marco de lectura del gen de interés de 1572 nucleótidos (Figura 13). La secuencia fue ingresada al GenBank con el número de acceso KF612271.

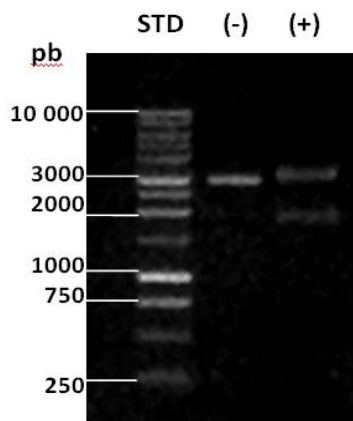


Figura 12. Cortes de restricción con EcoRI de la construcción pGEM-TEasy-1800ZmHT. El vector pGEM-T Easy se corrió en el gel (-) y el vector recombinante pGEM-TEasy-1800ZmHT digerido con la enzima EcoRI (+). Se verificó en un gel de agarosa al 1% usando TAE 1X como amortiguador de corrida y bromuro de etidio 0.5 μ L/mL. La imagen se capturó en el KODAK Image Station.

VIII. 3 Análisis *in silico* de la secuencia traducida de nucleótidos de ZmHT

La secuencia traducida de ZmHT tiene 523 aminoácidos con un peso calculado de 56.2 kDa, un pI de 9.34, con 40 aminoácidos cargados positivamente y 29 cargados negativamente. La secuencia de ZmHT presentó 11 nucleótidos distintos al de la secuencia que se encontraba en la base de datos de EST (BT018728.1; Anexo 2). De ellos 7 están dentro del posible marco de lectura. Tres de los cambios se traducirían en aminoácidos distintos: P56L, V188A y V438A.

1	11	21	31	41	50
GGATCTTCTG	CTGGCCGAGT	TCGTCTTGGA	GGAGAAGAGA	GAGAGAGAGA	50
GAGAGCGCCG	GGATCGGAGC	CAGGAAGCAT	CCAGCAGCGA	A TG GCGGGGCGG	100
AGGGGTGGCG	GCGCTGGGCG	TGAAGACGGA	GCGCGCGGCG	CAGTACAAGG	150
GGCGCATGAC	GCTCGCCGTC	GCCACGACCT	GCCTCGTGGC	CGCCGTCGGG	200
GGCGCCATCT	TCGGCTACGA	CATCGGCATC	TCCGGAGGCG	TGACATCCAT	250
GGACCTATTC	CTGGAGAAAT	TCTTCCCCTG	AGTGTTCAC	CGGAAGAACT	300
CCGGCGGGAA	GAACAACACT	TGTAAGTACG	ACAACCAGGG	ACTAGCGGCG	350
TTCACATCGT	CACTCTACCT	CGCCGGCCTC	GTTGCCCTCC	TCGTGCGGTC	400
CCCCGTGACG	AGGAACACTC	GCCGCAAAGC	TAGCATTGTC	TGCGGCGGCG	450
TGAGCTTCCT	CATCGGCGCG	GCCCTCAACG	TGGCCGCCGT	GAATCTGGCT	500
ATGCTCATCC	TCGGGCGCAT	CATGCTCGGC	GTCGGCATCG	GTTTTGGCAA	550
CCAGGCTGTG	CCGCTGTACC	TGTCGGAGAT	GGCGCCGGCG	CACCTCCGCG	600
GCGGCCTGAA	CATGATGTTC	CAGCTCGCGA	CGACGCTGGG	CATCTTCACG	650
GCGAACCTGA	TCAACTATGG	CACGCAGAAC	ATCAAGCCGT	GGGGGTGGCG	700
GCTGTGCTG	GGCCTCGCGG	CGGTGCCGGC	GCTGTGATG	ACGTTGGGCG	750
GGCTCTTTCT	TCCGGAGACT	CCCAACAGCC	TCATTGAGCG	CGGGCGCGTG	800
GAGGAGGGTC	GGCGCGTGCT	GGAGCGCATC	CGGGGCACGG	CCGACGTGGA	850
CGCCGAGTTC	ACGGACATGG	TGGAGGCGAG	CGAGCTGGCC	AACACCGTCG	900
AGCACCCGTT	CCGGAACATC	CTGCAGCCGC	GCAACCGGCC	GCAGCTGGTG	950
ATGGCCGTGT	GCATGCCGGC	GTTCCAGATC	CTGACGGGCA	TCAACTCCAT	1000
CCTCTTCTAC	GCGCCGGTCC	TGTTCCAGAG	CATGGGTTTC	GGCGGGAACG	1050
CGTCCCTCTA	CTCCTCCGTG	CTCACCGGCG	CCGTGCTCTT	CTCCTCGACG	1100
CTCATCTCCA	TCGGCATCGT	CGACCGCCTC	GGCCGCCGGA	AGCTCCTCAT	1150
CAGCGGCGGG	ATCCAGATGA	TCGTCTGCCA	GGTGATCGTG	GCGGTGATCC	1200
TGGGCGTGAA	GTTTCGGGGCG	GAGAAGCAAC	TGGCGCGGAG	CTACTCGGTC	1250
GCGGTGGTGG	TGGTGATCTG	CCTGTTTCGT	CTGGCGTTCG	GGTGGTTCGT	1300
GGGCCCCGCTG	GGATGGACGG	TGCCGAGCGA	GATCTTCCCG	CTGGAGACGC	1350
GGTCGGCGGG	GCAGAGCATC	ACGGTGGCCG	TGAACCTGCT	CTTCACCTTC	1400
GCCATCGCGC	AGGCGTTCCT	GTCGCTGCTG	TGCGCCTTCA	AGTTCGGCAT	1450
CTTCTCTTTT	TTCGCGGGGT	GGATCACCGT	CATGACCGTG	TTCGTCTACG	1500
TCTTCTCTG	GGAGACCAAG	GGCGTGCCCA	TCGAAGAGAT	GGTGCTGCTA	1550
TGGCGGAAGC	ACTGTTCTG	GAAGAAGGTC	ATGCCGGACA	TGCCGCTCGA	1600
GGATGGCTGG	GGCGCGGCTG	AGGGTCATGC	GGCACCTGCC	AGCAACAATC	1650
ACAAGGGA TG A CTGGAGTGA	AGCATGCATG	GTTGCCCTGGT	TGGTTTCGTG	1700	
GACACTTTAT	ATAATAACTG	AAGAAAACAA	GACAC	1735	

Figura 13. Secuencia de la clona ZmHT obtenida en este trabajo. Producto de mRNA de 1735 bp, anotada en el GenBank con el número de acceso KF612271. Se indican en rojo la secuencia de inicio y de paro.

Sin embargo, dos de estos cambios son conservados, además se presentan estos aminoácidos en las secuencias de otros transportadores de hexosas. El cambio de prolina por leucina en el aminoácido 56 si podría tener una influencia en la estructura o la actividad de la proteína ya que no se presenta en los transportadores de hexosas analizados (Figura 14).

```

    1
ZmHT M-AGGGVAALGVKTERAAQYKGRMTLAVATTCLVAAVGGAIFGYDIGISGGVTSMDLFLFLE
AtSTP1 MPAGGF----VVGDGQ-KAYPGKLTFFVLFVCVVAAMGGLIFGYDIGISGGVTSMPSFLK
NtMST1 M-AGGG----GIGPGNGKEYPGNLTLVTVTCIVAAMGGLIFGYDIGISGGVTSMDSFLS
VfSTP1 MPAAGI----PIGAGN-KEYPGNLTPFVTITCVVAAMGGLIFGYDIGISGGVTSMNPFLE
VvHT1 MPAVG-----GFDKGTGKAYPGNLTPYVTVTCVVAAMGGLIFGYDIGISGGVTSMAPFLQ
* * * . * * . : * * ** : ** : * * ***** * * *

    2
ZmHT KFFPVVFRHKN-SGGKNNYCKYDNQGLAAFTSSLYLAGLVAASLVASPVTRNYGRKASIVC
AtSTP1 RFFPSVYRKQQEDASTNQYCYQYDSTLTMTFTSSLYLAALISSLVASTVTRKFGRRLSMLF
NtMST1 RFFPSVFRKQKADDSTNQYCKFDSQTLTMTFTSSLYLAALLSSLVASTVTRKLRRLSMLC
VfSTP1 KFFPAVYRKKNAQHSKNQYCYQYDSETLTLFTSSLYLAALLSSVASTITRRFGRKLSMLF
VvHT1 KFFPSVYRKEALDKSTNQYCKFDSQTLTMTFTSSLYLAALLSSLVAATVTRKFGRRKLSMLF
: ** * : : : . . . * : ** : : . * : ***** : : : : : : * . * : * :

    3
ZmHT GGVSFLIGAALNVAAVNLAMLILGRIMLGVGIGFNGQAVPLYLSEMAPAHLRGGLNMMFQ
AtSTP1 GGILFCAGALINGFAKHVWMLIVGRILLGFGIGFANQAVPLYLSEMAPYKRGALNIGFQ
NtMST1 GGVLFCAGALINGFAQNVAMLIVGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKRGALNIGFQ
VfSTP1 GGLLFLVGALINGLAQNVAMLIVGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKRGALNIGFQ
VvHT1 GGLLFCAGAIINGAAKVWMLIVGRILLGFGIGFANQSVPLYLSEMAPYKRGALNIGFQ
** : * ** : * * : ***** : * : : : : : * * : * :

    4
ZmHT LATTLGIFTANLINYGTONIK-PWGWRLSLGLAAMPALMLTLGGFLPETPNLSIERGRV
AtSTP1 LSITIGILVAEVLNYFFAKIKGGWGWRLSLGGAVVPALIITIGSLVLPDTPNSMIERGQH
NtMST1 LSITIGILVANVLNYFFAKIH--WGWRLSLGGAMPALIIITIGSLFLPETPNSMIERNH
VfSTP1 LSITIGILVANILNYFFAKIKGGWGWRLSLGGAMPALIIITIGSLIIPDTPNSMIERGDR
VvHT1 LSITIGILVANILNYFFAKIKGGWGWRLSLGGAVVPALIITVGSVLVLPDTPNSMIERGQH
* : * : * : . * : : * * : * : ***** * * : * : * * : * : * : * : * : * :

    5
ZmHT EEGRVLERIRGTADVDAEFTDMVEASELANTVEHPFRNIIQPRNRPQLVMVAVMPAFQI
AtSTP1 EEAKTKLRRIRGVDDVSEQEFDLVAASKESQSIEHPWRNLLRRKYRPHLTMAVMIPFFQQ
NtMST1 DEAKARLKRIRGIDDDVEEFNDLVASEASRKIENPWRNLLQRKYRPHLTMAIMIPFFQQ
VfSTP1 DGAKAQLKRIRGVDDVEEFNDLVAASETSMQVENPWRNLLQRKYRPHLTMAVLIIPFFQQ
VvHT1 EGAKTKLRRIRGVDDVEEFNDLVASEASKLVEHPWRNLLQRKYRPHLTMAILIIPFFQQ
: . : * . ** * * * * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

    6
ZmHT LTGINSILFYAPVLFQSMGFGGNASLYSSVLTGAVLFSSTLISIGIVDRIGRRKLLISGG
AtSTP1 LTGINVIMFYAPVLFNTIGFTTASLMSAVVTGSVNVGATLVSIYGVDRWGRFRFLFLEGG
NtMST1 LTGINVIMFYAPVLFKTI GFADASLMSAVITGGVNVLATVVSIIYVDKLGRRRFLFLEGG
VfSTP1 FTGINVIMFYAPVLFNSIGFKDDASLMSAVITGVNVVATCVSIYGVDKWGRRALFLEGG
VvHT1 LTGINVIMFYAPVLFKTI GFADASLMSAVITGRVNVLATIVSIYGVDKWVRRRFLFLEGG
: ** * : ***** : : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

    7
ZmHT IQMIVCQVIVAVILGVKFGAEKQ---LARSYSVAVVVVICLFLVAFGWSWGPLGWTVPSE
AtSTP1 TQMLICQAVVAACIGAKFGVDGTPGELPKWYAIVVVFICIYVAGFAWSWGPLGWLVPSE
NtMST1 IQMLICQIAVSICIAIKFGVNGTPGDLPKWYAIVVVFICVYVAGFAWSWGPLGWLVPSE
VfSTP1 VQMLICQVAVAVSIAAKFGTSGEPGDLPKWYAIVVVFICIYVAGFAWSWGPLGWLVPSE
VvHT1 TQMLICQVIVATCILVKFGVDGEPWCLPKWYAIVVVFICVYVSGFAWSWGPLGWLVPSE
** : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

    8
ZmHT IFPLEIRSAGQSITVAVNLLFTFAIAQAFLSLLCAFKEGIFLFFAGWITVMTVFVYVFLP
AtSTP1 IFPLEIRSAAQSITVSVNMI FTFTAIAQIFLTMLCHLKFGLFLVFAFFVVMVSIFVYIFLP
NtMST1 IFPLEIRSAAQSINVSVMNI FTFTAIAQVFLTMLCHLKFGLFLFFAFFVVMITVFIYFFLP
VfSTP1 IFPLEIRSAAQSVNVSVMNI FTFTAIAQIFLTMLCHMKFGLFLFFAFFVVMITVIYITMLP
VvHT1 IFPLEIRSAAQSVNVSVMNI FTFTAIAQIFLNMLCHMKFGLFLSFAFFVVMVSFFIYFFLP
***** ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

    9
ZmHT ETKGVIIEEMVLLWRKHFWKVKMPDMPLEDGWAAEGHAAPASNNH--KG----
AtSTP1 ETKGVIIEEMQVWRSHWYWSRFVEDG---EY-----GNALEMGNKSNQAGTKHV
NtMST1 ETKNPIIEEMVIVWKEHFWFSKFMTEV---DYPGTRNGTSVEMSKGS--AGYKIV
VfSTP1 ETKGVIIEEMDRVWKSHPYWSRFVEHD---D-----NGVEMAKGG---VKNV
VvHT1 ETKGVIIEEMAEVWKSHPYWSRYVNDG---SY-----SGVELVKEN--YPVKNV
*** : ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

```

Figura 14. Alineamiento en Mafft de varios transportadores de azúcares con ZmHT. Se señalan con cilindros azules los cruces transmembrana correspondientes a ZmHT y se sombrearon las secuencias conservadas. AtSTP1, Transportador de azúcares en *Arabidopsis thaliana*; NtMST1, Transportador de monosacáridos en *Nicotiana tabacum*; VfSTP1, Transportador de hexosas en *Vicia faba*; VvHT1, Transportador de hexosas en *Vitis vinifera*. En rojo se señalan los aminoácidos que se encuentran codificados en ZmHT pero no en la secuencia original (BT018728.1) y en verde los aminoácidos que se encuentran en los otros transportadores de hexosas.

Se comparó la secuencia de ZmHT con miembros de la familia de transportadores de hexosas de plantas, encontrándose que hay una mayor identidad (56 y 59%) con la subfamilia de transportadores STP. Con miembros de las subfamilias ERD y AZT (AtERD6 y AttMT1 respectivamente) la identidad fue de 27 y 25%, mientras que la identidad con el transportador de sacarosa de maíz fue del 15% (Tabla 8).

Tabla 8. Matriz de porcentajes de identidad de las secuencias de proteínas de varios transportadores de monosacáridos y uno de sacarosa. AtSTP1, Transportador de azúcares de *A. thaliana*; NtMST1, Transportador de monosacáridos de *N. tabacum*; VfSTP1, Transportador de hexosas de *V. faba*; VvHT1; Transportador de hexosas de *V. vinifera* AtERD6; Transportador de respuesta temprana a la deshidratación de *A. thaliana*; AttMT1, presunta proteína sensora de azúcares de *A. thaliana* y ZmSUT Transportador de sacarosa de maíz. Datos obtenidos mediante el programa Mafft.

	ZmHT	AtSTP1	NtMST1	VfSTP1	VvHT1	AtERD6	AttMT1	ZmSUT1
ZmHT	100	56	59	56	56	27	25	15
AtSTP1	56	100	80	79	82	27	24	14
NtMST1	59	80	100	80	80	29	26	15
VfSTP1	56	79	80	100	81	28	25	13
VvHT1	56	82	80	81	100	27	23	14
AtERD6	27	27	29	28	27	100	29	16
AttMT1	25	24	26	25	23	29	100	15
ZmSUT1	15	14	15	13	14	16	15	100

Además, en ZmHT se identificaron los residuos o secuencias que se han conservado en los transportadores de azúcares, por ejemplo, la secuencia (R/K)XGR(R/K) entre los segmentos transmembranales 2 y 3 y entre 8 y 9 (Marger y Saier, 1993); la secuencia E-----R entre los segmentos 4 y 5 y entre 10 y 11; solamente no se

encontró la secuencia PESPR al final de los segmentos 6 y 12 que si se presenta en algunos transportadores de azúcares (Sun *et al.*, 2012). También se localizaron en ZmHT glutaminas que están conservadas en los transportadores de la familia SP como la 177 que en ZmHT es la 178, en el segmento transmembranal 5; y la glutamina 296 en el segmento transmembranal 7 (Wang *et al.*, 2008). Se encontraron también tres secuencias específicas de transportadores de hexosas de plantas como 402SWGP(M/L)GW(L/T)(V/I)PSE413, 414IFPLEIRSA422 y 472 (L/V)PEKT476 (McCurdy *et al.*, 2010). La primera es importante ya que se encuentra un W necesario para la unión del soluto.

Para determinar el probable arreglo topológico de la proteína en la membrana se realizó el análisis de la secuencia de aminoácidos de ZmHT mediante varios programas disponibles en línea. El resultado sugiere que la proteína podría presentar 12 segmentos transmembranales, cada uno constituido por 20 aminoácidos en promedio. Los dominios carboxilo y amino terminal viendo hacia el interior celular, al igual que el asa de 61 aminoácidos que une los segmentos transmembranales 6 y 7 (Figura 15).

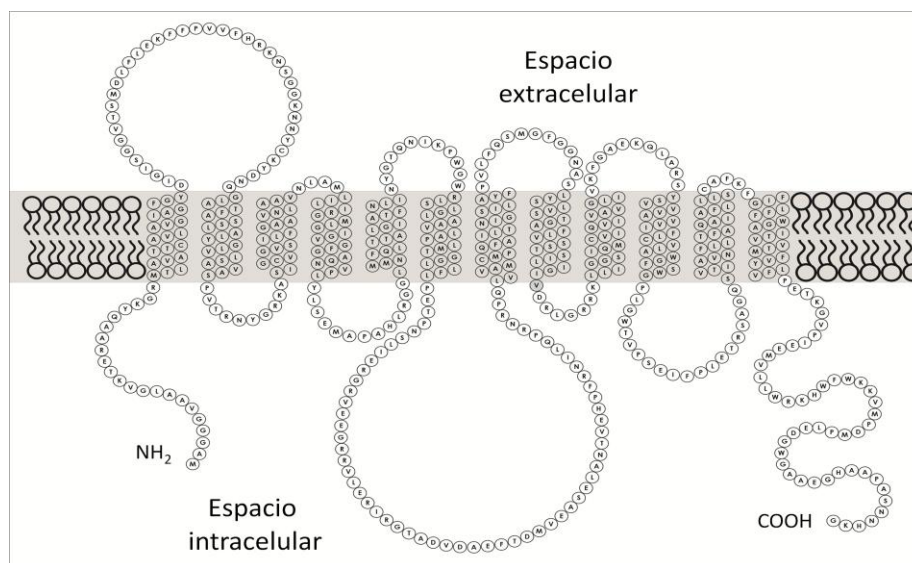


Figura 15. Modelo topológico de la estructura secundaria de ZmHT. El amino y el carboxilo terminal se encuentran en la cara de la membrana que ve al citosol, así como también un asa larga de 60 aminoácidos que une los segmentos transmembranales 6 y 7.

No hay disponible una estructura tridimensional o cristalográfica de un transportador de hexosas de plantas. Sin embargo si hay estructuras cristalográficas de varios transportadores de azúcares de bacterias (Cura y Carruthers, 2013). Con los servidores I-Tasser y Phyre2 se realizó la predicción de la estructura terciaria del presunto transportador de hexosas, ZmHT, mediante modelado por homología con las de bacterias.

En la superposición de los modelos producidos se observó que existían regiones muy similares, sin embargo la longitud de los segmentos transmembranales y el de las asas no era similar (Figura 16). Al realizar el alineamiento entre las secuencias plantilla (de los modelos) y la secuencia problema se encontró un desfaseamiento en los aminoácidos.

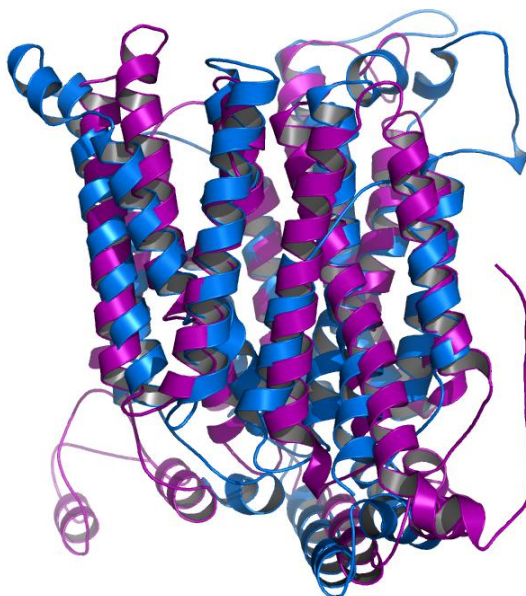


Figura 16. Superposición de los modelos construidos para ZmHT en I-Tasser (morado) y en Phyre2 (azul).

Se construyó un nuevo modelo en “Schödinger Maestro Version 9.5.014, Modulo Prime” tomando en cuenta la menor cantidad de cruces transmembrana interrumpidos, asas de longitud acorde a la estructura secundaria y una conformación abierta hacia afuera para hacer el análisis de acoplamiento molecular o “*Docking*” de la proteína con diferentes azúcares. El modelo final toma en cuenta el

porcentaje más alto de identidad entre los modelos producidos por I-Tasser y Phyre2 y se optimizó para eliminar los choques estéricos y conformacionales no favorables con el mismo programa. Éste modelo muestra 12 segmentos transmembranales de longitud variable, además dos de estos segmentos, el 7 y el 10, son discontinuos, similar a los transportadores usados como templados (Figura 17).

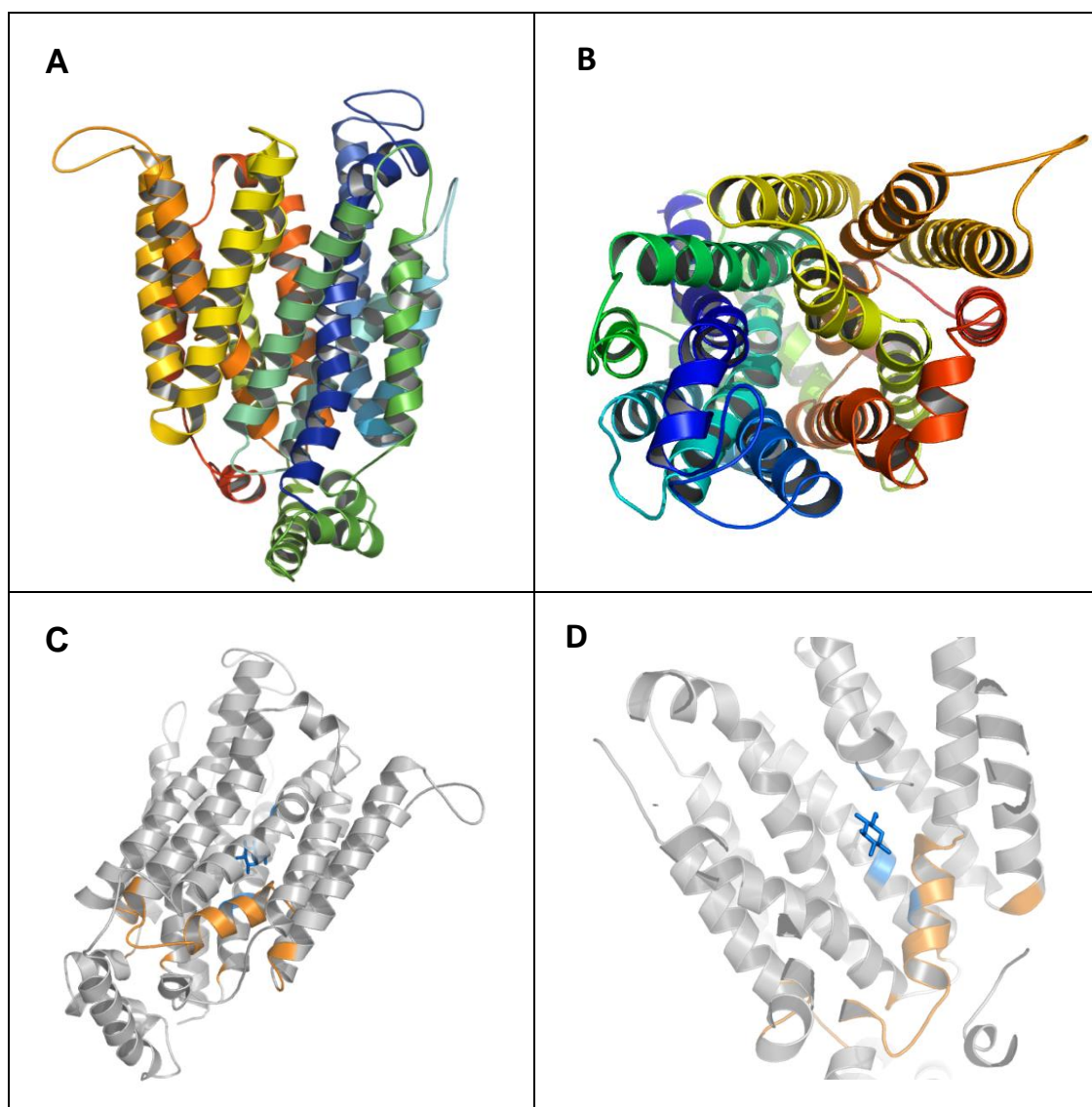


Figura 17. Representación en un modelo de cintas de la presunta estructura terciaria de ZmHT. **A.** Vista ortogonal **B.** Cara superior. **C.** Localización de las secuencias conservadas (naranja) y de los aminoácidos implicados en la unión al sustrato (azul). **D.** Acercamiento y diferente vista de C.

El modelo que se obtuvo es similar al simportador D-xilosa:H⁺ (templado) (Sun *et al.*, 2012), excepto que en ZmHT las asas son más largas. El asa central presentó estructuras alfa-hélice que se orientan del mismo lado que el dominio N- y C-terminal, lo que sugiere que podrían encontrarse en el espacio intracelular.

La estructura de la proteína tiene una conformación denominada “abierto hacia afuera” (Figura 17A), similar a la de otros transportadores de azúcares (Anexo 4). Si se observa la proteína desde arriba (Figura 17B) se aprecia una zona vacía que podría ser el poro por donde podría unirse el soluto a ser transportado. Los aminoácidos implicados en la unión al soluto se encuentran en las hélices 5 y 7 y en el segmento transmembranal 11 se expone el triptófano 409 en la cara interna que se localiza en una de las regiones conservadas, SWGP(M/L)GW(L/T)(V/I)PSE402-413 (Figura 17C y 17D).

Mediante el análisis de acoplamiento molecular entre distintos azúcares y el transportador de hexosas ZmHT, con Docking Glide y Autodocking 4.2, se obtuvieron los valores de energía del acoplamiento de los diferentes compuestos en el sitio probable de unión del transportador.

Tabla 9. Resultados del análisis de acoplamiento molecular mediante AutoDock 4.2 y Docking Glide.

Molécula	AutoDock 4.2		Glide	
	Energía de unión (Kcal/mol)	Cluster size	Glide SP* (Kcal/mol)	Glide XP** (Kcal/mol)
α-D-Glucosa	-4.40	20	-6.16	-6.12
β-D-Glucosa	-4.82	18	-5.90	-10.09
α-D-Fructosa	-3.94	18	-5.07	-8.25
β-D-Fructosa	-4.23	16	-5.81	-7.58
α-D-xilosa	-4.44	20	-6.00	-5.86
Manitol	-3.40	11	-3.60	-7.68
Sorbitol	-3.00	12	-4.17	-7.20
Sacarosa	-4.69	19	-5.48	-9.03

*SP análisis rápido y **XP análisis detallado. Se sombrea los tres valores más altos de energía para los tres tipos de análisis realizados.

El valor más negativo de energía de unión se presenta cuando la conformación es la más estable entre el ligante y la proteína (Tabla 9). La β -D-Glucosa presenta los valores más negativos en los tres tipos de análisis que se realizaron, seguida de la sacarosa, la fructosa y la xilosa y las energías más altas corresponden al manitol y al sorbitol. Estos resultados indican que la glucosa es el azúcar que tiene una unión preferente al modelo de la proteína construido para ZmHT.

Tomando como referencia la estructura cristalográfica del simportador D-xilosa:H⁺ se determinaron los enlaces que la β -D-Glucosa podría formar con ZmHT, así como los aminoácidos implicados en la unión (Figura 18A).

En el transportador de xilosa la β -D-Glucosa se coordina con residuos polares y aromáticos no cargados, formando puentes de hidrógeno con la glutamina 168, 288 y 289, la asparagina 294 y triptófano 392 (Sun *et al.*, 2012). Mientras que en ZmHT los grupos OH de la β -D-Glucosa formarían enlaces con la glutamina 178 y 296, el triptófano 409 y la asparagina 302 (Figura 18B), estableciéndose el mismo número de puentes de hidrógeno en ambos modelos (Figura 18C). Una vista superior del modelo del presunto transportador ZmHT con la β -D-Glucosa permite visualizar el posible sitio de entrada y unión de la hexosa (Figura 18D).

La información que se produjo con el análisis *in silico* de la proteína así como el acoplamiento de azúcares, permite sugerir que sí la proteína se produce *in vivo* está podría unir al menos glucosa.

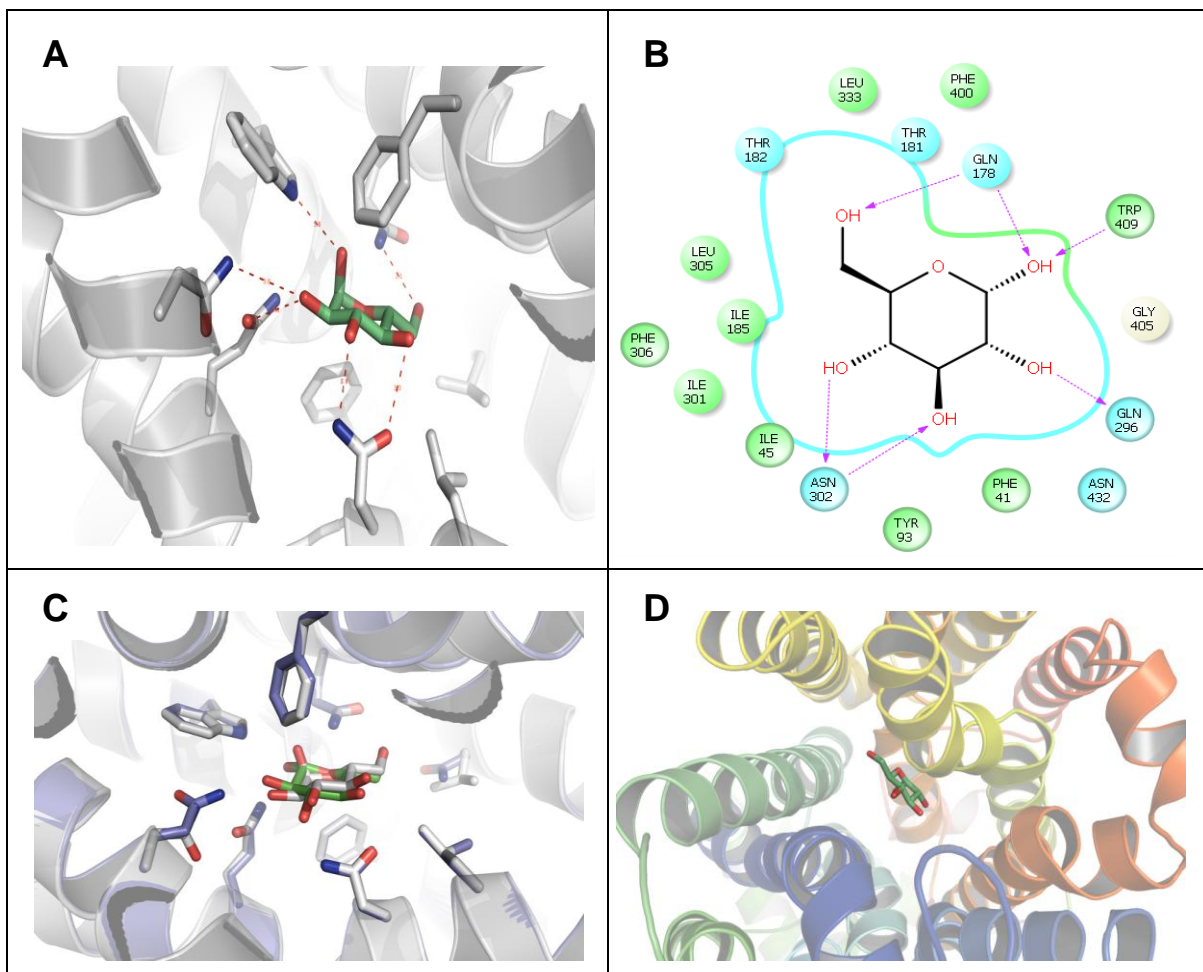


Figura 18. Probables aminoácidos implicados en el acoplamiento de la β -D-Glucosa con el modelo del transportador de hexosas de maíz. **A.** Representación de listones del transportador ZmHT estableciendo puentes de hidrógeno con la glucosa. **B.** Aminoácidos que podrían estar involucrados en la unión de la glucosa. **C.** Superposición de los modelos del sitio de unión de la glucosa del simportador xilosa:H⁺ (morado) y de la proteína ZmHT (gris). **D.** Cara superior donde se aprecia a la β -D-Glucosa en el posible poro de ZmHT.

VIII. 4 Expresión de ZmHT en un sistema de expresión heterólogo

No se logró expresar como proteína al gen para ZmHT ni en *E. coli*, cepa BL21 Codon Plus RIL (Figura 19) ni en los ovocitos de *Xenopus* (Figura 20). En *E. coli* se probaron diferentes construcciones y condiciones de inducción entre las que se incluyen diferentes tiempos de inducción, concentraciones de IPTG y temperaturas de incubación. Como se observa en la Figura 19 no hay una banda que se

incremento con alguna de las condiciones probadas, la banda esperada está en aproximadamente los 55 kDa.

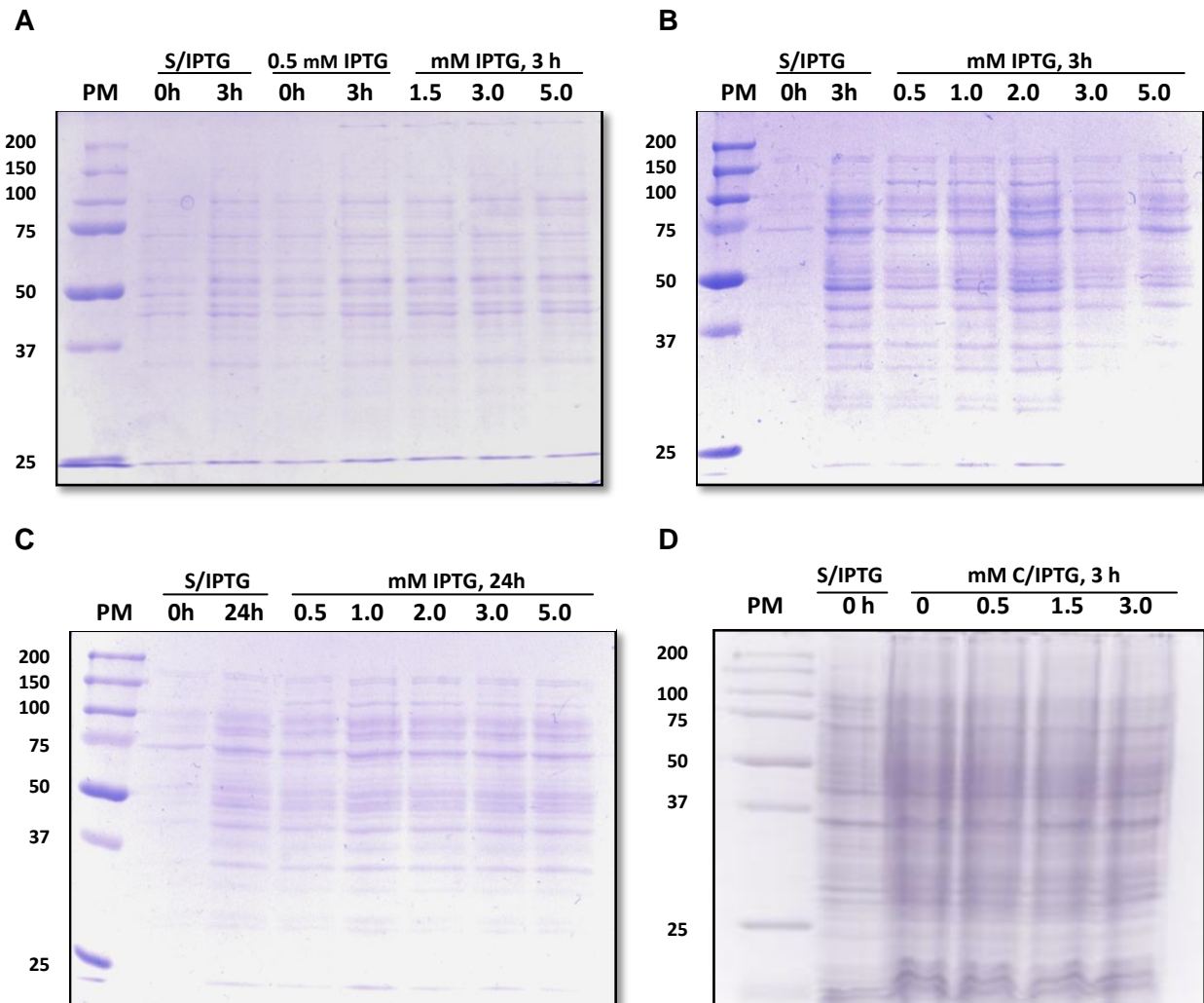


Figura 19. Geles de poliacrilamida para corroborar la expresión de ZmHT a diferentes condiciones de inducción. Las *E. coli* transformantes para el vector pET-32a-1600ZmHT se indujeron **A.** a diferentes concentraciones de IPTG por 3 h a 37°C; **B.** por 3 h a 30°C; **C.** por 24 h a 30°C. **D.** *E. coli* transformantes para el vector pGEX-4t-1 fueron inducidas con 0.5, 1.5 y 3.0 mM IPTG por 3 h a 30° C.

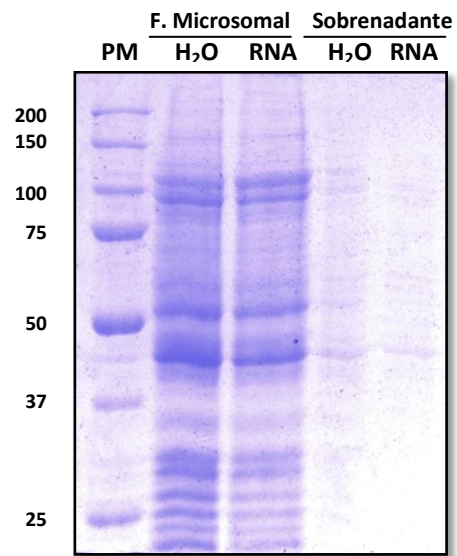


Figura 20. Monitoreo de la expresión de ZmHT en la fracción microsomal de los ovocitos de *Xenopus* en un gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Se cargó la fracción microsomal y el sobrenadante obtenido de la homogeneización de 20 ovocitos de *Xenopus* que fueron previamente inyectados con RNA para el transportador de hexosas ZmHT o bien inyectados con agua (control). El experimento se realizó por duplicado.

IX. DISCUSIÓN

IX. 1 ZmHT se expresó en tejidos fuente y demanda.

ZmHT se expresó en todos los tejidos examinados, aunque su expresión fue más alta en tejidos fuente. Los transportadores de hexosas se expresan preferencialmente en tejidos demandantes como el pistilo, la espiga, la raíz y la semilla (Lemoine, 2000; Wang *et al.*, 2008) aunque también están presentes en tejidos fuente.

En *Vitis vinifera* los transportadores VvHT1, VvHT3 y VvHT5 se expresaron durante el desarrollo de las hojas y poco en tejidos demanda (Hayes *et al.*, 2007), de manera similar a los transportadores AtSTP1, AtSTP3, AtSTP4 y AtSTP13 (Büttner *et al.*, 2000; Genevestator-Gene Atlas; Zimmermann *et al.*, 2004). Lo anterior sugiere que el transporte de hexosas es importante en los tejidos fuente para su recuperación del apoplasto. La fuga de azúcares puede ocurrir con el traslado de éstos por el floema y su procesamiento exterior por la invertasa o bien de procesos como la remodelación de pared celular (Hayes *et al.*, 2007).

Otro factor que puede llevar al aumento de hexosas y que también se traduce en un aumento en los transcritos para los transportadores de hexosas en los tejidos fuente, es el estrés por patógenos. En *Arabidopsis* los evocadores de hongos y la herida aumentaron la expresión de AtSTP4 en las hojas (Tuernit *et al.*, 1996). Durante el ataque por patógenos existe una competencia por los azúcares entre la planta y el huésped. La función de los transportadores de hexosas podría ser la de secuestrar estos nutrientes como respuesta de defensa (Hayes *et al.*, 2010). En relación a lo anterior, las plantas usadas en este trabajo no se crecieron en invernadero sino en campo. La planta pudo exponerse a varios tipos de estrés y que esto se tradujera en un aumento en la expresión de ZmHT en hoja, tallo y raíz.

Se ha propuesto que la función de los transportadores de monosacáridos en los tejidos demanda es fundamental. La sacarosa que es descargada del floema en el apoplasto de los tejidos demanda, es hidrolizada debido a la abundante expresión de invertasas en su pared celular. Las hexosas son transportadas a las células demanda para utilizarlas como fuente de energía, para almacenarlas como almidón y/o favorecer el crecimiento. Además, la reducción de azúcares en el apoplasto le permite a los tejidos demanda solicitar más sacarosa a los tejidos fuente (Caspari *et al.*, 1994; Lemoine, 2000).

Uno de los tejidos demanda examinados fueron los embriones en formación (inmaduros). Éstos presentaron una expresión más alta que los tejidos embrionarios de la semilla madura. Durante la embriogénesis de la semilla se requiere del importe de una gran cantidad de azúcares para el crecimiento celular y para formar las reservas en forma de almidón y/o lípidos que usará durante la germinación (Bradford, 2004; Nonogaki, 2010). La sacarosa que aporta la planta madre a la semilla se hidroliza por invertasas localizadas en la pared de las células de la parte basal del endospermo y el pedicelo, es decir en el primer tercio de la semilla. La ausencia de la invertasa es causa de la reducción del almidón en el endospermo y produce un fenotipo miniatura de la semilla (Miller y Chourey, 1992). Lo anterior explica que la toma de hexosas en embriones inmaduros de maíz sea 6 y 3.5 veces mayor que en los embriones secos maduros y en los ejes embrionarios, respectivamente (Zurita-Villegas, 2011). Todo lo anterior justifica porque hubo más transcritos para ZmHT en los embriones inmaduros que en los tejidos maduros de la semilla.

La germinación es un evento que resulta de la combinación de muchos procesos metabólicos que se coordinan para generar una planta fotosintéticamente activa (Bove *et al.*, 2001). Entre esos procesos se encuentra la movilización de carbono. El maíz contiene almidón en el endospermo, constituyendo el 80% del peso de la semilla (Bewley, 2001). En el embrión la principal reserva son los lípidos en un 34% (Luna-Löaiza, 2011), mismos que pueden convertirse en azúcares para nutrir a los ejes embrionarios que son los que contienen las estructuras que dan lugar a la planta

(Aoki *et al.*, 2006). El embrión del maíz está constituido por el eje embrionario y el escutelo. En este último se encuentran las reservas de lípidos y tiene en sus membranas al transportador de sacarosa. El eje embrionario consume sus reservas de azúcares solubles en las primeras 8 h y carece de transportador de sacarosa en sus membranas plasmáticas (Sánchez-Linares *et al.*, 2012). Adicionalmente, los embriones tienen una actividad de transporte de hexosas 8 veces mayor que el de sacarosa. Es por lo anterior que se esperaba que ZmHT se expresara en los tejidos embrionarios durante la germinación. Los transcritos para ZmHT aumentaron con el avance de la germinación, sin embargo sus niveles de transcrito a las 48 h siguen siendo bajos comparados con las raíces y hojas.

Al comparar la actividad de toma de glucosa durante la germinación de embriones maduros con la expresión relativa de ZmHT se observa una coincidencia en los patrones, sugiriendo que se está sintetizando ZmHT para movilizar la glucosa y que el embrión podría utilizarla como fuente de energía para la síntesis de nuevas biomoléculas que llevaran a la emergencia de la radícula (Taiz y Zeiger, 2006). No obstante es posible que otros transportadores sean los que contribuyan a la nutrición del eje embrionario, ya que los MST son familias multigénicas. Para confirmar la participación de ZmHT en la nutrición del eje embrionario primero se tendría que determinar si efectivamente este transcrito se lleva a proteína. Posteriormente determinar la especificidad por azúcares y su valor de Km tanto como proteína recombinante como la nativa de los embriones y/o ejes embrionarios. El análisis *in silico* del acoplamiento de la secuencia traducida de ZmHT con azúcares sugiere que la glucosa podría ser el soluto que transporta, siendo este el primer azúcar que se probaría en ensayos de transporte. Otra forma sería producir mutantes para el transportador y observar si se producen cambios fenotípicos y/o fisiológicos en la planta o semillas de maíz.

La disponibilidad de azúcares en la planta puede regularse por la expresión de sus transportadores, pero también se ha sugerido que los azúcares podrían modificar la expresión de los transportadores (Williams *et al.*, 2000; Çakir *et al.*, 2003). En un

trabajo previo se evidenció que el transcrito para ZmHT se inducía cuando se embebían embriones en fructosa (Gómez-Calderas, 2008). Resultado interesante ya que solo se han reportado dos con capacidad para transportar fructosa, ambos en el polen de *Arabidopsis thaliana* (Schneidereit *et al.*, 2005; Scholz-Starke *et al.*, 2003). Se repitió lo anterior y además se incluyeron controles de embriones embebidos con sorbitol, manitol, o bien con otros azúcares. Los transcritos se indujeron tanto por glucosa, fructosa como sacarosa. Sin embargo, al ser la sacarosa un disacárido conformado por glucosa y fructosa es probable que este fuera hidrolizado por las invertasas extracelulares del embrión, por lo que las hexosas podrían ser las moléculas implicadas en su regulación.

El sorbitol y el manitol son azúcares que ayudan a estabilizar el potencial osmótico en las plantas en respuesta al estrés abiótico y con ello protegen la actividad enzimática y las membranas celulares (Noiraud *et al.*, 2000). En presencia de ambos azúcares la expresión del transcrito para ZmHT aumenta cerca del doble con respecto a los embriones embebidos en agar. Sin embargo la diferencia no es tan grande si se compara con los niveles de transcritos alcanzados con glucosa, fructosa y sacarosa. Es probable que ambos polioles incrementen ligeramente la expresión de ZmHT, ya que se sugiere que el sorbitol participa en el flujo y distribución del carbono en el endospermo de maíz (Slewinski y Braun, 2010).

El análisis de acoplamiento de la proteína ZmHT con diferentes azúcares arrojó que glucosa, fructosa y sacarosa tienen las energías de unión más negativas. Es probable que ZmHT transporte a las hexosas ya que la sacarosa es un disacárido formado de glucosa y fructosa. La glucosa podría ser preferencialmente unido a ZmHT para ser transportado por vía apoplástica como se ha sugerido para el maíz (Dinant y Lemoine, 2010).

IX. 2 Análisis *in silico* de la secuencia traducida del gen para el presunto transportador de hexosas, ZmHT.

Johnson y *et al.* (2006) reportaron el análisis de la familia de MST en los bancos de EST de diferentes especies y encontraron que en *Arabidopsis* hay 53 genes con una alta similitud a MST distribuidos en siete subfamilias, aunque de éstos solo 12 han sido caracterizados. En maíz predijeron 15 genes en la subfamilia STP, 4 en AZT (presuntas secuencias de proteínas sensoras de azúcares), 9 ERD6, 5 pGLcT, 3 INT, 8 PLT, 2 XyloseTP-like (proteínas homologas al transportador de xilosa), con un total de 46 genes MST. Ninguno ha sido caracterizado.

Con la finalidad de caracterizar un MST en maíz, además de determinar si su actividad y/o expresión se presenta en los tejidos embrionarios de la semilla, se realizó la clonación de un transportador que se encontraba anotado como tal en las secuencias de EST de endospermos de maíz (BT018728.1). A pesar de que su expresión fue pobre durante la germinación se clonó y se analizó su secuencia traducida.

Para determinar la subfamilia de MST a la que pertenece la secuencia ZmHT se comparó con las secuencias de otros transportadores de hexosas. Se encontró que tiene una identidad del 57% con AtSTP1, semejante a otras proteínas similares a STPs. Esta identidad es mayor con respecto a AtERD6 (27%) de la subfamilia ERD6 y a AttMT1 (25%) de la subfamilia AZT (Tabla 8), así como con ZmSUT1 (15%), transportador de sacarosa en maíz. Se predice que las proteínas pertenecientes a la subfamilia STP se localizan en la membrana plasmática con un mecanismo de transporte en simporte con protón (Johnson *et al.*, 2006).

El alineamiento con la secuencia original mostró el cambio de algunas bases, generando un cambio de aminoácidos. Estos cambios probablemente se deben a la variedad del maíz, ya que la secuencia original proviene de una línea de maíz consanguínea W22 (Lai *et al.*, 2004), mientras que la que se clonó en este trabajo proviene de la variedad Chalqueño. Los aminoácidos no modificarían la estructura

secundaria porque dichos cambios se dan entre aminoácidos hidrofóbicos, a excepción de la prolina 56 por leucina. El alineamiento con otros transportadores de azúcares muestra que la prolina 56 parece conservarse en algunos transportadores. Adicionalmente ninguno de estos aminoácidos se encuentra dentro de las regiones conservadas identificadas ni en el probable sitio de unión al sustrato.

Se identificaron en ZmHT regiones que se han conservado en los transportadores de la familia SP, como es el caso de la secuencia (R/K)XGR(R/K), de la que se han encontrado variaciones: DXXXDRXGRR (Hirai *et al.*, 2003) o bien (D/N)RXGRR (Sun *et al.*, 2012). En ZmHT esta secuencia está localizada entre el segmento transmembranal 8 y 9, y entre el segmento 2 y 3. Se sugiere que las secuencias conservadas son esenciales para el transporte. Presentan varios residuos cargados que son sitios potenciales para formar una red de puentes de hidrógeno que no solo mediarían las interacciones entre los segmentos transmembranales sino también contribuirían en el mecanismo de transporte que se sugiere es simporte con H⁺. Sustituciones de algunos de estos residuos por alanina resultan en la anulación o disminución en la actividad de transporte (Marger y Saier, 1993; Sun *et al.*, 2012).

En el modelo tridimensional sugerido para ZmHT se encontró que las regiones conservadas se encuentran muy cerca del sitio de unión. Incluso dentro de la secuencia SWGP(M/L)GW(L/T)(V/I)PSE402-413, se encuentra el triptófano 409 que se predice clave en la unión del sustrato. La presencia en ZmHT de las regiones conservadas sugiere que el mecanismo de transporte de la proteína es simporte azúcar:H⁺. Sin embargo es necesario realizar la expresión de la proteína en un sistema heterólogo y la medición de transporte para corroborarlo.

ZmHT presenta una identidad grande en secuencia con algunos miembros la familia SP. La posible proteína se encuentra dentro del rango de aminoácidos esperado (400-600) con 523 residuos, que generan una estructura secundaria con 12 segmentos transmembranales. Por otro lado, el modelo que se construyó presenta algunas características estructurales que se encuentran en los miembros de MFS.

Los segmentos de estas proteínas están dispuestos en dos dominios que se denominan dominio N y dominio C. Si la proteína se corta en un eje de simetría perpendicular a la membrana, los segmentos 1 a 6 formarán el dominio N mientras que los segmentos 7 a 12 formarán el dominio C. Estos dos dominios son los que generan una conformación abierta hacia adentro o abierta hacia afuera. Inicialmente la proteína adquiere una conformación abierta hacia afuera para recibir al sustrato, pero una vez que lo reconoce y lo une, se genera un cambio conformacional que genera una conformación abierta hacia adentro para liberar a la molécula en el espacio intracelular. Otra característica es que el N- y C- terminal junto con el asa central se encuentran en el espacio intracelular. Se ha visto que el asa central puede o no encontrarse formando alfa hélices. Se le han dado nombres a ambas conformaciones, la conformación abierta hacia dentro o E1, mientras que la abierta hacia afuera es E2 (Geiger, 2011). Estas conformaciones se han identificado en los seis transportadores que han sido caracterizados (Anexo 4; Sun *et al.*, 2012). La secuencia de aminoácidos de ZmHT también podría adoptar la conformación abierta hacia afuera, similar a la del transportador de fucosa (XyleE; Anexo 4).

El análisis *in silico* de la secuencia obtenida, hace pensar que ZmHT es un buen candidato para ser un simportador perteneciente a la familia SP, ya que tanto su secuencia en aminoácidos como su estructura presenta muchas similitudes con estos transportadores de azúcares. El análisis por acoplamiento molecular predice que la proteína podría unir de manera eficiente tanto a la glucosa como a la fructosa. La obtención de la clona genera la posibilidad de realizar estudios de expresión y caracterización, para definir si esta proteína es o no un transportador y su especificidad por soluto a transportar.

IX. 3 Infructuosa expresión de ZmHT en dos sistemas heterólogos de expresión.

La expresión de proteínas membranales es esencial para el estudio estructural y funcional de las mismas. Entre los diversos sistemas de expresión heterólogos que

existen, se ha reportado que *E. coli* es capaz de expresar diversos transportadores funcionales de plantas. Como ejemplo se encuentran los transportadores de potasio AKT2, AtKUP1-2, AtHKT1 de *A. thaliana* y EchKT1, EchKT2 de *E. camaldulensis*; y los transportadores de péptidos como AgDCAT1 de *A. glutinosa* (Yesilirmar y Sayers, 2009).

Para la expresión de ZmHT se empleó *E. coli* como primera opción por su sencillez, rápido crecimiento, bajo costo y porque es un sistema que se conoce bien y con el que se contaban varias cepas en el laboratorio (Dreyer, 1999). Sin embargo este sistema trae consigo varios inconvenientes que pudieron influir en la nula expresión de la proteína. Uno los principales problemas que el sistema acarrea es la utilización de codones. Una diferencia en el uso de éstos puede impedir la transcripción debido a la demanda para uno o más tRNAs. Una poza baja de tRNAs en el sistema generaría entonces una proteína trunca al haber una traducción inconclusa o una terminación prematura de la misma, así como la mala incorporación de aminoácidos (Chen y Texada, 2006).

Se hizo la búsqueda de los codones menos empleados (codones raros) en *E. coli*, es decir cuya frecuencia es baja en comparación con otros organismos eucariontes como maíz. Al hacer un análisis con el programa Rare Codon Calculator RaCC (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/RACC/>) de la secuencia de ZmHT se encontró que esta presentaba los codones: AGG (1), CUA (3) y CCC (3); con una frecuencia de cada 1000 codones, de 1.9, 5.7 y 5.7 respectivamente (<http://www.kasuzo.or.jp/codon/>).

Una de las alternativas para solucionar este problema fue el empleo de la cepa *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus RIL que contiene una copia extra de los genes que codifican para los tRNA de arginina (AGG/AGA), isoleucina (AUA) y leucina (CUA) (Carsten *et al.*, Stratagene). Por otro lado se disminuyó la temperatura de inducción, debido a que se sabe que de esta manera *E. coli* disminuye su crecimiento y a su vez el proceso de transcripción (Terpe, 2006). Sin embargo con ninguna de estas estrategias empleadas se logró la expresión de la proteína recombinante.

Haciendo un análisis más amplio de la secuencia en Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>) se encontró que ZmHT presentaba otros codones poco frecuentes en *E. coli*: CGG (10) para arginina; GGA (5) y GGG (14) para glicina; y ACG (16) para treonina. Estos codones raros se encuentran a lo largo de toda la secuencia e incluso de manera consecutiva (GGA-GGG, GGA-CUA y ACG-AGG; Figura 21).

```

ATG GCG GGC GGA GGG GTG GCG GCG CTG GGC GTG AAG ACG GAG CGC GCG GCG CAG TAC AAG GGG CGC ATG ACG CTC GCC GTC GCG ACG ACC TGC CTC
GTG GCC GCC GTC GGG GGC GCC ATC TTC GGC TAC GAC ATC GGC ATC TCC GGA GGC GTG ACA TCC ATG GAC CUA TTC CTG GAG AAA TTC TTC CCG GTA GTG
TTC CAC GGG AAG AAC TCC GGC GGG AAG AAC AAC TAC TGT AAG TAC GAC AAC CAG GGA CUA GCG GCG TTC ACA TCG TCA CTC TAC CTC GCC GGC CTC GTT
GCC TCC CTC GTC GCG TCC ACG GTG ACG AGG AAC TAC GGC CGC AAA GCT AGC ATT GTC TGC GGC GGC GTG AGC TTC CTC ATC GGC GCG GCC CTC AAC
GTG GCC GCC GTG AAT CTG GCT ATG CTC ATC CTC GGG CGC ATC ATG CTC GGC GTC GGC ATC GGT TTT GGC AAC CAG GCT GTG CCG CTG TAC CTG TCG GAG
ATG GCG CCG GCG CAC CTC CGC GGC GGC CTG AAC ATG ATG TTC CAG CTC GCG ACG ACG CTG GGC ATC TTC ACG GCG AAC CTG ATC AAC TAT GGC ACG
CAG AAC ATC AAG CCG TGG GGG TGG GGG CTG TCG CTG GGC CTC GCG GCG GTG CCG GCG CTG CTG ATG ACG TTG GGC GGG CTC TTT CTT CCG GAG ACT GGG
AAC AGC CTC ATT GAG CGC GGG CGC GTG GAG GAG GGT GGG CGC GTG CTG GAG CGC ATC GGG GGC ACG GCC GAC GTG GAC GCC GAG TTC ACG GAC ATG
GTG GAG GCG AGC GAG CTG GCC AAC ACC GTC GAG CAC CCG TTC GGG AAC ATC CTG CAG CCG GCG AAC GGG CCG CAG CTG GTG ATG GCC GTG TGC ATG
CCG GCG TTC CAG ATC CTG ACG GGC ATC AAC TCC ATC CTC TTC TAC GCG CCG GTC CTG TTC CAG AGC ATG GGT TTC GGC GGG AAC GCG TCC CTC TAC TCC
TCC GTG CTC ACC GGC GCC GTG CTC TTC TCC TCG ACG CTC ATC TCC ATC GGC ATC GTC GAC CGC CTC GGC CCG GGG AAG CTC CTC ATC AGC GGC GGG ATC
CAG ATG ATC GTC TGC CAG GTG ATC GTG GCG GTG ATC CTG GGC GTG AAG TTC GGG GCG GAG AAG CAA CTG GCG GGG AGC TAC TCG GTC GCG GTG GTG GTG
GTG ATC TGC CTG TTC GTT CTG GCG TTC GGG TGG TCG TGG GGC CCG CTG GGA TGG ACG GTG CCG AGC GAG ATC TTC CCG CTG GAG ACG GGG TCG GCG GGG
CAG AGC ATC ACG GTG GCC GTG AAC CTG CTC TTC ACC TTC GCC ATC GCG CAG GCG TTC CTG TCG CTG TGC GCC TTC AAG TTC GGC ATC TTC CTC TTT
TTC GCG GGG TGG ATC ACC GTC ATG ACC GTG TTC GTC TAC GTC TTC CTG CCG GAG ACC AAG GGC GTG GCG ATC GAA GAG ATG GTG CTG CUA TGG GGG AAG
CAC TGG TTT TGG AAG AAG GTC ATG CCG GAC ATG CCG CTC GAG GAT GGC TGG GGC GCG GCT GAG GGT CAT GCG GCA CCT GCC AGC AAC AAT CAC AAG
GGA TGA
    
```

Figura 21. Localización en la secuencia de ZmHT de codones poco frecuentes en *E. coli*. Análisis hecho en Rare Codon Caltor (<http://people.mbi.ucla.edu/sumchan/caltor.html>).

Es muy probable que la cantidad de codones poco frecuentes genere un paro durante la traducción que al ser muy largo ocasione una disociación del mRNA con la maquinaria de traducción si el codón se encuentra muy al inicio en la secuencia, como en ZmHT. También podría generar que la elongación de la proteína fuera discontinua formando pequeños péptidos o una proteína trunca debido a la alta cantidad de codones raros que contiene la secuencia (Rosano y Ceccarelli, 2009). Por otro lado un paro puede llevar a un “salto” en la lectura y que la traducción continúe con el siguiente residuo, propiciando una mala incorporación de algún aminoácido por un corrimiento en la lectura debido ese “salto” (Kane, 1995). Además un marco de lectura diferente, la mala incorporación de un aminoácido clave en el reconocimiento y procesamiento de la proteína generaría un mal plegamiento de la misma o su agregación (Kane, 1995; Terpe, 2006).

Se sabe que la maquinaria de translocación de proteínas de membrana citoplasmáticas (Translocón Sec) reconoce algunos aminoácidos a los cuales se asocia durante un tiempo para poder plegar la proteína y posteriormente liberar cada segmento transmembranal conforme avanza la traducción. Sin embargo si no hay ningún reconocimiento de dichos aminoácidos la proteína podría no plegarse o hacerlo de manera incorrecta llevando a una degradación de la misma. Otra explicación probable es que se sature el Translocón Sec debido a un bloqueo en el mismo ocasionado por las pausas durante la síntesis proteica. Se generaría entonces un mal plegamiento o agregados de proteína (Klepsch *et al.*, 2011) que pueden ocasionar cuerpos de inclusión, toxicidad a la bacterias o poca estabilidad del mRNA con el ribosoma (Rosano y Ceccarelli, 2009).

Se sabe que aún con la adición de tRNAs al sistema, la proteína heteróloga puede contener algún aminoácido en un porcentaje mayor respecto a la composición típica de *E.coli* (Kane, 1995). Por otro lado algunos componentes involucrados en la biogénesis de proteínas en *E. coli* no siempre son compatibles con las proteínas heterólogas (Klepsch *et al.*, 2011).

Estas causas pudieron influir en la infructuosa expresión de ZmHT, ya que al ser una proteína membranal de origen eucarionte es probable que contenga algunas características en su estructura que le impidan una correcta expresión en *E. coli*. Se ha descrito que la mayoría de los transportadores de azúcares de plantas pertenecientes a MFS se han expresado y caracterizado en *Saccharomyces* o en *Xenopus laevis*. Al ser organismos eucariontes probablemente no presenten los problemas antes mencionados, además, una vez expresada la proteína su caracterización se hace más fácil en estos sistemas. Como se mencionó en la introducción, *Saccharomyces cerevisiae* cepa EBY.VW4000, deficiente en el transporte de glucosa, sería una alternativa para medir la toma de diferentes carbohidratos (Yesilirmak y Sayers, 2009). Sin embargo debido a que aún no llegaba la cepa de levadura al laboratorio se optó por intentar expresar la proteína en los ovocitos de *Xenopus laevis* (Miller y Zhou, 2000). En este sistema se logró expresar

al transportador de sacarosa ZmSUT1 (caracterizado por técnicas electrofisiológicas; Carpaneto *et al.*, 2005), así como varios transportadores SWEET de Arabidopsis (Chen *et al.*, 2010 y 2012).

Desafortunadamente tampoco se logró la expresión de la proteína en este sistema. Se ha reportado que la cantidad de mRNA que generalmente se inyecta al ovocito va de 2 a 75 ng (Preuss *et al.*, 2011). En los ensayos solo se probaron dos cantidades, 15 y 30 ng, probablemente se requiere probar otras cantidades de RNA. Además la cantidad del mRNA producido con el kit Mmessage Mmachine T7 RNA fue demasiado baja, por lo que no se pudo verificar su integridad antes de ser inyectado o bien que al momento de inyectar sufriera una degradación debido a su manipulación. Por otro lado, muchos de los ovocitos se dañaban durante el proceso de inyección y no llegaban al término del experimento, ya sea por una incorrecta manipulación al momento de su extracción o bien porque de alguna manera estos se vean afectados por el RNA exógeno.

También es importante resaltar que el marco de lectura que definimos por similitud con otras secuencias puede no ser necesariamente el correcto, siendo un factor determinante en que la expresión no se llevara a cabo.

No obstante lo anterior hace necesario probar el sistema de levadura para confirmar o descartar si la secuencia clonada se traduce a proteína y si se inserta de manera adecuada en la membrana para realizar la función de transporte predicha.

X. CONCLUSIONES

- Los transcritos de ZmHT son abundantes en tejidos fuente de nutrientes como el tallo y las hojas. También se encuentran en tejidos demanda como raíz, espiga, pistilo, embrión inmaduro, embrión maduro y eje.
- La expresión de ZmHT se induce en embriones maduros embebidos con glucosa, fructosa y sacarosa.
- Se clonó el gen para ZmHT de maíz.
- La secuencia primaria de ZmHT sugiere que es un transportador de hexosas de la membrana plasmática.

XI. PERSPECTIVAS

1. Transformar células de levadura carentes de transportadores de hexosas para determinar si se expresa la proteína.
2. Si se expresa la proteína medir su especificidad por azúcares y su Km.
3. Realizar ensayos de PCR para determinar si alguno de los 15 genes que codifica para los presuntos STP en maíz se presenta de manera específica en el eje embrionario con la finalidad de encontrar el que se encarga de la toma de nutrientes en este tejido.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Secuencia del presunto transportador de hexosas de endospermo y localización de los oligonucleótidos usados para su amplificación.

A. Secuencia encontrada en la base de datos de EST (número de acceso BT018728.1), donde se muestra la localización de los oligonucleótidos empleados (señalados en verde) para la obtención de una secuencia amplificada por PCR de 1800 pb.

1	11	21	31	41	50	
GCACGACGTA	TCCCCAACAT	GCTGGCTCTG	TGTGTCCCC	ATTCACTTCT		50
CACTCTAGAC	TCTAGTTCGC	CCCATGAGTC	TGGCAGGTCA	AAGAAGGGAA		100
GAGACAACCG	AAGGATCAAC	GGATCAAGCG	AGGTAGACGA	CTCCGCGTCT		150
AATTAAACCT	GTGGTCTGCG	GACGGGCGGT	CGTCGGT	TAG AGCATTGCTT		200
CCGTGTG GTG	CGGTTGATAG	CTCGGATCTT	CTGCTGGCGG	AGTTCGTCTT		250
GGAGGAGAAG	AGAGAGAGAG	AGCGCGCGCG	CCGGGATCGG	AGCCAGGAAG		300
CATCCAGCAG	CGATG GCGGG	CGGCGGGGTG	GCGGCGCTGG	GCGTGAAGAC		350
GGAGCGCGCG	GCGCAGTACA	AGGGGCGCAT	GACGCTCGCC	GTCGCCACGA		400
CCTGCCTCGT	GGCCGCCGTC	GGGGGCGCCA	TCTTCGGCTA	CGACATCGGC		450
ATCTCCGGAG	GCGTGACATC	CATGGACCCA	TTCTTGAGAG	AATTCTTCCC		500
GGTAGTGTTC	CACCGGAAGA	ACTCCGGCGG	GAAGAACAAC	TACTGTAAGT		550
ACGACAACCA	GGGACTAGCG	GCGTTCACAT	CGTCACTCTA	CCTCGCCGGC		600
CTCGTTGCCT	CCCTCGTCCG	GTCCCCCGTG	ACGAGGAACT	ACGGCCGCAA		650
AGCTAGCATT	GTCTGCGGCG	GCGTGAGCTT	CCTCATCGGC	GCGGCCCTCA		700
ACGTGGCCCG	CGTGAATCTG	GCTATGCTCA	TCCTCGGGCG	CATCATGCTC		750
GGCGTCGGCA	TCGGTTTTGG	CAACCAGGCT	GTGCCGCTGT	ACCTGTCCGA		800
GATGGCGCCG	GCGCACCTCC	GCGGCGGCC	GAACATGATG	TTCCAGCTCG		850
CGACATCAAGC	GGGCATCTTC	ACCGTGAACC	TGATCAACTA	TGGCAGCAG		900
AACATCAAGC	CGTGGGGGTG	GCGGCTGTCG	CTGGGCCCTCG	GCGCGGTGCC		950
GGCGCTGCTG	ATGACGTTGG	GCGGGCTCTT	TCTTCCGGAG	ACTCCAACA		1000
GCCTCATTGA	GCGCGGGCGC	GTGGAGGAGG	GTCCGGCGGT	GCTGGAGCGC		1050
ATCCGGGGCA	CGGCCGACGT	GGACGCCGAG	TTACACGGACA	TGGTGGAGGC		1100
GAGCGAGCTG	GCCAACACCG	TCGAGCACCC	GTTCCGGAAC	ATCCTGCAGC		1150
CGCGCAACCG	GCCGCAGCTG	GTGATGGCCG	TGTGCATGCC	GGCGTTCCAG		1200
ATCCTGACGG	GCATCAACTC	CATCCTCTTC	TACGCGCCGG	TCCTGTTCCA		1250
GAGCATGGGT	TTCGGCGGGA	ACGCGTCCCT	CTACTCCTCC	GTGCTCACCG		1300
GCGCCGTGCT	CTTCTCCTCG	ACGCTCATCT	CCATCGGCAT	CGTCGACCGC		1350
CTCGGCCGCC	GGAAGCTCCT	CATCAGCGGC	GGGATCCAGA	TGATCGTCTG		1400
CCAGGTGATC	GTGGCGGTGA	TCCTGGGCGT	GAAGTTCGGG	GCGGAGAAGC		1450
AACTGGCGCG	GAGCTACTCG	GTCCGCGTGG	TGGTGGTGAT	CTGCCTGTTT		1500
GTTCTGGCGT	TCGGGTGGTC	GTGGGGCCCG	CTGGGATGGA	CGGTGCCGAG		1550
CGAGATCTTC	CCGCTGGAGA	CGCGGTCCGG	GGGGCAGAGC	ATCACGGTGG		1600
CCGTGAACCT	GCTCTTCACC	TTCTGTCATC	CGCAGGCGTT	CCTGTCCGCTG		1650
CTGTGCGCCT	TCAAGTTCGG	CATCTTCCTC	TTTTTCGCGG	GGTGGATCAC		1700
CGTCATGACC	GTGTTTGTCT	ACGCTTTCCT	GCCGGAGACC	AAGGGCGTGC		1750
CCATCGAAGA	GATGGTGCTG	CTATGGCGGA	AGCACTGGTT	TTGGAAGAAG		1800
GTCATGCCCG	ACATGCCGCT	CGAGGATGGC	TGGGGCGCGG	CTGAGGGTCA		1850
TGCGGCACCT	GCCAGCAACA	ATCACAAGGG	ATGA CTGGAG	TGAAGCATGC		1900
ATGGTTGCCT	GGTTGGTTTT	GTGGACCCTT	TATATAATAA	CTGAAGAAAA		1950
CAAGACACCC	ACTAACATGT	AGGCGGCTGC	TTATTCT TAT	TGTATTTTGT		2000
ATAAAAACAAG	GCTGTGTGAT	ATGCAGGGAT	AAAAACGAAC	GAGATCGTTC		2050
CAAATAACCT	TTCTTTTGT	TTCAAAAAAA	AAAAAATAAA	AAAAAATAAA		2099

B. Clona obtenida para el presunto transportador de hexosas, ZmHT. Se muestra la localización de los oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión por PCR y qPCR (rojo; 178 pb) y para la sub-clonación de ZmHT en el vector pET-32a(+) (azul; 1605 pb).

1	11	21	31	41	50	
GGATCTTCTG	CTGGCCGAGT	TCGTCTTGGG	GGAGAAGAGA	GAGAGAGAGA		50
GAGAGCGCCG	GG ATCGGAGC	CAGGAAGCAT	CCAGCAGCGA	TGGCGGGCGG		100
AGGGGTGGCG	GCGCTGGGCG	TGAAGACGGA	GCGCGCGGCG	CAGTACAAGG		150
GGCGCATGAC	GCTCGCCGTC	GCCACGACCT	GCCTCGTGGC	CGCCGTCGGG		200
GGCGCCATCT	TCGGCTACGA	CATCGGCATC	TCCGGAGGCG	TGACATCCAT		250
GGACCTATTC	CTGGAGAAAT	TCTTCCCAGT	AGTGTTCAC	CGGAAGAACT		300
CCGGCGGGAA	GAACAACACT	TGTAAGTACG	ACAACCAGGG	ACTAGCGGCG		350
TTCACATCGT	CACTCTACCT	CGCCGGCCTC	GTTGCCCTCC	TCGTGCGGTC		400
CCCCGTGACG	AGGAACTACG	GCCGCAAAGC	TAGCATTGTC	TGCGGCGGCG		450
TGAGCTTCCT	CATCGGCGCG	GCCCTCAACG	TGGCCGCCGT	GAATCTGGCT		500
ATGCTCATCC	TCGGGCGCAT	CATGCTCGGC	GTCGGCATCG	GTTTTGGCAA		550
CCAGGCTGTG	CCGCTGTACC	TGTCGGAGAT	GGCGCCGGCG	CACCTCCGCG		600
GCGGCCTGAA	CATGATGTTC	CAGCTCGCGA	CGACGCTGGG	CATCTTCACG		650
GCGAACCTGA	TCAACTATGG	CACGCAGAAC	ATCAAGCCGT	GGGGGTGGCG		700
GCTGTGCTG	GGCCTCGCGG	CGGTGCCGGC	GCTGTGATG	ACGTTGGGGC		750
GGCTCTTTCT	TCCGGAGACT	CCCAACAGCC	TCATTGAGCG	CGGGCGCGTG		800
GAGGAGGGTC	GGCGCGTGCT	GGAGCGCATC	CGGGGCACGG	CCGACGTGGA		850
CGCCGAGTTC	ACGGACATGG	TGGAGGCGAG	CGAGCTGGCC	AACACCGTCG		900
AGCACCCGTT	CCGGAACATC	CTGCAGCCGC	GCAACCGGCC	GCAGCTGGTG		950
ATGGCCGTGT	GCATGCCGGC	GTTCCAGATG	CTGACGGGCA	TCAACTCCAT		1000
CCTCTTCTAC	GCGCCGGTCC	TGTTCCAGAG	CATGGGTTTC	GGCGGGAACG		1050
CGTCCCTCTA	CTCCTCCGTG	CTCACCGGCG	CCGTGCTCTT	CTCCTCGACG		1100
CTCATCTCCA	TCGGCATCGT	CGACCGCCTC	GGCCGCCGGA	AGCTCCTCAT		1150
CAGCGGCGGG	ATCCAGATGA	TCGTCTGCCA	GGTGATCGTG	GCGGTGATCC		1200
TGGGCGTGAA	GTTTCGGGGC	GAGAAGCAAC	TGGCGCGGAG	CTACTCGGTC		1250
GCGGTGGTGG	TGGTGATCTG	CCTGTTCGTT	CTGGCGTTTC	GGTGGTCTGT		1300
GGGCCCCGCTG	GGATGGACGG	TGCCGAGCGA	GATCTTCCCG	CTGGAGACGC		1350
GGTCGGCGGG	GCAGAGCATC	ACGGTGGCCG	TGAACCTGCT	CTTCACCTTC		1400
GCCATCGCGC	AGGCGTTCCT	GTCGCTGCTG	TGCGCCTTCA	AGTTCGGCAT		1450
CTTCCCTTTT	TTCGCGGGGT	GGATCACCGT	CATGACCGTG	TTCGTCTACG		1500
TCTTCCTGCC	GGAGACCAAG	GGCGTGCCCA	TCGAAGAGAT	GGTGCCTGCTA		1550
TGGCGGAAGC	ACTGGTTCTG	GAAGAAGGTC	ATGCCGGACA	TGCCGCTCGA		1600
GGATGGCTGG	GGCGCGGCTG	AGGGTCATGC	GGCACCTGCC	AGCAAC AATC		1650
ACAAGGGA TG	ACTGGAG TGA	AGCATGCATG	GTTGCCCT GGT	TGGTTTCGCTG		1700
GACACTT TAT	ATAATAACTG	AAGAAAACAA	GACAC			1735

Anexo 2. Alineamiento de la clona ZmHT obtenida en este trabajo con la secuencia encontrada en la base de datos de EST (número de acceso BT018728.1).

El alineamiento se realizó en Mafft. En gris oscuro se muestran los codones de inicio y término del probable marco de lectura para ZmHT; en gris claro los cambios en la secuencia que se encontraron entre ambas.

```

BT018728.1   GCACGACGTATCCCCAACATGCTGGCTCTGTGTGTCCCCATTCACTTCTCACTCTAGAC
ZmHT         -----

BT018728.1   TCTAGTTCGCCCCATGAGTCTGGCAGGTCAAAGAAGGGAAGAGACAACCGAAGGATCAAC
ZmHT         -----

BT018728.1   GGATCAAGCGAGGTAGACGACTCCGCGTCTAATTAACCTGTGGTCTGCGGACGGGCGGT
ZmHT         -----

BT018728.1   CGTCGGTTAGAGCATTGCTTCCGTGTGGTGC GGTTGATAGCTCGGATCTTCTGCTGGCGG
ZmHT         -----GGATCTTCTGCTGGCCG
                    ***** *

BT018728.1   AGTTTCGTCTTGGAGGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGCGCGCGCGCCGGGATCGGAGCCAGGAAG
ZmHT         AGTTTCGTCTTGGAGGAGAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGCGCCGGGATCGGAGCCAGGAAG
                    ***** * * *****

BT018728.1   CATCCAGCAGCGATGCGGGGCGGCGGGGTGGCGGCGCTGGGCGTGAAGACGGAGCGCGCG
ZmHT         CATCCAGCAGCGATGCGGGGCGGAGGGGTGGCGGCGCTGGGCGTGAAGACGGAGCGCGCG
                    *****

BT018728.1   GCGCAGTACAAGGGGCGCATGACGCTCGCCGTCGCCACGACCTGCCTCGTGCCCGCCGTC
ZmHT         GCGCAGTACAAGGGGCGCATGACGCTCGCCGTCGCCACGACCTGCCTCGTGCCCGCCGTC
                    *****

BT018728.1   GGGGGCGCCATCTTCGGCTACGACATCGGCATCTCCGGAGGCGTGACATCCATGGACCCA
ZmHT         GGGGGCGCCATCTTCGGCTACGACATCGGCATCTCCGGAGGCGTGACATCCATGGACCTA
                    *****

BT018728.1   TTCCTGGAGAAATTCTTCCCGGTAGTGTTCCACCGGAAGAACTCCGGCGGGAAGAACAAC
ZmHT         TTCCTGGAGAAATTCTTCCCGGTAGTGTTCCACCGGAAGAACTCCGGCGGGAAGAACAAC
                    *****

BT018728.1   TACTGTAAGTACGACAACCAGGGACTAGCGGCGTTACATCGTCACTCTACCTCGCCGGC
ZmHT         TACTGTAAGTACGACAACCAGGGACTAGCGGCGTTACATCGTCACTCTACCTCGCCGGC
                    *****

BT018728.1   CTCGTTGCCTCCCTCGTCGCGTCCCCCGTGACGAGGAAGTACGGCCGCAAAGCTAGCATT
ZmHT         CTCGTTGCCTCCCTCGTCGCGTCCCCCGTGACGAGGAAGTACGGCCGCAAAGCTAGCATT
                    *****

BT018728.1   GTCTGCGGCGGCGTGAGCTTCCCTCATCGGCGCGGCCCTCAACGTGGCCGCCGTGAATCTG
ZmHT         GTCTGCGGCGGCGTGAGCTTCCCTCATCGGCGCGGCCCTCAACGTGGCCGCCGTGAATCTG
                    *****
    
```


BT018728.1 CCGCTGGAGACGCGGTTCGGCGGGGCAGAGCATCACGGTGGCCGTGAACCTGCTCTTCACC
ZmHT CCGCTGGAGACGCGGTTCGGCGGGGCAGAGCATCACGGTGGCCGTGAACCTGCTCTTCACC

BT018728.1 TTCGTCATCGCGCAGGCGTTCCTGTCGCTGCTGTGCGCCTTCAAGTTCGGCATCTTCCTC
ZmHT TTCGTCATCGCGCAGGCGTTCCTGTCGCTGCTGTGCGCCTTCAAGTTCGGCATCTTCCTC

BT018728.1 TTTTTCGCGGGGTGGATCACCGTCATGACCGTGTTTGTCTACGTCTTCCTGCCGGAGACC
ZmHT TTTTTCGCGGGGTGGATCACCGTCATGACCGTGTTTGTCTACGTCTTCCTGCCGGAGACC

BT018728.1 AAGGGCGTGCCCATCGAAGAGATGGTGCTGCTATGGCGGAAGCACTGGTTTGGGAAGAAG
ZmHT AAGGGCGTGCCCATCGAAGAGATGGTGCTGCTATGGCGGAAGCACTGGTTTGGGAAGAAG

BT018728.1 GTCATGCCGGACATGCCGCTCGAGGATGGCTGGGGCGCGGCTGAGGGTCATGCCGGCACCT
ZmHT GTCATGCCGGACATGCCGCTCGAGGATGGCTGGGGCGCGGCTGAGGGTCATGCCGGCACCT

BT018728.1 GCCAGCAACAATCACAAGGGATGACTGGAGTGAAGCATGCATGGTTGCCTGGTTGGTTTC
ZmHT GCCAGCAACAATCACAAGGGATGACTGGAGTGAAGCATGCATGGTTGCCTGGTTGGTTTC

BT018728.1 GTGGACCCTTTATATAAATAACTGAAGAAAACAAGACACCCACTAACATGTAGGCGGCTGC
ZmHT GTGGACCCTTTATATAAATAACTGAAGAAAACAAGACAC-----

BT018728.1 TTATTCTTATTGTATTTTGTATAAAAACAAGGCTGTGTGATATGCAGGGATAAAAACGAAC
ZmHT -----

BT018728.1 GAGATCGTTCCAAATAACCTTTCTTTTGTTTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ZmHT -----

Anexo 3. Estandarización de la técnica de PCR en tiempo real (qPCR).

Especificidad. Para evaluar la especificidad de la reacción se verificó que los oligonucleótidos no formaran dímeros a temperaturas menores a 80° C ni productos inespecíficos a diferentes temperaturas durante la reacción. Para ello se agregó una etapa de disociación que consiste en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorear la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. En la curva de disociación (Figura 22) se detectó sólo un pico alrededor de 85° C, lo que indicó que el producto generado es específico. Asimismo no hubo amplificación cuando no se agrega cDNA a la mezcla de reacción (líneas horizontales en cero).

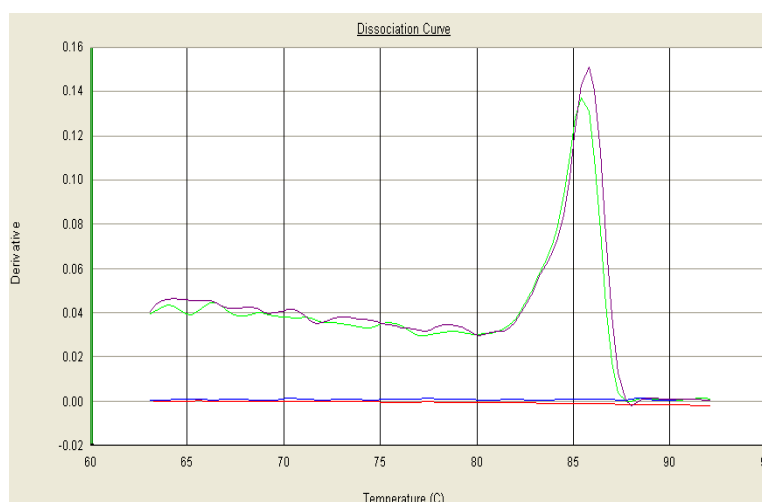


Figura 22. Curva de disociación para los oligonucleótidos directo ATCGAAGAGATGGTGCTGCT e inverso AAGTGTCCACGAAACCAACC (Anexo 1.B), usados para la detección de ZmHT.

Para corroborar la **Eficiencia, reproducibilidad y sensibilidad** de la reacción se elaboraron rangos dinámicos, ensayo que consistió en preparar una solución stock de cDNA de una muestra de donde se hicieron tres diluciones seriales 1:10. Después se realizó la reacción de qPCR de cada dilución por duplicado. La curva estándar (Figura 23) muestra que en cada dilución el C_T donde aparece la curva típica de amplificación se va retrasando 3.3 ciclos aproximadamente, valor esperado para las diluciones realizadas.

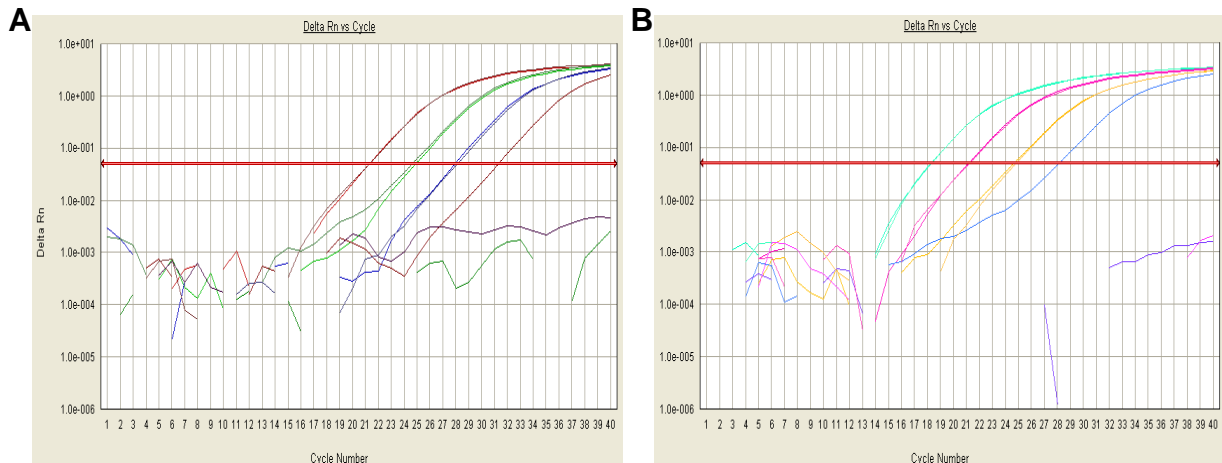


Figura 23. Curva estándar de amplificación para **A.** el gen ZmHT (izquierda); y para **B.** el gen constitutivo ubiquitina (derecha).

Para obtener el valor de eficiencia se fijó un valor de umbral o threshold (Figura 23, línea roja) donde las muestras se encontraban en la fase exponencial y así poder elaborar un gráfico de C_T contra el logaritmo de la concentración (Figura 24). De este gráfico se calculó la pendiente (Figura 24A) para el gen de ZmHT, valor que se usó para determinar el porcentaje de eficiencia a partir de la ecuación:

$$\%E = ([10^{-1/m}]) \times 100$$

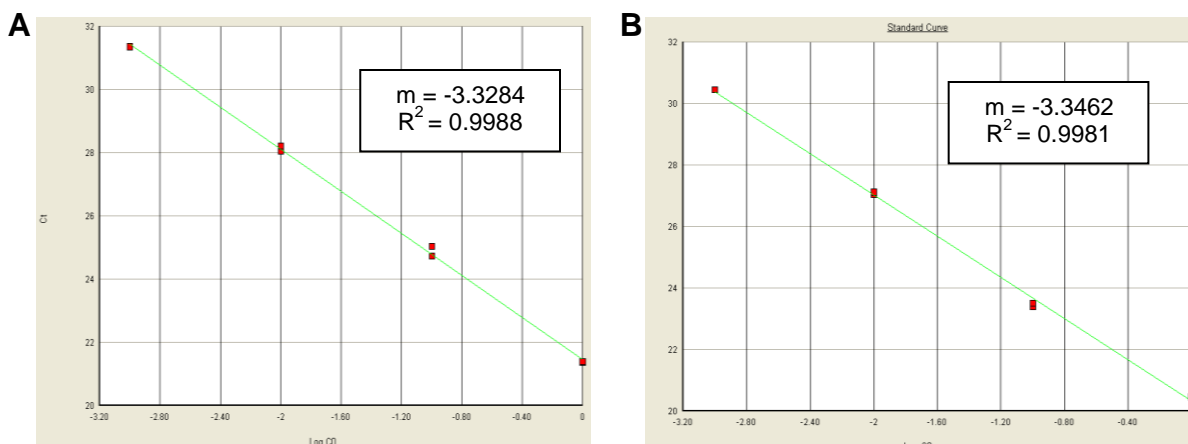


Figura 24. Gráfico de C_t contra Log Concentración para determinar la eficiencia de la reacción de qPCR. **A.** Gráfico para el gen ZmHT. **B.** Gráfico para el gen ubiquitina.

El valor de eficiencia calculado fue 99.73%. Sin embargo para poder emplear la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y determinar la cuantificación relativa de ZmHT, la eficiencia para ZmHT debe ser muy similar a la eficiencia producida por el gen constitutivo, por lo que también se realizó una curva estándar de amplificación para ubiquitina (Figura 24B). El valor de eficiencia fue de 99.0 %. Con una eficiencia mayor al 90% y muy cercana al 100% se considera que la reacción de PCR en tiempo real es aceptable en las condiciones establecidas.

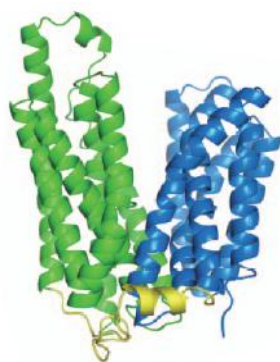
Finalmente se verificó que el gen de ubiquitina fuera un gen constitutivo. Este ensayo se realizó previamente en el laboratorio haciendo diluciones seriadas de DNA molde proveniente de dos tejidos diferentes de maíz y se verificó que los valores de CT fueran semejantes. Los ensayos mostraron que el gen es un buen candidato para utilizarse como gen normalizador (Guzmán-Chávez, 2013).

Anexo 4. Conformaciones estructurales para los miembros de la familia MFS.

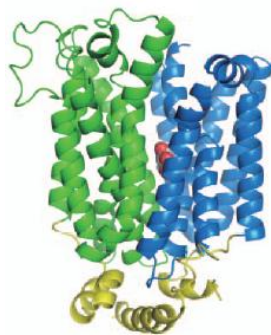
Los transportadores hasta ahora cristalizados pertenecientes a MFS son: el transportador glicerol-3-fosfato (GlpT), la lactosa permeasa (LacY), el simportador fucosa-protón (FucP), el simportador D-xilosa-protón (XylE), el transportador a múltiples fármacos (EmrD) de *E.coli* (Cura y Carruthers, 2013) y el transportador péptido-protón (PepTso) de la bacteria *Shewanella oneidensis* (Newstead *et al.*, 2011).

De las estructuras resueltas se han determinado básicamente dos conformaciones, la primera denominada conformación abierta hacia adentro o E1, donde el poro formado para el transporte de la molécula se encuentra orientado hacia el espacio extracelular. La otra conformación se denomina abierta hacia afuera o E2, donde el poro se encuentra orientado hacia el espacio intracelular (Geiger, 2011).

En la Figura 25 se muestran las diferentes conformaciones que adoptan los seis transportadores, los dominios N (en verde) y C (en azul) de cada uno (Sun *et al.*, 2012) y el asa que une los segmentos transmembranales 6 y 7 (en amarillo). En la misma figura se muestra ZmHT cuya conformación es abierta hacia afuera, parcialmente ocluida, similar a la del transportador de fucosa (XylE); así como el parecido que presenta ZmHT en el arreglo de los dominios N y C con los otros transportadores y su asa central formando alfas hélices al igual que el transportador de fucosa, xilosa y glicerol-3-fosfato.



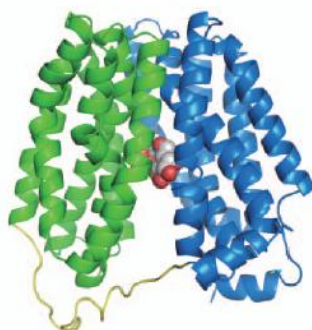
FucP
Conformación abierta hacia afuera



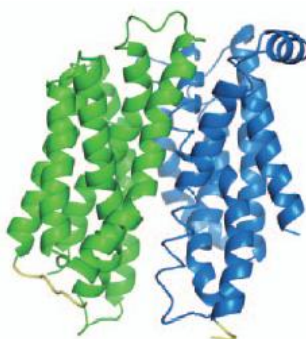
XylE
Ligando unido, conformación abierta hacia afuera, parcialmente ocluida.



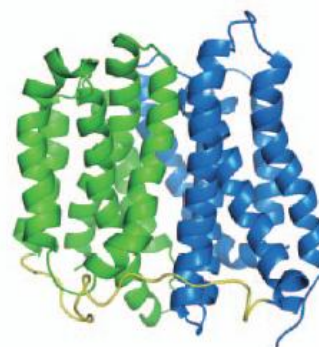
GlpT
Conformación abierta hacia adentro



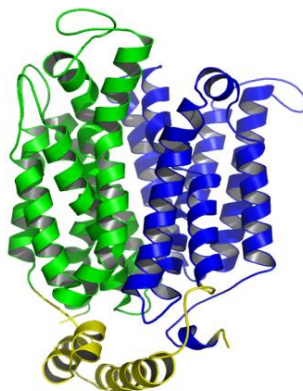
LacY
Ligando unido, conformación abierta hacia adentro.



PepTso
Conformación abierta hacia afuera, ocluida.



EmrD
Conformación ocluida.



ZmHT
Conformación abierta hacia afuera, parcialmente ocluida.

Figura 25. Distintas conformaciones adoptadas por los transportadores FucP, XylE, GlpT, LacY, PepTso, EmrD y el transportador putativo ZmHT. En verde el dominio N, en azul el dominio C y en amarillo el asa que une los cruces transmembrana 6 y 7.

XIII. REFERENCIAS

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2004. Biología molecular de la célula. Ediciones Omega. Barcelona, España. 615-630 pp.
- Aoki N, Scofield GN, Wang XD, Offler CE, Patrick JW, Furbank RT. 2006. Pathway of sugar transport in germination wheat seeds. *Plant Physiology* 141: 1255-1263.
- Barbier-Brygoo H, Gaymard F, Rolland N, Joyard J. 2001. Strategies to identify transport systems in plants. *TRENDS in Plant Science* 12 (12): 577-585.
- Bewley JD. 2001. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Bianchi L, Driscoll M. 2006. Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. The *C. elegans* Research Community, WormBook. Doi: doi/10.1895/wormbook.1.117.1, <http://www.wormbook.org>.
- Bove J, Jullien M, Grappin P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology* 3: 1002.1-1002.5.
- Bradford KJ. 2004. Germination: imbibitions, activation and reserve mobilization. In seed production and quality. 85-94 pp.
- Büttner M, Sauer N. 2000. Monosaccharide transporter in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 263-274.
- Büttner M. 2007. The monosaccharide transporters (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS letters* 581: 2318-2324.
- Büttner M. 2010. The *Arabidopsis* sugar transporter (AtSTP) family: an update. *Plant Biology* 12: 35-41.

- Cakir B, Agasse A, Gaillard C, Saumonneau A, Delrot S, Atanassova R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15: 2165-2180.
- Carpaneto A, Geiger D, Bamberg E, Sauer N, Fromm J, Hedrich R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry* 280 (22): 21437-21443.
- Caspari T, Will A, Opekarova M, Sauer N, Tanner W. 1994. Hexose/H⁺ symporters in lower and higher plants. *Journal of Experimental Biology* 196: 483–491.
- Carsten CP, Bonnardei J, Allen R, Waesche A. BL21-CodonPlus cells correct expression problems caused by codon bias. *Strategies Newsletters (Stratagene)* 14: 50-52.
- Cavassotto CN, Phatak SS. 2009. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today* 14: 676-683.
- Chen D, Texada DE. 2006. Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Therapy Molecular Biology* 10: 1-12.
- Chen LQ, Hou BH, Lalonde S, Takanaga H, Hartung ML, Qu X-Q, Guo QJ, Kim JG, Unerwood W, Chaudhuri B, Chermak D, Antony G, White FF, Somerville SC, Mudgett MB, Frommer WB. 2010. Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens. *Nature* 468: 527-532.
- Chen LQ, Qu XQ, Hou BH, Sosso D, Osorio S, Fernie AR, Frommer WB. 2012. Sucrose efflux mediated by Sweet proteins as a key step for phloem transport. *Science* 335 (6065): 207-211.
- Chen LQ. 2014. Sweet sugar transporters for phloem transport and pathogen nutrition. *New Phytologist* 201: 1150–1155.

- Cura AJ, Carruthers A. 2013. The role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism and homeostasis. *Comprehensive Physiology* 2 (2): 863-914. Doi: 10.1002/cphy.c110024.
- Delrot S, Atanassova R, Gomés E, Coutos-Thévenot P. 2001. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* 161: 391-404
- Dinant S, Lemoine R. 2010. The phloem pathway: new issues and old debates. *Plant Biology and Pathology* 333: 307-319.
- Dreyer I, Horeau C, Lemaillet G, Zimmermann S, Bush DR, Rodríguez-Navarro A, Schachtman DP, Spalding EP, Sentenac H, Gaber RF. 1999. Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *Journal of Experimental Botany* 50: 1073-1087.
- Geiger D. 2011. Plant sucrose forma a biophysical point of view. *Molecular Plant* 4 (3): 395-406.
- Gómez-Calderas A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramírez J, Sánchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruíz M. 2005. Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plams membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221 (4): 589-596.
- Guzmán-Chávez F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

- Guzmán-Chávez F. 2013. Efecto de *Trichoderma asperellum* en la respuesta fisiológica y de defensa del maíz contra *Fusarium verticillioides*. Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM.
- Hayes MA, Davies C, Dry IB. 2007. Isolation, functional characterization and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany* 58 (8): 1985-1997.
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153: 211-221.
- He H, Chincinska I, Hackel A, Grimm B, Kühn C. 2008. Phloem mobility and stability of sucrose transporter transcripts. *The Open Plant Science Journal* 2: 15-26.
- Hirai T, Heymann JAW, Maloney PC, Subramaniam S. 2003. Structural model for 12-helix transporters belong to the Major Facilitator Superfamily. *Journal of Bacteriology* 185 (5): 1712-1718.
- Ibraheem O, Botha CEJ, Brandley G. 2010. *In silico* analysis of cis-acting regulatory elements in 5' regulatory regions of sucrose transporter gene families in rice (*Oryza sativa* Japonica) and *Arabidopsis thaliana*. *Computational Biology and Chemistry* 34: 268-283.
- Johnson DA, Hill JP, Thomas MA. 2006. The monosaccharide transporter gene family in land plants is ancient and shows differential subfamily expression and expansion across lineages. *BMC Evolutionary Biology*, 6:64.
- Kane JF. 1995. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology* 6: 494-500.
- Keiper BD. 2002. Translation of mRNA in *Xenopus* oocytes. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. www.els.net

- Klepsch MM, Persson JO, L de Gier JW. 2011. Consequences of the overexpression of a eukaryotic membrane protein, the human KDEL receptor in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 407: 532-542.
- Krieger E, Nabuurs SB, Vriend G. 2003. Homology Modeling. *Structural Bioinformatics*. Editado por Philil E. Bourne y Helge Weissig. Capítulo 25: 507-521.
- Ladonde S, Boles E, Hellmann H, Barker L, Patrick JW, Frommer WB, Ward JM. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
- Lai J, Dey N, Kim CS, Bharti AK, Rudd S, Mayer KFX, Larkins BA, Becraft P, Messing J. 2004. *Genome Research* 14: 1932-1937.
- Law CJ, Maloney PC, Wang DN. 2008. Ins and outs of Major Facilitator, Superfamily antiporters. *Annual Review of Microbiology* 62: 289-305.
- Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465: 246-262.
- Liesche J, He HX, Grim B, Schulz A, Kühn C. 2010. Recycling of Solanum sucrose transporters expressed in yeast, tobacco, and in mature phloem sieve elements. *Molecular Plant* 3 (6): 1064-1074.
- Luna-Löaiza V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Marckovich D. 2008. Expression cloning and radiotracer uptakes in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature protocols* 3 (12):1975-1980.
- Marger MD, Saier Jr MH. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences* 18: 13-20.

- McCurdy WD, Dibley S, Cahyanegara R, Martin A, Patrick JW. 2010. Functional characterization and RNAi-mediated suppression reveals roles for hexose transporters in sugar accumulation by tomato fruit. *Molecular Plant* 3 (6): 1049-1053.
- Miller AJ, Zhou JJ. 2000. *Xenopus* oocytes as an expression system for planta transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 343-358.
- Miller ME, Chourey PS. 1992. The maize invertase-deficient *miniature-I* seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *Plant Cell* 4: 297-305.
- Newstead S, Drew D, Cameron AD, Postis VLG, Xia X, Fowler PW, Ingram JC, Carpenter EP, Sansom MSP, McPherson MJ, Baldwin SA, Iwata S. 2011. Crystal structure of a prokaryotic homologue of the mammalian oligopeptide-proton symporters, PepT1 and PepT2. *EMBO Journal* 30: 417-426.
- Nonogaki H, Bassel GW, Bewley JD. 2010. Germination-Still a mystery. *Plant Science*. Doi: 10.1016/j.plantsci.2010.02.010
- Noiraud N, Delrot S, Lemoine R. 2000. The sucrose transporter of celery. Identification and expression during salt stress. *Plant Physiology* 122: 1447-1455.
- Preuss CP, Huang CY, Tyerman S D. 2011. Proton-coupled high-affinity phosphate transport revealed from heterologous characterization in *Xenopus* of barley-root plasma membrane transporter, HvPHT1;1. *Plan Cell & Enviroment* 34: 681-689.
- Rasar MA, Hammes SR. The physiology of the *Xenopus laevis* ovary. 2006. *Methods in Molecular Biology* 322: 17-30.
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS Journal* 279: 2022-2035.
- Rolland F, Baena-Gonzales E, Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675-709.

- Rosano GL, Ceccarelli EA. 2009. Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microbial Cell Factories*, 8:41.
- Saier Jr MH, Beatty JT, Goffeau A, Harley KT, Heijne WHM, Huang SC, Jack DL, Jähn PS, Lew K, Liu J, Pao SS, Paulsen IT, Tseng TT, Virk PS. 1999. The Major Facilitator Superfamily. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1 (2): 257-279.
- Saier Jr MH. 2000. Families of transmembrane sugar transport proteins. *Molecular Microbiology* 35 (4): 699-710.
- Sánchez-Linares L, Gavilanes-Ruíz M, Díaz-Pontones D, Guzmán-Chávez F, Calzada-Alejo V, Zurita-Villegas V, Luna-Löaiza V, Moreno-Sánchez R, Bernal-Lugo I, Sánchez-Nieto S. 2012. Early carbon mobilization and radical protrusion in maize germination. *Journal of Experimental Botany* 63: 4513-4526.
- Schaadt NS, Christoph J, Helms V. 2010. Classifying substrate specificities of membrane transporters from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Chemical Information and Modelling* 50: 1899-1905.
- Schneidereit A, Scholz-Starke J, Sauer N, Büttner M. 2005. AtSTP11, a pollen tube-specific monosaccharide transporter in *Arabidopsis*. *Planta* 221: 48-55.
- Scholz-Starke J, Büttner M, Sauer N. 2003. AtSTP6, a new pollen-specific H⁺-monosaccharide symporter from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 70-77.
- Shiratake K. 2007. Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes, genomes and genomics* 1 (1): 73-80.
- Sjölund RD. 1997. The phloem sieve element: a river runs through it. *Plant Cell* 9: 1137-1146.
- Slewinski TL, Braun DM. 2010. Current perspectives on the regulation of whole-plant carbohydrate partitioning. *Plant Science* 178: 341-349.

- Slewinski TL. 2011. Diverse functional roles of monosaccharide transporters and their homologs in vascular plants: a physiological perspective. *Molecular Plant* 4(4):641-662.
- Slewinski TL, Zhang C., Turgeon R. 2013. Structural and functional heterogeneity in phloem loading and transport. *Frontiers in Plant Science* 4: 244. Published online Jul 5, 2013. doi: 10.3389/fpls.2013.00244
- Sun L, Zeng X, Yan C, Sun X, Gong X, Rao Y, Yan N. 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490: 361-367
- Taiz L, Zeiger E. 2006. *Fisiología vegetal*. Volumen I. Tercera edición. Publicaciones de la Universitat Jaume I. 1073 pp.
- Terpe K. 2006. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 72: 211-222.
- Tuernit E, Schmid J, Epple P, Illig J, Sauer N. 1996. The sink-specific and stress-regulated *Arabidopsis* STP4 gene: enhanced expression of a gene encoding a monosaccharide transporter by wounding elicitors and pathogen challenge. *The Plant Cell* 8: 2169-2182.
- Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR. 2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (16): 10876-10880.
- Voitsekhovskaja OV, Koroleva OA, Batashey DR, Knop C, Tomos AD, Gamalei YV, Heldt HW, Lohaus G. 2006. Phloem loading in two Scrophulariaceae species. What can drive symplastic flow via plasmodesmata?. *Plant Physiology* 140: 383-395.
- Wang Y, Xiao Y, Zhang Y, Chai C, Wei G, Wei X, Xu H, Wang M, Ouwerkerk PBF, Zhu Z. 2008. Molecular cloning, functional characterization and expression analysis of a novel monosaccharide gene OsMST6 from rice (*Oryza sativa* L.). *Planta* 228: 525-535.

- Weber H, Borisjuk L, Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. *Trends in Plant Science* 2 (5): 169-174.
- Williams LE, Lemoine R, Sauer N. 2000. Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Plant Science* 5 (7): 283-290.
- Yamanda K, Osakabe Y, Mizoi J, Nakashima K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2010. Functional analysis of an *Arabidopsis thaliana* abiotic stress-inducible facilitated diffusion transporter for monosaccharides. *The Journal of Biological Chemistry* 285 (2): 1138-1146.
- Yesilirmak F, Sayers Z. 2009. Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics* 2009: 16 pp.
- Zhang L, Hu Y, Yan S, Li H, He S, Huang M, Li L. 2012. ABA-mediated inhibition of seed germination is associated with ribosomal DNA chromatin condensation, decreased transcription, and ribosomal RNA gene hypoacetylation. *Plant Molecular Biology* 79: 285-293.
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Henning L, Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621-2632.
- Zurita-Villegas V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* en el transporte de carbohidratos en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.