



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES PUNTUALES DEL  
TRANSPORTADOR DE AMONIO AMT1;1 DE *Phaseolus vulgaris***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**DELIA ANGÉLICA NARVÁEZ BARRAGÁN**

TUTOR PRINCIPAL:

**DR. OMAR HOMERO PANTOJA AYALA**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. ENRIQUE RUDIÑO PIÑERA**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

**DR. IGNACIO LÓPEZ GONZÁLEZ**  
Instituto de Biotecnología, UNAM

CUERNAVACA, MORELOS. SEPTIEMBRE, 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.

**Cuando aprendiste todas las respuestas,  
te cambian todas las preguntas.**

**Mafalda (Quino).**

## AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mis padres, Oscar Narváez y Delia Barragán, por su apoyo y amor infinito. Mi hermano Oscar, por ser el mejor roomie que se puede tener. Mis hermanitos Carlos y Nadia, y a Caspian por darme horas de infancia y diversión. A Jahir por estar a mi lado incondicionalmente.

A mi tutor, el Dr. Omar H. Pantoja, por sus conocimientos, su dedicación, paciencia y motivación, los cuales han sido fundamentales para mi formación y para la realización del presente trabajo.

A mi comité tutorial: el Dr. Enrique Rudiño y el Dr. Ignacio López, por sus valiosas aportaciones, conocimientos y apoyo a lo largo de toda mi maestría.

A los integrantes de mi jurado evaluador: Dra. Carmen Beltrán, Dra. Claudia Martínez, Dr. Roberto Carlos Muñoz, Dr. Ángel Arturo Guevara y Dr. Christopher Wood. Por sus conocimientos, correcciones y comentarios constructivos realizados para la finalización de esta tesis.

A los integrantes del laboratorio OPA: M.C. Adriana Garibay, por su amistad, su conocimiento, su paciencia y su apoyo durante toda mi maestría, tanto dentro como fuera del laboratorio. A la Biol. Carolina Yáñez, Biol. Daniel Lagunas y el Dr. Paul Rosas, por su apoyo en las técnicas de levaduras. Así como a el Ing. Gustavo Lastiri y la Tec. Guadalupe Muñoz.

A los integrantes del laboratorio JD: Ramces García, Héctor Torres, Marcela Ramírez, Gustavo Rodríguez y Jazmín Reyes, por hacerme sentir parte de su laboratorio.

A mis amigos: Fernanda Rivera, Inci Bello, Alyeri Bucio, Mayra López, Tania Bautista, Hamid Tejas, Rogelio Reyes, Arianna Arteaga y Sabrina Marsiccobetre, por ser parte de esta etapa de mi vida y hacerla aún mejor. Han hecho fácil lo difícil.

Así como a mis compañeros de generación y a todas las personas que directa e indirectamente ayudaron a la realización de este trabajo.

## ÍNDICE GENERAL

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
II.1 <i>Phaseolus vulgaris</i> y la fijación de Nitrógeno .....	2
II.2 El transporte de amonio en las plantas .....	3
II.3 Familia de transportadores de amonio AMT1;1 .....	4
II.4 Caracterización de los transportadores AMT1;1 en plantas.....	8
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	10
III.1 Caracterización del transportador AMT1;1 de <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	10
III.2 Mutaciones puntuales en <i>PvAMT1;1</i> .....	12
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	17
<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	19
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	19
VI.1 General .....	19
VI.2 Particulares .....	19
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	20
VII.1 Modelado por homología de las mutantes puntuales de <i>PvAMT1;1</i> .....	20
VII.2 Mutantes del transportador <i>PvAMT1;1</i> .....	20
VII.3 Expresión heteróloga del transportador <i>PvAMT1;1</i> en ovocitos de <i>X. laevis</i> . ....	20
VII.3.1 Extracción del ADN plasmídico correspondiente al transportador <i>PvAMT1;1</i> en sus versiones tipo silvestre y mutantes. ....	20
VII.3.2 Transcripción <i>in vitro</i> del ARNc del transportador <i>PvAMT1;1</i> tipo silvestre y mutantes, así como fusionados a la EGFP. ....	21
VII.3.3 Extracción y remoción de las células foliculares de los ovocitos de <i>X. laevis</i> . ...	22
VII.3.4 Microinyección del ARNc del transportador <i>PvAMT1;1</i> en los ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	23
VII.4 Fusiones traduccionales de las mutantes a la proteína verde fluorescente .....	23
VII.5 Análisis de la expresión de los transportadores AMT fluorescentes por Microscopia de la Reflexión Interna Total de la Fluorescencia (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRFM) .....	26
VII.6 Análisis electrofisiológicos mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectrodos .....	26
VII.7 Registro de la actividad de canal unitario de la membrana plasmática de los ovocitos de <i>X. laevis</i> que expresaron las diferentes versiones del transportador <i>PvAMT1;1</i> .....	27
VII.8 Ensayos de complementación del crecimiento en el sistema de expresión heterólogo de <i>S. cerevisiae</i> .....	28
VII.8.1 Generación de las construcciones pYEP352:: <i>PvAMT1;1</i> , pYEP352:: <i>PvAMT1;1</i> -Q63H y pYEP352:: <i>PvAMT1;1</i> -H211A .....	28
VII.8.2 Ensayos de complementación del crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> mutante DL1...31	
<b>VIII. RESULTADOS</b> .....	32
VIII.1 Posible efecto de las mutaciones puntuales en la estructura de <i>PvAMT1;1</i> .....	32
VIII.2 Caracterización electrofisiológica de un canal endógeno de amonio en la membrana plasmática de los ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	36
VIII.3 Análisis electrofisiológicos de las mutantes <i>PvAMT1;1</i> -Q63H y <i>PvAMT1;1</i> -H211A .....	43
VIII.4 Localización de <i>PvAMT1;1</i> y <i>PvAMT1;1</i> -Q63H en ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	46
VIII.5 Complementación del crecimiento de la triple mutante <i>mep1Δ</i> , <i>mep2Δ</i> , <i>mep3Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i> .....	47
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	53

IX.1 Efecto de las mutaciones puntuales en la estructura de <i>PvAMT1;1</i> .....	53
IX.2 Transporte endógeno de amonio en los ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	55
IX.3 Localización de <i>PvAMT1;1</i> y <i>PvAMT1;1-Q63H</i> en la membrana plasmática de los ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	56
IX.4 Actividad de transporte de $\text{NH}_4^+$ de <i>PvAMT1;1</i> y sus mutantes en levaduras .....	57
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	59
<b>XI. PERSPECTIVAS</b> .....	60
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	61

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Plegamiento tridimensional de AmtB.....	6
<b>Figura 2.</b>	Estructura de Amt-1 de <i>A. fulgidus</i> .....	7
<b>Figura 3.</b>	Estructura del poro putativo del transportador Amt-1 de <i>A. fulgidus</i> .....	7
<b>Figura 4 .</b>	Mecanismo de transporte sugerido para AmtB de <i>E. coli</i> en base a su estructura atómica.....	8
<b>Figura 5.</b>	Modelaje de PvAMT1;1 usando la estructura del cristal del AmtB de <i>E. coli</i> como templado.....	10
<b>Figura 6.</b>	Estructura del poro putativo de PvAMT1;1.....	10
<b>Figura 7.</b>	Caracterización electrofisiológica de PvAMT1;1.....	11
<b>Figura 8.</b>	Mutaciones en His125 afectan el transporte de PvAMT1;1 sin cambio en la dependencia de pH.....	13
<b>Figura 9.</b>	Propiedades de la mutante PvAMT1;1-H211E.....	14
<b>Figura 10.</b>	La mutante PvAMT1;1-H211A es selectiva al amonio e independiente del pH extracelular.....	15
<b>Figura 11.</b>	La mutante PvAMT1;1-Q63H es altamente selectiva a amonio e independiente del pH extracelular.....	16
<b>Figura 12.</b>	Mapa de restricción del vector pOO2.....	24
<b>Figura 13.</b>	Mapa de restricción del vector lanzadera YEp352.....	29
<b>Figura 14.</b>	Estructura tridimensional modelada del transportador PvAMT1;1.....	33
<b>Figura 15.</b>	Sobreposición de los modelos de las mutantes puntuales PvAMT1;1-H211A y PvAMT1;1-Q63H con el modelo de la tipo silvestre.....	34
<b>Figura 16.</b>	Hélices transmembranales predichas para el transportador PvAMT1;1 tipo silvestre y mutantes.....	34
<b>Figura 17.</b>	Posibles cambios estructurales de la mutante PvAMT1;1-Q63H.....	35
<b>Figura 18.</b>	Posibles cambios estructurales de la mutante PvAMT1;1-H211A.....	35
<b>Figura 19.</b>	Corrientes macroscópicas inducidas por NH <sub>4</sub> Cl y reguladas por pH en ovocitos de <i>X. laevis</i> inyectados con agua-DEPC.....	37
<b>Figura 20.</b>	Actividad de canal unitario inducida por la presencia de NH <sub>4</sub> Cl en ovocitos inyectados con agua-DEPC.....	38
<b>Figura 21.</b>	Actividad de canal unitario generada por pulsos de voltaje en ovocitos inyectados con agua-DEPC.....	39
<b>Figura 22.</b>	Protocolo y análisis de rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con agua-DEPC.....	41
<b>Figura 23.</b>	Protocolo y análisis de rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con agua-DEPC.....	42
<b>Figura 24.</b>	ARNc de PvAMT1;1 obtenido de la transcripción <i>in vitro</i> .....	43
<b>Figura 25.</b>	Gráficas I-V obtenidas mediante TEVC.....	44
<b>Figura 26.</b>	Protocolo de rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con la mutante PvAMT1;1-H211A y PvAMT1;1-Q63H.....	45
<b>Figura 27.</b>	Fusiones traduccionales de los genes de PvAMT1;1 y PvAMT1;1-Q63H a la EGFP.....	46
<b>Figura 28.</b>	Localización de PvAMT1;1 y PvAMT1;1-Q63H en ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	47
<b>Figura 29.</b>	Construcciones pYEP352::PvAMT1;1, pYEP352::PvAMT1;1-Q63H, pYEP352::PvAMT1;1-H211A.....	48
<b>Figura 30.</b>	Ensayos de complementación del crecimiento de la cepa de levadura DL1 por la expresión de PvAMT1;1, y las mutantes PvAMT1;1-Q63H y PvAMT1;1-H211A.....	50
<b>Figura 31.</b>	Cinéticas de crecimiento de la cepa de levadura DL1 expresando PvAMT1;1, y las mutantes PvAMT1;1-Q63H y PvAMT1;1-H211A.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS Y APÉNDICES

<b>Tabla 1.</b>	Medios ND96 para ovocitos de <i>X. laevis</i> .....	23
<b>Tabla 2.</b>	Oligonucleótidos para la amplificación y adición de sitios de restricción <i>Bam</i> HI y <i>Eco</i> RI al gen <i>PvAMT1;1</i> .....	24
<b>Tabla 3.</b>	Programa para la amplificación del transcrito de <i>PvAMT1;1</i> .....	25
<b>Tabla 4.</b>	Reacción para la ligación mediante T4 DNA Ligasa.....	25
<b>Tabla 5.</b>	Oligonucleótidos utilizados para la recombinación homóloga <i>in vivo</i> .....	29
<b>Tabla 6.</b>	Programa para la recombinación homóloga <i>in vivo</i> .....	30
<b>Tabla 7.</b>	Oligonucleótidos internos utilizados para la comprobación mediante PCR de colonia.....	30
<b>Tabla 8.</b>	Conductancias calculadas en la modalidad de parche de membrana con la orientación invertida ("Inside-out"), en ovocitos inyectados con agua-DEPC..	40
<b>Tabla 9.</b>	Conductancias calculadas de ovocitos inyectados con la mutante <i>PvAMT1;1-Q63H</i> .....	45
<b>Tabla 10.</b>	Tiempos de duplicación calculados para cada cepa.....	51
<b>APÉNDICE A.</b>	Geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído.....	67
<b>APÉNDICE B</b>	Microscopía de la Reflexión Interna Total de la Fluorescencia (TIRFM).....	68
<b>APÉNDICE C.</b>	Transformación de levaduras con Acetato de Litio (LiAC) .....	70
<b>APÉNDICE D.</b>	"Lazy bones" método para la liberación rápida de ADN plasmídico de levadura.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS

3D: Tridimensional

A, Ala: Alanina

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

Amonio:  $\text{NH}_4^+$

ARN: Ácido Ribonucleico

C, Cys: Cisteina

CIC: Canales de cloro

*E. coli*: *Escherichia coli*

$E_r$ : potencial reverso

F, Phe: Fenilalanina

H, His: Histidina

L, Leu: Leucina

Metilamina: MeA

Nitrato:  $\text{NO}_3^-$

Nitrógeno:  $\text{N}_2$

P, Pro: Prolina

*P. vulgaris*: *Phaseolus vulgaris*

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

Q, Gln: Glutamina

R, Arg: Arginina

*S. cerevisiae*: *Saccharomyce cerevisiae*

THM: Hélice transmembranal

TIRFM: Microscopia de la Reflexion Interna Total de la Fluorescencia ("Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy")

$V_{max}$ : Velocidad máxima

W, Trp: Triptofano

*X. laevis*: *Xenopus laevis*

Y, Tyr: Tirosina

## I. RESUMEN

La caracterización del transportador de amonio AMT1;1 de *Phaseolus vulgaris*, demostró que funciona como un simportador  $H^+/NH_4^+$  y es dependiente de pH. Análisis de las mutantes puntuales *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*, mostraron que mantienen el transporte selectivo de amonio, no obstante los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  se incrementan, y no se observa saturación a altas concentraciones de  $NH_4^+$  (amonio). Asimismo, estas mutaciones transforman el transportador en un mecanismo independiente de pH, y los cambios en el potencial reverso ( $E_r$ ) indican que solo el  $NH_4^+$  es transportado, lo que sugiere que estas mutaciones puntuales pudieran convertir al co-transportador en un canal iónico. En el presente trabajo se utilizó el sistema de expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*, para determinar si dichas mutantes funcionaban como canal iónico. Para ello, debido a los pocos reportes existentes a nivel de canal unitario en este sistema, inicialmente se caracterizó la actividad endógena de los ovocitos, los cuales presentan en su membrana plasmática un canal endógeno de amonio que exhibe rectificación entrante con una conductancia de  $g= 96$  pS, el cuál se regula por pH; así como un canal no rectificante que permea amonio, con una conductancia de  $g= 78$  pS. Se observó también que el amonio permea al interior del ovocito a través de posibles canales de  $K^+$ , los cuales presentaron valores de conductancia de  $g= 64$ pS. En el caso de las mutantes puntuales *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*, no fue posible identificar actividad de canal de unitario diferente de los endógenos; probablemente debido a la localización puntuada que presentan estas proteínas en la membrana plasmática del ovocito. Sin embargo, al analizar mediante modelado por homología estas proteínas, se observó que es posible que estas mutaciones puedan estar involucradas en el desacople del mecanismo de simporte del transportador, específicamente por la eliminación y formación de puentes de hidrógeno, His63 con Ala139 y Ala211 con Gly206, respectivamente. Además, utilizando el sistema heterólogo de expresión de *Saccharomyce cerevisiae*, se observó, que la mutante *PvAMT1;1-H211A* posee una mayor capacidad de absorción de  $NH_4^+$  y MeA (Metilamonio).

## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 *Phaseolus vulgaris* y la fijación de Nitrógeno

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es uno de los cultivos más antiguos del Nuevo Mundo y en la actualidad es la leguminosa de grano de consumo humano más importante (Broughton *et al.*, 2003). El frijol es cultivado y consumido principalmente en países en vías de desarrollo, donde es un componente importante en la dieta de sus habitantes, siendo su mayor fuente de proteínas y calorías (Gepts *et al.*, 2008). Las principales áreas de producción de frijol son América Latina (con México y Brasil como los productores más importantes) y el este de África, donde el consumo *per cápita* es el más alto en el mundo en países como Burundi, Rwanda y Uganda (Broughton *et al.*, 2003).

El nutriente primario limitante en la productividad de las plantas en los ecosistemas naturales es el nitrógeno, por este hecho, las leguminosas, capaces de asociarse con bacterias fijadoras de este elemento, juegan un papel crítico en los ecosistemas y en la agricultura.

Un rasgo distintivo de las leguminosas es su capacidad para desarrollar nódulos en las raíces y fijar  $N_2$  atmosférico en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. El mayor aporte de nitrógeno disponible en la biósfera proviene de la reducción biológica del  $N_2$  atmosférico a amonio ( $NH_4^+$ ), llevada a cabo por dicha simbiosis. Entre 40 a 60 millones de toneladas métricas (Mt) de  $N_2$  son fijadas por leguminosas de importancia agrícola al año, otros 3 a 5 Mt son fijados por las leguminosas en los ecosistemas naturales anualmente (Graham *et al.*, 2003, Newton, 2000).

Todas las plantas dependen del suministro adecuado de nutrientes, especialmente nitrógeno. El amonio ( $NH_4^+$ ) y el nitrato ( $NO_3^-$ ) son las principales fuentes de nitrógeno en la agricultura y en los ambientes naturales, por lo tanto, se requieren en mayores cantidades que otros nutrientes minerales. En la naturaleza, el amonio

y los nitratos rara vez se encuentran en cantidades iguales, la proporción  $\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$  varía considerablemente dependiendo del tipo de suelo (Marschner, 1995); sin embargo, en algunos suelos con alto contenido de humedad, poca aireación y un pH ácido, la oxidación no se lleva a cabo y el amonio es la especie química dominante (Forde & Clarkson, 1999).

Las plantas absorben preferentemente  $\text{NH}_4^+$ , que representa la mayor forma biodisponible de nitrógeno, debido a que el nitrato, debe ser reducido a amonio en las células corticales y epidérmicas de la raíz para poder ser metabolizado (Howitt *et al.*, 2000, Bloom *et al.*, 1992). Esta reacción es sumamente costosa en términos energéticos y procede en dos pasos: la reducción de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), que se lleva a cabo principalmente en el citoplasma por la nitrato reductasa y que consiste en la transferencia de electrones provenientes del NADH hacia el nitrato; y como segundo paso, la reducción del nitrito a amonio en los cloroplastos y leucoplastos por la enzima nitrito reductasa (Heldt, 2005).

## **II.2 El transporte de amonio en las plantas**

El  $\text{NH}_4^+$  es obtenido del ambiente (incluyendo la rizósfera y la atmósfera) vía transportadores de amonio que se encuentran en la membrana plasmática, tanto en las células de la raíz como de la hoja. El  $\text{NH}_4^+$  está presente en todos los compartimentos de la célula, sin embargo su concentración varía dependiendo del pH (Nicholls & Ferguson, 1992, Udvardi & Day, 1997, Howitt *et al.*, 2000). El  $\text{NH}_4^+$  entra a la célula y es asimilado ya sea en el citoplasma a través de la glutamina sintetasa (GS), o en los plástidos y posiblemente también en las mitocondrias, después del transporte a estos organelos; ya dentro de ellos, donde el  $\text{NH}_4^+$  es metabolizado, su concentración puede ser mucho más baja que el predicho para el valor de equilibrio. Por lo tanto, las concentraciones de amonio varían considerablemente en los espacios intra y extracelulares, y dichas variaciones determinan la velocidad y la forma en la que se lleva a cabo su transporte (Howitt *et al.*, 2000). Las células tienen un repertorio de transportadores que les permiten

tener un importe eficiente de  $\text{NH}_4^+$  en un amplio rango de concentraciones (Gazzarrini *et al.*, 1999).

La absorción de  $\text{NH}_4^+$  por las plantas está mediada por transportadores de baja afinidad/alta capacidad y alta afinidad/baja capacidad (Wang *et al.*, 1994). Canales catiónicos no selectivos (Szczerba *et al.*, 2008), canales de potasio (Schachtman *et al.*, 1992) y algunos miembros de la familia de acuaporinas se proponen como los mecanismos capaces de mediar la absorción de baja afinidad de  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  (Holm *et al.*, 2005). La captación de alta afinidad se debe a la actividad de los transportadores de la superfamilia AMT (Ammonium Transporters Family), la cual ocurre en los rangos micromolar a milimolar (Yuan *et al.*, 2007, Loqué *et al.*, 2009).

### **II.3 Familia de transportadores de amonio AMT1;1**

La importancia de la familia de proteínas de transporte de Amonio/Permeasa de Metilamonio/Rhesus (AMT/MEP/Rh), es evidente por la presencia de estas proteínas en todos los dominios de la vida, desde bacterias hasta humanos (Pantoja, 2012). Trabajos sobre la absorción de metilamina (MeA) y  $\text{NH}_4^+$  en *Saccharomyces cerevisiae*, revelaron que el transporte está mediado por al menos dos mecanismos funcionalmente distintos, Mep1 y Mep2 (Dubois & Grenson, 1979). La doble mutante (*mep-1 mep-2*) presenta un crecimiento lento, en medio que contiene bajas concentraciones de amonio como única fuente de nitrógeno. También observaron indicios de un tercer sistema de absorción en levaduras, Mep3. Los genes que codifican para transportadores de amonio en plantas, fueron identificados por complementación funcional de estas mutantes de levaduras con defectos en la absorción de alta afinidad de amonio. Empleando la cepa 26972c de *S. cerevisiae* (Dubois & Grenson, 1979) que es deficiente en dos sistemas de absorción de  $\text{NH}_4^+$  (MEP1 y MEP2), el uso de este sistema de expresión heterólogo, permitió identificar al primer transportador de amonio de plantas mediante la transformación de la mutante con el cDNA de *Arabidopsis thaliana* (Ninnemann *et al.*, 1994). El cDNA de *AtAMT1*, tiene un marco de lectura abierto de 501 aminoácidos que codifica para una proteína altamente hidrofóbica, con 9-

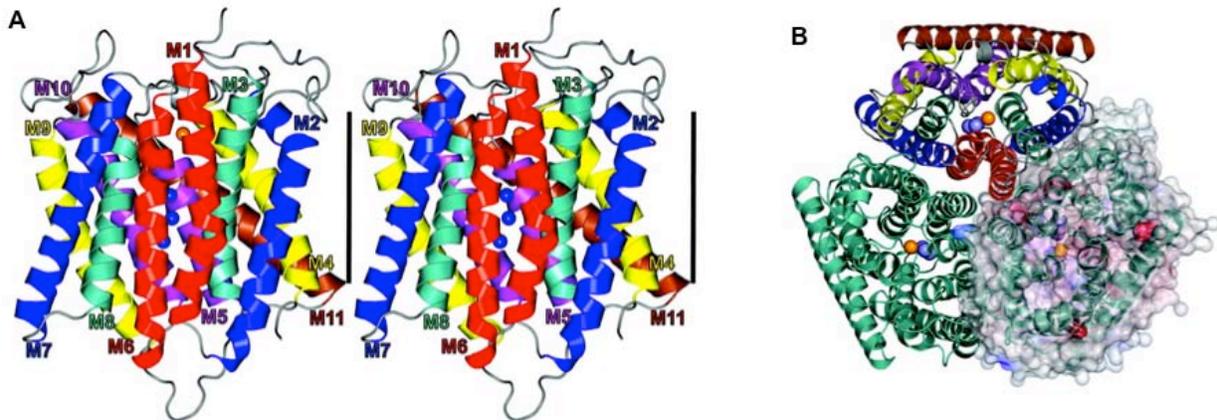
12 regiones putativas que atraviesan la membrana. Mediciones directas de absorción, mostraron que la levadura mutante expresando esta proteína, fue capaz de tomar MeA marcada radioactivamente [ $^{14}\text{C}$ ]. La captación de MeA se inhibió de manera eficiente por  $\text{NH}_4^+$ , pero no por  $\text{K}^+$ , lo que indicó que este transportador era selectivo a  $\text{NH}_4^+$  (Ninnemann *et al.*, 1994). En muchos organismos se han identificado varias copias de genes que codifican para transportadores de amonio. Las bacterias y archaeas cuentan con dos o más genes; las levaduras, cuentan con tres; la planta modelo *A. thaliana* posee 8 genes y en arroz se han encontrado 10 genes (Wirén & Merrick, 2004). Múltiples copias génicas sugieren la presencia de transportadores con afinidades y características diferentes pero complementarias, que le permiten al organismo reaccionar ante los cambios y exigencias ambientales (Ortíz-Ramírez, 2010).

Los miembros de esta familia de transportadores comparten muchas propiedades, entre ellas la alta afinidad ( $K_m$  en el rango  $\mu\text{M}$ ), las concentraciones de saturación de amonio  $\leq 1$  mM y su selectividad por amonio, ya que transportan exclusivamente  $\text{NH}_4^+$  y su análogo metilado, MeA, pero no otros cationes monovalentes (Gazzarrini *et al.*, 1999, Ludewig *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 2006, Wood *et al.*, 2006; Sogaard *et al.*, 2009, Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011).

La elucidación del mecanismo de transporte asociado a esta familia de proteínas es complicada, por el hecho de que el amonio existe en dos formas,  $\text{NH}_3$  y  $\text{NH}_4^+$ , y sus cantidades relativas dependen del pH. Estudios estructurales y mutacionales de proteínas de la superfamilia Amt/Mep/Rh, han permitido un enfoque más directo en mecanismos moleculares. Estos estudios han mostrado la existencia de un sitio de unión bien definido para  $\text{NH}_4^+$  en el vestíbulo extracelular de la proteína, pero no da una respuesta clara de cómo estas proteínas llevan a cabo el transporte de amonio, si lo hacen en su forma cargada  $\text{NH}_4^+$  o en su forma neutra  $\text{NH}_3$  (Sogaard *et al.*, 2009).

Los análisis bioquímicos (Ludewig *et al.*, 2003), así como estructurales mediante la cristalización de los transportadores de amonio AmtB de *Escherichia coli* (Fig. 1, Khademi *et al.*, 2004) y Amt1 de *Archaeoglobus fulgidus* (Fig. 2, Andrade *et al.*,

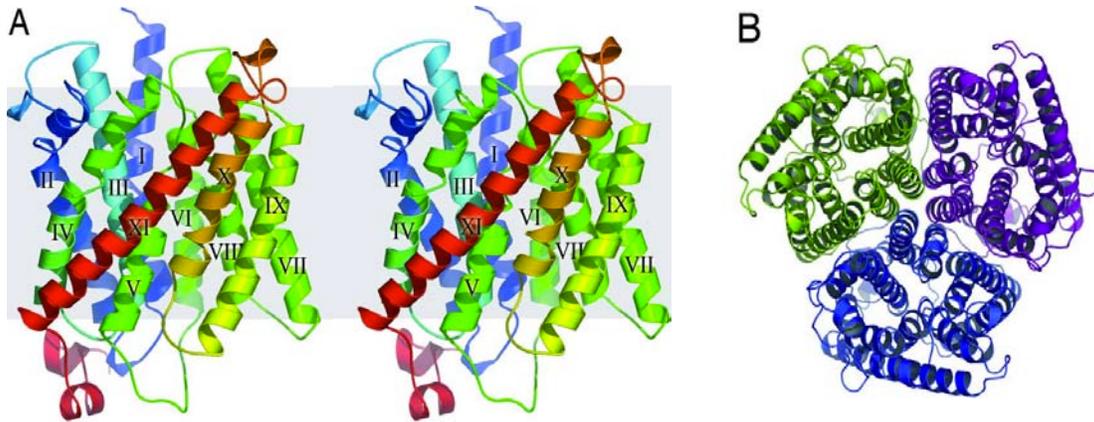
2005), demostraron que los transportadores están conformados como homotrimeros altamente estables y conservados, en el que cada monómero se compone de 11 hélices transmembranales (THMs) que forman un canal central hidrofóbico, que se propone es la vía por la cual se lleva a cabo el transporte de amonio.



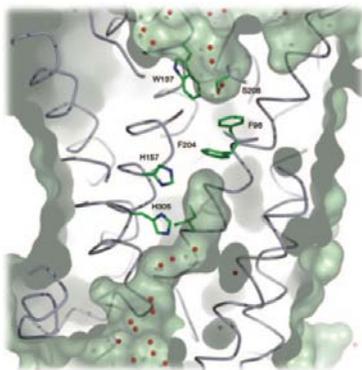
**Figura 1. Plegamiento tridimensional de AmtB. (A)** Representación de listón del monómero de AmtB visto perpendicularmente, la barra vertical (35 Å) representa la posición inferida de la porción hidrofóbica de la membrana. Las esferas azules representan tres moléculas de  $\text{NH}_3$ . **(B)** Vista superficial desde el exterior de un trímero de AmtB. El monómero derecho tiene una superficie transparente accesible al disolvente, coloreada de acuerdo a su potencial electrostático (rojo para negativo y azul para positivo). Las tres esferas azules y la naranja representan moléculas potenciales de amoniaco y un ion de amonio respectivamente, tomado de Khademi *et al.*, 2004.

En el poro se observan residuos altamente conservados, en posiciones que probablemente son cruciales para la función del transportador. Este poro putativo selectivo de amonio está formado por un sitio de reclutamiento localizado en el lado periplasmático, que se cree funciona como un filtro de selectividad, en el cual existen dos residuos conservados de Ser y Trp (*E. coli*: S219 y W148; *A. fulgidus*: S208 y W137), en donde se discriminan los iones de  $\text{K}^+$  y las moléculas de agua, y sólo se une el amonio por la formación de puentes de hidrógeno con la serina y residuos vecinos, así como por el sistema  $\pi$  del triptófano (al que pueden unirse específicamente cationes). Por debajo de este filtro, se localizan un par de fenilalaninas, que se asume conforman y funcionan como una compuerta (*E. coli*: F107 y F215; *A. fulgidus*: F96 y F204). La región central del poro está constituida por dos His altamente conservadas en las hélices V y VI respectivamente (*E. coli*:

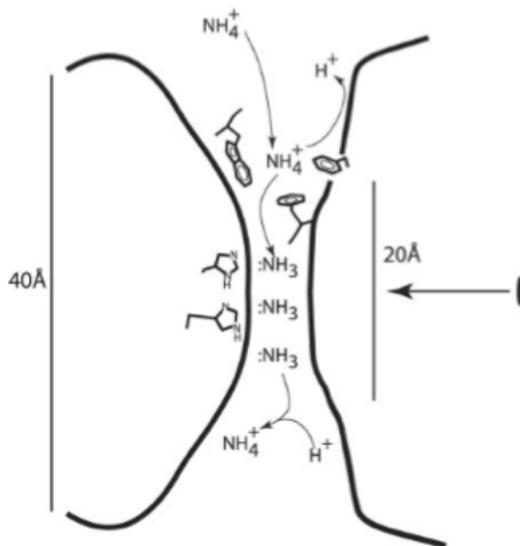
H168 e H318; *A. fulgidus*: H157 e H305), las cuales se sugiere participan en la desprotonación del amonio a amoniaco, facilitando el paso del sustrato sin carga. Finalmente, en el vestíbulo citoplasmático, como resultado del pH ambiental, el amoniaco es protonado, logrando así, el transporte neto de  $\text{NH}_4^+$  a través de la membrana (Fig. 3, 4; Khademi *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2005).



**Figura 2. Estructura de Amt-1 de *A. fulgidus*.** (A) Representación estereoscópica del monómero de Amt-1. El espesor de la membrana se indica en color gris, con el lado extracelular arriba y el lado citoplasmático abajo. Las 11 hélices transmembranales se observan numeradas, el N terminal se observa en color azul y el C terminal en rojo. (B) Vista extracelular del trímero de Amt-1. Tomado de Andrade *et al.*, 2005.



**Figura 3. Estructura del poro putativo del transportador Amt-1 de *A. fulgidus*.** Se observan los residuos conservados que conforman el sitio de reclutamiento (S208 y W137), la compuerta de fenilalanina (F96 y F204) y la región central (H157 e H305). Tomado de Andrade *et al.*, 2005.



**Figura 4. Mecanismo de transporte sugerido para AmtB de *E. coli* en base a su estructura atómica.** Se muestra el vestíbulo de reclutamiento de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, un canal que facilita el paso de NH<sub>3</sub>, y su posterior protonación en el vestíbulo citoplasmático (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>). Tomado de Khademi *et al.*, 2004.

A la fecha, distintos mecanismos de transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se han sugerido para los transportadores Amt/MEP/Rh. Se ha sugerido que los Amt de bacterias (Khademi *et al.*, 2004, Zheng *et al.*, 2004) y los RhAG, RhBG y RhCG de humano (Ludewig *et al.*, 2001), realizan el transporte electroneutro de NH<sub>3</sub>. En el caso de los AMT de plantas, se ha sugerido el simporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011), el simporte NH<sub>3</sub>/H<sup>+</sup> (Mayer *et al.*, 2006, Sogaard *et al.*, 2009), o el uniporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Ludewig *et al.*, 2002, 2003).

#### II.4 Caracterización de los transportadores AMT1;1 en plantas

Los transportadores de amonio AMT1 de plantas mostraron ser electrogénicos al expresarlos en ovocitos de *Xenopus laevis*, lo que sugiere el transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> o un co-transporte de NH<sub>3</sub>/H<sup>+</sup>; sin embargo, el mecanismo de transporte aún permanece sin elucidarse por completo (Ludewig *et al.*, 2001, 2003). Por esta razón las investigaciones recientes se han centrado en la caracterización de transportadores AMT1;1 en distintas especies de plantas.

Estudios electrofisiológicos utilizando ovocitos de *X. laevis* expresando el AMT1;1 de *A. thaliana* (AtAMT1;1), revelaron que el transporte de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> por esta proteína se lleva a cabo de forma pasiva impulsado por los cambios en el potencial de

membrana y que es independiente del pH extracelular. Además, la expresión de *AtAMT1;1* en una cepa de levadura deficiente en el transporte endógeno de  $\text{NH}_4^+$  y en la acidificación vacuolar, apoya el mecanismo de transporte sugerido para *AtAMT1;1* y revela su papel central en la acidificación de vacuolas y el almacenamiento y retención de  $\text{NH}_4^+$  en las células (Wood *et al.*, 2006).

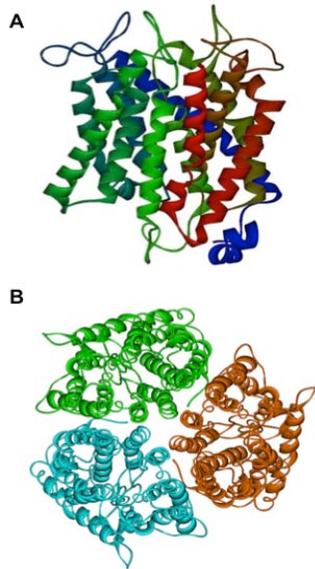
El transportador *AMT1;1* de *Lycopersicon esculentum* (*LeAMT1;1*), funciona como uniportador de  $\text{NH}_4^+$  o como co-transportador de su equivalente fisiológico  $\text{H}^+/\text{NH}_3$ . Es dependiente de la concentración de amonio y del voltaje, independiente de pH, y se induce por deficiencia de nitrógeno (Ludewig *et al.*, 2002, Mayer *et al.*, 2006).

Mediante análisis de fijación de voltaje con dos microelectrodos, Sogaard y colaboradores (Sogaard *et al.*, 2006), reportaron que al expresar en ovocitos de *X. laevis* el transportador de trigo *TaAMT1;1*, se activaron corrientes entrantes de  $\text{NH}_4^+$  y de MeA, las cuales aumentaron cinco veces cuando el pH disminuyó de 7.4 a 5.5, por lo que concluyeron, que este transportador de amonio era dependiente del pH extracelular.

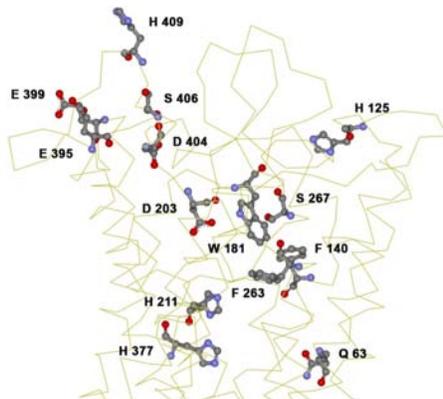
### III. ANTECEDENTES

#### III.1 Caracterización del transportador AMT1;1 de *Phaseolus vulgaris*

La estructura del transportador AMT1;1 de *Phaseolus vulgaris* (PvAMT1;1, Fig. 5), se modeló utilizando como base la estructura del cristal del transportador de amonio (AmtB) de *E. coli* (Fig. 1); en este modelo se observó que la estructura del poro se mantiene conservada, incluyendo el triptofano y la serina del sitio de reclutamiento (W181 y Y267), la compuerta de fenilalanina (F140 y F263), así como las histidinas de la región central (H211 e H374, Fig. 6).

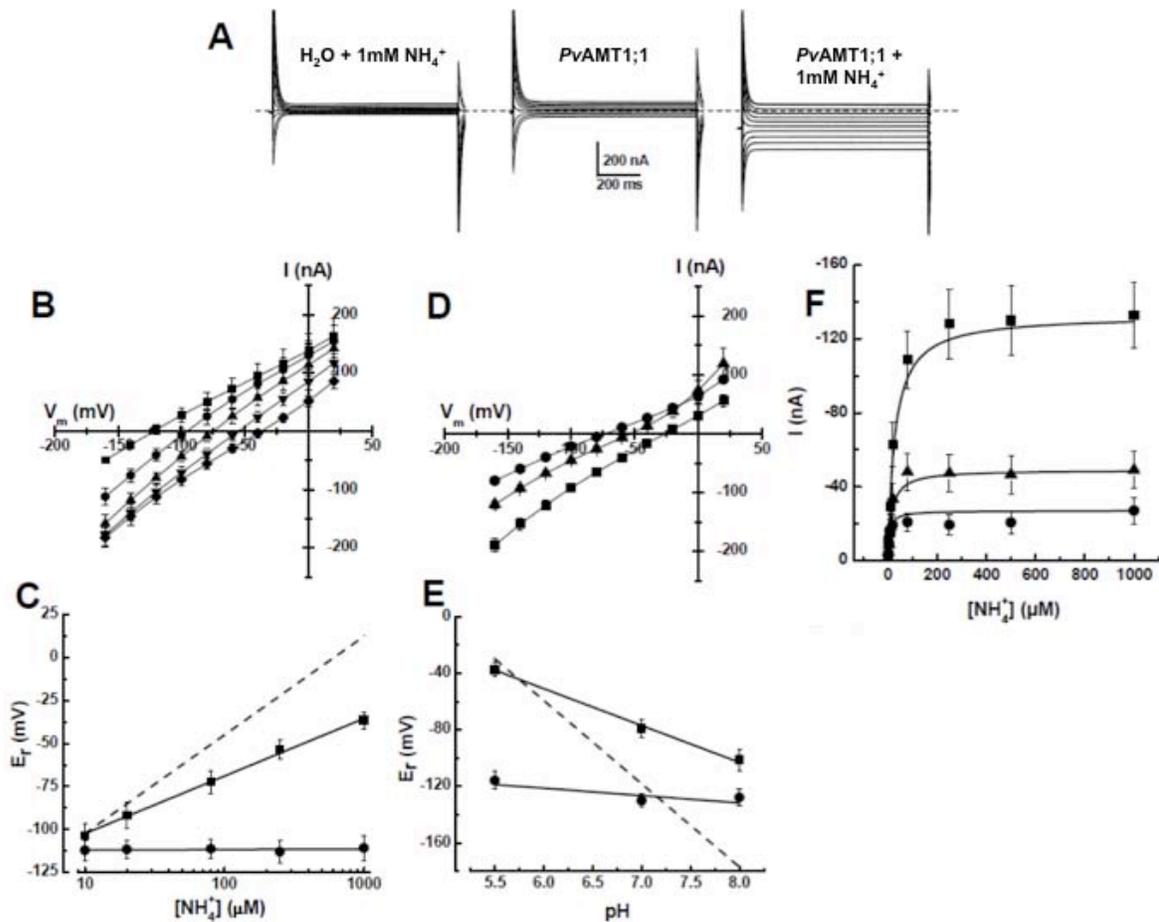


**Figura 5. Modelaje de PvAMT1;1 usando la estructura del cristal del AmtB de *E. coli* como templado.** A) Modelo homólogo de la estructura monomérica de PvAMT1;1. B) Estructura putativa trimérica de PvAMT1;1. Tomado de Ortiz-Ramírez, 2010.



**Figura 6. Estructura del poro putativo de PvAMT1;1.** Se observan los residuos conservados que conforman el sitio de reclutamiento (S267 y W181), la compuerta de fenilalanina (F140 y F263) y la región central (H211 e H377). Tomado de Ortiz-Ramírez, 2010.

La caracterización electrofisiológica de *PvAMT1;1* demostró que este transportador es dependiente de pH, observándose una mayor actividad a pH ácido, actividad que estuvo asociada con cambios en el potencial reverso y la acidificación del citoplasma, lo que indicó que estaba involucrado en el transporte de  $H^+$ , sugiriendo que en el frijol el mecanismo de transporte corresponde a un simporte de  $H^+/NH_4^+$  (Fig. 7, Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011).



**Figura 7. Caracterización electrofisiológica de *PvAMT1;1*.** **A)** Corrientes activadas por pulsos de voltaje en ovocitos inyectados con agua (izq), cARN de *PvAMT1;1* expuesto a 1mM de  $NH_4^+$  (der) y sin  $NH_4^+$  (centro) a pH 5.5. **B)** Relación corriente (I)-voltaje (V) de ovocitos que expresan *PvAMT1;1* expuestos a diferentes concentraciones  $\mu M$  de  $NH_4^+$  (■ = 0, ● = 20, ▲ = 80, ▼ = 250, ◆ = 1000) o **D)** con 1mM de  $NH_4^+$  a diferentes pH extracelulares (● = 8.5, ▲ = 7.5, ■ = 5.5). **C)** Variaciones en los potenciales reversos con distintas concentraciones extracelulares de  $NH_4^+$  o **E)** diferentes niveles de pH extracelular (■ = *PvAMT1;1*, ● =  $H_2O$ ; las líneas punteadas representan los cambios esperados de acuerdo a la ecuación de Nernst). **F)** Cinética del transporte de  $NH_4^+$  para *PvAMT1;1* a -160 mV y diferentes pH extracelulares (■ = 5.5, ▲ = 7.5, ● = 8.5). Tomado de Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011.

Reportes previos en miembros de la familia AMT, como *LeAMT1;1* (Ludewig *et al.*, 2002) y *AtAMT1;1* (Wood *et al.*, 2006), no mostraron dependencia de pH, con la excepción de *TaAMT1;1* (Sogaard *et al.*, 2009). Por lo tanto, *PvAMT1;1* es el segundo miembro reportado, en el que la actividad de la proteína está regulada por el pH externo (Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011).

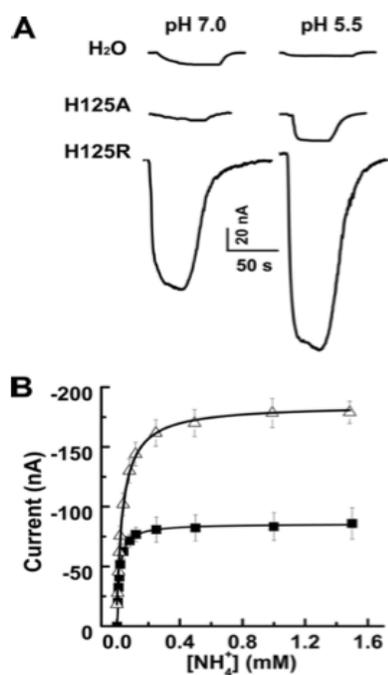
### **III.2 Mutaciones puntuales en *PvAMT1;1***

Predecir la función de una proteína basándose en la estructura cristalina de una proteína homóloga, es un método invaluable, sin embargo, esta herramienta no permite dilucidar por completo los mecanismos de transporte y regulación. Una estrategia útil para estos fines, es la realización de mutaciones puntuales en aminoácidos clave para estudiar cómo afectan estos la estructura y por lo tanto la función de la proteína (Mayer *et al.*, 2006).

#### **Mutante *PvAMT1;1*-H125P**

Debido a que la caracterización electrofisiológica de *PvAMT1;1* indicó que este transportador es dependiente de pH, se buscó algún residuo potencial que pudiera estar jugando un papel esencial en este mecanismo. Al realizar un análisis de secuencias, comparando el transportador de *P. vulgaris* con los *AMT1;1* de otras plantas, se encontró que en el residuo correspondiente al aminoácido 125, el resto de las plantas presentan una Pro conservada, sin embargo, en frijol este residuo corresponde a una His; esto fue de gran relevancia, debido a que el grupo imidazol presente en la cadena lateral de la His, se ve afectado por el pH del medio; a pH 5 el grupo está cargado positivamente, es polar e hidrofílico; mientras que a pH 7.4 es neutro, apolar e hidrofóbico (Rotzschke *et al.*, 2002). Por tal razón, se cambió esta His 125 por una Ala observándose que la actividad del transportador disminuyó, sin embargo, al cambiar este residuo por una Arg, simulando la protonación de la His, se provocó la estimulación del transporte de  $\text{NH}_4^+$ , sin afectar la  $K_m$ . Interesantemente, estos cambios ocurrieron sin afectar la dependencia de pH del simportador (Fig. 8, Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011). Estos resultados revelaron que estos residuos no estaban involucrados en la

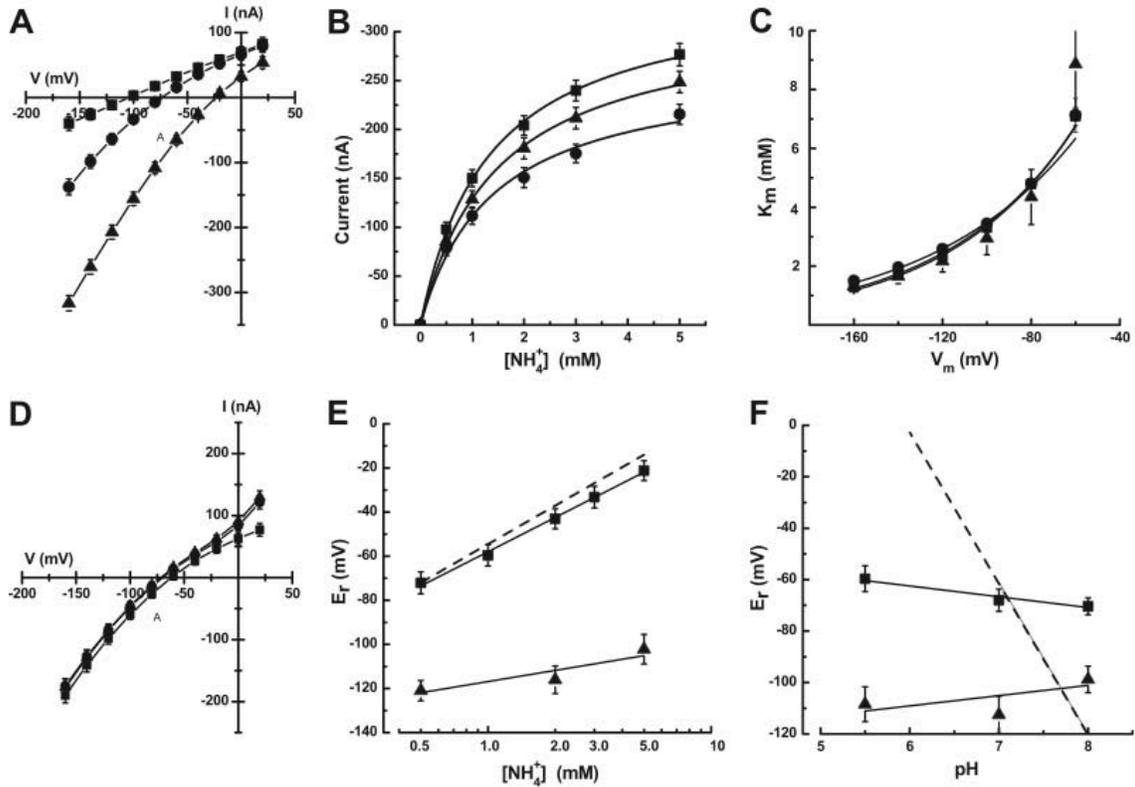
dependencia de pH del transportador, por este motivo, se mutaron residuos de His conservados en el poro putativo.



**Figura 8. Mutaciones en His125 afectan el transporte de PvAMT1;1 tipo silvestre, sin suprimir la dependencia de pH.** **A)** Las corrientes entrantes son activadas por 1mM de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> en el ovocito control (H<sub>2</sub>O), en un ovocito expresando la mutante H125A y otro expresando la mutante H125R a pH 7.0 (izquierda) o pH 5.5 (derecha), a un potencial de mantenimiento de -150mV. **B)** Cinética del transporte de amonio a pH 5.5 en ovocitos inyectados con PvAMT1;1 (■) o PvAMT1;1-H125R (Δ). Tomado de Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011

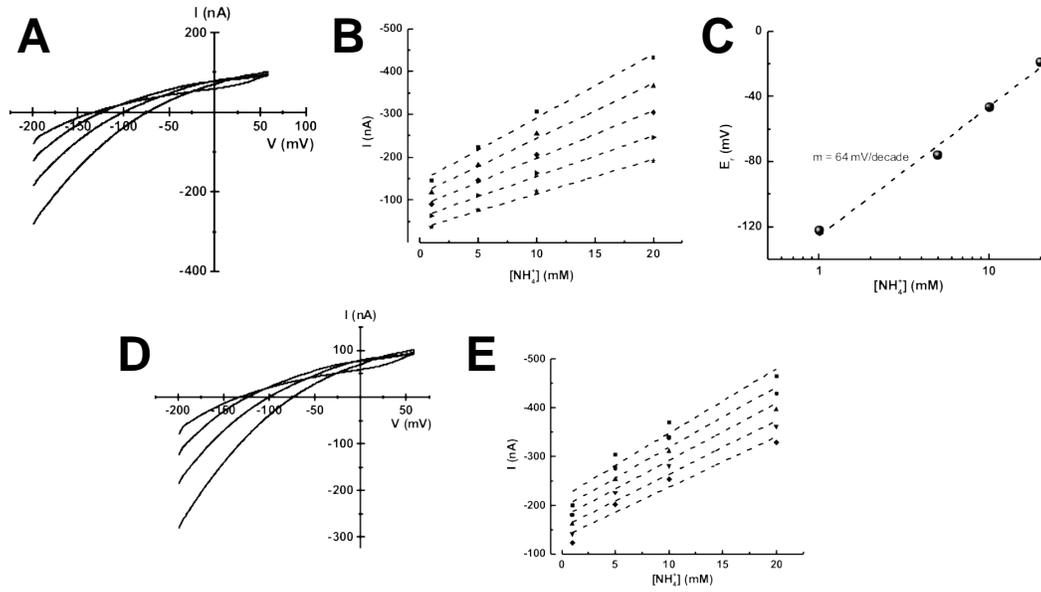
### Mutantes PvAMT1;1-H211E y PvAMT1;1-H211A

El cambio de la His 211 por un Glu modificó la función de la proteína, haciendo al mecanismo independiente de pH, además, está pérdida de sensibilidad al pH externo estuvo acompañada por una disminución en su afinidad por el NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, causando un incremento en sus valores de  $K_m$  (Fig. 9, Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011).



**Figura 9. Propiedades de la mutante PvAMT1;1-H211E.** **A)** Gráficas de corriente-voltaje de ovocitos expresando la mutante PvAMT1;1-H211E expuesto a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  ( $\blacksquare = 0$ ,  $\bullet = 0.5$ ,  $\blacktriangle = 5.0$ ) a pH 5.5. **B)** Cinética de transporte del amonio por la mutante PvAMT1;1-H211E a distintos pH ( $\blacksquare = 5.5$ ,  $\blacktriangle = 7.0$ ,  $\bullet = 8.0$ ). **C)** Dependencia de voltaje de la  $K_m$  a pH 5.5 =  $\blacksquare$ , 7.0 =  $\blacktriangle$  y 8.0 =  $\bullet$ . **D)** Gráfica corriente-voltaje de ovocitos expresando la mutante PvAMT1;1-H211E expuesta a 1mM de  $\text{NH}_4^+$  a pH 5.5 =  $\blacksquare$ , 7.0 =  $\blacktriangle$  y 8.0 =  $\bullet$ . **E)** Potencial reverso obtenido a diferentes concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  de ovocitos que expresan la mutante PvAMT1;1-H211E ( $\blacksquare$ ) y ovocitos control inyectados con DEPC/ $\text{H}_2\text{O}$  ( $\blacktriangle$ ). **F)** Potencial reverso obtenido a tres diferentes valores de pH extracelular de ovocitos expresando la mutante PvAMT1;1-H211E en presencia ( $\blacksquare$ ) o ausencia ( $\blacktriangle$ ) de 1mM de  $\text{NH}_4^+$ . En E y F las líneas punteadas representan la relación de acuerdo a la ecuación de Nernst. Tomado de Ortíz-Ramírez *et al.*, 2010.

Por otro lado, la expresión de la mutante PvAMT1;1-H211A en los ovocitos, mostró que el transporte de  $\text{NH}_4^+$  se mantuvo y fue independiente del pH extracelular, además de no mostrar saturación del transportador aún a concentraciones de 20 mM. Los potenciales de inversión variaron de una forma lineal con el logaritmo de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  y fueron muy cercanos a los predichos por la ecuación de Nernst, lo que indicaba que sólo un ion es transportado por esta mutante (Fig. 10; experimentos del laboratorio no publicados).



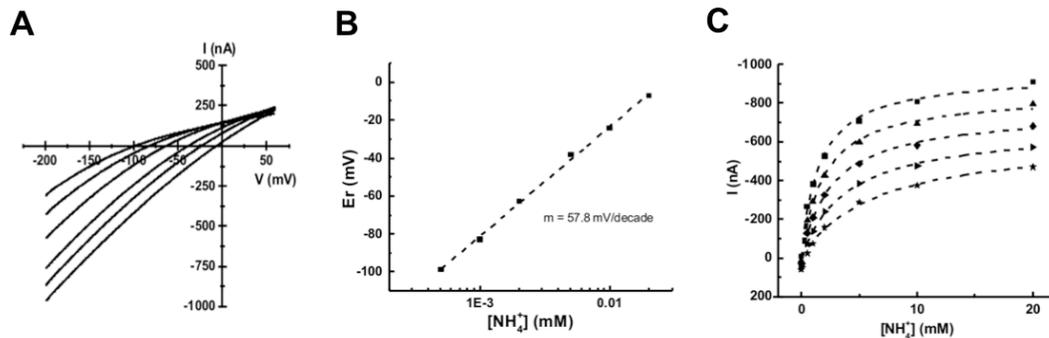
**Figura 10. La mutante PvAMT1;1-H211A es selectiva a  $\text{NH}_4^+$  e independiente del pH extracelular.** Gráficas corriente-voltaje en las que se incrementan las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en ovocitos inyectados con PvAMT1;1-H211A a pH extracelular 5.5 **A)** ó 7.5 **D)**. Las corrientes de amonio de la mutante PvAMT1;1-H211A muestran una cinética no saturable a pH extracelular de 5.5 **B)** o 7.5 **E)**. **C)** Variaciones en el potencial reverso con concentraciones extracelulares de amonio a pH 5.5.

### Mutante PvAMT1;1-Q63H

En la búsqueda de residuos de aminoácidos importantes en el mecanismo del transportador *AtAMT1;1*, se encontró que al cambiar un residuo de Gln por una His (*AtAMT1;1-Q57H*), se provocó una mayor actividad de este transportador (Loqué *et al*, 2009), por lo que se realizó esta mutación en el transportador homólogo del frijol y se registró su actividad.

Al realizar la mutación Q63H en *PvAMT1;1*, el transporte de  $\text{NH}_4^+$  y su selectividad se mantuvieron, observándose una disminución de su afinidad; sin embargo, la variación de los potenciales de inversión con la concentración extracelular de  $\text{NH}_4^+$  fue muy cercana a la predicha por la ecuación de Nernst, lo que sugería que el  $\text{NH}_4^+$  era el único ion transportado por esta versión mutada del transportador, y por lo tanto, funcionaba distinto al transportador tipo silvestre. También se pudo observar que al ajustar los valores a una cinética tipo Michaelis-Menten, la  $K_m$  para  $\text{NH}_4^+$  fue de 3 mM, además de observar que la saturación de la actividad del

transportador mutado ocurrió a concentraciones mayores a 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 11; experimentos del laboratorio no publicados), en comparación con la proteína tipo silvestre que se satura a concentraciones menores a 1 mM (ver Fig. 7). Estos cambios sugieren que posiblemente esté ocurriendo un cambio en el mecanismo de transporte de  $\text{NH}_4^+$  en el transportador.



**Figura 11. La mutante *PvAMT1;1-Q63H* es altamente selectiva a  $\text{NH}_4^+$  e independiente del pH extracelular. A)** Gráfica corriente-voltaje en la que se incrementan las concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en ovocitos inyectados con *PvAMT1;1-Q63H* a pH 5.5. **B)** Variaciones en el potencial reverso con concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  extracelular. **C)** Cinética del transporte de amonio para *PvAMT1;1-Q63H* a diferentes voltajes.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los transportadores y los canales iónicos se han considerado estructural y funcionalmente distintos; experimentalmente, la velocidad del flujo unitario es más comúnmente utilizado para hacer esta distinción. Por lo general, los canales son rápidos (de más de  $10^6$  iones  $s^{-1}$ ) y los transportadores son lentos (1-1000 iones  $s^{-1}$ ). Estos rangos reflejan las diferentes barreras de energía de los pasos limitantes para el movimiento del sustrato en los dos tipos de transportadores: baja para la difusión (cuando todas las puertas están abiertas) y alta para los reordenamientos conformacionales (compuerta alterna, Ashcroft *et al.*, 2009). Sin embargo, datos electrofisiológicos sugieren que los cambios conformacionales predichos por el modelo de acceso alternante en el co-transporte, pueden ser menores, y por lo tanto más similares a las compuertas de un canal (DeFelice *et al.*, 2007). Como parte intrínseca de sus mecanismos moleculares, los transportadores pueden albergar canales. Al interrumpir una compuerta o la comunicación entre ellas, de modo de que ambas estén abiertas simultáneamente, un transportador puede convertirse en un canal (Ashcroft *et al.*, 2009)

En el caso de las proteínas CIC, originalmente clasificadas como una familia de canales de cloro, ahora se reconoce que esta familia incluye tanto canales de  $Cl^-$ , como antiportadores  $Cl^-/H^+$ . De los nueve CIC presentes en el genoma humano, 4 corresponden a canales y 5 son antiportadores. Sin embargo, ambos comparten algunas propiedades estructurales; aunque la estructura tridimensional se conserva tanto en los canales como en los transportadores, las secuencias guardan muy poca similitud entre sí y sólo se conservan pequeños motivos correspondientes a las regiones que interactúan íntimamente con el ión (Dutzler, 2006). Para esta familia, se ha reportado que mutaciones puntuales en la secuencia que generan cambios casi imperceptibles en la estructura, resultan en cambios considerables en la función. Mediante estudios electrofisiológicos se ha logrado caracterizar varios aminoácidos con importancia funcional dentro de los canales y transportadores CIC. El primero recibe el nombre de glutamato de la

compuerta y corresponde al residuo 148 en el EcClCa de *E. coli*; cuando se muta este Glu, los canales pierden su dependencia del voltaje y los transportadores se convierten en canales de cloruro no rectificantes (Bergsdorf *et al.*, 2009, Zdebick *et al.*, 2008). El segundo aminoácido se conoce como glutamato del protón (E203 en EcClCa), la mayoría de transportadores de la familia presentan un Glu en esta posición. En contraste, todos los canales de la familia presentan una Val en la posición equivalente al Glu del protón (Zdebick *et al.*, 2008). En los transportadores que presentan un Glu en la posición glutamato del protón, mutación de este residuo por otro cargado, como Asp, reduce las corrientes pero mantiene la función (Zdebick *et al.*, 2008); por el contrario, al mutarlo por un residuo no cargado, se desacopla el transporte tanto de Cl<sup>-</sup> como de H<sup>+</sup> (Bergsdorf *et al.*, 2009, Zdebick *et al.*, 2008). En los transportadores CIC de humanos, estas mutaciones suprimen las corrientes iónicas asociadas con su función. El remplazo de Val por Glu en un canal modifica su transporte, pero no es suficiente para convertirlo en un transportador (Zdebick *et al.*, 2008). Esto sugiere que se necesitan pocos cambios para modificar una estructura única que lleve a cabo estos dos mecanismos de transporte (Accardi & Picollo, 2010).

En base a las propiedades de las mutantes PvAMT1;1H211A y PvAMT1;1Q63H del transportador PvAMT1;1, se sugiere que cambios puntuales son responsables de la modificación del mecanismo de acción de la proteína, al convertirla de un co-transportador a un canal iónico.

## V. HIPÓTESIS

Las mutaciones puntuales H211A y Q63H convertirán al simportador *PvAMT1;1* en un canal iónico.

## VI. OBJETIVOS

### VI.1 General

Detectar la actividad de canal unitario en las mutantes puntuales del transportador de amonio de frijol *PvAMT1;1-H211A* y *PvAMT1;1-Q63H*.

### VI.2 Particulares

- Modelar la estructura del transportador *PvAMT1;1* con las mutaciones puntuales de interés, mediante la técnica de modelado por homología.
- Caracterizar a nivel de canal unitario los canales presentes en la membrana de los ovocitos de *X. laevis* en condiciones relevantes para este estudio.
- Analizar si las mutantes H211A y Q63H tienen actividad de canal iónico utilizando la técnica de "Patch-Clamp".
- Confirmar la localización de *PvAMT1;1* y las mutantes, expresadas en ovocitos de *X. laevis* mediante TIRFM.
- Confirmar la función de *PvAMT1;1* y de las mutantes, utilizando el sistema heterólogo de expresión de *S. cerevisiae*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Modelado por homología de las mutantes puntuales de *PvAMT1;1*

La estructura 3D de las proteínas se generó mediante el servidor 'CPHmodels-3.0 - Remote homology modeling using structure guided sequence profiles' (Nielsen *et al.*, 2010). Los modelos obtenidos se evaluaron visualmente utilizando como molde la estructura tridimensional de la proteína Amt1 de *A. fulgidus* con el programa "UCSF Chimera" (Pettersen *et al.*, 2004). Posteriormente las estructuras obtenidas se analizaron utilizando los programas "UCSF Chimera" (Pettersen *et al.*, 2004) y Swiss-PdbViewer (Guex & Peitsch, 1997).

### VII.2 Mutantes del transportador *PvAMT1;1*

Para el desarrollo de este proyecto, se utilizaron las clonas de las mutantes *PvAMT1;1*-Q63H y *PvAMT1;1*-H211A (cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ ), las cuáles se generaron previamente en el laboratorio (experimentos del laboratorio no publicados).

### VII.3 Expresión heteróloga del transportador *PvAMT1;1* en ovocitos de *X. laevis*.

Las propiedades electrofisiológicas del transportador *PvAMT1;1* en sus versiones tipo silvestre y mutante, así como su localización se obtuvieron mediante su expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis*. Para analizar las propiedades de transporte en este sistema, fue necesaria la sobreexpresión del transportador en la membrana de los ovocitos, para lo que estos fueron microinyectados con el RNA complementario (RNAc) correspondiente.

#### VII.3.1 Extracción del ADN plasmídico correspondiente al transportador *PvAMT1;1* en sus versiones tipo silvestre y mutantes.

Para la extracción del ADN plasmídico se utilizó el kit “GeneJET Plasmid Miniprep” (11356012, Fermentas), como lo describe el protocolo incluido en el paquete. El ADN plasmídico purificado se almacenó a -20 °C.

### **VII.3.2 Transcripción *in vitro* del ARNc del transportador *PvAMT1;1* tipo silvestre y mutantes, así como fusionados a la EGFP.**

Para obtener el ARNc (ARN complementario) del transportador *PvAMT1;1*, y de las mutantes *PvAMT1;1-Q63H*, *PvAMT1;1-H211A*, así como de las proteínas correspondientes fusionadas con la proteína verde fluorescente (*PvAMT1;1::EGFP* y *PvAMT1;1-Q63H::EGFP*, ya que debido a problemas en la clonación no se obtuvo la construcción *PvAMT1;1-H211A::EGFP*) fue necesario linearizar el ADN plasmídico mediante una digestión con la enzima Mlu I (Fermentas, México), utilizando el buffer R (Fermentas, México) a 37 °C durante toda la noche. La digestión se detuvo agregando 1 µl de EDTA 0.5 M, y el ADN se precipitó agregando 2 µl de Acetato de Sodio (NaAc) 3 M y 2 volúmenes de Etanol frío al 100 %, enfriamiento a -20 °C al menos 30 min y centrifugación a 14,000 rpm a 4 °C por 20 min. El sobrenadante se removió y la pastilla de ADN se resuspendió en agua libre de nucleasas tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) al 0.05 %.

La reacción de transcripción *in vitro* se llevó a cabo utilizando el paquete “mMessage mMachine” (Ambion 2130, Woodward St. Austin TX USA). Se prepararon alícuotas de 1 µl del ARNc y se almacenaron a -80 °C para evitar su degradación.

La cantidad obtenida de ARNc en la reacción se cuantificó a una longitud de onda de 260 nm utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (THERMO Fisher Scientific Inc.). La integridad del ARNc se comprobó mediante su separación en geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído (Apéndice A). Las muestras se incubaron por 15 min a 65 °C y se transfirieron inmediatamente a hielo para eliminar la formación de estructuras secundarias. Las muestras se cargaron en los pozos del gel y se resolvieron a 50 V durante 1 h. El ARNc se visualizó utilizando el fotodocumentador “Gel Doc XR+ System” (Bio Rad).

### **VII.3.3 Extracción y remoción de las células foliculares de los ovocitos de *X. laevis*.**

Para la obtención de los ovocitos, la rana se anestesió exponiéndola por 30 min a una solución de 1.2 g de tricaína (Ethyl-m-aminobenzoato ácido sulfónico; Sigma-Aldrich, Toluca, México) disuelta en 750 mL de agua corriente. A la rana anestesiada se realizó una pequeña incisión en la piel en la parte baja del abdomen con un bisturí y se cortó el músculo para tener acceso a los ovocitos que se encuentran en los lóbulos de los ovarios. Mediante una pinza se localizaron y se extrajeron los ovocitos. Cuando se obtuvo un número adecuado de ovocitos, los ovarios se colocaron dentro de la cavidad abdominal y se suturo la incisión empleando hilo quirúrgico sintético (ATRAMAT, México), empezando por el músculo y terminando en la piel, teniendo cuidado de no dejar burbujas de aire entre la piel y los músculos abdominales. La rana se colocó en agua corriente para su recuperación. Los ovocitos obtenidos se colocaron en una caja Petri con solución ND96 libre de calcio (Tabla 1).

Los ovocitos obtenidos contienen células foliculares que los rodean y los mantienen unidos dentro de los ovarios; para facilitar su liberación, se colocaron en solución ND96 libre de calcio a la que se le agregaron 0.5 mg/mL de colagenasa (Sigma-Aldrich, Toluca, México) y se incubaron en agitación constante por 20 min a temperatura ambiente. Los ovocitos se enjuagaron varias veces con solución ND96 libre de calcio para eliminar la solución con colagenasa, y se colocaron nuevamente en una caja Petri con la misma solución. Los ovocitos se mantuvieron a 17 °C durante 4 h en una cámara de incubación (Boekel Scientific MiniFridge II 260009, Roanoke, Virginia, U.S.). Las células foliculares que no se removieron con el tratamiento de colagenasa, fueron retiradas manualmente con ayuda de un microscopio estereoscópico y pinzas de punta muy fina. Finalmente, los ovocitos se colocaron en solución ND96 con calcio 1.8 mM (Tabla 1) y se mantuvieron a 17°C durante toda la noche.

**Tabla 1. Medios ND96 para ovocitos de *X. laevis*.**

ND96 s/Ca <sup>2+</sup>		ND96 c/Ca <sup>2+</sup>		ND96 Recuperación	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
NaCl	82.5 mM	NaCl	96 mM	Gentamicina	50 ug/mL
KCl	2.5 mM	KCl	2 mM	Piruvato	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	CaCl <sub>2</sub>	1.8 mM	Se utiliza ND96 c/Ca <sup>2+</sup> para hacer la solución	
HEPES	5 mM	MgCl <sub>2</sub>	1 mM		
		HEPES	5 mM		
pH 7.5 ajustado con NaOH		pH 7.6 ajustado con NaOH			
<b>Todas las soluciones deben tener de 0.240-0.260 Osmol/Kg</b>					

#### **VII.3.4 Microinyección del ARNc del transportador *PvAMT1;1* en los ovocitos de *X. laevis***

Para la microinyección del ARNc, primero se seleccionaron los ovocitos en estados V-VI de la ovogénesis, en los cuales se visualizan los polos animal y vegetal bien definidos (negro y amarillo, respectivamente) y con el borde entre ambos bien delimitado. Estos ovocitos se colocaron en una caja Petri con el fondo rayado (para evitar su movimiento durante la microinyección) y solución ND96 con calcio 1.8 mM. Utilizando un microscopio estereoscópico y un Nano inyector (Drummond Scientific Co., Broomall, PA), se realizó la microinyección del ARNc en el polo animal, teniendo cuidado de no dañar demasiado la membrana. Los ovocitos microinyectados se transfirieron a una caja Petri con medio ND96 de recuperación (Tabla 1) y se incubaron a 17 °C en una cámara de incubación durante 4 a 6 días (Boekel Scientific MiniFridge II 260009, Roanoke, Virginia, U.S.).

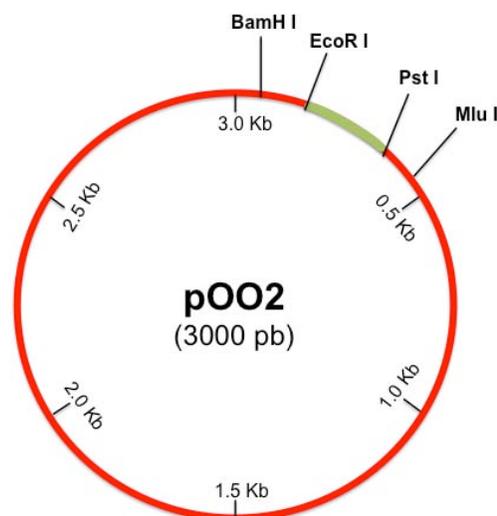
#### **VII.4 Fusiones traduccionales de las mutantes a la proteína verde fluorescente**

Para la fusión de las mutantes de interés a la proteína verde fluorescente modificada para aumentar su expresión (EGFP), se amplificó el gen *AMT1;1* (tipo silvestre y mutantes) mediante el protocolo de la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), utilizando el paquete “Phusion High-Fidelity DNA Polymerase” (THERMO Fisher Scientific Inc.) que es de alta fidelidad y garantiza evitar posibles mutaciones en la secuencia. Para amplificar el fragmento de 1503 pb correspondiente al *PvAMT1;1* se utilizaron oligonucleótidos específicos (Tabla 2). Asimismo, estos oligonucleótidos sirvieron para agregar al gen amplificado los sitios de restricción *Bam*HI (río arriba del codón de inicio del gen) y *Eco*RI (río abajo del término del gen), necesarios para su clonación en el vector pOO2, el cual porta la proteína EGFP (Fig. 10). La amplificación se llevó a cabo empleando un termociclador de gradientes “MJ RESEARCH PTC-200 PELTIER THERMAL CYCLER” (Hercules, Cal.) utilizando el programa mostrado en la Tabla 3.

**Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación y adición de sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI al gen *PvAMT1;1***

Nombre	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC
AMT- <i>Bam</i> HI	Sentido (5'-3')	CGGGATCCATGTCGCTGCAAACCTTGTTCCG GCGGACCAACTA	41	76.94	56.1
AMT- <i>Eco</i> RI	Antisentido (5'-3')	CGGAATTCAGAACCACCACCCTCATCAGTG GTGGGAGTGGA	41	76.94	56.1



**Figura 12. Mapa de restricción del vector pOO2.** Se muestran los sitios de restricción de interés, y la EGFP fusionada entre los sitios *Eco*RI y *Pst*I.

**Tabla 3. Programa para la amplificación del transcrito de *PvAMT1*;1**

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	98 °C	3 min
2	35	98 °C	30 s
		64°C	30 s
		72 °C	3 min
3	1	72 °C	10 min
4	1	4°C	∞

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados con el paquete “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, USA) y se sometieron a una doble digestión utilizando las enzimas referidas. Estos fragmentos, se ligaron al vector pOO2::EGFP (previamente purificado y linearizado mediante digestión con *Bam*HI y *Eco*RI), utilizando la enzima T4 DNA Ligasa (THERMO Fisher Scientific Inc., Tabla 4).

**Tabla 4. Reacción para la ligación mediante T4 DNA Ligasa.**

Reactivo	Concentración
Vector linearizado	100 ng
Inserto de DNA	Relación molar 1:3 sobre el vector
Buffer 10X T4 DNA Ligasa	2 µL
T4 DNA Ligasa	1 U
Agua libre de nucleasas	Aforar a 20 µL
<b>Se incubó 1 h a 22°C y posteriormente se inactivó a 70°C por 5 min.</b>	

Los productos de la ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli* mediante el siguiente protocolo: 2 µL de la reacción de ligación se pusieron en contacto con células electrocompetentes DH5α y se sometieron a un pulso eléctrico de 2.5 kV por 25 mS empleando el electroporador “MicroPulser Electroporator” (Hercules, CA, USA), después del choque eléctrico las células se recuperaron por una hora en medio LB a 37 °C y agitación constante y 200 µL de estos cultivos se dispersaron en cajas Petri con medio LB suplementado con Ampicilina (50 µg/mL) como marcador de selección y se incubaron a 37 °C durante

toda la noche. Las colonias resultantes se inocularon en 5 mL de medio LB selectivo líquido y se dejaron crecer durante toda la noche a 37 °C en agitación constante. A partir de estos cultivos, se extrajo ADN utilizando el paquete “GeneJet Plasmid Miniprep” (THERMO Fisher Scientific Inc.), que se sometió a una triple digestión con las enzimas *Bam*H1, *Eco*R1 y *Psi*I (Fermentas) para corroborar la clonación de los fragmentos y descartar falsas-positivos. Para verificar las fusiones, el ADN de los plásmidos recombinantes se secuenció en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

#### **VII.5 Análisis de la expresión de los transportadores AMT fluorescentes por Microscopia de la Reflexión Interna Total de la Fluorescencia (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, TIRFM)**

Para observar la localización del transportador en los ovocitos de *X. laevis*, se utilizó la técnica de Microscopia de la Reflexión Interna Total de la Fluorescencia (TIRFM, Apéndice B). Se utilizaron ovocitos expresando las construcciones *PvAMT1;1::EGFP* y *PvAMT1;1-Q63H::EGFP*, de 4 a 6 días después de la microinyección del ARNc. Se utilizó el microscopio Olympus IX81 del Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del Instituto de Biotecnología de la UNAM, con un objetivo de inmersión en aceite 100X y NA (apertura numérica) 1.49. Las imágenes se tomaron con una cámara Andor IXON 3 con un lente de transferencia de 1.6X, en las modalidades de campo claro, campo completo (“wide-field”) y TIRFM.

#### **VII.6 Análisis electrofisiológicos mediante la técnica de fijación de voltaje con dos microelectródos**

Para verificar la expresión funcional de las proteínas mutantes H211A y Q63H, en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis* posterior a la inyección del ARNc, se utilizó la técnica de fijación de voltaje con dos microelectródos. Esta técnica permite cuantificar el flujo de iones a través de la membrana celular, el cual se mide en forma de corriente eléctrica, mientras que el potencial de membrana se mantiene bajo control experimental constante (Rudy & Iverson,

1992), empleando el amplificador "GeneClamp 500B" (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los microelectródos utilizados en estos experimentos, se hicieron a partir de capilares de borosilicato (Sigma, P-152) y se llenaron con una solución de KCl 3 M. Los protocolos de voltaje y la toma de datos se controlaron con el programa Clampex y el análisis de datos se llevó a cabo con el programa Clampfit incluidos en el paquete pClamp 10 (Axon CNS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

### **VII.7 Registro de la actividad de canal unitario de la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis* que expresaron las diferentes versiones del transportador PvAMT1;1**

La actividad eléctrica de las mutantes Q63H y H211A de PvAMT1;1, se registró de 4 a 6 días después de la microinyección del ARNc; el registro se llevó a cabo mediante la técnica de fijación zonal del potencial de membrana ("Patch-Clamp"), la cual permite la medición de los flujos iónicos a través de canales individuales presentes en la membrana. En esta técnica se utiliza un sólo electrodo, lo que permite mantener el voltaje en un nivel constante, mientras que los cambios en la corriente se registraron empleando el amplificador Axoclamp 200B (Axon CNS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA), conectado a una computadora PC a través del convertidor analógico-digital Digidata 1550A (Axon CNS, Molecular Devices). Los microelectródos de borosilicato (Sigma, P-152) fueron llenados con una solución conteniendo 50 mM NH<sub>4</sub>Cl, Mes 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 1 mM a pH 5.5. Un electrodo de Ag/AgCl en contacto con esta solución conduce los cambios eléctricos a un amplificador de fijación de voltaje. El microelectrodo se presiona contra la membrana celular y se aplica succión para absorber un pequeño parche de la membrana en la punta de la pipeta/electrodo, lo que forma un sello eléctricamente estable (giga-sello). Esta técnica se utilizó en las modalidades de célula unida ("Cell attached") y parche de membrana con la orientación invertida ("Inside-out"), donde el parche de la membrana se separa de la célula y se expone la superficie intracelular de la membrana a la solución del baño, que a su vez puede cambiarse por diferentes soluciones. Los protocolos de voltaje y la

adquisición de datos se controlaron con el programa Clampex (Axon CNS, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El análisis de datos se llevó a cabo con el programa Clampfit incluidos en el paquete pClamp 10 (Axon CNS, Molecular Devices) y con el programa OriginLab 8.1 (OriginLab Corporation). Para evitar la corriente de ruido, los registros se filtraron utilizando un filtro de paso bajo (“Low-Pass 8-Pole Bessel”), el cual permite el paso de las señales con una frecuencia inferior a la frecuencia de corte y atenúa las señales con frecuencias superiores a la misma, conservando la forma de onda de las señales filtradas en la banda de paso.

## **VII.8 Ensayos de complementación del crecimiento en el sistema de expresión heterólogo de *S. cerevisiae***

Para tener una aproximación experimental del comportamiento del transportador tipo silvestre y las mutantes, se utilizó la técnica de complementación de función en levadura. Esta técnica consiste en tomar una levadura “knock out” para un gen o grupo de genes conocido, en este caso los genes *Mep* *mep-1Δ*, *mep-2Δ*, *mep-3Δ* (Loqué *et al.*, 2007) y transformarla con una construcción que posea un gen homólogo con función similar (*PvAMT1;1*), lo que nos permite evaluar si el gen introducido produce una proteína capaz de complementar la mutación y revertirla a tipo silvestre

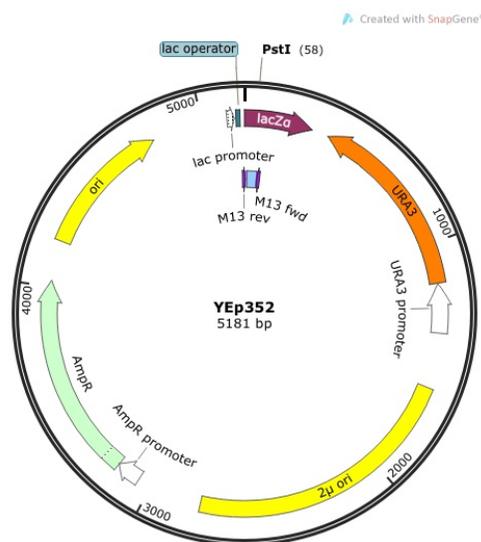
### **VII.8.1 Generación de las construcciones pYEP352::*PvAMT1;1*, pYEP352::*PvAMT1;1-Q63H* y pYEP352::*PvAMT1;1-H211A***

Para llevar a cabo la expresión de los genes de interés se utilizó el vector lanzadera Levadura/*E. coli* YEP352 (Fig. 13). Los oligonucleótidos utilizados para amplificar estos genes tienen regiones que permiten que el vector integre el producto de PCR a su secuencia mediante recombinación homóloga *in vivo* (Tabla 5).

Se linearizó el vector YEP352 con la enzima *Pst*I (Fermentas, México), posteriormente se realizó una amplificación del ADN de *PvAMT1;1* tipo silvestre y

mutantes empleando los oligonucleótidos referidos (Tabla 5) con ayuda del termociclador de gradientes “MJ RESEARCH PTC-200” (Hercules, Ca) utilizando el programa detallado en la Tabla 6. Los productos de PCR obtenidos se purificaron con el paquete “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, USA).

La cepa de levadura BW31a (*MATa leu2-3/122 ura3-1 trp1-1 his3-11/15 ade2-1 can1-100 GAL SUC2 mal10 ena1-4D::HIS3 nha1::LEU2*), se utilizó para expresar las construcciones pYEP352::PvAMT1;1, pYEP352::PvAMT1;1-Q63H y pYEP352::PvAMT1;1-H211A, utilizando el protocolo de transformación de LiAc (Apéndice C).



**Figura 13. Mapa de restricción del vector lanzadera YEp352.** Se muestran las características del vector; así como el sitio de restricción PstI, el cuál se utiliza para linearizarlo.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la recombinación homóloga *in vivo*.** En rojo se muestran las secuencias que permiten la recombinación con el vector.

Nombre	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC
FYEP352 /AMT1;1	Sentido (5'-3')	GTACATTATAAAAAAAAAATCCTGAA CTTAGCTAGATATTATGTCGCTGCA AACTTGTTCCG	60	56	32
RYEP352 /AMT1;1	Antisentido (5'-3')	CTCCCACCACTGATGAGTGACATG CAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTT ACAACGTCGTG	60	59	55

**Tabla 6. Programa para la inserción de los sitios requeridos para la recombinación homóloga *in vivo***

Segmento	Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	1	98 °C	30 s
2	35	98 °C	10 s
		55 °C	30 s
		72 °C	30 s
3	1	72 °C	5 min
4	1	4°C	∞

Para seleccionar las células transformadas, se utilizaron placas de medio YNB “Yeast Nitrogen Base” (YNB sin aminoácidos 6.68 g/L, glucosa 20 g/L, agar 20 g/L) suplementado con His, Leu, Trp, Uracilo y Adenina (5 µg/mL cada uno). Para confirmar que las construcciones se encontraban insertadas correctamente, se realizaron PCRs de colonia, utilizando los oligonucleótidos referidos en la Tabla 5 en combinación con los oligonucleótidos internos descritos en la Tabla 7.

La cepa DH5α de *E. coli*, se utilizó como hospedero del ADN plasmídico obtenido de las levaduras transformadas mediante el método “Lazy Bones” adaptado de Kaiser *et al.*, 1994 (Apéndice D), creciéndose en medio LB con ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C. El ADN plasmídico se extrajo utilizando el paquete “GeneJET Plasmid Miniprep” (Fermentas), y se mandó a secuenciar a la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias fueron analizadas mediante el programa BioEdit 7.2.5 (Ibis Biosciences).

**Tabla 7. Oligonucleótidos internos utilizados para la comprobación mediante PCR de colonia.**

Nombre	Oligonucleótido	Secuencia	Longitud (pb)	Tm (°C)	%GC
F- InPvAMT1;1	Sentido (5'-3')	CGTTAGTCGTGCTCGGAACC	20	55.9	60
R- InPvAMT1;1	Antisentido (5'-3')	GGCACAACCGGCTGTGATGG	20	57.9	65

## VII.8.2 Ensayos de complementación del crecimiento de *S. cerevisiae* mutante DL1.

Para los ensayos de crecimiento se utilizó la cepa de levadura DL1 (*mep1Δ*, *mep2Δ*, *mep3* y *gap1Δ*, Loqué *et al.*, 2007), la cual se transformó con el ADN de las construcciones pYEP352::*PvAMT1*;1, pYEP352::*PvAMT1*;1-Q63H y pYEP352::*PvAMT1*;1-H211A usando LiAC (Apéndice D). Las diferentes cepas se seleccionaron en medio YNB sólido (239210, Difco). Para los ensayos de crecimiento, las células se precultivaron en YNB líquido toda la noche, el cultivo se ajustó a una D.O.<sub>600</sub> de 0.05 y se diluyó  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , y  $10^{-4}$  en agua milli-Q estéril. Las diluciones se utilizaron para realizar las pruebas de gota en placas de YNB sólido sin aminoácidos y sin fuente de amonio. Las cajas de ensayo se prepararon con diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl, para los ensayos de complementación del crecimiento y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para los ensayos de absorción de MeA. Después de 4 días de incubación a 30 °C, el crecimiento celular se documentó utilizando el fotocomentador Gel Doc XR+ System (Bio Rad), mediante el escaneo de la placa a 600 dpi en el modo de escala de grises. También se realizaron cinéticas de crecimiento en medio líquido, utilizando YNB sin aminoácidos (Medio mínimo para levaduras, 291940, Difco) y YNB sin aminoácidos y sin sulfato de amonio (233520, Difco), suplementado con NH<sub>4</sub>Cl 0.5 mM. La densidad óptica de las muestras se midió a 650 nm cada 6 h por un periodo de 120 h.

## VIII. RESULTADOS

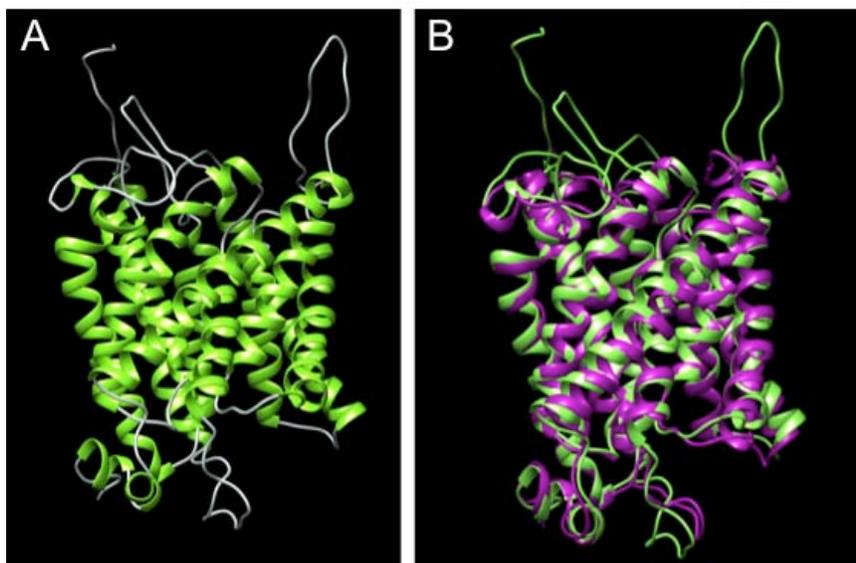
### VIII.1 Posible efecto de las mutaciones puntuales en la estructura de PvAMT1;1

Para entender el posible papel que desempeñan las mutaciones puntuales en el mecanismo de transporte de PvAMT1;1, se comparó la estructura de la proteína silvestre contra las mutantes, mediante la técnica de modelado por homología.

La proteína modelada del transportador AMT1;1 del frijol se obtuvo mediante el servidor “CPHmodels-3.0” (Nielsen *et al.*, 2010) y fue comparada con la estructura tridimensional de *A. fulgidus*, debido a que a diferencia de la estructura de *E. coli* (Fig. 1), en la estructura de *A. fulgidus* (Fig. 2) fue posible cristalizar el carboxilo terminal de la proteína. El modelo que se obtuvo para PvAMT1;1 con el servidor (Fig. 14A) parece ser bastante confiable, ya que se pueden observar las 11  $\alpha$  hélices transmembranales, un dominio N-terminal extracelular y un dominio C-terminal citoplásmico, lo que concuerda con el modelo previamente realizado para este transportador (Ortíz-Ramírez, 2010). Al superponer el modelo obtenido de PvAMT1;1 con el de *A. fulgidus* mediante el programa “UCSF Chimera” (Pettersen *et al.*, 2004, Fig. 14B), se observó que fueron muy similares, sólo se observaron diferencias en las asas extra e intracelulares, sin embargo se sabe que la disposición espacial de estas es difícil de predecir; lo que sugiere que es un buen modelo para realizar los estudios posteriores de las mutaciones puntuales, así como para obtener el modelo de las mismas.

Para analizar el posible efecto que las mutaciones puntuales PvAMT1;1-H211A y PvAMT1;1-Q63H pudieran tener sobre la estructura del transportador AMT1;1 del frijol, primero se observó utilizando el programa “UCSF Chimera” (Pettersen *et al.*, 2004), si las mutaciones puntuales tenían algún efecto en la estructura tridimensional de la proteína, por lo que los modelos obtenidos de las mutantes se superpusieron en el modelo obtenido para PvAMT1;1. Como puede observarse en la Figura 15, ninguna de las proteínas mutantes exhibió cambios estructurales a

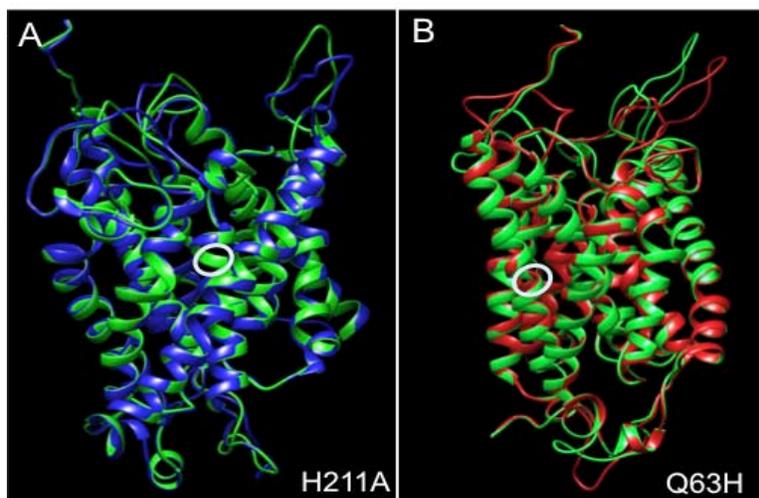
este nivel, observándose diferencias exclusivamente en las asas extra e intracelulares, sin embargo, como ya se mencionó, la disposición espacial de estas es difícil de predecir, por lo que no puede asegurarse que el cambio observado sea resultado de la mutación puntual.



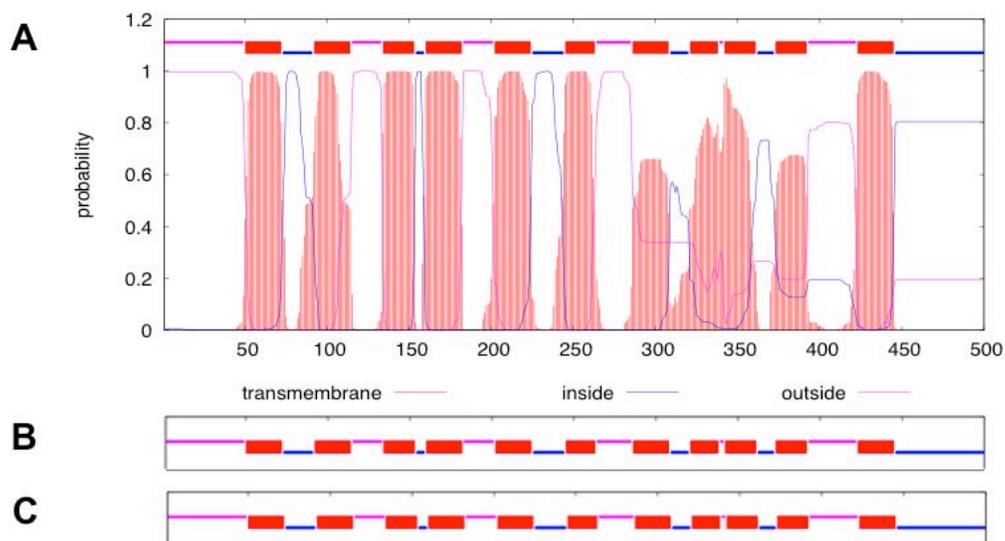
**Figura 14. Estructura tridimensional modelada del transportador PvAMT1;1. (A)** Modelo de PvAMT1;1 obtenido por el servidor CPHmodels-3.0 (Nielsen *et al.*, 2010), se observan en verde las  $\alpha$  hélices transmembranales y en gris las asas extracelulares (arriba) y citoplasmáticas (abajo). **(B)** Superposición de la estructura de PvAMT1;1 (verde) y AfAmt1 (morado) con el programa UCSF “Chimera” (Pettersen *et al.*, 2004).

Para determinar si las hélices transmembranales que conforman el transportador se vieron afectadas por las mutaciones puntuales, se utilizó el servidor TMHMM v.2.0 (Krogh *et al.*, 2001), sin embargo a este nivel tampoco fue posible observar cambios estructurales, ya que las regiones transmembranales de las mutantes mantuvieron una estructura similar a la silvestre (Fig. 16). No obstante, se decidió observar si a nivel molecular, se presentaron modificaciones en las interacciones entre estos residuos, mediante el uso del programa “Swiss-PdbViewer” (Guex N. & Peitsch MC., 1997). Para este análisis, fue necesario llevar a cabo la minimización de energía de las proteínas, con lo que se optimizó su estructura y se aproximaron a las conformaciones más estables de las mismas. En el caso de la Gln 63, que se localiza en el dominio transmembranal I, se observa que en PvAMT1;1 este residuo forma un puente de hidrógeno con la Ala 139, la cual se localiza en el dominio transmembranal III. Al simular la mutación del residuo Gln 63 por una His,

se observó que este potencial puente de hidrógeno con la Ala 139 se desestabilizó (Fig. 17), ya que la cadena lateral de la His no es capaz de mantener esta interacción.

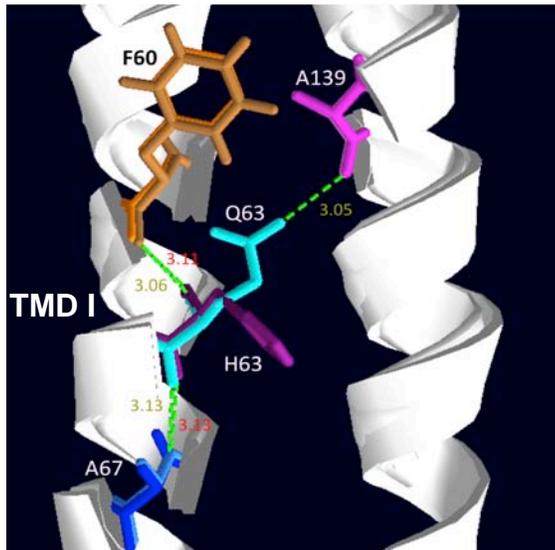


**Figura 15. Sobreposición de los modelos de las mutantes puntuales *PvAMT1;1*-H211A y *PvAMT1;1*-Q63H con el modelo de la tipo silvestre. (A) Mutante H211A (azul) y tipo silvestre (verde). (B) Mutante Q63H (rojo) y tipo silvestre (verde). Los círculos muestran las posiciones de los residuos 211 y 63 en A y B, respectivamente. Para hacer evidentes las mutaciones, ambas estructuras se muestran en diferente perspectiva. Superposiciones realizadas con el programa “UCSF Chimera” (Pettersen *et al.*, 2004).**

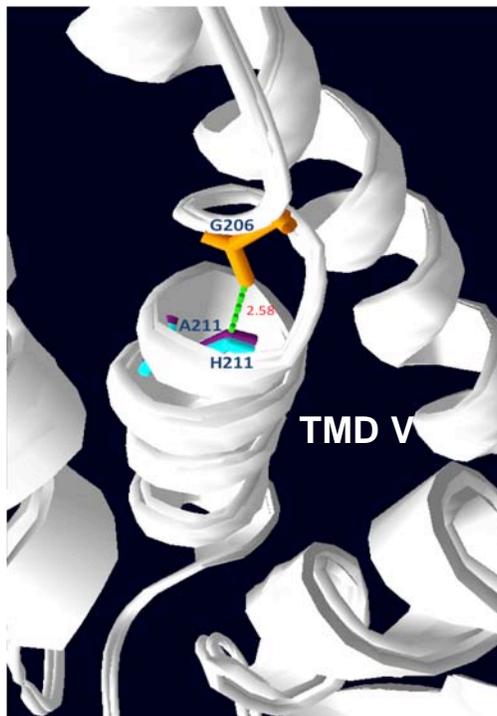


**Figura 16. Hélices transmembranales predichas para el transportador *PvAMT1;1* tipo silvestre y mutantes. Modelos obtenidos para A) *PvAMT1;1* tipo silvestre, B) mutante Q63H y C) mutante H211A (de estas últimas, sólo se muestra el resumen de las predicciones). Modelos obtenidos mediante el servidor TMHMM v.2.0 (Krogh *et al.*, 2001).**

En el caso de la His 211, que se localiza en el dominio transmembranal V, según el modelo obtenido para *PvAMT1*;1 se observó libre de interacciones con residuos vecinos. Esto, debido a que se sugiere que esta His está involucrada en la desprotonación del amonio, por lo que debe permanecer libre para interactuar con este catión (Khademi *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2005). Al simular la mutación por una Ala, se observó la posible formación de un puente de hidrógeno con la Gly 206 (Fig. 18).



**Figura 17. Posibles cambios estructurales de la mutante *PvAMT1*;1-Q63H.** Se observa la Gln 63 (azul) y el puente de hidrógeno potencial con la Ala 139 (rosa). La mutante His 63 (morado) no forma enlaces con residuos de la hélice vecina.



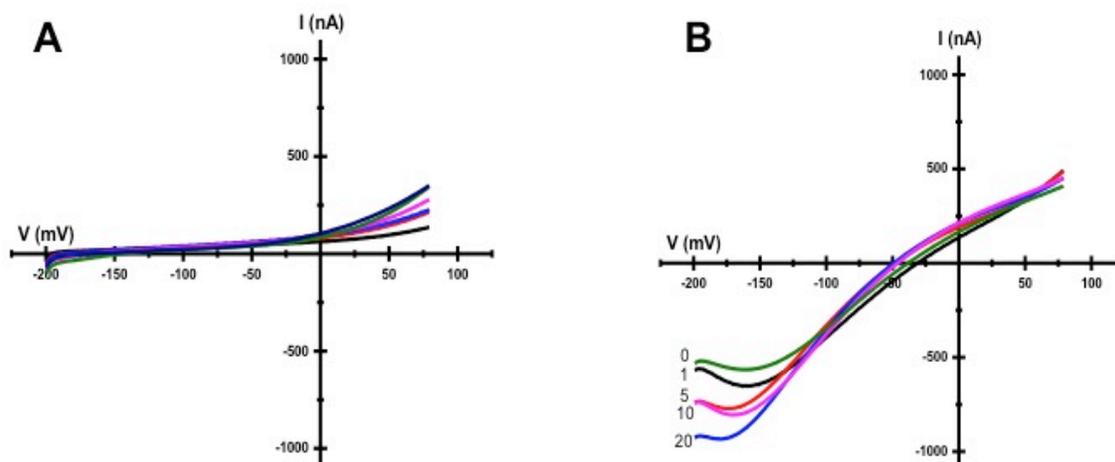
**Figura 18. Posibles cambios estructurales de la mutante *PvAMT1*;1-H211A.** Se muestra el posible puente de hidrógeno que se forma cuando la His (azul) se sustituye por una Ala (morado) la cual podría interactuar con el residuo Gly 206, a diferencia de la tipo silvestre.

## VIII.2 Caracterización electrofisiológica de un canal endógeno de amonio en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*.

Como cualquier sistema de expresión heterólogo, el uso de los ovocitos de *X. laevis* requiere la ausencia de proteínas endógenas similares, en este caso la ausencia de canales iónicos permeables al  $\text{NH}_4^+$ . Sin embargo, en estudios previos se ha reportado, que los ovocitos de *X. laevis* presentan en su membrana plasmática canales selectivos a  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  activados por voltaje, estímulos mecánicos,  $\text{Ca}^{2+}$  o cambios en el volumen celular (Weber, 1999). El catión  $\text{NH}_4^+$ , tiene un radio iónico similar al  $\text{K}^+$ , pero es más grande que el  $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{Li}^+$  y  $\text{Na}^+$ , y más pequeño que el  $\text{Rb}^+$  y el  $\text{Cs}^+$  (Ksenzhek & Volkov, 1998). Por otra parte, Cougnon y colaboradores, reportaron que los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  son permeables a  $\text{NH}_4^+$ ; sin embargo, los registros de estos canales sólo se han reportado a nivel de corrientes macroscópicas (Cougnon *et al.*, 1996). A nivel de canal unitario, sólo existen reportes de los canales 'Stretch-Activated' (SA), los cuales son permeables al  $\text{NH}_4^+$ , con una conductancia ( $g$ ) de 76 pS (Yang & Sachs, 1990). También han sido reportados canales de cloro inactivados por calcio (CaIC) con una  $g=$  90 pS (Reifarth *et al.*, 1997); así como canales de calcio tipo T y tipo N con conductancias calculadas de 9 pS y 18 pS, respectivamente (Lacerda *et al.*, 1994). Debido a esto y para conocer qué tipo de canales iónicos se encuentran en los ovocitos de las ranas del laboratorio, fue necesario realizar la caracterización de los canales endógenos de la membrana de los ovocitos de *X. laevis* en las condiciones de registro a utilizar en la caracterización de las mutantes de PvAMT1;1.

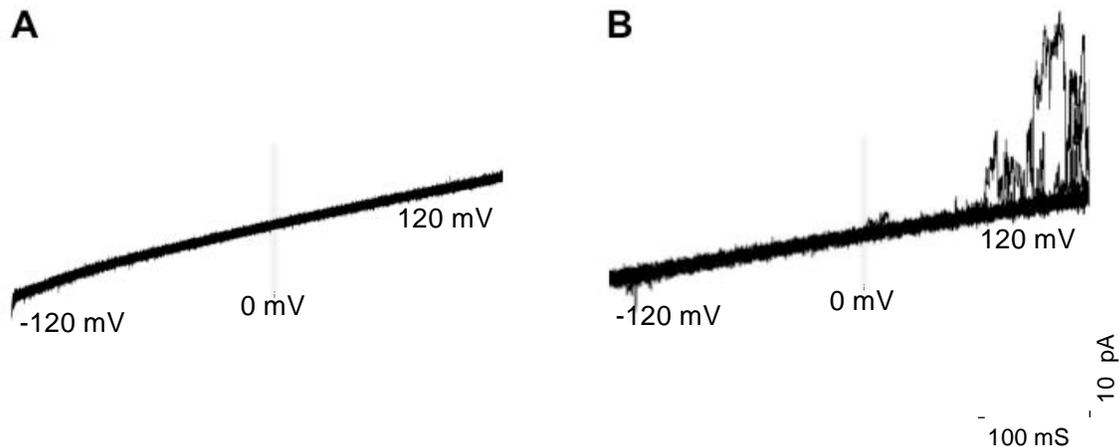
Utilizando la técnica de fijación de voltaje con dos microelectródos (TEVC) en ovocitos control (inyectados con agua-DEPC), se observó que al exponerlos a distintas concentraciones de amonio (0 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM y 20 mM) se activaron corrientes entrantes, las cuales fueron más activas conforme el medio se alcalinizó (Fig. 19). Estos resultados indicaron que las corrientes entrantes registradas a pH neutro-alcalino cuando el amonio se empleó como catión

principal, correspondían al movimiento de este catión hacia el interior del ovocito, actividad que disminuyó a pH ácido.



**Figura 19. Corrientes macroscópicas inducidas por  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y reguladas por pH en ovocitos de *X. laevis* inyectados con agua-DEPC. Corrientes registradas a pH extracelular 5.5 A) o pH 7.5 B).**

Las corrientes macroscópicas activadas por amonio antes descritas, se observaron a nivel de canal unitario mediante la técnica de “Patch-Clamp”, en la modalidad de célula unida (“Cell attached”), utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  30 mM en la pipeta y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en el baño y aplicando protocolos de rampas de voltaje de -120 mV a 120 mV a pH extracelular de 5.5 y 7.5. A este nivel, se observó el mismo efecto mostrado por las corrientes macroscópicas (Fig. 20). Lo anterior indica, la presencia de un canal de  $\text{NH}_4^+$  en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*, cuya actividad, podría interferir con el posterior estudio de las mutantes puntuales del transportador de amonio AMT1;1 de *P. vulgaris*; por lo tanto, fue necesario caracterizar este canal endógeno a nivel de canal unitario.

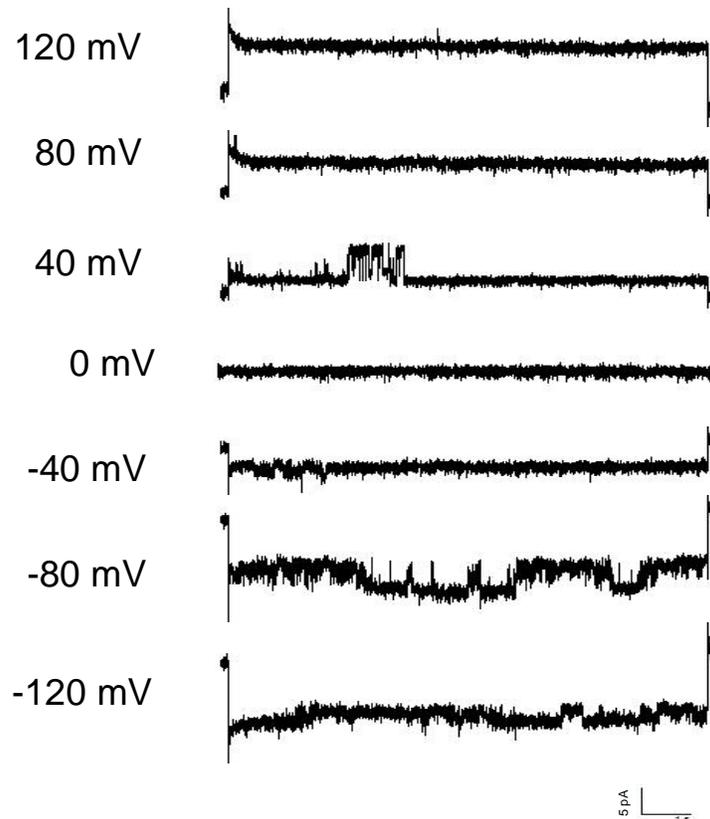


**Figura 20. Actividad de canal unitario inducida por la presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en ovocitos inyectados con agua-DEPC.** A) pH extracelular 5.5, B) pH extracelular 7.5. Registros realizados en la modalidad de célula unida (cell attached), aplicando protocolos de rampas de voltaje de -120 mV a 120 mV, utilizando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  30 mM en la pipeta y  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 mM en el baño. Ancho de banda 5 kHz y frecuencia de muestreo 20 kHz.

La actividad de los canales iónicos a nivel de canal unitario es de naturaleza aleatoria. La apertura y cierre del canal se refleja en aumentos y disminuciones repentinas en la magnitud de la corriente registrada. La actividad que aparece en un registro de canal unitario corresponde a eventos cuadrados que representan transiciones finitas entre los estados cerrado (no conductor) y abierto (conductor) del canal. La amplitud del evento corresponde a la intensidad de la corriente que atraviesa un canal único. Si en el registro hay dos canales activos, se observan pulsos de intensidad unitaria y doble, estos últimos corresponden a la apertura simultánea de los dos canales. Cabe mencionar, que en las configuraciones de célula unida ("Cell attached") y parche de membrana con orientación invertida ("Inside-out"), las corrientes positivas observadas en estos registros corresponden al movimiento de cationes hacia el interior de la célula (corrientes entrantes); mientras que las corrientes negativas que exhiben los registros, reflejan el flujo de cationes hacia el exterior de la célula (corrientes salientes).

La medida de la corriente iónica que fluye por un canal es fácilmente calculable en un registro de canal unitario, basta con medir la diferencia de amplitud entre el estado cerrado (línea base) y el estado abierto. Conociendo la corriente unitaria ( $i$ ) y el voltaje aplicado ( $V$ ), la conductancia unitaria ( $g$ ) se calcula utilizando la ley de

Ohm:  $g = i/V$ . Sin embargo, este procedimiento debe realizarse en una población estadísticamente significativa de eventos de apertura y cierre, para así obtener un valor preciso de la corriente unitaria que fluye a través del canal a un determinado voltaje. En el caso de los ovocitos de *X. laevis*, la actividad de canal unitario fue muy baja, por lo que se obtuvieron pocos eventos por registro, lo que impidió obtener resultados estadísticamente significativos (Fig. 21).



**Figura 21. Actividad de canal unitario generada por pulsos de voltaje en ovocitos inyectados con agua-DEPC.** Registros realizados en la modalidad de célula unida (cell attached), aplicando protocolos de pulsos a diferentes voltajes, utilizando 30mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en la pipeta y 50mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en el baño. Se observa la presencia de pocos eventos de apertura.

Por esta razón, para estudiar los canales endógenos de la membrana de ovocitos de *X. laevis*, se analizaron las curvas corriente-voltaje (I-V), lo cual permitió, mediante una regresión lineal, obtener el valor de la pendiente, que corresponde a la conductancia ( $g$ ) del canal. Una manera conveniente para obtener estas gráficas I-V, fue por la alteración del potencial de membrana de una manera continua a través de un protocolo de rampas (Fig. 22A). Para analizar estos

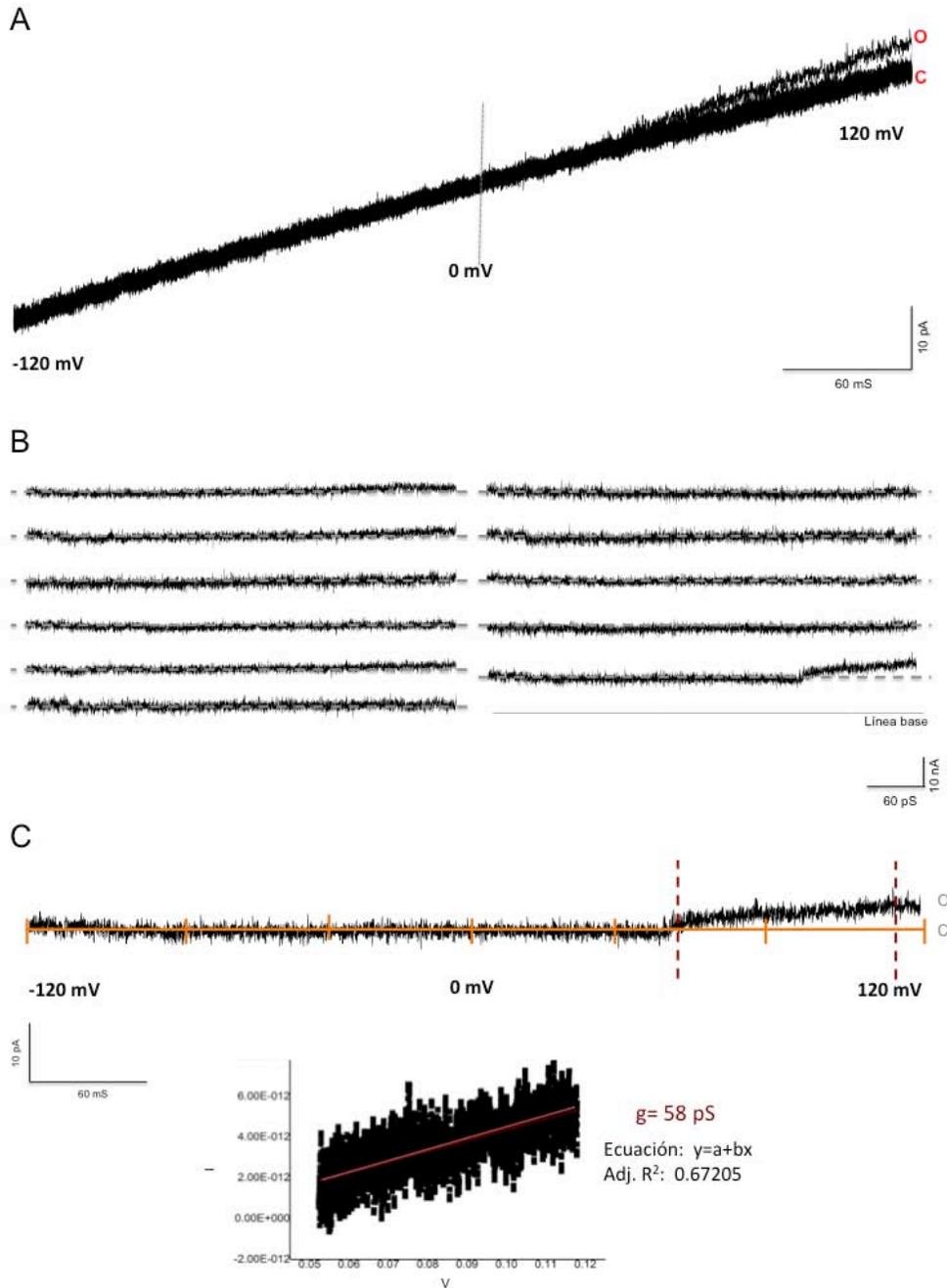
registros, primero se identificó en el registro la rampa que correspondía al estado cerrado del canal, el cual se utilizó como línea base, y se substrajo de las rampas donde se observó la actividad de canal unitario (Fig. 22B).

Debido a que el canal endógeno de amonio es más activo a pH 7.5, de acuerdo a los registros de fijación de voltaje con dos electrodos, los registros para los análisis de canal unitario se llevaron a cabo a pH 5.5, con la finalidad de tener mayor probabilidad de obtener la conductancia de la apertura de un sólo canal y no de la suma de varios canales abiertos simultáneamente. Se realizaron protocolos de rampas de -120 mV a 120 mV en ovocitos inyectados con agua-DEPC, en la configuración de célula unida, utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Fig. 22). Al analizar estos registros, se observó un canal rectificador de entrada, que presenta una conductancia de  $g=60 \pm 4$  pS calculada de al menos dos registros independientes, de al menos dos ranas distintas (Fig. 22C).

Para determinar si los ovocitos presentaban corrientes salientes activadas por  $\text{NH}_4^+$ , también se realizaron, protocolos de rampas en la configuración de parche de membrana con la orientación invertida (“Inside-out”), utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se observó un canal rectificador entrante de  $g= 96 \pm 3$  pS, así como un canal que al parecer no presenta rectificación con una conductancia de  $g= 78 \pm 5$  pS. También se pudo registrar un canal entrante con una conductancia de  $g= 67 \pm 2$  pS, como se detalla en la Tabla 8. La toma de datos y el análisis se realizó conforme a lo descrito para la Figura 22, los valores de conductancia se calcularon de al menos tres registros independientes, de al menos 3 ranas distintas.

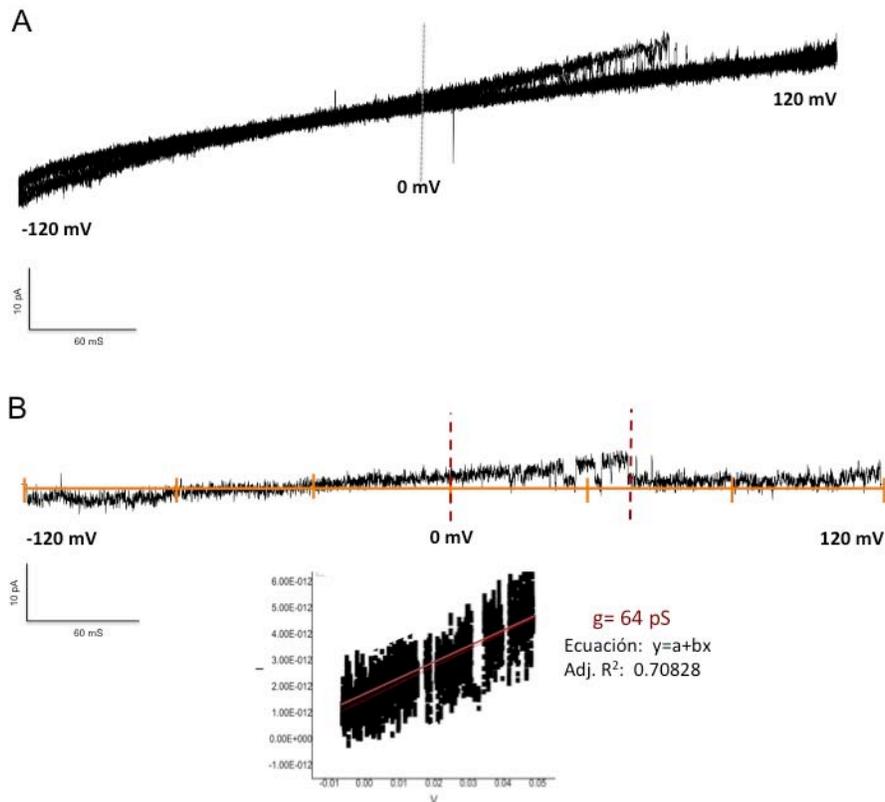
**Tabla 8. Conductancias calculadas en la modalidad de parche de membrana con la orientación invertida (“Inside-out”), en ovocitos inyectados con agua DEPC.**

I entrantes	I salientes
$77 \pm 5$ pS	$79 \pm 5$ pS
$67 \pm 2$ pS	ND
$96 \pm 3$ pS	ND



**Figura 22. Protocolo y análisis de rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con agua-DEPC.** **A)** Registros realizados en la modalidad de célula unida, aplicando protocolos de rampas de voltaje de -120 mV a 120 mV, utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM en la pipeta y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 mM en el baño, a pH 5.5. **B)** Substracción del estado cerrado al estado abierto para obtener los eventos de apertura. **C)** Análisis de rampas, se observa una conductancia para el canal de  $g=58 \text{ pS}$  ( $\pm 4 \text{ pS}$ ), conductancia calculada de al menos dos registros independientes, de al menos dos ranas distintas. Ancho de banda 5 kHz y frecuencia de muestreo 20 kHz.

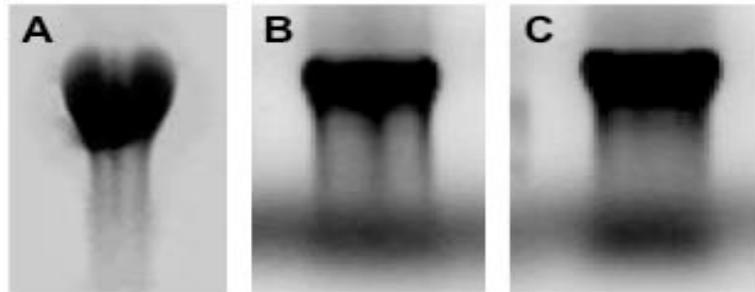
Debido a que el  $\text{NH}_4^+$  puede ser transportado por canales de  $\text{K}^+$  (Cougnon *et al.*, 1996), se realizaron controles con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 mM en la micropipeta y KCl 50 mM en el baño, en ovocitos inyectados con agua-DEPC, en la modalidad de parche de membrana con la orientación invertida. Bajo estas condiciones, se observó que la rampa de voltaje activó corrientes positivas (hacia el interior de la célula) con una  $g = 64 \text{ pS} \pm 4$  (Fig. 23); que representa la entrada de  $\text{NH}_4^+$ .



**Figura 23. Protocolo y análisis de rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con agua-DEPC.** Registros realizados en la modalidad de parche de membrana con la orientación invertida ("Inside-out"), aplicando protocolos de rampas de voltaje de -120 mV a 120 mV, utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 mM en la pipeta y KCl 50 mM en el baño, a pH 5.5. La conductancia obtenida fue de  $g = 64 \pm 4 \text{ pS}$ . Esta se obtuvo de al menos tres registros independientes, de al menos 3 ranas distintas. Ancho de banda 5 kHz y frecuencia de muestreo 20 kHz.

### VIII.3 Análisis electrofisiológicos de las mutantes *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*

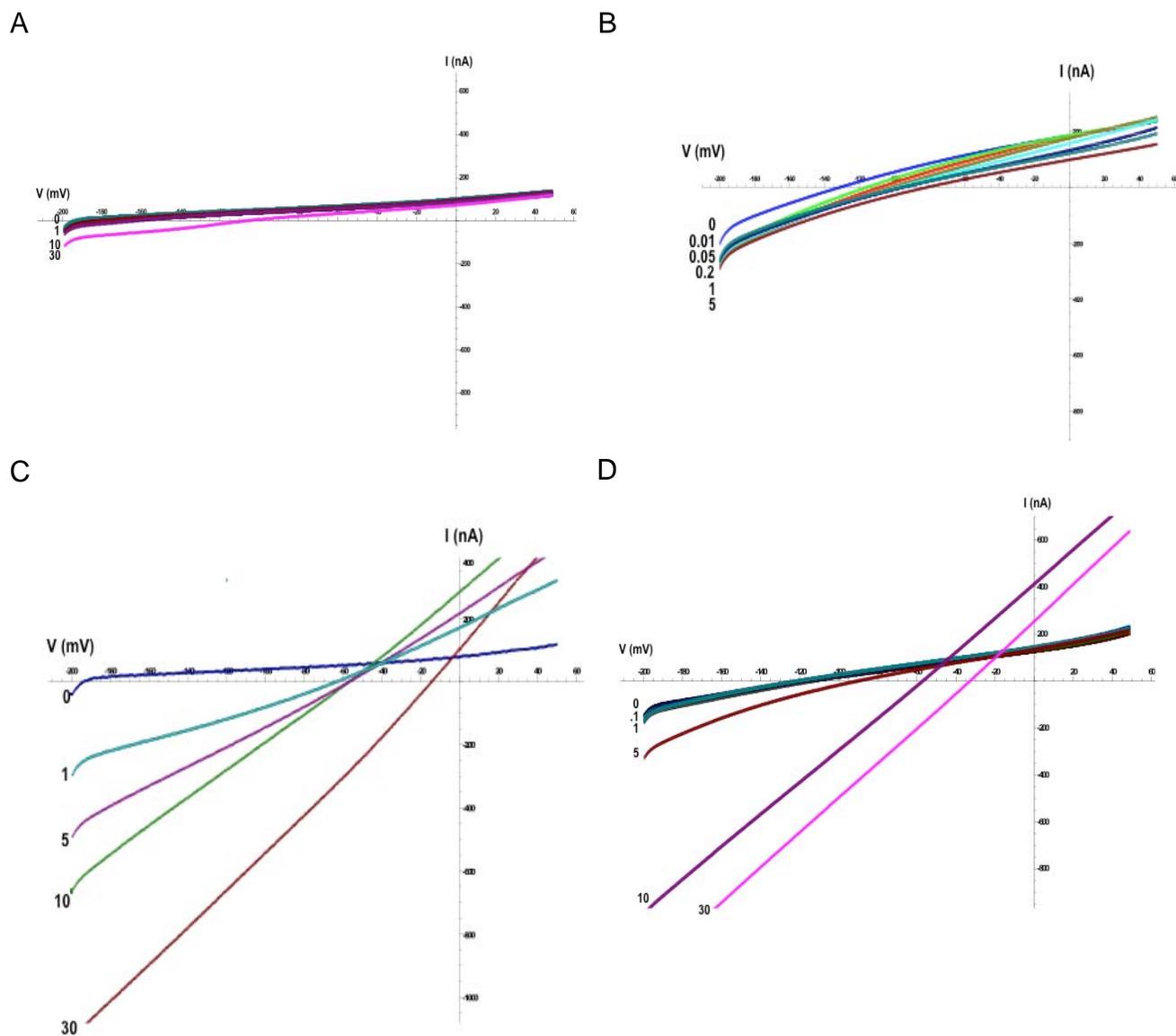
Para expresar las mutantes puntuales en los ovocitos de *X. laevis*, se obtuvo el ARNc de *PvAMT1;1* y de las mutantes *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*. La integridad del ARNc se confirmó en geles de agarosa (Fig. 24).



**Figura 24. ARNc de *PvAMT1;1* obtenido de la transcripción *in vitro*. (A) ARNc de *PvAMT1;1*. (B) ARNc de la mutante Q63H. (C) ARNc de la mutante H211A.**

Utilizando la técnica de fijación de voltaje de dos microelectródos (TEVC) se confirmó la correcta expresión de estas mutantes en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis* (Fig. 25). En las gráficas I-V obtenidas de ovocitos inyectados con la mutantes *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*, se observó que la magnitud de las corrientes entrantes aumentó con la concentración de amonio, registrando corrientes más grandes en concentraciones más altas (Figs. 25 C ,D), a diferencia de lo observado en los ovocitos inyectados con el transportador tipo silvestre y con agua-DEPC (Figs. 25 B, A), lo que concuerda con la caracterización previa de estas mutantes (experimentos del laboratorio no publicados).

Una vez corroborado que tanto el transportador tipo silvestre *PvAMT1;1*, como las mutantes *PvAMT1;1H211A* y *PvAMT1;1Q63H* funcionaba en los ovocitos, se procedió a realizar registros de canal unitario mediante la técnica de “Patch-Clamp” en las modalidades de célula unida (“Cell attached”) y parche de membrana con la orientación invertida (“Inside-out”). La actividad de canal unitario se registró aplicando protocolos de rampas de -120 mV a 120 mV, utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en la pipeta.



**Figura 25. Gráficas I-V obtenidas mediante TEVC. (A)** Registros originales de ovocitos inyectados con agua tratada con DEPC, **(B)** con el ARNc del transportador *PvaMT1;1*; **(C)** de la mutante *PvaMT1;1-Q63H* o **(D)** de la mutante *PvaMT1;1-H211A*. Los ovocitos fueron expuestos a distintas concentraciones mM de NH<sub>4</sub>Cl. Corrientes registradas 4-5 días después de la inyección del ARNc.

En el caso de los ovocitos inyectados con la mutante *PvaMT1;1-Q63H*, se observó un canal rectificador entrante de  $g = 94 \pm 2$  pS, así como un canal con una conductancia de  $g = 60 \pm 4$  pS; se observó también una corriente saliente con una conductancia de  $g = 73 \pm 5$  pS, como se detalla en la Tabla 9. Los valores de

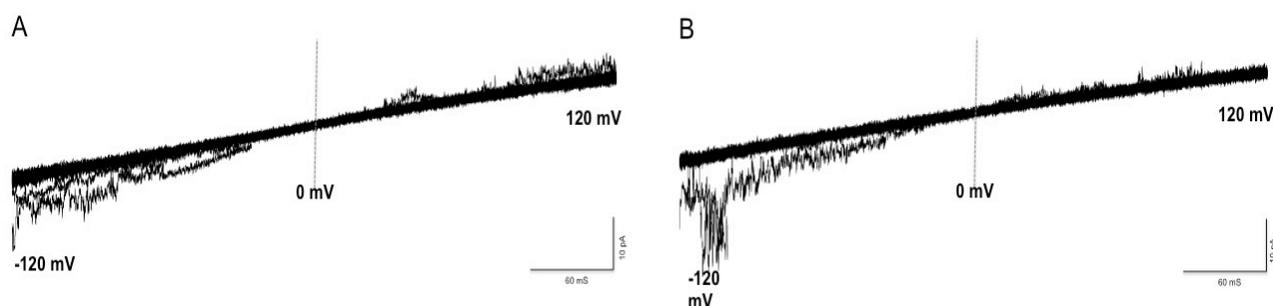
conductancia fueron calculados de al menos tres registros independientes, de al menos 3 ranas distintas.

**Tabla 9. Conductancias calculadas de ovocitos inyectados con la mutante PvAMT1;1-Q63H.**

I entrantes	I salientes
58 ±4 pS	73 ±5 pS
93 ±2 pS	ND

En el caso de la mutante PvAMT1;1-H211A, se realizaron protocolos de rampas como los aplicados para la mutante PvAMT1;1-Q63H. Se observaron canales entrantes con una conductancia de  $g= 132$  pS, la cual correspondería a la apertura de dos canales de  $g= 66$  pS, abiertos simultáneamente. Cabe destacar que en los ovocitos inyectados con las mutantes PvAMT1;1-Q63H y PvAMT1;1-H211A, se observó mayor actividad de corrientes negativas, lo que corresponde a la salida de  $\text{NH}_4^+$  del interior del ovocito (como se ejemplifica en la Fig. 26).

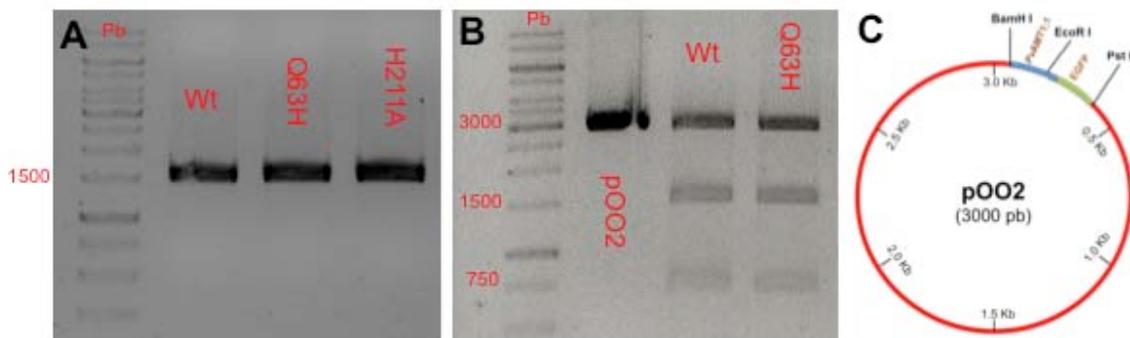
Las conductancias obtenidas para los ovocitos inyectados con el transportador tipo silvestre PvAMT1;1, presentaron conductancias similares a los inyectados con agua-DEPC (datos no mostrados).



**Figura 26. Registros originales de corrientes activadas por rampas de voltaje aplicadas a ovocitos inyectados con la mutante PvAMT1;1-H211A o PvAMT1;1-Q63H.** Actividad de corrientes de canal unitario estimuladas por rampas de voltaje de -120 mV a 120 mV a ovocitos inyectados con la mutante PvAMT1;1-H211A **A**) o la mutante PvAMT1;1-Q63H **B**). Se observa una mayor actividad a potenciales negativos. Registros realizados en la modalidad de parche de membrana con la orientación invertida ("Inside-out"), utilizando  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  30 mM en la pipeta y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  50 mM en el baño, a pH 5.5. Ancho de banda de 5 kHz y frecuencia de muestreo 20 kHz.

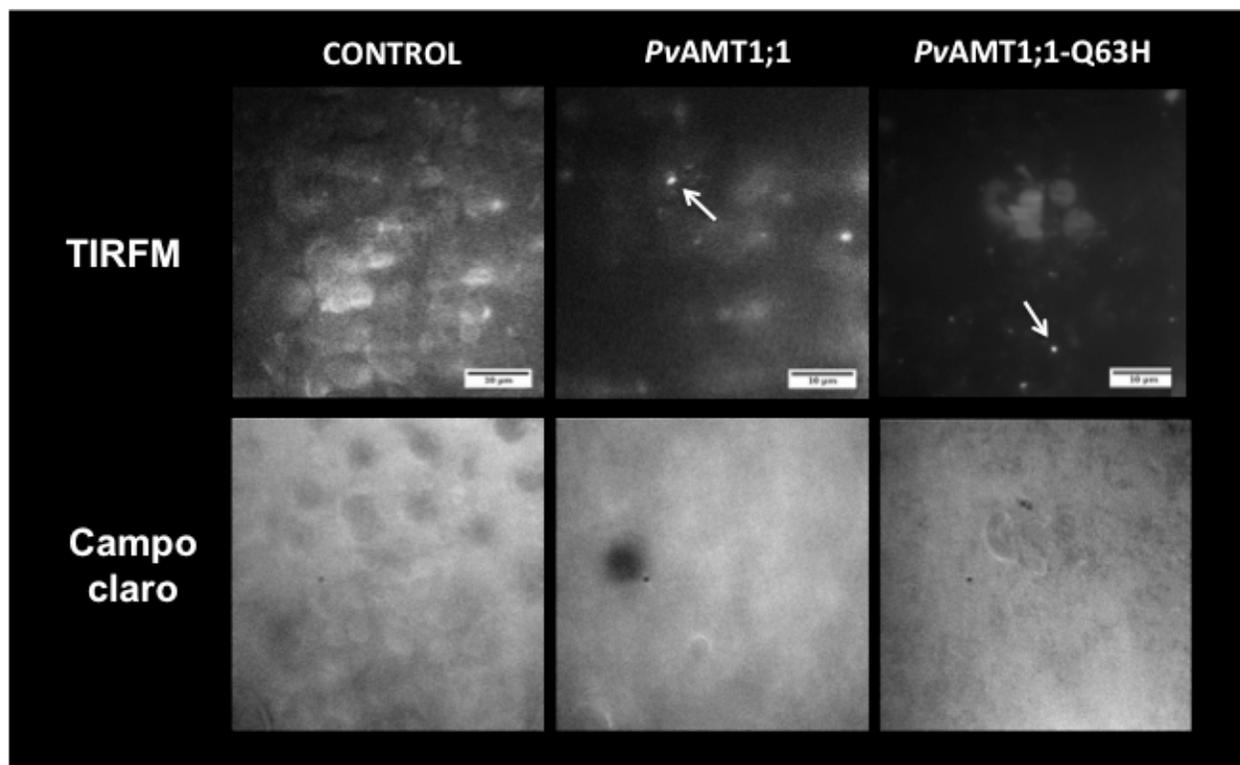
#### VIII.4 Localización de *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H* en ovocitos de *X. laevis*

Para determinar la localización de *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H* en los ovocitos de *X. laevis*, se generaron construcciones del transportador *AMT1;1* de frijol en sus versiones silvestre y mutante fusionadas a la EGFP (Fig. 27).



**Figura 27. Fusiones traduccionales de los genes *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H* a la EGFP. (A)** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para insertar los sitios de restricción *EcoR* I y *Bam*H I; se observa el producto de 1500 pb que corresponde a *PvAMT1;1*. **(B)** Triple digestión para comprobar la correcta inserción del gen de interés; se observan las bandas correspondientes al vector pOO2 (3,000 pb), el gen de *PvAMT1;1* (1503 pb) y el gen de la *EGFP* (750pb). **(C)** Esquema de la construcción en el plásmido pOO2.

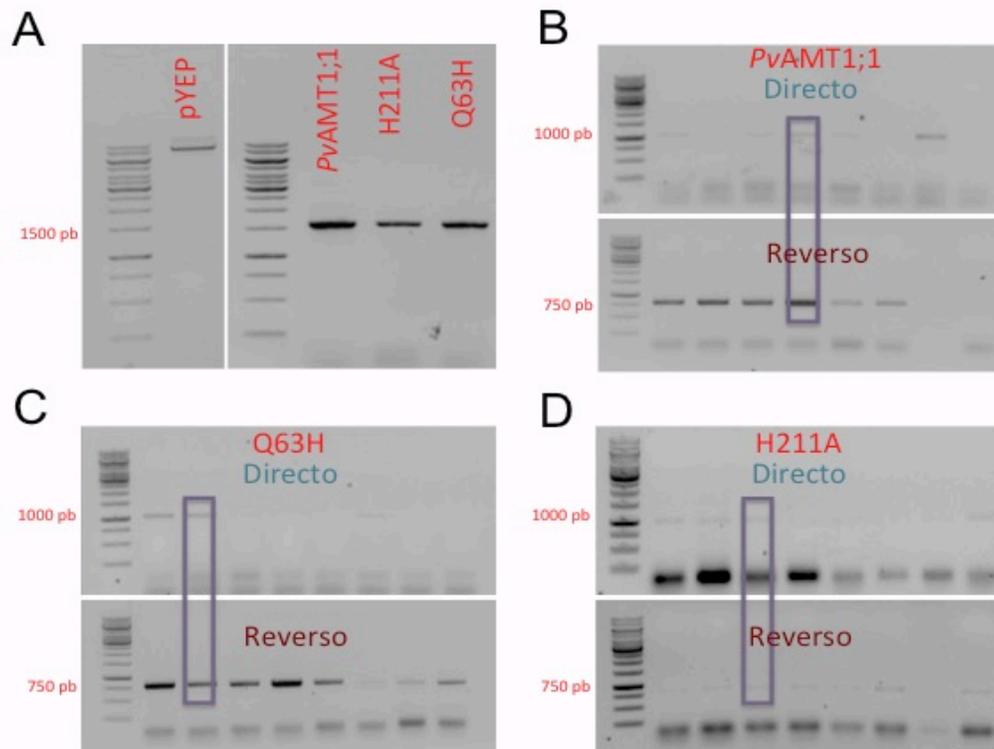
La composición de los ovocitos de *X. laevis* dificulta la obtención de datos de microscopía de alta resolución, debido a esto, para observar la localización de las proteínas de interés, se utilizó la técnica TIRFM (APÉNDICE B). Como se muestra en la Figura 28, los ovocitos de *X. laevis* mostraron autofluorescencia en posibles vesículas cercanas a la membrana plasmática. En el caso de *PvAMT1;1-EGFP* y *PvAMT1;1-Q63H-EGFP*, ambas proteínas se localizaron en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*; donde las partículas fluorescentes correspondientes a las proteínas de interés fusionadas a la EGFP, se observaron como estructuras punteadas. En un parche de membrana, de aproximadamente  $45 \mu\text{m}^2$ , se observaron en promedio 5 de estos puntos, como se observa en el campo TIRF (Fig. 28). El área de membrana que se utilizó para este experimento se muestra mediante microscopía de campo claro (Fig. 28).



**Figura 28.** Localización de *PvAMT1;1-EGFP* y *PvAMT1;1-Q63H-EGFP* en ovocitos de *X. laevis*. Las imágenes se tomaron a un aumento de 100 X con un lente de transferencia de 1.6 X y son representativas de al menos 2 réplicas independientes. Las flechas señalan las proteínas de interés fusionadas a la EGFP. La línea de escala representa 10  $\mu$ M.

### VIII.5 Complementación del crecimiento de la triple mutante *mep1* $\Delta$ , *mep2* $\Delta$ , *mep3* $\Delta$ de *S. cerevisiae*

Para evaluar el efecto que tienen las mutaciones puntuales *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A* en el transporte de  $\text{NH}_4^+$  y su análogo metilado, MeA, se llevaron a cabo ensayos de complementación del crecimiento en *S. cerevisiae*. Para esto, primero se insertaron los genes de interés en el vector de levaduras YEP352 mediante recombinación homóloga *in vivo* (Fig. 29).

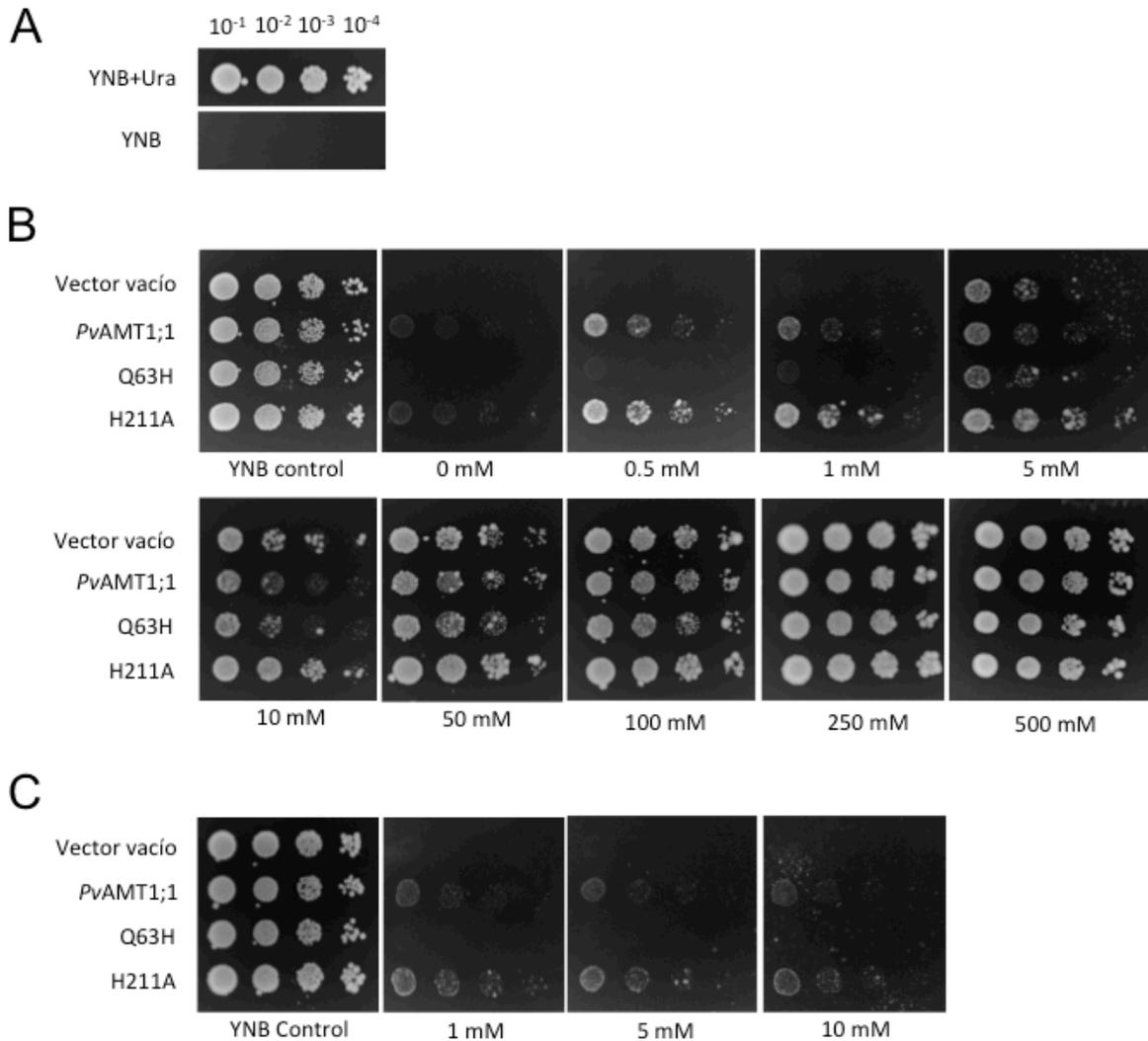


**Figura 29. Comprobación de las construcciones pYEP352::PvAMT1;1, pYEP352::PvAMT1;1-Q63H, pYEP352::PvAMT1;1-H211A. A)** Vector linealizado y genes de interés utilizados para la recombinación homóloga *in vivo*. Las construcciones se comprobaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de colonia; se observan las bandas correspondientes a los oligonucleótidos internos directos (1160 pb) y reversos (780pb), para **B)** PvAMT1;1, **C)** Q63H y **D)** H211A.

Para llevar a cabo estos ensayos, se empleó como fondo la cepa mutante DL1 (*mep1*  $\Delta$ , *mep2*  $\Delta$ , *mep3*  $\Delta$ , *gap1*  $\Delta$ ; Loqué *et al.*, 2007), en la que fueron eliminados los tres genes que codifican para transportadores de  $\text{NH}_4^+$ , Mep1, Mep2 y Mep3 en levadura (Marini *et al.*, 1994 y 1997). La ausencia de estos genes le impide a la cepa DL1 crecer en medios que contengan menos de 1 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Marini *et al.*, 1997), aunque pueden crecer en un medio con uracilo, ya que la cepa es auxótrofa para esta base nitrogenada (Fig. 30A). En medio mínimo estándar (YNB control,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \pm 30\text{mM}$  como fuente de amonio), las levaduras transformadas con los genes de interés mostraron un crecimiento homogéneo (Fig. 30 YNB Control). Al agregar al medio de cultivo diferentes concentraciones de amonio, se observó que la inserción del gen PvAMT1;1 y de la versión mutada

*PvAMT1;1-H211A*, restauraron el crecimiento de las levaduras, presentando la mutante un mejor crecimiento en bajas concentraciones de amonio (Fig. 30B). Por su parte, la mutante *PvAMT1;1-Q63H* se comportó muy parecido al vector vacío, ya que sólo se observó el crecimiento de la levadura a partir de concentraciones de amonio  $\geq 5$  mM (Fig. 30B). Se observó también que las levaduras transformadas con el vector vacío, *PvAMT1;1* tipo silvestre, y ambas mutantes, crecieron mejor conforme se aumentó la concentración de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , no llegando a ser tóxico incluso a concentraciones tan altas como 500 mM (Fig. 30B).

Debido a que *PvAMT1;1* transporta también MeA (Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011), se realizaron ensayos de crecimiento utilizando como única fuente de amonio MeA, con la finalidad de probar si las mutantes puntuales mantenían la capacidad de transportarlo. Se observó que a bajas concentraciones de MeA, tanto *PvAMT1;1* como *PvAMT1;1-H211A* restablecieron el crecimiento de la levadura, y nuevamente la mutante *PvAMT1;1-H211A* exhibió un crecimiento mayor que la tipo silvestre (Fig. 30C). En el caso de la mutante *PvAMT1;1-Q63H* no se observó crecimiento, al igual que en la cepa transformada con el vector vacío. Es importante mencionar que a diferencia de lo observado con  $\text{NH}_4^+$ , el crecimiento de las levaduras se vio inhibido a concentraciones altas de MeA ( $\geq 5$  mM), debido al efecto tóxico de este compuesto (Fig. 30C).



**Figura 30. Ensayos de complementación del crecimiento de la cepa de levadura DL1 por la expresión de *PvAMT1;1*, y las mutantes *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*. A) Auxotrofia de la Cepa 3ΔMep al uracilo. B) Ensayo de complementación del crecimiento realizado a distintas concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl. C) Ensayo de complementación del crecimiento utilizando MeA como única fuente de amonio. Imagen representativa de al menos 3 réplicas independientes. En los ensayos se utilizaron diluciones 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> y 10<sup>-4</sup> respectivamente.**

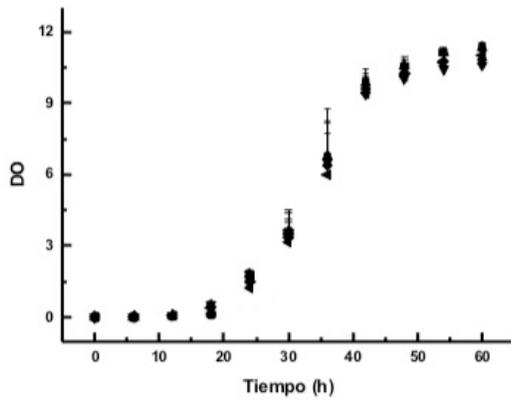
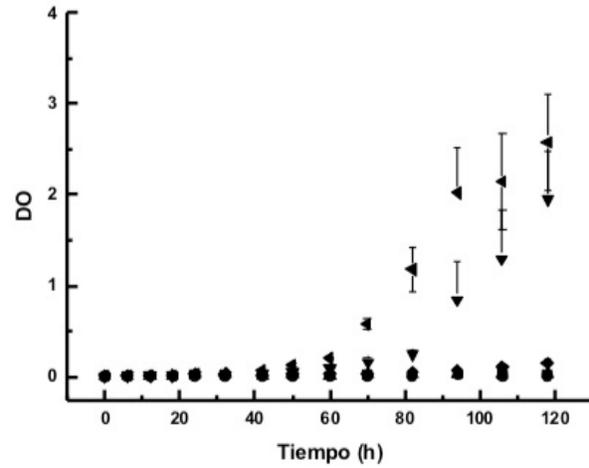
Para determinar la eficiencia de transporte y corroborar la complementación de la cepa DL1, por las diferentes versiones del transportador de amonio *PvAMT1;1* evaluadas en este estudio, se realizó una cinética de crecimiento en medio líquido, debido a que este ensayo es más sensible que los realizados en medio sólido, ya que se puede calcular el tiempo de duplicación, al cuantificar la densidad óptica del cultivo. En este ensayo se evaluaron dos condiciones, primero se utilizó medio

mínimo estándar para levaduras (YNB,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 \pm 30\text{mM}$  como fuente de amonio) como control, ya que en los experimentos en placa se observó que la cepa mutante transformada con los genes de interés presentan un crecimiento homogéneo (Fig. 30B YNB-Control). En esta condición, se observó que el crecimiento de las levaduras inició la fase exponencial después de 12 h y entraron a fase estacionaria a las 45 h (Fig. 31A). Los tiempo de duplicación calculados (Roth, 2006) para cada una de las cepas fueron muy similares, como se detalla en la Tabla 10.

También se evaluó la capacidad de transporte en bajas concentraciones de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5 mM). En este ensayo observó que la fase exponencial inició en distintos tiempos para cada cepa. En el caso de *PvAMT1;1* esta fase comenzó a partir de las 60 h, mientras que inició a las 40 h para la mutante *PvAMT1;1-H211A* y para la mutante *PvAMT1;1-Q63H*, lo mismo que para el vector vacío no se observa crecimiento en estas condiciones (Fig. 31B).

**Tabla 10. Tiempos de duplicación del crecimiento calculados para las cepas de *S. cerevisiae* expresando el transportador *PvAMT1;1* y sus mutantes H211A o Q63H.**

Cepa	Tiempo de duplicación
Vector vacío	17.07 h
<i>PvAMT1;1</i>	17.35 h
<i>PvAMT1;1-Q63H</i>	16.8 h
<i>PvAMT1;1-H211A</i>	17.4 h

**A****B**

**Figura 31. Cinéticas de crecimiento de la cepa de levadura DL1 expresando *PvAMT1;1* tipo silvestre, y las mutantes *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*. A) Cinética de crecimiento realizada con medio mínimo estándar para levaduras. B) Cinética de crecimiento realizada en presencia de 0.5 mM de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . ●= vector vacío, ▼= *PvAMT1;1*, ◆= *PvAMT1;1-Q63H* y ◀= *PvAMT1;1-H211A*. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 réplicas independientes.**

## IX. DISCUSIÓN

### IX.1 Efecto de las mutaciones puntuales en la estructura de *PvAMT1;1*

Las proteínas de la familia AMT/MEP/Rh presentan aminoácidos conservados en posiciones que probablemente son importantes para la función del transportador (Khademi *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2005). Modificaciones en estos residuos por aminoácidos que presentan propiedades distintas resultan en cambios que afectan o modifican dicho transporte (Khademi *et al.*, 2004, Loqué *et al.*, 2009, Javelle *et al.*, 2006, Hall & Kustu, 2011, Ortiz-Ramírez *et al.*, 2011, Pantoja, 2012).

El análisis que se realizó en este trabajo, sobre la identificación de posibles cambios en la estructura del transportador de amonio *PvAMT1;1* por medio del modelaje por homología, demostró que al simular la mutación H211A, existe la posibilidad de la formación de un puente de hidrógeno entre la Ala 211 y la Gly 206 (Fig. 18), esta interacción podría evitar que la Ala 211 lleve a cabo la desprotonación del amonio, afectando su función. En *EcAmtB*, los residuos correspondientes al par de His que se sugiere participan en la desprotonación del amonio son H168 y H318, al realizar la sustitución de estos residuos por diversos aminoácidos, incluyendo la mutación H168A (homóloga a H211A en frijol), se observó que la localización y estabilidad de la proteína no se vio afectada, sin embargo estas no fueron activas, siendo la excepción H168E que fue parcialmente activa. Esto indica que las alteraciones en la función del transportador se deben a un efecto directo en el sitio de sustitución y no a un cambio en el poro o la estructura general de la proteína. Al utilizar la densidad residual de los electrones como indicador de cambios en el poro y su superficie, se observó que sólo la mutante H168E mantiene un patrón similar a la proteína nativa, ya que la cadena lateral del Glu puede realizar interacciones similares a las existentes para la His, lo que sugiere que la actividad de la proteína depende de una combinación de propiedades espaciales y químicas específicas del poro (Javelle *et al.*, 2008). Sin embargo, en el caso del transportador AMT1;1 de frijol, las mutaciones en el

residuo homólogo a H168 de *E. coli*, H211A y H211E, fueron funcionales pero modificaron la función de la proteína, haciendo al mecanismo independiente de pH y disminuyendo su afinidad por el amonio (Ortíz-Ramírez *et al.*, 2011). En el caso de la mutante H211A también se observó un mayor transporte de amonio (Fig. 10). El transporte eficiente del sustrato podría requerir un poro estrecho principalmente hidrofóbico, con algunas funciones mayormente orientadas a aceptores o donadores de puentes de hidrógeno, para la estabilización de las interacciones con el agua/amoniaco, lo que permitiría una rápida difusión (Javelle *et al.*, 2008). Accardi y colaboradores (Accardi *et al.*, 2006) reportaron en el intercambiador  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  de *E. coli* (CIC-ec1), que las sustituciones T445A y T445S, causaron la desestabilización de la unión del  $\text{Cl}^-$ , por lo que se suprimió la unión de  $\text{H}^+$ , afectando el acoplamiento de  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ . Como se mencionó anteriormente, este desacople del co-transporte puede observarse en las mutantes H211A y Q63H de frijol (Figs. 10 y 11); en el caso del residuo H211, el cual se sugiere participa en la desprotonación del  $\text{NH}_4^+$  (Khademi *et al.*, 2004, Andrade *et al.*, 2005), el cambio en la cadena lateral que produce la sustitución de His por Ala, podría ser responsable del cambio en la función de este residuo, resultando en el desacople del antiporte que exhibe esta mutante.

Con respecto a la mutante Q63H, a nivel estructural no se observaron cambios, sin embargo, a nivel molecular se observó que esta mutación puede anular la interacción entre Q63 (localizado en la hélice transmembranal I) y la A139 de la hélice transmembranal III de PvAMT1;1 tipo silvestre (Fig. 17), lo que podría estar afectando el mecanismo de transporte. En *Arabidopsis thaliana*, Loqué y colaboradores (Loqué *et al.*, 2009), reportaron que los residuos Gln-57, Phe-60, localizados en la hélice transmembranal I, así como los residuos Ile-136, Ala-137 y Ala-138, localizados en la hélice transmembranal III, son importantes para la función del transportador AtAMT1;1. Por lo tanto, la mutación Q63H podría influir indirectamente sobre residuos localizados en el poro, el cual está conformado por las hélices transmembranales III, V, VI y X (Andrade *et al.*, 2005), causando el cambio en las propiedades de transporte que exhibe esta mutante (Fig. 11). Por

otra parte, la Gln es un aminoácido sin carga, mientras que la His debido a su pKa puede cambiar su carga total en respuesta a variaciones en el pH, lo que podría causar el desacople del mecanismo de simporte que presenta esta mutante (Fig. 11). Cabe destacar que en *AtAMT1;1*, la mutación Q57H mostró una mayor actividad de este transportador (Loqué *et al.*, 2009), muy similar a lo que se observa para la mutante Q63H en frijol (Fig. 11).

## **IX.2 Transporte endógeno de amonio en los ovocitos de *X. laevis***

Los ovocitos de *X. laevis* como sistema heterólogo de expresión son ampliamente utilizados, mayormente en el campo de la electrofisiología; sin embargo, no existen muchos reportes que caractericen a nivel de canal unitario los canales presentes en su membrana plasmática. Por lo tanto, en el presente estudio se caracterizó el transporte endógeno de amonio en este sistema y se observó, que estos presentan un canal endógeno de amonio con rectificación entrante, que exhibe una conductancia de  $g = 96$  pS y es regulado por el pH extracelular. Existen también canales que transportan amonio y que no presentan rectificación, con una conductancia calculada de  $g = 78$  pS. Además, se observó que el amonio puede permear por posibles canales de potasio que presentaron una rectificación entrante de  $g = 64$  pS, lo que concuerda con lo reportado a nivel de corrientes macroscópicas en este sistema (Cougnon *et al.*, 1996). La presencia de este transporte endógeno de amonio podría interferir en la identificación de la actividad de canal unitario de las mutantes, complicándose más, debido a que el único parámetro confiable caracterizado fue el valor de conductancia, ya que debido a la baja actividad que presentan estos canales, otros parámetros que permiten su caracterización como son la probabilidad de apertura y el tiempo de permanencia, no pudieron ser calculados. De tal manera, para identificar la actividad de canal unitario en las mutantes, su conductancia debería ser distinta de la calculada para los endógenos.

Los intentos realizados para obtener registros de canal unitario que pudiesen apoyar la hipótesis de que las mutantes puntuales *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-*

H211A funcionan como canales, no fueron exitosos, ya que los análisis de canal unitario arrojaron valores de conductancia muy similares a los obtenidos para los ovocitos control. Sin embargo, se observó en la membrana de los ovocitos que expresaron a las mutantes puntuales de interés, una mayor actividad de canal unitario a potenciales negativos, lo que indica una mayor actividad de transporte de  $\text{NH}_4^+$  del interior hacia el exterior del ovocito, por lo tanto, es posible que estas mutantes presenten actividad de canal unitario en la dirección opuesta con una conductancia muy baja, que no fue posible calcular mediante el análisis de rampas utilizado. También existe la posibilidad de que la aparente ausencia de actividad de canal unitario en los ovocitos que expresaron a las mutantes Q63H y H211A se deba a que la probabilidad de realizar un parche de membrana que contenga la proteína de interés es muy baja, como se discute a continuación.

### **IX.3 Localización de *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H* en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis***

Mediante fusiones a la proteína verde fluorescente (EGFP), se observó que *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H*, se localizaron en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis* (Fig. 28), lo que concuerda con lo reportado para otros *AMT1;1* de plantas (Mayer *et al.*, 2006, Bu *et al.*, 2013, Ranathunge *et al.*, 2014). Estas observaciones mostraron que *PvAMT1;1* y *PvAMT1;1-Q63H*, se distribuyeron de manera punteada en la membrana plasmática, dando la impresión de que las proteínas se encontraban agregadas en estos puntos, sin embargo, no fue posible determinar si estas correspondían a grupos de proteínas o proteínas individuales, ya que el método experimental utilizado no permitió discriminar entre estas dos posibilidades. Tomando en cuenta que el diámetro de la micropipeta de "Patch-Clamp" es de 1.2-2  $\mu\text{m}$ , y que en un espacio de membrana de 45  $\mu\text{m}^2$ , se observan en promedio cinco partículas asociadas a los transportadores de amonio, la probabilidad de obtener un parche de membrana que contenga la proteína de interés es muy baja, lo que podría explicar la dificultad de registrar la actividad de canal unitario de las mutantes puntuales de *PvAMT1;1*. Por otro lado,

si los canales endógenos de amonio propios del ovocito, presentan una distribución similar en la membrana, esto también podría explicar la baja actividad observada de estos canales.

#### **IX.4 Actividad de transporte de $\text{NH}_4^+$ de *PvAMT1;1* y sus mutantes en levaduras**

Los ensayos de complementación del crecimiento, tanto en medio sólido como líquido, demostraron que la mutante *PvAMT1;1*-H211A presenta una mayor efectividad en el transporte de  $\text{NH}_4^+$ , ya que permitió el crecimiento de las levaduras en bajas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , inclusive mejor que *PvAMT1;1*, lo que sugiere una mayor capacidad de absorción por esta mutante (Fig. 30B), actividad que concuerda con lo descrito en su caracterización mediante TEVC (Fig. 10). En el caso de la mutante *PvAMT1;1*-Q63H, se observó que también fue capaz de transportar amonio, no obstante, el fenotipo de esta mutante fue muy parecido al de la levaduras transformadas con el vector vacío (Fig. 30B), por lo que no es posible concluir si esta mutación modifica el transporte de  $\text{NH}_4^+$ , o si la ausencia de fenotipo es porque esta mutante está siendo retenida intracelularmente y no se expresa en la membrana plasmática de las levaduras. Las levaduras no mostraron toxicidad a altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ , teniendo incluso, un mejor crecimiento conforme se aumentaron las concentraciones en el medio (Fig. 30B), lo que indicaría que este ion no es tóxico para el sistema o que probablemente se estén activando otras respuestas celulares para aliviar esta toxicidad.

En estudios previos del transportador *AtAMT1;1* se estudió la mutante Q57H, la cual es homóloga a la mutante Q63H del frijol y, como se demostró mediante su caracterización electrofisiológica, estas mutantes presentan propiedades similares. Sin embargo, al expresarla en el sistema heterólogo de *S. cerevisiae*, la mutante *AtAMT1;1*-Q57H por arriba de 20 mM de  $\text{NH}_4^+$  mostró un efecto tóxico en las levaduras, el cual fue más severo a concentraciones más altas, lo que sugiere que

esta mutante presenta un mayor transporte de amonio (Loqué *et al.*, 2009). Esto difiere de lo observado para la mutante Q63H de frijol en este sistema, ya que en este caso, en altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  se observó incluso un mejor crecimiento. No obstante, como se mencionó anteriormente, es posible que la proteína este siendo retenida intracelularmente, por lo que no sería posible observar este fenotipo.

A pesar de no haber logrado obtener actividad de canal unitario específica de las mutantes, es probable que al menos la mutante *PvAMT1;1-H211A* pueda funcionar como canal, como lo sugieren los análisis de modelado por homología y los ensayos con levaduras.

## X. CONCLUSIONES

Es posible que las mutaciones puntuales *PvAMT1;1-Q63H* y *PvAMT1;1-H211A*, puedan estar involucradas en el desacople del mecanismo de simporte del transportador, específicamente por la eliminación y formación de puentes de hidrógeno entre His63 con Ala139 y Ala211 con Gly206, respectivamente.

Los ovocitos de *X. laevis*, presentan en su membrana plasmática un canal endógeno rectificador entrante de amonio, con una conductancia de  $g= 96$  pS, que se regula por pH. Así como un canal no rectificante que permea amonio, con una conductancia de  $g= 78$  pS.

El amonio también permea al interior de los ovocitos de *X. laevis*, a través de posibles canales de potasio, los cuales presentan una conductancia de  $g= 64$  pS.

El transportador *PvAMT1;1*, así como la mutante *PvAMT1;1-Q63H*, se observaron como estructuras punteadas localizadas en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*.

La mutación H211A de *PvAMT1;1* confiere una mayor capacidad de absorción de  $\text{NH}_4^+$  y MeA al sistema heterólogo de levadura.

## XI. PERSPECTIVAS

Realizar registros de canal unitario de las mutantes, mediante “Patch-Clamp” acoplado a microscopía de fluorescencia, con el fin de asegurar que el parche de membrana utilizado contenga la proteína de interés.

Utilizar un sistema heterólogo de expresión alternativo, como son las células CHO, HEK, para reducir la superficie de la célula, y aumentar la probabilidad de obtener un parche de membrana con las proteínas de interés.

Realizar análisis de ruido de los registros de las mutantes *PvAMT1;1-H211A* y *PvAMT1;1-Q63H*, lo que nos permitiría calcular la conductancia de estos posibles canales aunque su valor de *g* sea muy pequeño.

Realizar análisis de fotoblanqueo utilizando TIRFM, para determinar la estequiometría de las partículas asociadas a *PvAMT1;1* tipo silvestre y la mutante *PvAMT1;1-Q63H*, en la membrana plasmática de los ovocitos de *X. laevis*.

Observar la localización de las mutantes H211A y Q63H, en el sistema de *S. cerevisiae* mediante fusiones a la proteína verde fluorescente (GFP), con el fin de comprobar si se están expresando correctamente en la membrana plasmática de las levaduras.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

- Accardi A, Lobet S, Williams C, Miller C, Dutzler R, (2006), Synergism between halide binding and proton transport in a CLC-type exchanger. *Journal of Molecular Biology*; 362: 691–699.
- Accardi A, Picollo A, (2010), CLC channels and transporters: proteins with borderline personalities. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1798(8): 1457–1464.
- Andrade SLA, Dickmanns A, Ficner R, Einsle O, (2005), Crystal structure of the archaeal ammonium transporter Amt-1 from *Archaeoglobus fulgidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 102: 14994–14999.
- Ashcroft F, Gadsby D, Miller C, (2009), Introduction. The blurred boundary between channels and transporters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*; 364(1514): 145–147.
- Bergsdorf EY, Zdebik AA, Jentsch TJ, (2009), Residues Important for Nitrate/Proton Coupling in Plant and mammalian CLC Transporters. *The Journal of Biological Chemistry*; 284(17): 11184–11193.
- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL, (1992), Root Respiration Associated with Ammonium and Nitrate Absorption and Assimilation by Barley. *Plant Physiology*; 99(4): 1294–1301.
- Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, *et al.* (2003) Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. *Plant Soil*; 252: 55–128.
- Bu Y, Sun B, Zhou A, Zhang X, Lee I, Liu S, (2013), Identification and Characterization of a *PutAMT1;1* Gene from *Puccinellia tenuiflora*. *PLoS ONE*; 8(12): e83111.
- Cougnon M, Bouyer P, Hulin P, Anagnostopoulos T, Planelles G, (1996), Further investigation of ionic diffusive properties and of  $\text{NH}_4^+$  pathways in *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*; 431:(4): 658-667.

- DeFelice LJ, Goswami T, (2007), Transporters as channels. *The Annual Review of Physiology*; 69: 87–112.
- Dutzler R, (2006), The structural basis of ClC chloride channel function. *Trends in Neuroscience and Education*; 27(6): 315-320.
- Dubois E, Grenson M, (1979), Methylamine/ammonia uptake systems in *Saccharomyces cerevisiae*: multiplicity and regulation. *Molecular and General Genetics*; 175(1):67-76.
- Forde B., Clarkson D, (1999), Nitrate and ammonium nutrition of plants: physiological and molecular perspectives. *Advances in Botanical Research*; 30: 2-90.
- Gazzarrini S, Lejay L, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, Wiréna N, (1999), Three Functional Transporters for Constitutive, Diurnally Regulated, and Starvation-Induced Uptake of Ammonium into *Arabidopsis* Roots. *The Plant Cell*; 11: 937–947.
- Gepts P, Aragao FL, DeBarros E, Blair MW, Brondani R, Broughton W, Galasso I, Hernandez G, Kami J, Lariguet P, (2008), Genomics of *Phaseolus* Beans, a Major Source of Dietary Protein and Micronutrients in the Tropics. In: *Genomics of Tropical Crop Plants*. Moore PH, Ming R, editor. Philadelphia, Springer; pp. 113–143.
- Graham PH, Vance CP, (2003), Legumes: Importance and Constraints to Greater Use. *Plant Physiology*; 131: 872–877.
- Guex N, Peitsch MC, (1997), SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*; 18: 2714-2723.
- Hall JA, Kustu S, (2011), The pivotal twin histidines and aromatic triad of the *Escherichia coli* ammonium channel AmtB can be replaced. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 108: 13270–13274.
- Heldt H, (2005), *Plant Biochemistry*, third edition. Elsevier Academic Press. California.

- Holm LM, Jahn TP, Moller AL, Schjoerring JK, Ferri D, Klaerke DA, Zeuthen T, (2005), NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*; 450: 415–428.
- Howitt SM, Udvardi MK, (2000), Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*; 1465: 152-170.
- Javelle A, Lupo D, Ripoche P, Fulford T, Merrick M, Winkler FK, (2008), Substrate binding, deprotonation, and selectivity at the periplasmic entrance of the *Escherichia coli* ammonia channel AmtB. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 105: 5040–5045.
- Kaiser C, Michaelis S, Mitchell A, (1994), *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Khademi S, O'Connell J, Remis J, Robles-Colmenares Y, Miercke LJW, Stroud RM, (2004), Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: structure of AmtB at 1.35 Å. *Science*; 305: 1587–1594.
- Krogh A, Larsson B, Heijne GV, Sonnhammer EL, (2001), Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*; 305(3): 567–580.
- Ksenzhek OS, Volkov AG, (1998), *Plant Energetics*, Academic Press, San Diego, CA.
- Lacerda AE, Perez-Reyes E, Wei X, Castellano A, Brown AM, (1994), T-type and N-type calcium channels of *Xenopus oocytes*: evidence for specific interactions with beta subunits. *Biophysical Journal*; 66(6): 1833–1843.
- Loqué D, Lalonde S, Looger LL, VonWirén N, Frommer WB, (2007), A cytosolic *trans*-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*; 446: 195–198.
- Loqué D, Mora SI, Andrade SLA, Pantoja O, and Frommer WB, (2009), Pore Mutations in Ammonium Transporter AMT1 with Increased Electrogenic Ammonium Transport Activity. *The Journal of Biological Chemistry*; 284(37): 24988–24995.

- Ludewig U, Wirén NV, Frommer WB, (2002), Uniport of  $\text{NH}_4^+$  by the Root Hair Plasma Membrane Ammonium Transporter *LeAMT1;1*. The Journal of Biological Chemistry; 277(16): 13548–13555.
- Ludewig U, Wirén NV, Rentsch D, Frommer WB, (2001), Rhesus factors and ammonium: a function in efflux?. Genome Biology. 2(3):reviews1010.
- Ludewig U, Wilken S, Wu B, Jost W, Obrdlik P, El Bakkoury M, Marini AM, André B, Hamacher T, Boles E, von Wirén N, Frommer WB, (2003), Homo- and hetero-oligomerization of ammonium transporter-1  $\text{NH}_4^+$  uniporters. The Journal of Biological Chemistry; 278: 45603–45610.
- Marini AM, Vissers S, Urrestarazu A, and André B, (1994), Cloning and expression of the MEP1 gene encoding a transporter of ammonium in *Saccharomyces cerevisiae*. The EMBO Journal; 13: 3456–3463.
- Marini AM, Soussi-Boudekou S, Vissers S, André B, (1997), A family of ammonium transporters in *saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology; 17(8): 4282–4293.
- Mattheyses AL, Simon SM, Rappoport JZ, (2010), Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist. Journal of Cell Science; 123: 3621-3628.
- Mayer M, Dynowski M, Ludewig U, (2006), Ammonium ion transport by the AMT/Rh homologue *LeAMT1;1*. Biochemical Journal; 396: 431–437.
- Nicholls DG, Ferguson SJ, (1992), Bionergetics 2. London; San Diego: Academic Press.
- Nielsen M, Lundegaard C, Lund O, Petersen TN, (2010), CPHmodels-3.0--remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. Nucleic Acids Research; 38:W576-W581.
- Ninnemann O, Jauniauxl JC, Frommer WB, (1994), Identification of a high affinity  $\text{NH}_4^+$  transporter from plants. The EMBO Journal; 13(15): 3464-3471.
- Newton WE, (2000), Nitrogen fixation in perspective. In: Pedrosa FO, Hungria M, Yates MG, Newton WE, editors. Nitrogen fixation: From molecules to crop productivity. Dordrecht: Kluwer; pp. 3–8.

- Ortíz, Carlos Humberto. Análisis del Mecanismo de Activación por Protones del Transportador *PvAMT1;1* del Frijol. México 2010. Tesis presentada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.
- Ortíz-Ramírez C, Mora SI, Trejo J, Pantoja O, (2011), *PvAMT1;1*, a highly selective ammonium transporter that functions as H<sup>+</sup> /NH<sub>4</sub><sup>+</sup> symporter. *The Journal of Biological Chemistry*; 286: 31113–31122.
- Pantoja O, (2012), High affinity ammonium transporters: molecular mechanism of action. *Frontiers in plant science*; 3: 24.
- Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch SG, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE, (2004), UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Computational Chemistry*; 25: 1605–1612.
- Ranathunge K, El-kereamy A, Gidda S, Bi Y-M, Rothstein SJ, (2014), *AMT1;1* transgenic rice plants with enhanced NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability show superior growth and higher yield under optimal and suboptimal NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conditions. *Journal of Experimental Botany*; 65(4): 965–979.
- Reifarth FW, Amasheh S, Clauss W, Weber WM, (1997), The Ca<sup>2+</sup>-inactivated Cl<sup>-</sup> Channel at Work: Selectivity, Blocker Kinetics and Transport Visualization. *The Journal of Membrane Biology*; 155: 95–104.
- Roth V. 2006 <http://www.doubling-time.com/compute.php>
- Rotzschke O, Lau JM, Hofstatter M, Falk K, Strominger JL, (2002), A pH-sensitive histidine residue as control element for ligand release from HLA-DR molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 99(26): 16946–16950.
- Rudy B, Iverson L, (1992), Expression of ion channels in *Xenopus oocytes*. *Methods in Enzymology*. Volume 207 ION CHANNELS (Section IIA). eds. Academic Press. pp 225-390.
- Schachtman DP, Schroeder JI, Lucas WJ, Anderson JA, Gaber RF, (1992), Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science*; 258: 1654–1658.

- Sogaard R, Alsterfjord M, MacAulay N, Zeuthen T, (2009), Ammonium ion transport by the AMT/Rh homolog *TaAMT1;1* is stimulated by acidic pH. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*; 458(4):733-43.
- Szczerba MW, Britto DT, Ali SA, Balkos KD, Kronzucker HJ, (2008),  $\text{NH}_4^+$ -stimulated and -inhibited components of  $\text{K}^+$  transport in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*; 59(12): 3415–3423.
- Udvardi MK, Day DA, (1997), Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*; 48: 493-523.
- Wang MY, Glass A, Shaff JE, Kochian LV, (1994), Ammonium Uptake by Rice Roots. *Plant Physiol.* 104, 899–906.
- Weber W-M, (1999), Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochim Biophys Acta*; 1421:213–233.
- Wirén N, Merrick M, (2004), Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics in Current Genetics*; 9: 95-120.
- Wood CC, Poreé F, Dreyer I, Koehler GJ, Udvardi MK, (2006), Mechanisms of ammonium transport, accumulation, and retention in oocytes and yeast cells expressing Arabidopsis *AtAMT1;1*. *FEBS Letters*; 580(16): 3931-3936.
- Zdebick AA, Zifarelli G, Bergsdorf EY, Soliani P, Scheel O, Jentsch TJ, Pusch M, (2008), Determinants of anion-proton coupling in mammalian endosomal CIC proteins. *The Journal of Biological Chemistry*; 2008; 283(7): 4219-4227.
- Zheng L, Kostrewa D, Bernéche S, Winkler FK, and Li X-D, (2004), The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 101(49): 17090–17095.
- Yang XC, Sachs F, (1990), Characterization of stretch-activated ion channels in *xenopus oocytes*. *Journal of Physiology*; 431:103-122.
- Yuan L, Loqué D, Kojima S, Rauch S, Ishiyama K, Inoue E, Takahashi H, von Wirén N, (2007), The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Depends on the Spatial Arrangement and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters. *Plant Cell*; 19: 2636–2652.

## APENDICE A

### Geles de agarosa al 1% conteniendo formaldehído

1g Agarosa

70 mL de agua libre de nucleasas tratada con DEPC (dietil pirocarbonato)

20 mL de formaldehído

10 mL de MOPS 10X

Buffer de corrida: MOPS 1X.

El gel se pre-corre durante 20 min a 100 V antes de cargar las muestras.

Por cada  $\mu\text{L}$  de muestra de ARN se agregaron 9  $\mu\text{L}$  de Buffer de carga.

### Soluciones

- MOPS 10X: 200 mM MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid], 50 mM de acetato de sodio, 10 mM de EDTA, pH 7.0 ajustado con NaOH concentrado.
- Buffer de carga: 5  $\mu\text{L}$  de formamida, 1  $\mu\text{L}$  de MOPS 10x, 2  $\mu\text{L}$  formaldehído, 1  $\mu\text{L}$  Buffer de carga II (proporcionado en el paquete mMessage mMachine, Ambion 2130, Woodward St. Austin TX USA) y 10 mg/mL de Bromuro de Etidio.

## APÉNDICE B

### Microscopía de la Reflexión Interna Total de la Fluorescencia (TIRFM)

La microscopía tipo TIRF es una técnica altamente sensible que puede ser usada en una gran variedad de superficies celulares. Esta técnica explota las propiedades únicas de inducir una onda evanescente en una región limitada de una muestra, la cual se encuentra inmediatamente adyacente a la interfaz entre dos medios con índices de refracción distintos, por lo que restringe la detección y excitación de fluoróforos que se encuentran en o muy cercanas a la membrana celular (30-100 nm) y elimina la fluorescencia de fondo. Esta técnica también permite mejorar la relación señal-ruido, y por lo tanto, la resolución espacial de los eventos de interés.

Para realizar esta técnica, se requieren dos medios ópticos con índices de refracción diferentes, como es el vidrio ( $n=1.518$ ) y el agua ( $n=1.333$ ). Cuando el haz de luz incide en una interfaz entre el medio en el cual está viajando y en un medio de índice de refracción menor, parte del haz es refractado y parte es reflejado. La proporción relativa de la luz refractada y reflejada, depende del ángulo de incidencia ( $\theta$ , ángulo en el que el haz golpea la interface). Como el ángulo de incidencia aumenta, la cantidad de luz reflejada también se incrementa. Una vez que el ángulo de incidencia excede el ángulo conocido como, ángulo crítico ( $\theta_c$ ), toda la luz es reflejada. Esto se conoce como reflexión total interna.

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

Donde:

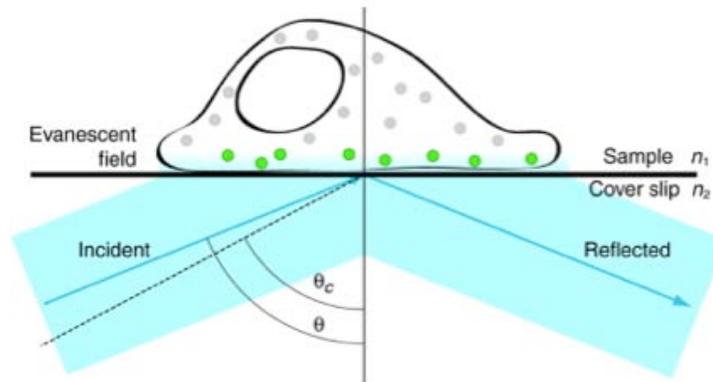
$\theta_c$ = Ángulo crítico

$n_1$ =Índice de refracción del primer medio (ej. vidrio)

$n_2$ = Índice de refracción del segundo medio (ej. agua)

Cuando la luz es totalmente reflejada internamente, parte de la energía incidente genera un pequeño campo electromagnético, que penetra al segundo medio. La

intensidad de este campo disminuye exponencialmente en medida que se aleja de la interfaz, y como tal es llamado campo evanescente. El campo evanescente retiene la frecuencia de la incidencia de la luz y es capaz de excitar fluoróforos dentro de aproximadamente 100 nm del cubre-objetos. La profundidad exacta de penetración depende de la longitud de onda de la incidencia de la luz y del ángulo de incidencia. La profundidad disminuye mientras el ángulo de incidencia aumenta y la longitud de onda de la luz disminuye. Como el campo evanescente sólo excita fluoróforos con una distancia excepcionalmente pequeña del cubre-objetos, nos brinda una sección óptica muy delgada que elimina la fluorescencia de fondo.



**Bases de la microscopía tipo TIRF.** El haz de excitación entra por la izquierda con un ángulo de incidencia ( $\theta$ ) que es mayor que el del ángulo crítico ( $\theta_c$ , líneas punteadas). El haz de excitación es reflejado del cubre-objetos a la interfaz de la muestra, y el campo evanescente es generado en el lado contrario de la interfaz, en la muestra. Sólo los fluoróforos en el campo evanescente son excitados (partículas verdes). Tomado de Mattheyses *et al.*, 2010.

[http://www.nikon.com/products/instruments/bioscience-applications/application-notes/pdf/nikon\\_note\\_10\\_LR.pdf](http://www.nikon.com/products/instruments/bioscience-applications/application-notes/pdf/nikon_note_10_LR.pdf)

## APENDICE C

### TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS CON LiAC

- 1) Iniciar un pre cultivo en matraz de 250 mL con 5 mL de YPD “Yeast Extract Peptone Dextrose” (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, ajustado a pH 5.5 con HCl), dejar toda la noche a 30 °C en agitación.
- 2) Agregar 50 mL de YPD por cada 5 mL de cultivo, y dejar incubando 4 horas.
- 3) Colectar las células en un tubo falcon de 50 mL, centrifugando de 5-7 min a 4500g a temperatura ambiente.
- 4) Durante la centrifugación desnaturalizar ssDNA por 10 min a 96 °C y enfriar 5 min en hielo.
- 5) Descartar el YPD y resuspender las células en 45 mL de dH<sub>2</sub>O y agregar 5 mL de 10X LiAc-TE. Mezclar invirtiendo el tubo y centrifugar las células de 5-7 min a 4500g a temperatura ambiente.
- 6) Descartar el sobrenadante y resuspender las células en el líquido remanente en el tubo.

Para 10 transformaciones:

- 7) En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar 700 µL de PEG 50% , 80 µL de LiAc-TE y mezclar con una pipeta de 1 mL.
- 8) Agregar 180 µL de células y 30 µL de ssDNA desnaturalizado (8-10 µg/µl) y mezclar inmediatamente con una pipeta de 1 mL.  
(todo debe ser realizado a temperatura ambiente, excepto por el ssDNA que debe mantenerse en hielo hasta agregarse a las células)
- 9) Agregar 98 µL de la mezcla en tubos para PCR que contengan 1 µL del DNA plasmidico (200 ng).
- 10) Incubar los tubos de PCR en una termocicladora utilizando el siguiente programa:

28 °C por 30 min

42 °C por 13 min  
28 °C hasta 2 hrs

- 11) Descartar la solución de PEG cuidadosamente con una pipeta de 200 µL
- 12) Resuspender las células en 100 µL de dH<sub>2</sub>O y dispersar en medio selectivo

## **Soluciones**

- **Soluciones stock**

50% polietilenglicol

1M Tris-HCl y 0.2M EDTA, pH 8.0 (TE Buffer)

1M Acetato de Litio, pH 7.5

- **LiAc-TE:** 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, con 1mM EDTA y 0.1M de Acetato de Litio.

## APENDICE D

### "Lazy bones" método para la liberación rápida de ADN plasmídico de levadura

- 1) Incubar una colonia a 28°C en 5mL de YPD "Yeast Extract Peptone Dextrose" (extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%, ajustado a pH 5.5 con HCl) durante toda la noche o en medio selectivo (1-2 días).
- 2) Centrifugar 1.5 mL del cultivo a 5000xg por 5 min. Descartar el sobrenadante.
- 3) Agregar 0.2 mL de solución de liberación de ADN y resuspender las células.
- 4) Agregar 0.2 mL de fenol:cloroformo:isoamilalcohol (25:24:1) y 0.3 mL de perlas de vidrio lavadas con ácido.
- 5) Aplicar vortex a máxima velocidad de 5-10 min.
- 6) Centrifugar por 5 min a velocidad máxima a temperatura ambiente.
- 7) Transferir 120 µL de la fase acuosa a un nuevo tubo. Precipitar el ADN con 1X V de isopropanol y lavar con 1X V de EtOH 70%. Resuspender las células en 30 µL de dH<sub>2</sub>O.
- 8) Para transformar células competentes de *E. coli* utilizar 5-10 µL del ADN. Para células electrocompetentes utilizar 1 µL del DNA.

### Soluciones

- Solución de liberación de ADN: Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8.0) y Na-EDTA 1 mM.
- Perlas lavadas con ácido: Utilizar perlas de 250-500 micras. Lavar 100 mL de perlas de vidrio en 200 mL de HCl concentrado y dejarlas reposar toda la noche en una campana de extracción. Descartar el HCl y lavar las perlas múltiples veces con dH<sub>2</sub>O, hasta que el pH sea >5.0 (si después de varias etapas de lavado el pH continúa por debajo de pH 3, realizar un último lavado con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 20 mM a pH 7).

- Secar las perlas de vidrio en un horno a 70 °C toda la noche.