



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS
VDAC DE MAÍZ Y PRODUCCIÓN
DE LA ISOFORMA ZmVDAC1b**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:
DONAJÍ AZUCENA GARCÍA ORTIZ**



CDMX

2023



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DR. J. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS

VOCAL: DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

SECRETARIO: DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

1° SUPLENTE: DR. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

2° SUPLENTE: DR. EUCLIDES ÁVILA CHÁVEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 102 DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Andrés Burgos Palacios

SUSTENTANTE:

Donají Azucena García Ortiz

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de tesis "*Análisis in silico de las secuencias VDAC de maíz y producción de la isoforma ZmVDAC1b*" realizado por **Donají Azucena García Ortiz**, fue desarrollado bajo la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto**, con la dirección técnica del **M. en C. Andrés Burgos Palacios** y de la **M. en C. Beatriz King Díaz** en el laboratorio 102 del Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

Este trabajo de tesis se llevó a cabo gracias al financiamiento de:

Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto A1-S-17269

Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica IN225220.

Se recibió apoyo económico durante el desarrollo de esta tesis a través del Subprograma 127 "Formación Básica en la Investigación", del Departamento de Superación Académica, Facultad de Química, UNAM.

A los miembros del jurado, al Dr. J. Eleazar Martínez Barajas, la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, la Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez, al Dr. José Pedraza Chaverri y al Dr. Euclides Ávila Chávez, por sus oportunos comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 1 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| Mitocondrias..... | 3 |
| Canales aniónicos dependientes de voltaje..... | 4 |
| Organización estructural y localización..... | 4 |
| Integración de VDAC en la mitocondria..... | 6 |
| Transporte de iones y moléculas a través de VDAC..... | 8 |
| Mecanismo de transporte de iones y metabolitos..... | 9 |
| Papel de VDAC en el transporte de calcio..... | 12 |
| Regulación de VDAC..... | 12 |
| Modificaciones postraduccionales..... | 13 |
| Interacción con moléculas y apoptosis..... | 14 |
| Familia de genes <i>VDAC</i> | 17 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 20 |
| HIPÓTESIS..... | 22 |
| OBJETIVO GENERAL..... | 22 |
| OBJETIVOS PARTICULARES..... | 22 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 23 |
| Análisis <i>in silico</i> | 23 |
| Búsqueda de las secuencias de la familia VDAC de maíz..... | 23 |
| Búsqueda de ortólogos de VDAC en plantas..... | 24 |
| Predicción de la estructura proteica de ZmVDAC..... | 24 |
| Búsqueda de motivos en la familia ZmVDAC..... | 25 |
| Búsqueda de secuencias promotoras..... | 25 |
| Análisis de las secuencias de las isoformas ZmVDAC..... | 25 |
| Alineamiento múltiple de secuencias y matriz de identidad..... | 26 |
| Construcción del árbol filogenético de las VDAC en maíz..... | 26 |
| Procedimiento para obtención de la clona de <i>ZmVDAC1b</i> por medio de la Tecnología Gateway®..... | 26 |
| Diseño de oligonucleótidos y vectores <i>in silico</i> | 28 |
| Amplificación de la secuencia <i>ZmVDAC1b</i> | 28 |
| Inserción del amplicón <i>ZmVDAC1b</i> en el vector pDONR221..... | 30 |
| Transformación de células competentes con el vector pDONR221-ZmVDAC1b..... | 30 |
| PCR de colonia confirmatoria de las células DH5 α con el vector pDONR221-ZmVDAC1b..... | 31 |

| | |
|--|----|
| Extracción, purificación y ensayo de restricción del vector pDONR221-ZmVDAC1b | 32 |
| Reacción de LR clonasa entre el vector pDONR221-ZmVDAC1b y pDEST-42 | 33 |
| Transformación de células competentes con el vector pDEST42-ZmVDAC1b | 33 |
| PCR de colonia confirmatoria de las células DH5 α con el vector pDEST42-ZmVDAC1b | 34 |
| Extracción, purificación y ensayo de restricción del vector pDEST42-ZmVDAC1b | 34 |
| Transformación del vector pDEST42-ZmVDAC1b en las células competentes <i>E. coli</i> BL21-RIL..... | 35 |
| Inducción de proteína recombinante ZmVDAC1b y resolución de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS | 35 |
| Ensayo de Western Blot | 36 |
| Clonación mediante enzimas de restricción..... | 37 |
| Obtención del gen <i>ZmVDAC1b</i> a partir del vector pGEM T easy-ZmVDAC1b. | 37 |
| Ligación del fragmento con el gen <i>ZmVDAC1b</i> en el vector pBluescript II KS(+) | 38 |
| Transformación de células competentes con el vector pBluescript II KS(+) ZmVDAC1b | 38 |
| Extracción y purificación de vectores | 39 |
| Ensayos de restricción y purificación de los fragmentos de interés | 39 |
| Ligación de <i>ZmVDAC1b</i> en pDEST42 | 40 |
| Transformación de pDEST42-ZmVDAC1b, purificación y ensayos de restricción | 40 |
| Transformación de pDEST42-ZmVDAC1b en la cepa <i>E. coli</i> BL21-RIL | 40 |
| Inducción de proteína recombinante <i>ZmVDAC1b</i> | 41 |
| RESULTADOS | 42 |
| Identificación de los miembros de la familia <i>ZmVDAC</i> | 42 |
| A. Construcción de la base de datos de <i>ZmVDAC</i> | 42 |
| B. Análisis de las estructuras primarias, secundarias y terciarias de la familia <i>ZmVDAC</i> | 44 |
| C. Intrones y exones de los genes <i>ZmVDAC</i> | 53 |
| D. Análisis de <i>ZmOPMPPPOR1</i> y <i>ZmPorin1_0</i> | 54 |
| Establecimiento de la nomenclatura de los miembros de <i>ZmVDAC</i> | 55 |
| Localización genética de la familia <i>ZmVDAC</i> | 58 |
| Características de los miembros de la familia <i>ZmVDAC</i> | 59 |
| Identidad entre miembros de la familia..... | 59 |
| Modificaciones postraduccionales | 62 |
| Secuencias reguladoras en <i>cis</i> de los genes <i>VDAC</i> | 63 |

| | |
|--|----|
| Clonación del gen <i>ZmVDAC1b</i> | 66 |
| Subclonación del gen <i>ZmVDAC1b</i> mediante la Tecnología Gateway | 66 |
| Subclonación del gen <i>ZmVDAC1b</i> mediante enzimas de restricción | 70 |
| Producción de <i>ZmVDAC1b</i> recombinante | 71 |
| DISCUSIÓN..... | 73 |
| CONCLUSIONES | 84 |
| PERSPECTIVAS | 85 |
| REFERENCIAS | 86 |
| ANEXOS..... | 93 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Estructura y localización de VDAC en la mitocondria. | 5 |
| Figura 2. Proceso de integración de VDAC en la membrana externa de la mitocondria. | 7 |
| Figura 3. HsVDAC1 de <i>Homo sapiens</i> es una proteína multifuncional. | 9 |
| Figura 4. Transporte de iones y metabolitos a través de VDAC. | 10 |
| Figura 5. Implicación de las proteínas VDAC en procesos celulares de animales y plantas. | 19 |
| Figura 6. Esquema de trabajo diseñado para la identificación de los miembros de la familia VDAC de maíz, mediante análisis <i>in silico</i> , y la obtención de ZmVDAC1b recombinante. | 23 |
| Figura 7. Reacciones de recombinación del sistema Gateway®. | 27 |
| Figura 8. Criterios para descartar secuencias de la familia VDAC de maíz en la construcción de la base de datos. | 42 |
| Figura 9. Estructura secundaria de ZmVDAC1b. | 46 |
| Figura 10. Predicción de las estructuras terciarias de ZmVDAC con el valor de pLDDT ≥ 90 | 48 |
| Figura 11. Predicción de las estructuras terciarias de ZmVDAC con el valor de pLDDT < 90 | 49 |
| Figura 12. Superposición de las estructuras ZmVDAC1b y ZmVDAC6 con MmVDAC1. | 52 |
| Figura 13. Intrones y exones de los genes <i>ZmVDAC</i> | 54 |
| Figura 14. Alineamiento de los primeros 40 nucleótidos y 40 aminoácidos de las secuencias ZmOPMPPPOR1 y ZmPorin1_0. | 55 |
| Figura 15. Árbol filogenético con algunas secuencias de VDAC. | 57 |
| Figura 16. Localización cromosómica de los genes <i>ZmVDAC</i> | 58 |
| Figura 17. Regiones que se encuentran conservadas en las secuencias de aminoácidos de la familia <i>ZmVDAC</i> | 60 |
| Figura 18. Sitios posibles de fosforilación de AtVDAC1. | 62 |
| Figura 19. Residuo fosforilable T33 de <i>Rattus norvegicus</i> | 63 |
| Figura 20. Análisis de elementos que actúan en <i>cis</i> en la región promotora de la familia de genes <i>VDAC</i> del maíz. | 65 |
| Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen <i>ZmVDAC1b</i> con los adaptadores universales attB. | 66 |
| Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR confirmatoria del gen <i>ZmVDAC1b</i> | 67 |
| Figura 23. Ensayo de restricción del vector vacío pDONR221 y de la construcción pDONR221-ZmVDAC1b. | 68 |
| Figura 24. Ensayo de restricción del vector pDEST42-ZmVDAC1b de dos colonias seleccionadas. | 68 |
| Figura 25. Identificación de ZmVDAC1b recombinante en bacteria. | 69 |
| Figura 26. Ensayo de restricción de los vectores pBluescript II KS (+) vacío, pBluescript II KS (+) con <i>ZmVDAC1b</i> y pDEST-42 vacío. | 70 |
| Figura 27. Ensayo de restricción del vector pDEST-42 con <i>ZmVDAC1b</i> | 71 |
| Figura 28. Curvas temporales de inducción de ZmVDAC1b recombinante. | 72 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Reguladores citosólicos y membranales de VDAC obtenidos de forma <i>in vitro</i> , en experimentos con canales reconstituidos. | 14 |
| Tabla 2. Mutantes knockout de las isoformas de <i>Arabidopsis thaliana</i> y sus implicaciones en el fenotipo de la planta. | 18 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para añadir la mitad de los adaptadores attB. | 28 |
| Tabla 4. Reactivos para la adición mediante PCR de la mitad de los adaptadores attB en el gen <i>ZmVDAC1b</i> sintético. | 28 |
| Tabla 5. Oligonucleótidos attb universales utilizados en la clonación de <i>ZmVDAC1b</i> | 29 |
| Tabla 6. Mezcla de reacción para la adición mediante PCR de los adaptadores attB universales a la secuencia <i>ZmVDAC1b</i> | 29 |
| Tabla 7. Componentes para la reacción de BP clonasa. | 30 |
| Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la PCR confirmatoria de la clonación de <i>ZmVDAC1b</i> en el vector pDONR221. | 31 |
| Tabla 9. Componentes y volúmenes para la reacción de PCR confirmatoria de <i>ZmVDAC1b</i> | 32 |
| Tabla 10. Componentes para el ensayo de restricción del vector pDONR221- <i>ZmVDAC1b</i> | 33 |
| Tabla 11. Componentes para la reacción de LR clonasa. | 33 |
| Tabla 12. Componentes para el ensayo de restricción del vector pDEST42- <i>ZmVDAC1b</i> | 35 |
| Tabla 13. Componentes para el ensayo de restricción del vector pGEM T easy- <i>ZmVDAC1b</i> | 38 |
| Tabla 14. Componentes para el ensayo de restricción de los vectores pBluescript II KS(+), pBluescript II KS(+) <i>ZmVDAC1b</i> y pDEST42. | 39 |
| Tabla 15. Características de las secuencias VDAC en maíz incluidas en la base de datos de manera inicial. | 43 |
| Tabla 16. Secuencias de VDAC que presentan extensiones o regiones de residuos faltantes en comparación con las 18 secuencias <i>ZmVDAC</i> analizadas. | 44 |
| Tabla 17. Valor de RMSD entre las <i>ZmVDAC</i> y <i>AtVDAC1</i> comparadas con <i>MmVDAC1</i> en el programa PyMOL. | 51 |
| Tabla 18. Propiedades de las proteínas <i>ZmVDAC</i> | 59 |
| Tabla 19. Matriz de identidad a nivel de aminoácidos de las secuencias VDAC encontradas en maíz. | 61 |
| Tabla 20. Matriz de identidad a nivel de nucleótidos de las secuencias VDAC encontradas en maíz. | 61 |

ABREVIATURAS

| | |
|---------------|---|
| ADP | Adenosín difosfato |
| ATP | Adenosín trifosfato |
| IMM | Membrana interna mitocondrial |
| IMS | Espacio intermembrana mitocondrial |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| MCS | Sitio Múltiple de Clonación |
| MCU | Uniportador de calcio mitocondrial |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleótido |
| OMM | Membrana externa mitocondrial |
| PDB | Protein Data Bank |
| Pi | Fosfato inorgánico |
| pLDDT | Predicted local distance difference test |
| PTM | Modificaciones postraduccionales |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| RMSD | Desviación cuadrática media raíz |
| ROS | Especies reactivas de oxígeno |
| UTR | Región no traducida |
| VDAC | Canal aniónico dependiente de voltaje |
| ZmVDAC | Canal aniónico dependiente de voltaje de maíz |

RESUMEN

Los canales aniónicos dependientes de voltaje (VDAC), son las proteínas más abundantes de la membrana externa mitocondrial y se consideran transportadores. Sin embargo, también cumplen una gama de funciones que van desde el intercambio de energía y metabolitos, participación en la señalización entre la mitocondria y el citoplasma, hasta otras muy discutibles como la muerte celular. La regulación de la actividad de las VDAC depende del potencial de membrana, así como por su interacción con diversas proteínas, metabolitos y lípidos. Las alteraciones en su regulación se han relacionado en mamíferos con enfermedades como el cáncer.

En plantas, el estudio de las VDAC es limitado. Se ha demostrado que tienen participación en diferentes estreses como el salino y por sequía. Aunque también se ha planteado que participan en la muerte celular programada durante la infección por patógenos. Por lo que, el estudio de las familias de VDAC en plantas y en particular, en especies de interés agronómico, contribuirá al entendimiento de su participación en las respuestas al estrés y en la fisiología de las plantas.

El presente trabajo tuvo cuatro objetivos, el primero, identificar a los miembros putativos de la familia VDAC en *Zea mays* (ZmVDAC), el segundo, proponer una nomenclatura. Para cumplir estos dos objetivos se realizó un análisis bioinformático de las secuencias anotadas en las diferentes bases de datos, después de eliminar las secuencias duplicadas, las que no contenían las regiones UTR e identificar cuáles eran las que se plegaban como una estructura de barril β , con 19 láminas β y una hélice α en el NH_2 -terminal, se propone que la familia ZmVDAC tiene 9 miembros y para establecer la anotación adecuada de cada secuencia se analizaron sus relaciones filogenéticas con otras familias de VDAC de plantas. Con lo anterior, la familia queda compuesta por: ZmVDAC1a, ZmVDAC1b, ZmVDAC2, ZmVDAC3a, ZmVDAC3b, ZmVDAC4a, ZmVDAC4b, ZmVDAC5a y ZmVDAC5b.

Como tercer objetivo, se analizó la presencia de elementos reguladores en *cis* en una región de 2,000 pb arriba de la región de inicio de cada gen, identificando que potencialmente las VDAC podrían regularse por luz, hormonas y estrés hídrico.

Por último, el cuarto objetivo, fue subclonar el gen *ZmVDAC1b* para producir la proteína recombinante en bacteria. Se logró subclonar el gen y producir la proteína en bacteria. Material biológico que puede ser usado para futuros proyectos.

INTRODUCCIÓN

Mitocondrias

La mitocondria es un organelo subcelular altamente dinámico presente en todas las células eucariotas (da Silva *et al.*, 2014). Estructuralmente, está definido por un sistema de doble membrana, que se ha propuesto que se produjo como resultado de un proceso de endosimbiosis entre una protobacteria y una bacteria (Martin *et al.*, 2015), así queda compuesta por una membrana interna (IMM) y una membrana externa (OMM), ambas separadas por el espacio intermembrana mitocondrial (IMS). La IMM forma pliegues en donde se localiza la cadena transportadora de electrones, importante para la producción de ATP y NADH (Pfanner *et al.*, 2019).

Además del papel de las mitocondrias en la producción de energía y de su alta capacidad metabólica, también se ha demostrado que actúan como sensores de la homeostasis metabólica, participan en respuestas a diversos tipos de estrés y la regulación de las vías de transducción de señales (Harvey, 2019; Mannella, 2021). Por ejemplo, en animales, juegan un papel crucial en el proceso de apoptosis (Bayrhuber *et al.*, 2008). Mientras que en células vegetales, las mitocondrias se han relacionado con la ejecución de la muerte celular programada donde las células muertas son eliminadas por la digestión celular y fagocitosis por células vecinas (Scott & Logan, 2008). Tienen además participación en funciones interconectadas con diversos organelos, como es el caso del cloroplasto en la fotorrespiración, actividad que impacta directamente en la fotosíntesis. La actividad mitocondrial es importante para el desarrollo de semillas, en la germinación y el crecimiento de raíces, probablemente debido a que en esos tejidos y etapas del desarrollo las células tienen una fuerte dependencia del suministro de energía proveniente de la respiración (Vothknecht & Szabo, 2020).

En la función de las mitocondrias y su comunicación con la célula interviene de manera importante el transporte de solutos. Las membranas celulares poseen transportadores proteicos que mantienen la comunicación entre ambos lados de la membrana, en el caso de la OMM, la presencia de canales iónicos es clave en la

regulación de varios procesos fisiológicos y de integridad mitocondrial y celular (Jentsch *et al.*, 2004; de Angeli *et al.*, 2007). A continuación, se describe uno de estos canales, los denominados VDAC.

Canales aniónicos dependientes de voltaje

Los **Canales Aniónicos Dependientes de Voltaje (VDAC**, por sus siglas en inglés) son proteínas abundantes en las membranas externas de las mitocondrias, pueden representar más del 50 % de las proteínas totales (Colombini, 2016), y cubrir hasta el 80 % de la superficie de la membrana en regiones de alta densidad (Gonçalves *et al.*, 2007).

La presencia de VDAC fue caracterizada por primera vez en las bicapas lipídicas mitocondriales del *Paramecium aurelia* debido a un intento fallido por caracterizar un canal de calcio dependiente de voltaje (Schein *et al.*, 1976), se trató del primer canal de membrana intrínseco reconstituido y estudiado. En un inicio las proteínas VDAC, se denominaron “porinas mitocondriales”, por la gran similitud entre las porinas de las células bacterianas y su relación con el origen de las mitocondrias, que se explica a partir de un evento endosimbiótico primario. No obstante, después de mostrar una conductancia máxima en el potencial transmembrana cercana a cero, el que disminuyó en función del voltaje tanto positivo como negativo y la preferencia del canal por los aniones sobre los cationes en el estado de alta conducción, se denominó entonces como “canal selectivo a aniones dependiente del voltaje” (Hodge & Colombini, 1997; Ravi *et al.*, 2021).

Organización estructural y localización

A través de estudios de cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN), se dilucidaron las estructuras tridimensionales de VDAC1 en *Mus musculus* (MmVDAC1) y *Homo sapiens* (HsVDAC), respectivamente (Bayrhuber *et al.*, 2008; Ujwal *et al.*, 2008). VDAC se presenta como un único polipéptido de ~30 kDa inmerso en las bicapas lipídicas mitocondriales en forma de barril β , compuesto por 19 láminas β , con la primera y la última lámina β ordenadas de forma paralela

permitiendo la disposición de aminoácidos polares frente al compartimento hidrofílico, formando un poro, mientras que los residuos no polares quedan dispuestos hacia el núcleo de la membrana hidrofóbica (Hiller *et al.*, 2008; Ravi *et al.*, 2021; **Figura 1**). Además, la estructura presenta una hélice α en el segmento N-terminal con un plegamiento hacia la parte interna del poro que interactúa con la pared del barril mediante enlaces de hidrógeno y provoca una reducción parcial en el centro del transportador (Mannella, 2021).

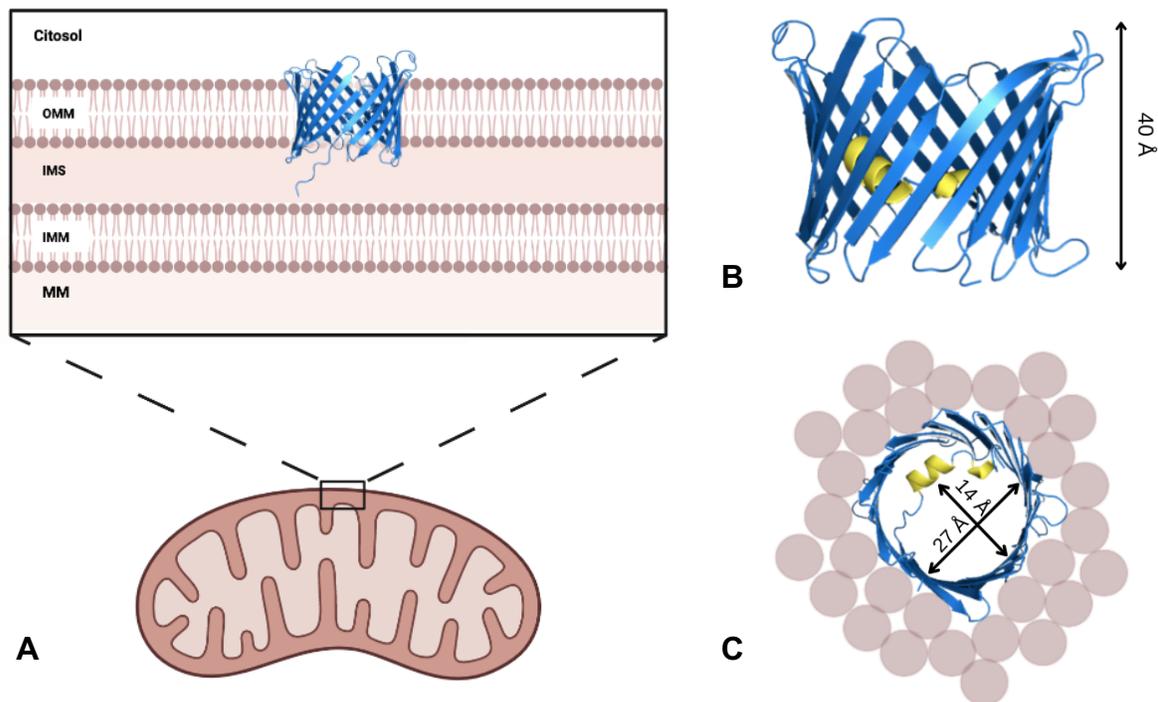


Figura 1. Estructura y localización de VDAC en la mitocondria.

A. Localización de MmVDAC1 de *Mus musculus* (PDB: 3emn), la estructura tridimensional de la proteína fue resuelta a través de cristalografía de rayos X (resolución de 2.3 Å). La proteína se localiza en la membrana externa de la mitocondria, mientras que tanto el extremo amino como el carboxilo de la proteína, se encuentran viendo hacia el espacio intermembrana. **B.** MmVDAC1 desde una vista lateral, se presenta como un barril β con repeticiones de láminas β (azul) dispuestas de forma antiparalela que se enrollan para formar una estructura cerrada, mediante la unión de asas, además incluye una hélice α (amarillo) dispuesta hacia la luz del transportador. **C.** Representación de MmVDAC1 inmersa en la bicapa lipídica de la OMM, plano transversal en vista superior. Adaptación de Rostovtseva *et al.*, 2020. OMM: membrana mitocondrial externa, IMS: espacio intermembrana, IMM: membrana mitocondrial interna, MM: matriz mitocondrial.

En la conformación nativa, los segmentos C-terminal y N-terminal de VDAC están orientados hacia el espacio intermembrana (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012). De acuerdo con las estimaciones de las micrografías electrónicas, las dimensiones del canal rondan entre 2.7 η m de diámetro y de 3.8 a 4 η m de altura (Hiller *et al.*, 2008; Ujwal *et al.*, 2008). Sin embargo, algunos VDAC pueden presentar una variabilidad en la dimensión de los poros, debido a la flexibilidad intrínseca de la proteína (Gonçalves *et al.*, 2007), y aunque VDAC no tienen un límite de exclusión definido, generalmente son permeables a moléculas de hasta 6 kDa de tamaño (Benz, 1994).

Integración de VDAC en la mitocondria.

Casi todas las proteínas membranales de las bacterias Gramnegativas son proteínas plegadas como barril β y se componen de láminas β antiparalelas que forman un orificio hidrofílico en forma de barril en la membrana. En eucariotas, la presencia de proteínas con forma de barril β , está restringida a las membranas externas mitocondriales y de los cloroplastos, probablemente debido a sus antecedentes de ancestros procarióticos (Gross *et al.*, 2021).

El mecanismo por el cual VDAC se integra a la OMM (**Figura 2**), involucra a chaperonas citosólicas que evitan que se pliegue, agregue y se degrade en su camino hacia la membrana mitocondrial (Hecht, 1994). Se ha demostrado que las dos isoformas de las chaperonas Hsp70 de *Saccharomyces cerevisiae* (Ssa1/2) y sus co-chaperonas Hsp40 (Ydj1 y Sis1), participan en la importación de los barriles β . La proteína precursora de VDAC o pre-VDAC es inicialmente reconocida por los receptores del complejo TOM (Translocon of the Outer Membrane) en la parte externa de la OMM (Moitra & Rapaport, 2021), al acercarse al complejo TOM, la primera horquilla β en el C-terminal es reconocida e interactúa con el receptor Tom20, lo que sirve como señal de orientación para su translocación en la membrana a través del poro formado por Tom40 (Jores *et al.*, 2018). En el espacio intermembrana, la translocasa de la membrana interna, TIM, conduce a VDAC recién sintetizada al complejo de translocación de proteínas barril β (TOB) de la membrana externa, también conocido como maquinaria de clasificación y

ensamblaje (SAM), el cual facilita los pasos finales de integración en la membrana (Habib *et al.*, 2005).

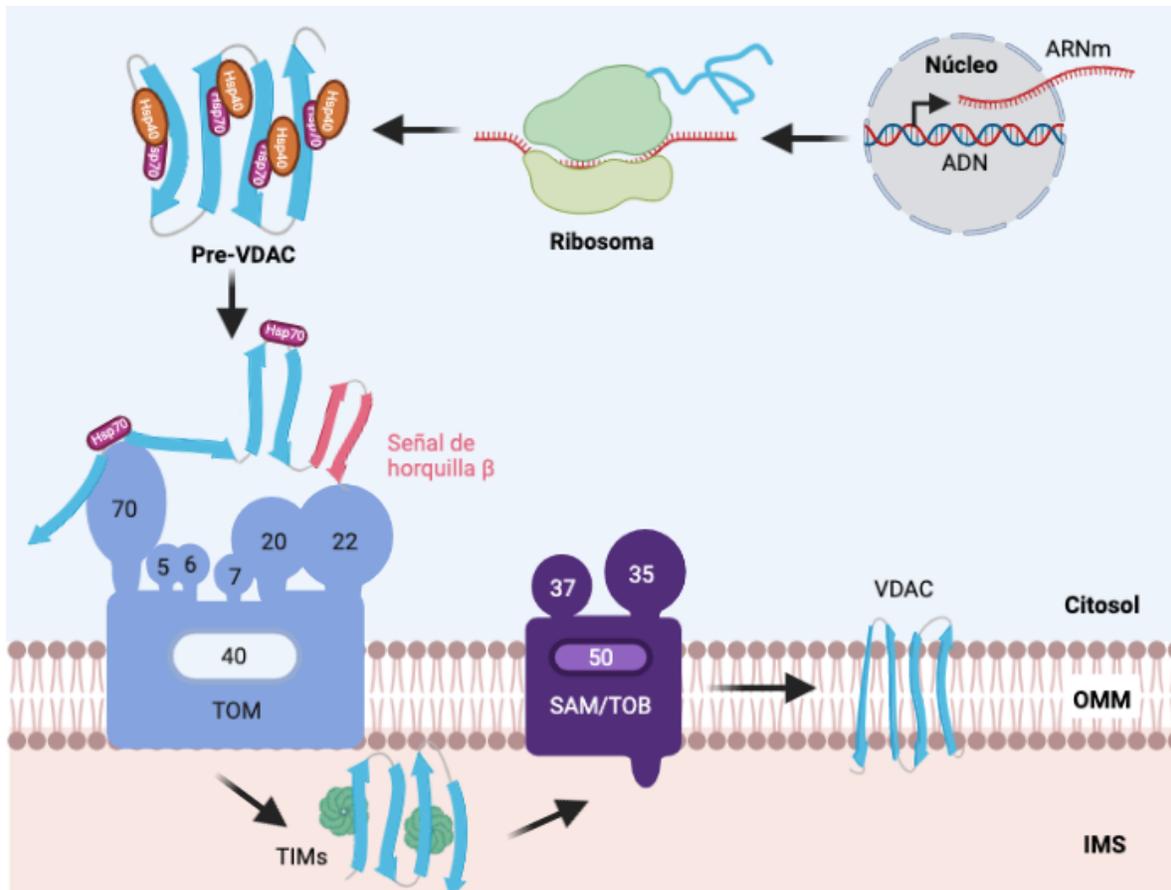


Figura 2. Proceso de integración de VDAC en la membrana externa de la mitocondria.

VDAC se traduce en los ribosomas, el pre-VDAC es mantenido desplegado y llevado a la superficie de la mitocondria mediante las chaperonas Hsp70 y Hsp40. Posteriormente, la proteína es reconocida por el complejo TOM y se transloca al espacio intermembrana a través del poro formado por Tom40. Las chaperonas TIM ayudan a la proteína a pasar al complejo SAM/TOB, y así, facilitar su integración final en la OMM. OMM: membrana mitocondrial externa, IMS: espacio intermembrana mitocondrial. Adaptación de Moitra & Rapaport, 2021.

Se sugiere que la correcta inserción de VDAC en la membrana mitocondrial externa está determinada por la presencia de aminoácidos hidrofílicos en la penúltima lámina β del barril y que flanquea el extremo carboxilo. Además, una contribución

combinada de varios motivos de horquilla β con una cara altamente hidrofóbica también podría asegurar la adecuada orientación de VDAC en la mitocondria (Moitra & Rapaport, 2021). Por otra parte, es necesario aclarar que la célula no comete errores en la inserción de VDAC en plantas, ya que puede diferenciar el transporte de proteínas entre los cloroplastos y las mitocondrias, debido a que la hidrofobicidad promedio del segmento N-terminal de las proteínas VDAC es menor que la encontrada en los péptidos de tránsito de proteínas dirigidas a los cloroplastos (Klinger *et al.*, 2019).

Transporte de iones y moléculas a través de VDAC.

VDAC es esencial para la permeabilidad mitocondrial, es capaz de transportar iones, péptidos y metabolitos. Las isoformas de VDAC en humano se han descrito que participan en el transporte de ácidos orgánicos y glucosa, en la regulación de la permeabilidad de la OMM de algunos nucleótidos como NADH/NAD⁺, en la homeostasis del calcio, el transporte de colesterol y en la apoptosis mitocondrial (**Figura 3**; Mazure, 2017; Shoshan-Barmatz *et al.*, 2019). Si bien de la gran diversidad de moléculas que son transportadas a través de VDAC, el ADP y el ATP son los de mayor flujo (Colombini, 2016). Al respecto se ha sugerido que VDAC está en contacto muy próximo con una proteína de la membrana interna mitocondrial, el translocador de adenín nucleótidos o ANT, formando con esta un poro mayor que comunica a la matriz mitocondrial y al citosol. Esta comunicación parece ser necesaria para el transporte de ADP citosólico hasta el sitio de uso y la salida del ATP de la mitocondria y asegura un eficaz movimiento de ambos metabolitos y de la actividad de la vía glucolítica y la fosforilación oxidativa.

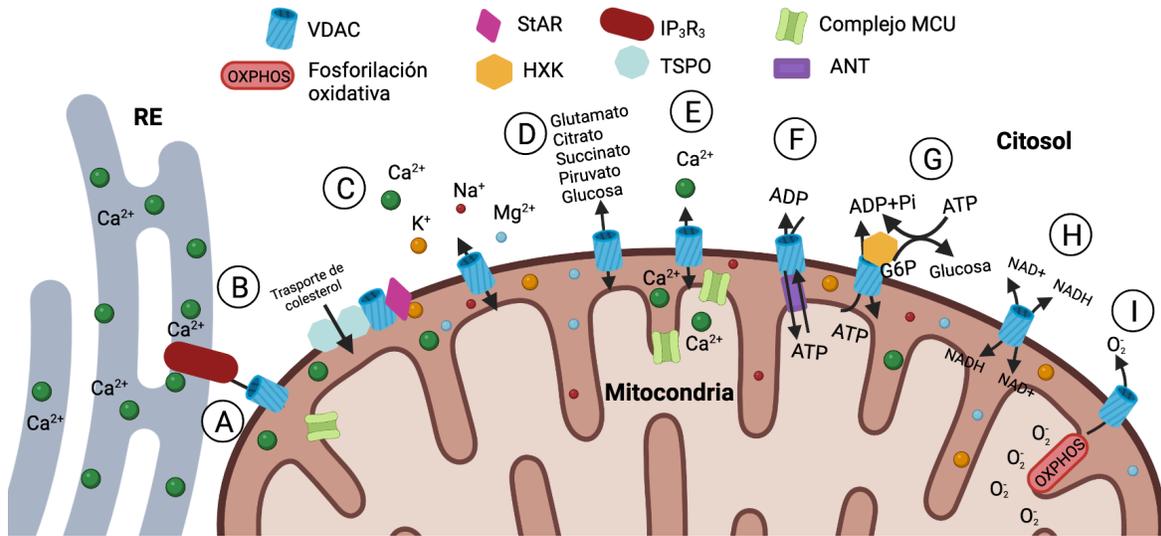


Figura 3. HsVDAC1 de *Homo sapiens* es una proteína multifuncional.

A. HsVDAC1 participa en el transporte de Ca^{2+} a través del OMM, modulando así la señalización de Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico (RE) hasta la mitocondria, mediado por el receptor de inositol 3 fosfato tipo 3 (IP_3R_3). **B.** Transporte de colesterol por medio de un complejo multiproteico, donde interviene la proteína translocadora (TSPO), HsVDAC1 y la proteína StAR. **C.** Modulación del paso de los iones Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ desde el espacio intermembrana hacia el citosol y viceversa. **D.** Control del entrecruzamiento de las vías metabólicas mitocondriales y del resto de la célula, mediante el transporte de metabolitos como glutamato, citrato, succinato, piruvato y glucosa. **E.** HsVDAC1 es un canal de Ca^{2+} , una vez que el Ca^{2+} es transportado hacia el IMS, el uniportador de calcio mitocondrial (MCU) en la IMM participa para introducir el calcio a la matriz mitocondrial. **F.** Participación en el paso de moléculas con alta capacidad energética, ADP y ATP. **G.** Regulación de la glucólisis a través de la asociación con la hexocinasa (HXK). **H.** Modulación del dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada y reducida. **I.** HsVDAC1 actúa como un canal de liberación para el anión superóxido, producto durante la respiración por la fosforilación oxidativa (OXPHOS). Adaptación de Shoshan-Barmatz *et al.*, 2019.

Mecanismo de transporte de iones y metabolitos.

En general, los canales VDAC *in vitro* tienen la capacidad de adoptar un estado abierto y varios estados cerrados con sensibilidad variable a los cambios de voltaje (Colombini *et al.*, 1996). Son estos cambios conformacionales los que permiten el paso de iones en la dirección hacia el espacio intermembrana o en la dirección opuesta (Colombini *et al.*, 1996; Krammer *et al.*, 2015; Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

El estado abierto se establece a partir de un potencial de membrana entre +20 mV y -20 mV, selectivo a iones pequeños como Cl^- , K^+ o Na^+ , pero mostrando una mayor afinidad por los aniones grandes, como el glutamato, fosfato, nucleótidos de adenina, ATP, ADP y P_i , permitiendo el intercambio de ATP recién producido contra el ADP del citosol (**Figura 4**, Rostovtseva & Bezrukov, 2021). Aunque también se ha demostrado el transporte de grandes cationes, como la acetilcolina y la dopamina en el estado abierto (Gincel *et al.*, 2000).

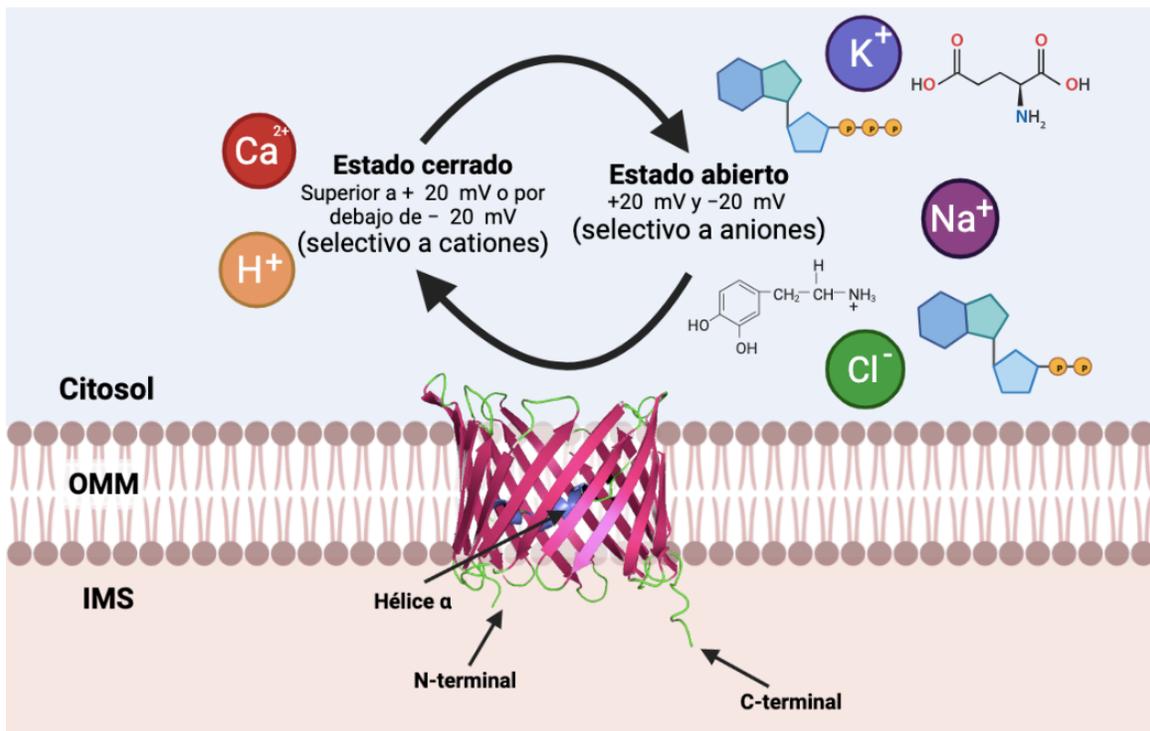


Figura 4. Transporte de iones y metabolitos a través de VDAC.

La regulación de diversas moléculas entre la mitocondria y el citosol se lleva a cabo por medio de la actividad de VDAC, quien presenta dos estados de conductancia de iones dependientes del voltaje. En un estado abierto, generalmente VDAC es selectivo a aniones, mientras que, en un estado cerrado, es selectivo a cationes. OMM: membrana mitocondrial externa, IMS: espacio intermembrana mitocondrial, Ca^{2+} : ion calcio, H^+ : ion hidrógeno, K^+ : ion potasio Na^+ : ion sodio, Cl^- : ion cloruro, ATP, ADP, dopamina, glutamato. Adaptación de Kanwar *et al.*, 2020.

El estado cerrado se produce a un potencial de membrana superior a +20 mV o por debajo de -20 mV y es débilmente selectivo a cationes como el Ca^{2+} , y

prácticamente impermeables a los metabolitos cargados negativamente como el ATP (Hodge & Colombini, 1997; Mazure, 2017).

El mecanismo de activación de los canales VDAC aún no está del todo aceptado. No obstante, existe evidencia experimental y teórica que respalda el modelo propuesto en 1996 por Colombini y colaboradores, el cual postula la existencia de un sensor de voltaje, un dominio móvil con carga positiva en la pared interna del canal. La distribución de lisinas y argininas ubicadas en la hélice α del extremo N-terminal, parece ser la apropiada para actuar como este sensor o también denominado filtro de selectividad principal para iones (Hiller *et al.*, 2010). Se ha observado que el segmento α -helicoidal se ha observado que se mueve hacia el centro del canal, lo que permite bloquear el paso de metabolitos (Fang & Maldonado, 2018).

Por otra parte, algunos residuos del transportador que están cargados positivamente y ubicados en la abertura del barril facilitan la entrada del fosfato divalente, así como del ADP y ATP. La regulación del paso de transporte de iones se produce a diferentes niveles. Inicialmente, VDAC discrimina entre la carga eléctrica total transportada por el anión y también parece sensible al número de fosfatos contenidos en las moléculas (Krammer *et al.*, 2015).

Los estados abiertos del canal son permeables a los flujos de Ca^{2+} y ATP/ADP. Sin embargo, existen múltiples estímulos que inducen el bloqueo transitorio para tener un estado cerrado. Cuando el canal se cierra, el dominio sensor de voltaje con carga positiva, cambia de conformación y se orienta hacia el espacio citosólico, lo que ocasiona una reducción en el poro y la inversión de la selectividad en el canal, en este estado, solo se conducen iones pequeños y Ca^{2+} (Rostovtseva & Bezrukov, 2008).

Adicionalmente, existe evidencia experimental que demuestra que inmediatamente después de la transición del estado abierto al estado cerrado, los canales se

"reabren" con mayor facilidad. No obstante, cuando VDAC está por más tiempo en potenciales de membrana elevados (del orden de 5 a 15 minutos, experimentalmente), abrir el canal se vuelve más complicado una vez que los potenciales disminuyen (Colombini *et al.*, 1996; Sabirov *et al.*, 2001). Sin embargo, existen VDACS que son insensibles al potencial de membrana, como es el caso de una isoforma en *Drosophila melanogaster* (Aiello *et al.*, 2004).

Papel de VDAC en el transporte de calcio

El Ca^{2+} es un catión importante implicado en diversos procesos celulares, que van desde la regulación de la glucólisis, hasta la muerte celular (Clapham, 2007). El mantenimiento de los niveles de calcio en las mitocondrias se da por medio del contacto con reservorios presentes en otros organelos como el retículo endoplásmico, de tal manera que en la interfaz de estos sitios, se encuentran complejos multiproteicos compuestos por los canales de Ca^{2+} y los receptores de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R) que interactúan con VDAC en la OMM (Lock & Parker, 2020). Esta interacción propicia una transferencia rápida de Ca^{2+} hacia las mitocondrias y a su vez promueve la toma de Ca^{2+} a través del uniportador de calcio mitocondrial o MCU para llegar a la matriz mitocondrial (Rosencrans *et al.*, 2021).

Por lo anterior, se ha postulado a VDAC como importante en la regulación y señalización mediada por calcio. Sin embargo, no todas las isoformas de VDAC presentan la misma respuesta al Ca^{2+} . Por ejemplo, en mamíferos, hay tres isoformas de VDAC, la isoforma VDAC1 es una proteína que presenta un poro más aniónico y es la proteína menos selectiva para Ca^{2+} de entre las tres isoformas, mientras que VDAC3 tiene un poro más catiónico y, en consecuencia, es más selectivo para Ca^{2+} (Rosencrans, Aguilera, *et al.*, 2021).

Regulación de VDAC

Independientemente de la modulación que el potencial transmembranal ocasiona en VDAC, también existen otras formas de alterar su función, como con las modificaciones postraduccionales (PTM, por sus siglas en inglés) y la interacción de

VDAC con otras moléculas como proteínas, metabolitos y lípidos, tanto del lado citosólico como en el espacio intermembrana.

Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales (PTM, por su nombre en inglés), desempeñan un papel crucial en la biología celular, ya que pueden cambiar las propiedades tanto físicas como químicas, la actividad, la localización o hasta la estabilidad de las proteínas (Pittalà *et al.*, 2021), además de ser fundamentales en los procesos de señalización celular (Kerner *et al.*, 2012).

Las proteínas VDAC son afectadas por diversas PTM como fosforilación, acetilación, GlcNAcilación, modificaciones oxidativas posteriores a la traducción (Ox-PTM) y ubiquitinación (Ravi *et al.*, 2021). Además, las PTM afectan la translocación de proteínas de un compartimento a otro de la célula y afectan la interacción de VDAC con otras proteínas (Kerner *et al.*, 2012), también pueden generar cambios en las respuestas biofísicas de VDAC (Tewari *et al.*, 2015).

Por ejemplo, HsVDAC1 y HsVDAC2 de humanos presentan cisteínas en el N-terminal que se ha sugerido pueden oxidarse para alterar la selectividad del canal, la propuesta es que estos cambios hacen a VDAC un sensor del estado redox de la célula (Reina *et al.*, 2020). Sin embargo, HsVDAC3 mantiene sus cisteínas oxidadas, por lo que no podría participar como un sensor redox (Fang & Maldonado, 2018). Aún se necesitan más estudios para determinar la factibilidad de que VDAC sea un sensor redox.

En mamíferos se ha detectado la fosforilación de VDAC en algunos residuos, los cuales están asociados con un aumento en la apoptosis (Kerner *et al.*, 2012), pero sin duda, es un campo donde queda un amplio camino por estudiar.

Interacción con moléculas y apoptosis

VDAC tiene un papel de gran relevancia en la permeabilidad mitocondrial, misma que al ser reducida impacta de manera importante en la célula, a tal grado que puede inducir su muerte. Es probable que por ello existe una gran diversidad de moléculas encargadas de la regulación de la transición de VDAC de un estado abierto a uno cerrado (**Tabla 1**), mismas que se han observado en los canales reconstituidos en bicapas lipídicas planares (Rostovtseva *et al.*, 2005; Rostovtseva & Bezrukov, 2008).

Tabla 1. Reguladores citosólicos y membranales de VDAC obtenidos de forma *in vitro*, en experimentos con canales reconstituidos. Tomado y adaptado de Rostovtseva & Bezrukov, 2008.

| Molécula o ion | Tipo | Estado del canal | Mecanismo de acción |
|--|--|---|---|
| Bcl-x _L | Proteína citosólica | Favorece el estado abierto | Interacciones con VDAC que impiden cambio en el potencial de membrana y cierre |
| tBID | Proteína citosólica | Induce el cierre irreversible | Interacciones con VDAC y OMM para inducir el cierre |
| Actina | Proteína citosólica | Favorece estados cerrados de menor conductancia | Reduce el potencial requerido para el cierre de VDAC |
| Hexocinasa | Proteína citosólica | Favore el estado del canal abierto | Interactúa directamente con VDAC |
| Tubulina | Proteína del citoesqueleto | Induce el cierre | Se une con VDAC y bloquea el canal |
| Lípidos no lamelares, PE* y cardiolipina | Lípidos mitocondriales presentes en la OMM | Favorece estados cerrados de menor conductancia | Cambia el equilibrio conformacional de VDAC |
| NADH | Coenzima citosólica | Favorece el estado cerrado | Disminuyen el estado de apertura de VDAC |
| Ca ²⁺ | Ion | Favorece el estado de canal cerrado | VDAC tiene sitios de unión de Ca ²⁺ y la sobrecarga de iones Ca ²⁺ induce el cierre |

*PE: Fosfatidiletanolamina; tBID (del inglés "truncated BID) proteína proapoptótica); Bcl-x_L proteína anti-apoptótica.

En mamíferos, los principales reguladores de la función de VDAC son la hexocinasa, el NADH y tBid (proteína pro-apoptótica), estos dos últimos favorecen el estado cerrado de VDAC y en el caso especial de tBid, se induce el cierre irreversible de los canales dependiente de la dosis (Hiller *et al.*, 2008).

La hexocinasa (HXK) es mejor conocida por su papel en el primer paso de la glucólisis en el citoplasma, pero algunas isoformas de HXK presentan una secuencia en el amino-terminal que les permite insertarse en la OMM, en donde es capaz de interactuar con VDAC de manera reversible (Rosano, 2011). La interacción de la HXK con VDAC se ha propuesto que puede tener varias funciones, una de ellas es formar un circuito metabólico, en el que el ADP liberado por la HXK pasa por VDAC hacia la matriz mitocondrial, mientras que el ATP recién sintetizado por la mitocondria pasa por VDAC y llega a la HXK para que esta catalice la fosforilación de la glucosa. Este proceso demostrado en betabel parece optimizar el metabolismo de la glucosa (Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013) y necesariamente requeriría que VDAC mantuviera al canal en un estado que permita el intercambio de ADP/ATP.

Otra función de la asociación HXK con VDAC es la de inhibir la apoptosis. Estudios en mamíferos demostraron que la remoción de la HXK de la OMM promueve el hinchamiento de la mitocondria y la salida de citocromo c, marcando el inicio de la muerte celular (McCommis & Baines, 2012; Ravi *et al.*, 2021). En arroz, también se ha planteado que VDAC4 interacciona con la HXK para regular la muerte celular programada. Sin embargo, el mecanismo propuesto para el papel anti-apoptótico de la HXK es poco entendido, aunque se tienen varias hipótesis, una propuesta sugiere que la HXK compite por la unión a VDAC con la familia de proteínas Bcl2 que tienen una función anti-apoptótica, lo cual impide el inicio del proceso apoptótico. Estudios recientes demuestran que la HXK ayuda a la relocalización de las proteínas pro-apoptóticas en el citosol, lo que reduce su interacción con VDAC y la posible salida de otras proteínas apoptóticas como citocromo c (Lauterwasser *et al.*, 2021). A pesar de lo anterior, aún se requieren más estudios sobre la

interacción de VDAC y la HXK en plantas para determinar si VDAC se mantiene en un estado cerrado o abierto y las implicaciones de ello en la respuesta de muerte.

El estudio de la familia de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 y Bcl-x_L ha sido intenso, ya que ambas están fuertemente involucradas en procesos como el cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Mazure, 2017). Se conoce que Bcl-x_L favorece el estado abierto de VDAC y restaura el intercambio de moléculas de alta energía entre las mitocondrias y el citosol (Rostovtseva & Bezrukov, 2008). Bcl-x_L se une a VDAC en las láminas β 17 y 18 y al parecer su unión se debe a interacciones electrostáticas, ya que el asa de VDAC que se encuentra cerca de las láminas β 17 y 18 contienen varios residuos básicos, las lisinas de los aminoácidos 200, 201, 252 y 266, mientras que Bcl-x_L con un pI de 4.9, a pH neutro estaría negativamente cargada y por tanto sería atraída por VDAC (Hiller *et al.*, 2008).

En mamíferos, se ha observado que la apertura de VDAC propicia un aumento en el potencial de membrana ($\Delta\Psi$) de la mitocondria, lo que a su vez ocasiona un incremento del índice ATP/ADP, inhibiendo la glucólisis y ocasionado una mayor producción de ROS (Maldonado, 2017). Se sugiere que la presencia de reguladores citosólicos como la tubulina, que actúan cerrando a VDAC ejercen un control sobre el metabolismo mitocondrial y la formación de ROS, disminuyendo así la disfunción mitocondrial, falla bioenergética y muerte celular que ocasionan los estados abiertos de VDAC (Fang & Maldonado, 2018).

Otro mecanismo implicado en el cierre de VDAC es la disminución de la conductancia promedio donde participan en conjunto los lípidos no lamelares y la actina (Varughese *et al.*, 2021).

En resumen, en animales, VDAC interactúa con la HXK, la translocasa de nucleótido de adenina (ANT, por sus siglas en inglés), las proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 y proteínas proapoptóticas de esta misma familia, entre otras, además de la unión de lípidos. En plantas, se ha encontrado que interacciona también con

la HXK y otras proteínas, aunque su estudio es menor al realizado en mamíferos. Establecer la relación de VDAC con estas proteínas es de importancia para establecer la interfaz de comunicación celular entre la mitocondria y el resto de la célula, tanto en procesos fisiológicos como de estrés (Mannella, 2021; Varughese *et al.*, 2021).

Familia de genes VDAC

Hoy en día, se han caracterizado diversas familias VDAC en varias especies eucariotas en todos los reinos. En humanos hay tres isoformas de VDAC nombradas en el orden de su descubrimiento (Messina *et al.*, 2012) y muestran una similitud a nivel de aminoácidos entre ellas de hasta un 75 % (Mazure, 2017). Las tres isoformas muestran diferencias estructurales en su DNA debido al número de exones, 9 exones para VDAC1 y VDAC3, frente a 10 exones para VDAC2. Sin embargo, todas tienen su codón de inicio en el segundo exón, siendo el primero parte de la 5' UTR del RNAm correspondiente. Además, comparten similitudes estructurales y funcionales a pesar de sus diferentes patrones de expresión y localización (De Pinto *et al.*, 2010).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos genes que codifican para POR1/YVDAC1 y POR2/YVDAC2. La similitud a nivel de nucleótidos entre las VDAC de humano y levadura es alta, de un 70 %. En *Neurospora crassa* hay un solo gen que codifica para VDAC. Los genes que codifican para las VDAC se localizan generalmente en diferentes cromosomas, excepto para los genes de VDAC en *Drosophila melanogaster*, los cuales están organizados en un tándem repetido en el mismo cromosoma (Graham & Craigen, 2005).

En plantas, se ha demostrado que las familias VDAC son multigénicas, por ejemplo, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, se han descrito cinco genes para VDAC (Hemono *et al.*, 2020), cuatro de ellas han sido clonadas (Lee *et al.*, 2009) y para algunas se han producido mutantes knockout para determinar su efecto fisiológico en la planta (**Tabla 2**; Rostovtseva & Bezrukov, 2021).

Tabla 2. Mutantes knockout de las isoformas de *Arabidopsis thaliana* y sus implicaciones en el fenotipo de la planta. Tomado de Rostovtseva & Bezrukov, 2021.

| Implicación | Isoforma mutante knockout de AtVDAC | | | |
|---|-------------------------------------|---------|---------|---------|
| | AtVDAC1 | AtVDAC2 | AtVDAC3 | AtVDAC4 |
| Reducción del número de semillas debido a una gran cantidad de óvulos no desarrollados. | X | | | |
| Reducción de la cantidad de granos de polen, tasa de germinación y longitud del tubo de polen. | X | X | | X |
| Disminución del potencial de membrana. | X | | | |
| Provoca un retraso grave del crecimiento de las hojas maduras | | X | | X |
| Involucrado en la respuesta al estrés salino. | | X | | |
| Ocasiona una ligera disminución en el potencial de la membrana mitocondrial, pero no hay retraso en el crecimiento. | | | X | |

En *Solanum tuberosum* (papa) se han reportado cuatro genes putativos de VDAC; diez genes se encuentran en el genoma de *Populus trichocarpa* (álamo); tres genes en *Oryza sativa* (arroz) y *Nicotiana tabacum* (nicotiana) (Homblé *et al.*, 2012); al menos cinco VDAC putativos en *Medicago truncatula* (carretón), *Lotus japonicus* (trébol de cuernos), *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Glycine max* (soya) (Ravi *et al.*, 2021); seis en *Vitis vinifera* (uva) (Xu *et al.*, 2021) y hasta 26 genes putativos se han encontrado en *Triticum aestivum* L.(trigo) (Yu *et al.*, 2022).

A diferencia de los mamíferos quienes tienen un genoma diploide, las plantas suelen ser tetra o hasta hexaploides como en el maíz, esto es de relevancia, puesto que, estos eventos de duplicación de genes pueden llevar a producir proteínas que

cambian ligeramente de función o bien pueden adquirir nuevas funciones, dando como resultado nuevas características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas a los organismos y sistemas celulares que las contienen (Arsovski *et al.*, 2015).

En plantas, se sugiere que las isoformas de VDAC podrían tener una funcionalidad específica en algún estadio de desarrollo, estado nutricional o para contender a situaciones de estrés. Lo anterior se propone debido a que en animales la mutación o delección de los genes de VDAC está fuertemente relacionado con algunas enfermedades como el lupus, el Parkinson y el cáncer. Los pocos estudios que se han realizado en plantas relacionan a los VDAC con las respuestas a diferentes tipos de estrés como por sequía (Yang *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2022), salinidad (Sanyal *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2022), frío (Z.-Y. Li *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2021); involucrados también en el crecimiento de las plantas (Tateda *et al.*, 2012), tolerancia al estrés oxidante (Sanyal *et al.*, 2020) o respuesta a la infección por patógenos (Kusano *et al.*, 2009) y se ha visto que también están involucrados en el crecimiento de las plantas (Tateda *et al.*, 2012). Así mismo, se han encontrado que participan en el desarrollo de gametos y en la comunicación interorgánica (**Figura 5**; Kanwar *et al.*, 2020).

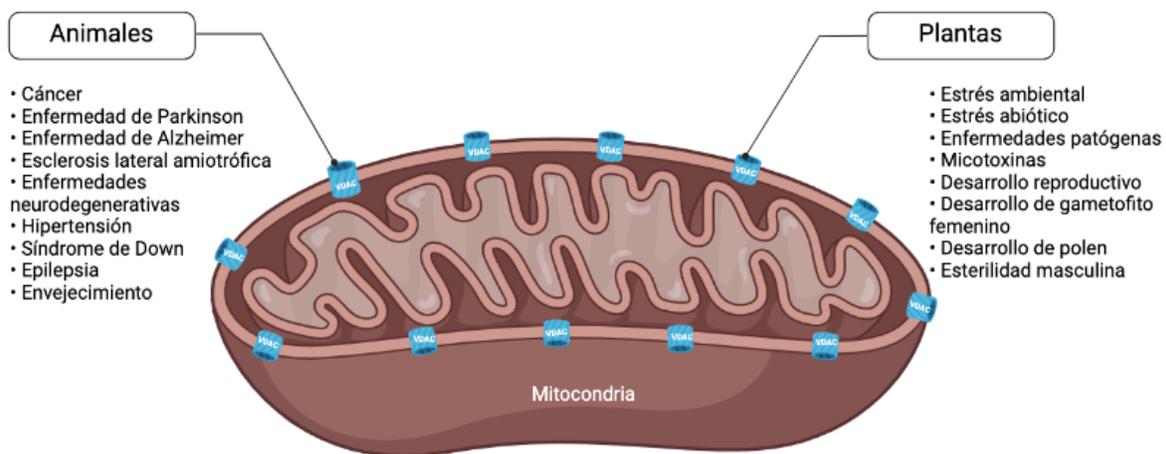


Figura 5. Implicación de las proteínas VDAC en procesos celulares de animales y plantas.

A pesar de compartir un ancestro común en el proceso endosimbiótico sobre la diferenciación a mitocondrias, la evolución ha permitido la diferenciación en las

funciones de VDAC entre animales y plantas. La pérdida de función de las isoformas de VDAC están relacionadas con padecimientos y enfermedades en animales, mientras que en plantas, están implicadas en la respuesta al estrés, funciones tejido-específico y respuesta a patógenos. Adaptación de Kanwar *et al.*, 2020.

JUSTIFICACIÓN

Como ya se mencionó, VDAC forma parte esencial en el transporte mitocondrial, puesto que es la proteína más abundante en la OMM y es capaz de transportar iones pequeños y moléculas como el ATP y ADP y su apropiado funcionamiento impacta en la homeostasis no solo de la mitocondria, sino de la célula (De Pinto *et al.*, 2021). Debido a lo anterior la regulación de VDAC se encuentra finamente regulada, varios iones, proteínas, lípidos modulan su permeabilidad y función (Choudhary *et al.*, 2010), y alteraciones en la interacción en esos iones o moléculas con VDAC altera el metabolismo celular e incluso puede llevar a la muerte celular (Rostovtseva, 2012).

Las características de las VDAC que se acaban de mencionar se han estudiado principalmente en mamíferos, sin embargo, en plantas existe todavía poca información sobre su función y regulación. Más aún en plantas de interés agronómico, como el maíz, no hay evidencias suficientes sobre su papel en la fisiología de la planta y su capacidad de responder ante diferentes tipos de estreses. En este trabajo se estudió a la familia VDAC en *Zea mays* (ZmVDAC). Se realizó en maíz debido a que en un trabajo previo del grupo, encontramos mediante experimentos de “pull down” que VDAC está interactuando con la HXK (Rodríguez-Saavedra y King-Díaz, comunicación personal). Por lo que, para determinar el papel de la interacción de ambas proteínas en la fisiología de la planta decidimos estudiar a la familia VDAC de maíz.

A pesar de que en maíz se han realizado estudios de secuenciación de genomas completos de varias variedades y que permite contar con una biblioteca de secuencias en las cuales se pueden encontrar los miembros de la familia VDAC, la

base de datos no se encuentra depurada, además de que la anotación no es homogénea. Por lo que en este estudio se planteó realizar un análisis *in silico* de las secuencias de ZmVDAC para identificar a los miembros que componen la familia, así como contar con una anotación de las secuencias que relacione los nombres con otras familias de VDAC de plantas. La información obtenida podrá servir de base para continuar con el estudio funcional de las proteínas VDAC.

Adicional a lo anterior se propuso clonar a uno de los miembros de la familia ZmVDAC, uno que se expresa de manera alta durante la infección de la planta de maíz con el patógeno *Fusarium verticillioides*. Por lo que este estudio será la base para posteriores investigaciones sobre la caracterización funcional tanto *in vitro* como *in vivo*, de VDAC y determinar su interacción con diferentes moléculas, incluyendo a la HXK.

HIPÓTESIS

A partir del análisis estructural y de la estructura génica, se podrán predecir las secuencias funcionales de VDAC en maíz.

OBJETIVO GENERAL

Identificar y nombrar a los miembros de la familia VDAC de maíz mediante su análisis *in silico* y clonar a *ZmVDAC1b* para su caracterización posterior.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Identificar a los miembros de la familia VDAC de maíz.
 - a. Búsqueda de las secuencias de la familia VDAC en maíz.
 - b. Analizar las secuencias de nucleótidos y de proteínas de la familia VDAC de maíz.
 - c. Modelar la estructura tridimensional de las isoformas de ZmVDAC.
2. Proponer una nomenclatura para los miembros de la familia VDAC.
 - a. Generar un árbol filogenético de las secuencias ZmVDAC.
3. Producir ZmVDAC1b recombinante.
 - a. Generar vectores de expresión de una ZmVDAC para la producción de la proteína recombinante en bacteria.
 - b. Confirmar la producción de la proteína recombinante.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Para alcanzar los objetivos planteados en este trabajo, se diseñó el procedimiento de la **Figura 6**, el cual se dividió en dos partes metodológicas: el análisis *in silico* de la familia VDAC de maíz y la parte experimental para llevar a cabo la clonación de *ZmVDAC1b*.

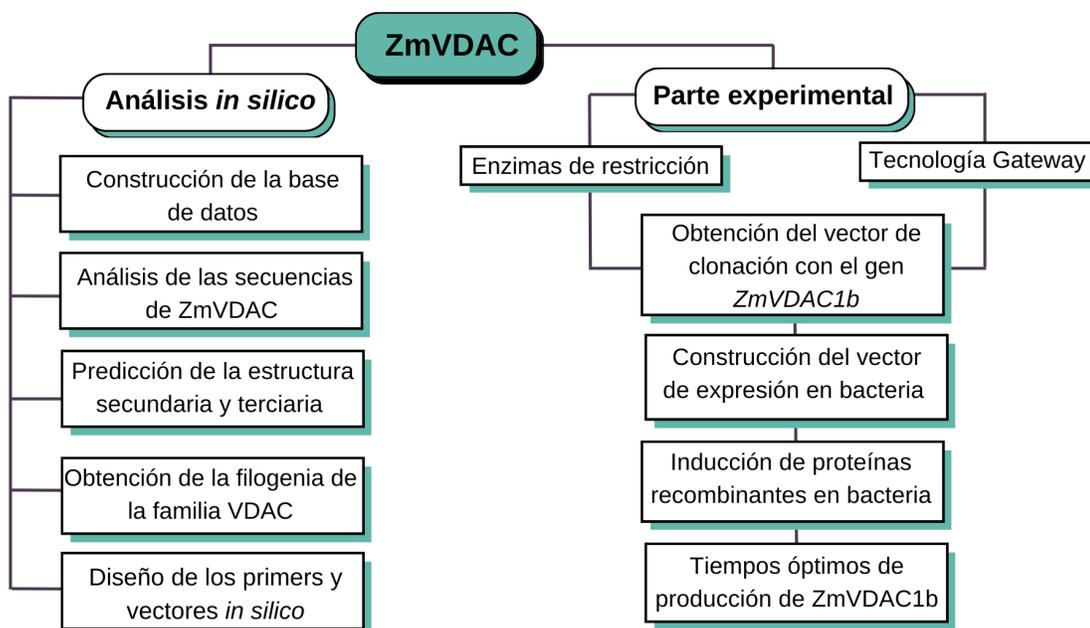


Figura 6. Esquema de trabajo diseñado para la identificación de los miembros de la familia VDAC de maíz, mediante análisis *in silico*, y la obtención de *ZmVDAC1b* recombinante.

Análisis *in silico*.

Búsqueda de las secuencias de la familia VDAC de maíz.

Para identificar los genes que codifican para la familia VDAC en *Zea mays* se utilizaron las bases de datos Ensembl plants (<https://plants.ensembl.org/index.html>), y Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), esta última se utilizó también para compilar una lista de ortólogos VDAC de organismos vertebrados y otras plantas. Adicionalmente, se determinaron los parámetros de punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (mW) de las proteínas usando el servidor ExPASy mediante la herramienta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Las secuencias encontradas fueron buscadas también en las bases de datos de MaizeGDB (<https://www.maizegdb.org/>), ENA (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se descartaron aquellas secuencias cuya anotación no fue localizada en más de una de las bases de datos con la finalidad de disminuir el número de coincidencias en una búsqueda es decir eliminar las secuencias duplicadas.

Búsqueda de ortólogos de VDAC en plantas.

Se compararon las secuencias de VDAC de maíz con los genes homólogos en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas, utilizando la base de datos de proteínas Uniprot. Se alinearon las secuencias de maíz con las de secuencias de VDACs de diferentes plantas usando el programa Seaview, lo que llevó a encontrar solo 30 secuencias con una similitud con las VDAC de maíz, de ellas solo 10 secuencias presentaron una anotación en un sistema de puntuación heurístico de 5 puntos con las mejores anotaciones de una entrada del proteoma y el resto con anotación básica inferida por homología.

Predicción de la estructura proteica de ZmVDAC.

Estructura secundaria. Las secuencias de aminoácidos de 18 proteínas de VDAC de maíz se analizaron para la predicción de la estructura secundaria en los servidores PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) y MINNOU (<http://minnou.cchmc.org/>). Ambos resultados se compararon para obtener las predicciones de las estructuras secundarias más probables en cada una de las proteínas.

Estructura terciaria. Se determinó la estructura de 18 ZmVDAC mediante el servidor Alpha Fold 2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>). Se eligieron los modelos con mayor valor en la prueba de diferencia de distancia local ($pLDDT \geq 90$) y menor desviación cuadrática media raíz (RMSD).

Las estructuras tridimensionales de cada proteína fueron posteriormente visualizadas en el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.), así como también la superposición de las estructuras proteicas para identificar aquellas VDAC con mayor similitud estructural. El análisis se realizó considerando el cristal de la proteína de ratón MmVDAC1 (*Mus musculus*, PDB: 3emn) obtenido del Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). Además, se usó como control de plantas a una proteína que se conoce es funcional a AtVDAC1.

Búsqueda de motivos en la familia ZmVDAC

Las regiones con mayor conservación en las secuencias de aminoácidos de VDACs de maíz se observaron con el servidor The ConSurf Server (<https://consurf.tau.ac.il/>), mientras que los motivos conservados se identificaron en el sitio web MEME v5.1.1 (<https://meme-suite.org/meme/>) con la búsqueda de 6 motivos en 39 secuencias de VDAC incluidas las de ortólogos en plantas, se estableció un intervalo de 15 a 55 aminoácidos por motivo, mientras que los demás parámetros los estableció el programa de forma predeterminada.

Búsqueda de secuencias promotoras

Para predecir los elementos que actúan en *cis*, se seleccionaron alrededor de 2,000 pb de secuencia de DNA genómico río arriba del promotor de los genes VDAC de maíz. Se analizaron en el sitio web New PLACE (*A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*, <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) y se buscaron las funciones de las secuencias reguladoras en la base de datos de elementos reguladores del DNA en plantas NBDC PLACE (http://togodb.biosciencedbc.jp/togodb/view/place_main#en).

Análisis de las secuencias de las isoformas ZmVDAC

Usando las secuencias de los cromosomas en maíz y el DNA codificante de las ZmVDAC candidatas de la base de datos, se analizaron las estructuras génicas de las secuencias de nucleótidos con Gene Structure Display Server 2.0

(<http://gsds.gao-lab.org/>). Adicionalmente, las modificaciones postraduccionales putativas fueron visualizados mediante el servidor GPS (<http://gps.biocuckoo.cn/online.php>).

Alineamiento múltiple de secuencias y matriz de identidad

Las secuencias de aminoácidos de cada isoforma de VDAC se obtuvieron del repositorio UniProt para la entrada “VDAC” en el organismo “*Zea mays*”. La alineación múltiple de secuencias se realizó utilizando los programas SeaView (**Anexo 1**), mientras que la matriz de identidad de secuencias se ejecutó en el servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Construcción del árbol filogenético de las VDAC en maíz.

Las secuencias de aminoácidos de ZmVDAC (**Anexo 2**) y el resto de las especies, se alinearon usando el software MEGA X mediante el algoritmo de MUSCLE usando el método de Cluster UPGMA con los parámetros predeterminados. El árbol evolutivo se construyó usando el método de máxima verosimilitud (ML) con el método de ajuste LG+G. La confiabilidad de la topología del árbol se evaluó mediante un análisis de 100 repeticiones de Bootstrap.

Procedimiento para obtención de la clona de *ZmVDAC1b* por medio de la Tecnología Gateway®

La clonación de *ZmVDAC1b* se inició utilizando vectores que funcionan con la tecnología Gateway, técnica que se basa en las propiedades de recombinación del bacteriófago lambda, y que implica a las secuencias de recombinación del DNA (sitios att) y las proteínas que median la reacción (enzimas clonasa). La recombinación se lleva a cabo entre los sitios de unión attB en el cromosoma de *Escherichia coli* y los attP en el cromosoma lambda. Tras la integración de lambda, la recombinación se produce entre los sitios attB y attP para dar lugar a los sitios attL y attR (Landy, 1989).

Dos reacciones de recombinación constituyen la base de la tecnología Gateway®:

La reacción BP que facilita la recombinación de un sustrato attB (producto attB-PCR o un clon de expresión de attB linealizado) con un sustrato attP (vector donante) para crear un clon de entrada que contiene attL (**Figura 7**), catalizada por la mezcla de enzimas LR Clonase™; y la reacción LR, la cual facilita la recombinación de un sustrato attL (clon de entrada) con un sustrato attR (vector de destino) para crear un clon de expresión que contiene attB, catalizada por la mezcla de enzimas LR Clonase™ (Reece-Hoyes & Walhout, 2018).

Para la producción de la clona *ZmVDAC1b* por medio de la tecnología Gateway® (**Figura 7**), se utilizó el vector donante pDONR221 quien presenta los sitios attP1/attP2 y un marcador de resistencia a la kanamicina (**Figura 7A**). Una vez que el gen se insertará en el vector pDONR221 se realizó la recombinación con el vector destino, que en este caso sería el vector de expresión en bacteria pET-DEST42 (**Figura 7B**), quien se encuentra regulado por el promotor T7 de expresión de alto nivel de copias y que le confiere a la proteína recombinante dos etiquetas en el C-terminal, las secuencias V5 y 6xHis, que pueden ser usadas para su identificación y purificación.

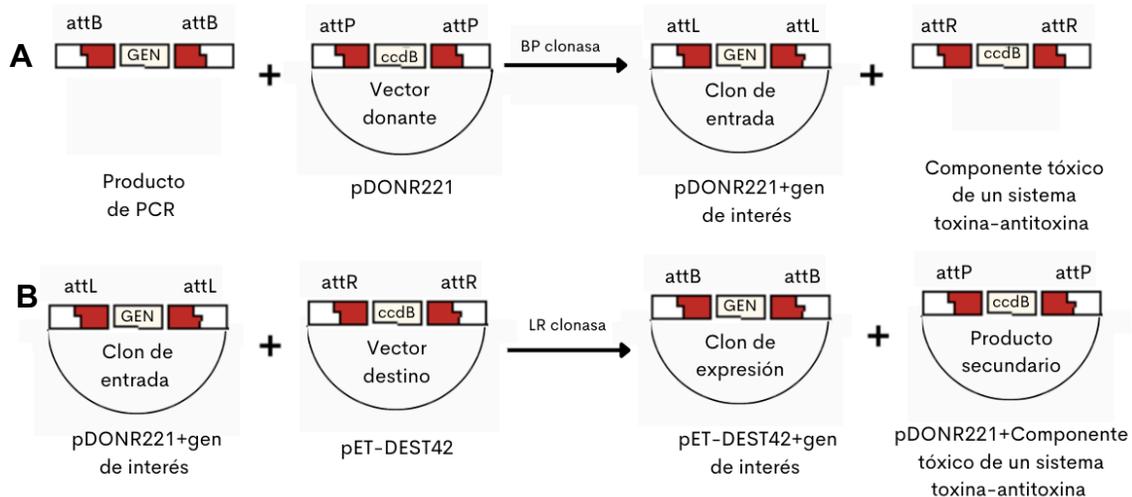


Figura 7. Reacciones de recombinación del sistema Gateway®.

A. Reacción de la BP clonasa para la generación del clon de entrada pDONR221 con el gen de interés. **B.** Reacción de LR clonasa para la producción del clon de expresión pET-DEST42 con el gen de interés. Imagen adaptada del manual de Gateway Recombination Cloning Technology (Themofisher).

Diseño de oligonucleótidos y vectores *in silico*

Para realizar la clonación de *ZmVDAC1b* en los vectores pDONOR221 y pDEST42 se diseñaron los oligonucleótidos con el programa SnapGen (**Tabla 3**), necesarios para la amplificación específica del gen *ZmVDAC1b* y la adición subsecuente de la mitad de los adaptadores universales attB para introducir el fragmento en el vector pDONR221.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para añadir la mitad de los adaptadores attB.

| Primera ronda de PCR | | |
|----------------------|----------------------------|---|
| Producto | Dirección de amplificación | Secuencia (5' → 3') |
| <i>ZmVDAC1b</i> | Sentido | GT ACA AAA AAG CAG GCT ATG GTC GGA CCA GGC |
| | Antisentido | GT ACA AGA AAG CTG GGT GGG CTT GAG GGC CAC AG |

Amplificación de la secuencia *ZmVDAC1b*.

Previamente, en el laboratorio ya se contaba con el gen *ZmVDAC1b* sintético de 831 pb diseñado por el laboratorio IDT®, al cual se le añadió en una primera ronda de PCR una secuencia corta de nucleótidos en los extremos 5' y 3' mediante los oligonucleótidos de la **Tabla 3**.

Tabla 4. Reactivos para la adición mediante PCR de la mitad de los adaptadores attB en el gen *ZmVDAC1b* sintético.

| Reactivo | Volumen |
|--|----------------|
| 5X Advantage® HD Buffer (con 5 mM de MgCl ₂) | 5.0 µL |
| dNTP [10 mM] | 0.5 µL |
| Oligonucleótido attB1_Fw_VDAC1b [10 mM] | 1.0 µL |
| Oligonucleótido attB2_Rv_VDAC1b [10 mM] | 1.0 µL |
| Templado [10 ng/µL] | 2.0 µL |
| Advantage® HD Polymerase (Takara) | 0.25 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 20.0 µL |

La mezcla de reacción para la PCR se muestra en la **Tabla 4**, y se siguió un programa de temperaturas que comprendió una predesnaturalización por 30 s a 98 °C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización por 5 s a 98 °C, alineamiento por 5 s a 55 °C y elongación por 15 s a 72 °C, por último se realizó una elongación final por 1 min a 72 °C. El producto de la reacción se corrió en un gel de agarosa al 1 % con 35 µL de bromuro de etidio (0.5 mg/mL, **Anexo 3**), se aplicó una diferencia de potencial a la cámara de electroforesis de 70 V durante 40 min con amortiguador TAE 1X (**Anexo 3**) y se observó la banda esperada en el transluminador WUV-L50 marca WiseUv® a 365 nm. Se realizó la purificación del fragmento de DNA con el kit GenElute™ Gel Extraction Sigma®, finalmente se cuantificó el material genético en el Nanodrop 2000 (ThermoScientific®), obteniendo una concentración de 48.4 ng/µL.

Tabla 5. Oligonucleótidos attb universales utilizados en la clonación de *ZmVDAC1b*.

| Oligonucleótido | Secuencia (5'→ 3') |
|-----------------|---|
| attB1 Forward | G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC |
| attB2 Reverse | GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT |

La secuencia de los adaptadores universales attB completa (**Tabla 5**), se añadió en una segunda ronda de PCR (**Tabla 6**), para obtener los extremos attB1 y attB2 flanqueando el gen *ZmVDAC1b* sintético. La reacción se realizó bajo las mismas condiciones que se emplearon en la adición de la mitad de los adaptadores attB.

Tabla 6. Mezcla de reacción para la adición mediante PCR de los adaptadores attB universales a la secuencia *ZmVDAC1b*.

| Reactivo | Volumen |
|--|----------------|
| 5X Advantage® HD Buffer (con 5 mM de MgCl ₂) | 5.0 µL |
| dNTP [10 mM] | 0.5 µL |
| Oligonucleótido attB1_Rv_universal [10 mM] | 1.0 µL |
| Oligonucleótido attB2_Fw_universal [10 mM] | 1.0 µL |
| Producto de PCR con ½ adaptadores (80 ng) | 2.0 µL |
| Advantage® HD Polymerase (Takara) | 0.25 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 20.0 µL |

El amplicón resultante, se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, se aplicó una diferencia de potencial a la cámara de electroforesis de 70 V durante 40 min con amortiguador TAE 1X y se observó la banda esperada del fragmento de DNA con los adaptadores universales en el transluminador WUV-L50 marca WiseUv ® a 365 nm. A la par, se realizó la misma reacción para emplear el producto de la reacción de PCR en la siguiente parte de la metodología, la cuantificación del fragmento amplificado fue de 337.8 ng/μL.

Inserción del amplicón *ZmVDAC1b* en el vector pDONR221.

Los fragmentos de DNA provenientes de la PCR, se sometieron a una reacción BP con el vector donante de acuerdo con las indicaciones del proveedor para la Tecnología Gateway® (Invitrogen), para ello se tomaron en consideración los volúmenes de la reacción de la **Tabla 7**. La reacción se incubó durante 5 h a 25 °C, después de ello se agregaron 2 μL de proteinasa K (Invitrogen®) para terminar la reacción y se incubó a 37 °C por 10 min.

Tabla 7. Componentes para la reacción de BP clonasa.

| Reactivo | Volumen |
|---|-----------------------|
| attB-Producto de PCR (~15-150 ng) | 0.6 μL |
| Vector donante pDONR221 (~150 ng/μl) | [865.4 ng/ μL] 0.2 μL |
| Amortiguador TE, pH=8.0 | c.b.p. 16.0 μL |
| Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) | 4.0 μL |

Transformación de células competentes con el vector pDONR221-ZmVDAC1b

El vector pDONR221-ZmVDAC1b se usó para transformar las células competentes DH5α de *E. coli* de acuerdo con el siguiente procedimiento: en un microtubo con 50 μL de la cepa de las células competentes, se adicionaron 10 μL del plásmido, se mezcló por inversión de 5 a 6 veces, después se dejó reposando en hielo por 30 min. Luego se realizó el choque térmico a 42 °C durante 1 min y se regresa al hielo por 2 min. Posteriormente, se agregaron 900 μL de medio SOC (**Anexo 4**) y se

incubó por 90 min a 37 °C con una agitación de 150 rpm, seguido de una centrifugación a 3,500 rpm durante 1 min, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en aproximadamente 100 µL del sobrenadante. Finalmente, se plaqueó en cajas Petri con agar al 1 %, medio Luria-Bertani (LB, **Anexo 4**) y 35 µL de Kanamicina a una concentración de 100 µg/ mL, para después incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. Se eligieron colonias aisladas para cultivarlas en 6 mL de medio LB adicionado con 6 µL de Kanamicina (100 mg/mL) durante 24 h a 37 °C con agitación de 150 rpm. Transcurrido el tiempo, se guardaron alícuotas de 660 µL en 330 µL de glicerol al 50 % en tubos de 1.5 mL a una temperatura de -70°C para su posterior uso.

PCR de colonia confirmatoria de las células DH5α con el vector pDONR221-ZmVDAC1b

Se realizó una reacción de PCR de dos colonias seleccionadas para corroborar la presencia del vector pDONR221-ZmVDAC1b, se ocuparon los oligonucleótidos descritos en la **Tabla 8** los cuales amplifican un fragmento de 113 pb del gen *ZmVDAC1b*.

Tabla 8. Oligonucleótidos empleados en la PCR confirmatoria de la clonación de *ZmVDAC1b* en el vector pDONR221.

| Oligonucleótidos | Secuencia (5' → 3') | Tm (°C) |
|------------------|-------------------------------|---------|
| ZmVDAC1b_Fw | GGG AAC TTC ACC AAA TAC AAT G | 55 |
| ZmVDAC1b_Rv | TCA ATT CGC TCA CCT TGT GGT | 52 |

De las dos colonias elegidas, la mitad de ellas se diluyeron en 10 µL de agua libre de nucleasas, se llevó a calentamiento a 90 °C por 10 min, se centrifugó a 3,500 rpm durante 1 min y el sobrenadante se utilizó para el tubo de reacción, con los componentes descritos en la **Tabla 9**, bajo las condiciones de temperatura de predesnaturalización de 98 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 96 °C por

30 s, alineamiento a 47 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 45 s, por último se realizó un ciclo de elongación final a 72 °C por 5 min.

Tabla 9. Componentes y volúmenes para la reacción de PCR confirmatoria de *ZmVDAC1b*.

| Reactivo | Volumen |
|---|----------------|
| PCR master mix (Promega) | 6.25 µL |
| Oligonucleótido Sentido <i>ZmVDAC1b</i> [10 ng/ µL] | 0.5 µL |
| Oligonucleótido Antisentido <i>ZmVDAC1b</i> [10 ng/ µL] | 0.5 µL |
| DNA (colonia) | 2.0 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 12.5 µL |

Los productos resultantes de la reacción correspondientes a las dos colonias seleccionadas, se cargaron en los pozos del gel de agarosa al 2 % con 35 mL bromuro de etidio (0.5 mg/mL), se aplicó una diferencia de potencial a la cámara de electroforesis de 70 V durante 40 min con amortiguador TAE 1X y trascurrido el tiempo, se observó el gel en el transluminador WUV-L50 marca WiseUv ® a 365 nm.

Extracción, purificación y ensayo de restricción del vector pDONR221-*ZmVDAC1b*

De las colonias seleccionadas con la reacción de PCR (+), se crecieron en tubos de rosca con 6 mL de medio LB y 6 µL de Kanamicina (100 mg/mL) durante 24 h a 37 °C con agitación de 150 rpm. Se realizó la purificación del vector de interés del cultivo de células transformantes empleando el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep, de acuerdo con las indicaciones del fabricante, la cuantificación del vector obtenido fue de 512.0 ng/µL. Seguido de ello, se realizó un ensayo de restricción para confirmar la presencia de *ZmVDAC1b* en el vector pDONR221, para este proceso, se emplearon dos enzimas de restricción MluI y BspHI en reacciones separadas para observar un patrón de bandas (**Tabla 10**). El ensayo de restricción se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1 % adicionado con bromuro de etidio en una cámara

de electroforesis a 70 mV durante 40 min en amortiguador TAE 1X y empleando el marcador de 1 kb (Thermo Scientific) en el primer carril.

Tabla 10. Componentes para el ensayo de restricción del vector pDONR221-ZmVDAC1b.

| Reactivo | pDONR221 vacío | pDONR221-ZmVDAC1b con MluI | pDONR221-ZmVDAC1b con BspHI |
|---------------------------------------|----------------|----------------------------|-----------------------------|
| 10X fast Digest buffer | 2.0 µL | 2.0 µL | 2.0 µL |
| Enzima FastDigest (Thermo Scientific) | 1.0 µL | 1.0 µL | 1.0 µL |
| DNA (~200 ng) | 1.0 µL | 1.0 µL | 1.0 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 20.0 µL | c.b.p. 20.0 µL | c.b.p. 20.0 µL |

Reacción de LR clonasa entre el vector pDONR221-ZmVDAC1b y pDEST-42

Como parte del protocolo de la Tecnología Gateway® se procedió con la inserción del gen de interés flanqueado por los extremos attL (pDONR221-ZmVDAC1b), en el vector de expresión pDEST-42. Para ello, se consideraron los volúmenes de la reacción de la **Tabla 11**. La reacción se incubó por 2 h a 25 °C, después de ello se agregaron 2 µL de 2 µg/µL de proteinasa K (Invitrogen®) para terminar la reacción y se incubó a 37 °C por 10 min.

Tabla 11. Componentes para la reacción de LR clonasa.

| Reactivo | Volumen |
|---|----------------|
| Clon de entrada (~100-300 ng) | 1.0 µL |
| Vector destino pDEST-42 (~150 ng/µl) | 1.0 µL |
| Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) | 4.0 µL |
| Amortiguador TE, pH=8.0 | c.b.p. 16.0 µL |

Transformación de células competentes con el vector pDEST42-ZmVDAC1b

El vector resultante de la reacción de LR clonasa se usó para transformar las células competentes DH5α de *E. coli* por medio de un choque de calor con 5 µL del producto de la reacción. Posteriormente, se agregaron 900 µL de medio SOC y se incubó por

90 min a 37 °C con una agitación de 150 rpm. Seguido de una centrifugación a 3,500 rpm durante 1 min, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 100 µL del sobrenadante. Se plaqueó en cajas Petri con agar al 1 %, medio LB y 100 µg/ mL de Ampicilina, para después incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. Se eligieron colonias aisladas para cultivarlas en 6 mL de medio LB adicionado con 6 µL de Ampicilina (100 mg/mL) durante 24 h a 37 °C con agitación de 150 rpm. Transcurrido el tiempo, se guardaron alícuotas de 660 µL en 330 µL de glicerol al 50 % en tubos de 1.5 mL a una temperatura de -70°C para su posterior uso.

PCR de colonia confirmatoria de las células DH5α con el vector pDEST42-ZmVDAC1b

Se realizó una reacción de PCR de dos colonias seleccionadas para corroborar la presencia del vector pDEST42-ZmVDAC1b, se ocuparon los oligonucleótidos descritos anteriormente en la **Tabla 8** con las mismas condiciones empleadas con el vector pDONR221-VDAC1b.

Extracción, purificación y ensayo de restricción del vector pDEST42-ZmVDAC1b

De las colonias seleccionadas con la reacción de PCR (+), se realizó la purificación del vector de interés del cultivo de células transformantes empleando el kit ZymoPURE™ Plasmid Miniprep, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Seguido de ello, se realizó un ensayo de restricción para confirmar la presencia de *ZmVDAC1b* en el vector pDEST42, para este proceso, se emplearon dos enzimas de restricción HindIII y MluI en reacciones separadas para observar un patrón de bandas (**Tabla 12**). El ensayo de restricción se llevó a cabo en un gel de agarosa al 1 % adicionado con 35 µL de bromuro de etidio (0.5 mg/mL) en una cámara de electroforesis a 70 mV durante 40 min en amortiguador TAE 1X y empleando el marcador de 1 kb (Thermo Scientific) en el primer carril.

Tabla 12. Componentes para el ensayo de restricción del vector pDEST42-ZmVDAC1b.

| Reactivo | pDEST42 vacío | pDEST42-ZmVDAC1b con MluI | pDEST42-ZmVDAC1b con HindIII |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------------------|-------------------------------------|
| 10X fast Digest buffer | 2.0 µL | 2.0 µL | 2.0 µL |
| Enzima FastDigest (Thermo Scientific) | 1.0 µL | 1.0 µL | 1.0 µL |
| DNA (~200 ng) | 2.0 µL | 3.0 µL | 1.0 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 20.0 µL | c.b.p. 20.0 µL | c.b.p. 20.0 µL |

Transformación del vector pDEST42-ZmVDAC1b en las células competentes

***E. coli* BL21-RIL**

El vector pDEST42-ZmVDAC1b resultante de la purificación se empleó para transformar las células competentes BL21-RIL de *E. coli*, una cepa que ha sido genéticamente modificada para mejorar la producción de proteínas recombinantes. La transformación se realizó por medio de un choque de calor con 10 µL del plásmido, posteriormente, se realizó la adición de 900 µL de medio SOC y se incubó por 90 min a 37 °C con una agitación de 150 rpm. Seguido de una centrifugación a 3,500 rpm durante 1 min, el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 100 µL del sobrenadante. Se plaqueó en cajas Petri con agar al 1 %, medio LB, 100 µg/ mL de Ampicilina y 30 µg/ mL de Cloranfenicol, para después incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. Se escogieron las colonias aisladas para cultivarlas en 6 mL de medio LB adicionado con 3 µL de Ampicilina (100 mg/mL) y 3 µL de Cloranfenicol (30 mg/mL) durante 24 h a 37 °C con agitación de 150 rpm.

Inducción de proteína recombinante ZmVDAC1b y resolución de la proteína en geles de poliacrilamida-SDS

Para la producción de la proteína recombinante se siguieron las indicaciones de Magri *et al.*, 2019 con algunas modificaciones. En un matraz de 50 mL con 20 mL de medio LB, se adicionaron 3 mL del precultivo con las células BL21-RIL transformantes para el vector pDEST42-ZmVDAC1b. El tubo se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 150 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de

0.4-0.5 a 600 nm, se tomó una alícuota de 1 mL antes de agregar el isopropil - β -D -tiogalactopiranosido (IPTG), muestra control no inducido (t_0). Posteriormente, se hizo la inducción de la expresión de proteínas, agregando IPTG a una concentración final de 0.5 mM, se incubó en agitación constante a una temperatura de 28 °C y se tomaron alícuotas de 1 mL cada hora durante 6 h para evaluar el tiempo óptimo de inducción. Las muestras obtenidas se sonicaron a una amplitud del 25 %, pulsos de 30 s y descansos de 15 s durante 5 minutos. Se preparó un gel de acrilamida que contenía 4 % de poliacrilamida-SDS en el gel concentrador, 15 % en el gel separador y 0.75 mm de grosor (**Anexo 5**). Las muestras desde el t_0 al t_6 se cargaron en los pozos del gel, en el primer carril colocaron 3 μ L el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual color (BioRad), las condiciones de corrida fueron a 15 mA hasta pasar el gel concentrador y 25 mA hasta el final del gel. El gel obtenido se tiñó con la disolución teñidora con azul de Coomassie (**Anexo 5**) durante toda la noche, posteriormente se decantó y se agregó la disolución desteñidora (**Anexo 5**) hasta observar un fondo traslúcido en el gel y que se identificaran las bandas en los geles. Los registros fotográficos se obtuvieron con el equipo ChemiDoc System de BioRad.

Ensayo de Western Blot

Una vez finalizada la electroforesis, se transfirió el gel no teñido de poliacrilamida-SDS a una membrana de PVDF (Immobilon® Transfer Membrane) de 0.45 μ m. Previamente, la membrana utilizada se sumergió 5 minutos en metanol y se pasó al amortiguador de transferencia (**Anexo 6**) por 5 minutos, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Posteriormente, el gel se colocó en el cassette de plástico de la siguiente forma: cassette negro, esponja, hoja de papel filtro, gel, membrana de PVDF, papel filtro, esponja y cassette rojo, lo anterior, se realizó en un recipiente con amortiguador de transferencia, para asegurar humedecer todos los elementos. El cassette preparado se colocó en una cámara de electrotransferencia de tal manera que la membrana estuviera orientada hacia el ánodo para que las proteínas se transfirieran desde el gel. La electrotransferencia se realizó por 3 h a 25 V con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se enjuagó

la membrana con la disolución TBS (**Anexo 6**) y después se colocó en un recipiente con la disolución bloqueadora (**Anexo 6**) por 1 h, agitación suave utilizando una plataforma y a temperatura ambiente. Después, se realizaron tres lavados de la membrana con la disolución de TTBS (**Anexo 6**) durante 5 min cada lavado y agitación suave. Una vez lavada la membrana, esta se colocó en un recipiente con 10 mL de la disolución de bloqueo con el anticuerpo Anti-V5-HRP (Invitrogen) 1:5,000, y se incubó con agitación constante durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 5 lavados de la membrana con duración de 5 minutos y agitación suave, con la disolución de TTBS. Para el revelado de la membrana, se mezclaron 750 μ L de la disolución 1 (peróxido) con 750 μ L de la disolución 2 (luminol), ambas disoluciones se distribuyeron homogéneamente en la membrana, se dejó interactuando hasta observar las bandas con intensidad suficiente.

Clonación mediante enzimas de restricción

Obtención del gen *ZmVDAC1b* a partir del vector pGEM T easy-*ZmVDAC1b*.

Una estrategia alterna fue la clonación clásica por medio de enzimas de restricción. En el grupo de trabajo se contaba con la construcción del vector pGEM T easy-*ZmVDAC1b* a una concentración de 591.5 ng/ μ L (**Anexo 7**; producido por Rodríguez-Saavedra), a este se le realizó un ensayo de restricción (**Tabla 13**) empleando la enzima EcoRI, la cual flanqueaba el gen de interés (925 pb), se separó el fragmento que contenía *ZmVDAC1b* mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 % con 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio en amortiguador TAE 1X, usando como estándar el marcador de 100 pb (Thermo Scientific). Después del corrimiento por 40 min a 70 mV, se purificó el producto de la restricción con el kit de extracción GenElute™ Gel Extraction Kit de Sigma-Aldrich® utilizando las instrucciones del fabricante.

Tabla 13. Componentes para el ensayo de restricción del vector pGEM T easy-ZmVDAC1b.

| Reactivo | Volumen (μL) |
|--------------------------------------|---|
| 10X fast Digest buffer | 2.0 |
| EcoRI FastDigest (Thermo Scientific) | 1.0 |
| DNA (~200 ng) | 0.4 |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 12.5 |

Ligación del fragmento con el gen *ZmVDAC1b* en el vector pBluescript II KS(+)

Una vez purificado el fragmento de interés, este se insertó en el vector de clonación pBluescript II KS(+) que también fue restringido con la enzima EcoRI y purificado como se describió anteriormente. Se realizó la reacción de ligación que contenía 1.2 μL del fragmento purificado con *ZmVDAC1b* [13.6 ng/ μL], 15.0 μL del vector pBluescript II KS (+) [5.3 ng/ μL], 2.0 μL de amortiguador DNA ligasa T4 (Promega), 1 μL de T4 DNA ligasa [3 U/ μL] y c.b.p. 20.0 μL de H₂O libre de nucleasas. La reacción se incubó durante 3 h a 25 °C y se detuvo a 65 °C por 10 min.

Transformación de células competentes con el vector pBluescript II KS(+) *ZmVDAC1b*

El vector resultante de la reacción de ligación se usó para transformar las células competentes según se describió anteriormente. El botón resuspendido se plaqueó en cajas Petri que contenía LB/Agar/IPTG/X-gal (**Anexo 4**), para dejar incubando las placas a 37 °C durante toda la noche. Luego de observar crecimiento de células en las placas, se eligieron las colonias blancas aisladas y una colonia azul (fue empleada como control positivo en el ensayo de restricción), para crecerlas en tubos con 6 mL de medio LB adicionado con 6 μL de Ampicilina 100 mg/mL durante 24 h a 37 °C y con agitación a 150 rpm. Transcurrido el tiempo, se guardaron alícuotas de 660 μL en 330 μL de glicerol al 50 % en tubos de 2 mL a una temperatura de -70 °C para su posterior uso.

Extracción y purificación de vectores

De los tubos con crecimiento celular, se realizó la purificación del vector de interés empleando el kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep (Jena Bioscience®) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Ensayos de restricción y purificación de los fragmentos de interés

Se realizó un ensayo de restricción a los vectores pBluescript II KS(+)- ZmVDAC1b y pBluescript II KS(+) vacío, con la finalidad de corroborar la presencia del gen de interés. La restricción se realizó empleando las enzimas de restricción XbaI y Sall. También se digirió el vector de expresión pDEST42 con ambas enzimas según el protocolo para ensayos de restricción de Thermo Scientific® (**Tabla 14**).

Los productos del ensayo de restricción se separaron en un gel de agarosa al 1 % con 0.5 µg/mL bromuro de etidio y usando como estándar el marcador de 1 kb (Thermo Scientific), la separación ocurrió durante 40 min a 70 mV en el amortiguador de corrida TAE 1X, los resultados se visualizaron en el transluminador WUV-L50 marca WiseUv® a 365 nm y las dos bandas de interés, correspondientes al fragmento con el gen *ZmVDAC1b* (982 pb) y el vector pDEST sin el ccdB (2,904 pb) fueron purificadas con el kit de extracción GenElute™ Gel Extraction Kit de Sigma-Aldrich® siguiendo las indicaciones del fabricante.

Tabla 14. Componentes para el ensayo de restricción de los vectores pBluescript II KS(+), pBluescript II KS(+) ZmVDAC1b y pDEST42.

| Reactivo | Vector digerido | | |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------|
| | pBluescript II KS(+) | pBluescript II KS(+) ZmVDAC1b | Vector pDEST42 |
| 10X Fast Digest buffer | 2.0 µL | 2.0 µL | 2.0 µL |
| XbaI FastDigest (Thermo Scientific) | 0.75 µL | 0.75 µL | 0.75 µL |
| Sall FastDigest (Thermo Scientific) | 0.75 µL | 0.75 µL | 0.75 µL |
| DNA (~200 ng) | 2.0 µL | 2.0 µL | 2.0 µL |
| Agua libre de nucleasas | c.b.p. 12.5 µL | c.b.p. 12.5 µL | c.b.p. 12.5 µL |

Ligación de ZmVDAC1b en pDEST42

Se realizó una reacción de ligación con los fragmentos purificados, con 1.5 µL del fragmento purificado con ZmVDAC1b, 15.0 µL del vector pDEST42, 2.0 µL de amortiguador DNA ligasa T4 (Promega), 1 µL de T4 DNA ligasa [3 U/ µL] y c.b.p. 20.0 µL de H₂O libre de nucleasas, conforme al protocolo de ligación de Promega®.

Transformación de pDEST42-ZmVDAC1b, purificación y ensayos de restricción

Se siguió el protocolo de transformación antes descrito, utilizando las células competentes DH5α de *E. coli*. El botón resuspendido se plaqueó en cajas Petri con agar 15 g/L, medio LB 20 g/L y Ampicilina 0.1 mg/mL. Se dejó incubando durante toda la noche a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se picaron varias colonias y se crecieron en tubos con 6 mL de medio LB adicionado con 6 µL de Ampicilina 100 mg/mL durante 24 h a 37 °C y una agitación constante de 150 rpm. A partir de los 6 mL de medio se purificó plásmido con el kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep de Jena Bioscience®.

Para confirmar la inserción del gen *ZmVDAC1b* en el vector pDEST42 (**Anexo 8**), se realizó la restricción del vector usando la enzima de restricción MluI. Los volúmenes empleados fueron 2.1 µL de pDEST42-ZmVDAC1b (~200 ng), 1.0 µL de MluI (Thermo Scientific), 2.0 µL de 10X fast Digest buffer (Thermo Scientific) y agua libre de nucleasas c.b.p 20.0 µL. Posteriormente, se realizó la separación electroforética en gel de agarosa como anteriormente se describió.

Transformación de pDEST42-ZmVDAC1b en la cepa *E. coli* BL21-RIL

Para la expresión de ZmVDAC1b en bacteria, se realizó la transformación de la cepa *E. coli* BL21-RIL con el vector pDEST42-ZmVDAC1b de acuerdo con el protocolo anteriormente mencionado. Después de la transformación las células fueron esparcidas en cajas con medio LB-Amp. Luego del periodo de incubación, se eligieron varias colonias con forma cóncava de color blancas a amarillas y se pusieron a crecer en tubos con 6 mL de medio LB con 6 µL de Ampicilina 100 mg/mL

durante 24 h a 37 °C con agitación de 150 rpm. Estos fueron los precultivos y se almacenaron alícuotas de 660 µL en 330 µL de glicerol al 50 % en tubos de 2 mL a -70 °C.

Inducción de proteína recombinante ZmVDAC1b

Para la producción de la proteína recombinante se siguieron las indicaciones de Magri *et al.*, 2019 con algunas modificaciones. En un tubo con tapón de rosca con 15 mL de medio LB, se adicionaron 3 mL del precultivo con las células BL21-RIL transformantes para el vector pDEST42-ZmVDAC1b. El tubo se incubó a 37 °C en un agitador orbital a 150 rpm hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0.4-0.5 a 600 nm, se tomó una alícuota de 1 mL antes de agregar el IPTG, muestra control no inducido (t_0). Posteriormente, se hizo la inducción de la expresión de proteínas, agregando IPTG a una concentración final de 0.5 mM, se incubó en agitación constante a una temperatura de 28 °C y se tomaron alícuotas de 1 mL cada hora durante 8 h para evaluar el tiempo óptimo de inducción. 15 µL del volumen correspondiente a las alícuotas de cada tiempo fueron cargadas en un gel de poliacrilamida, el gel concentrador contenía 4 % de poliacrilamida-SDS y el separador fue al 15 %, el grosor del gel fue de 0.75 mm (**Anexo 5**).

En el primer carril se cargaron 3 µL el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual color (BioRad), las condiciones de corrida fueron a 60 V hasta pasar el gel concentrador y 85 V hasta el final del gel. Los geles obtenidos se tiñeron con la disolución teñidora con azul de Coomassie (**Anexo 5**) durante toda la noche, posteriormente se decantó y se agregó la disolución desteñidora (**Anexo 5**) hasta observar un fondo traslúcido en el gel y que se identificaran las bandas en los geles. Los registros fotográficos se obtuvieron con el equipo ChemiDoc System de BioRad.

RESULTADOS

Identificación de los miembros de la familia ZmVDAC

A. Construcción de la base de datos de ZmVDAC

El análisis bioinformático previo a la caracterización de proteínas como las VDAC, es un proceso fundamental para analizar lo que se encuentra depositado en las bases de datos. En el presente trabajo se identificaron las secuencias a nivel de nucleótidos que codifican para las proteínas VDAC en maíz. Para lograrlo, se construyó una base de datos y se establecieron los criterios para la selección de las secuencias que presentaran el mayor potencial para codificar una proteína VDAC (*Figura 8; Anexo 9*).



Figura 8. Criterios para descartar secuencias de la familia VDAC de maíz en la construcción de la base de datos.

Inicialmente, la base de datos se generó con los registros de ortólogos de *Z. mays* de la base de datos Uniprot, utilizando como palabras de búsqueda VDAC AND taxonomy_id:4577 (taxonomía del maíz). Se eliminaron las secuencias con anotaciones correspondientes a proteínas no relacionadas con VDAC, con lo que se tuvo un total de 38 secuencias identificadas con el nombre de “VDAC”, “porina”, “proteína porina de la membrana plastidial externa”, “proteína porina de la membrana mitocondrial externa” o “proteína no caracterizada”. Posteriormente, se

realizó la búsqueda de las secuencias en distintas bases de datos (MaizeGDB, NCBI, ENA y EnsemblPlants) para garantizar que se trataba de una misma secuencia y no de aquellas procedentes de fragmentos de secuencias o incluso otras similares, y de esta forma, corroborar la veracidad de su anotación. Se descartaron aquellas secuencias que no fueron encontradas en al menos dos bases de datos, quedando un total de 18 secuencias (**Tabla 15**).

Tabla 15. Características de las secuencias VDAC en maíz incluidas en la base de datos de manera inicial.

| Nº | Nombre | Localización cromosómica | Número de nucleótidos | Número de aminoácidos | ID Uniprot |
|----|-------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------|
| 1 | ZmVDAC1a | chr 2: 181,511,123-181,512,600 | 831 | 276 | Q9SPD9 |
| 2 | ZmVDAC1b | chr7: 102,142,586-102,146,487 | 831 | 276 | A0A1D6I2X6 |
| 3 | ZmVDAC2_2 | chr6:172,936,942-172,940,416 | 831 | 276 | Q9SPD7 |
| 4 | ZmPorin1_0 | chr8: 143,733,235-143,739,212 | 828 | 275 | K7VJ77 |
| 5 | ZmVDAC3_1 | chr3: 225,067,705-225,070,108 | 828 | 275 | B4FX24 |
| 6 | ZmUP | chr1: 8,303,887-8,307,439 | 831 | 276 | A0A804LDA0 |
| 7 | ZmVDAC4 | chr9: 158,366,536-158,370,125 | 831 | 276 | B6T1E3 |
| 8 | ZmOMMPP | chr1: 22,812,096-22,816,226 | 828 | 275 | A0A1D6JS28 |
| 9 | ZmMOMPP2 | chr9: 154,265,975-154,271,184 | 828 | 275 | C4IYM7 |
| 10 | ZmOPMPPPOR1 | chr8: 143,840,623-143,843,517 | 834 | 277 | P42057 |
| 11 | ZmOMM | chr3: 208,258,352-208,260,807 | 834 | 277 | B6TAU9 |
| 12 | ZmMOMPP4 | chr1: 8,304,556-8,306,909 | 852 | 283 | A0A1D6JN64 |
| 13 | ZmVDAC3_0 | chr8: 139,640,236-139,648,936 | 834 | 277 | A0A1D6FWS5 |
| 14 | ZmVDAC2_0 | chr6: 160,830,973-160,834,492 | 915 | 304 | A0A3L6EA00 |
| 15 | ZmVDAC2_1 | chr8: 139,383,756-139,390,389 | 945 | 314 | A0A3L6DRN5 |
| 16 | ZmPorin1_1 | chr8: 143,840,897-143,843,253 | 912 | 303 | A0A1D6FYA4 |
| 17 | ZmOMMPorin1 | chr1: 8,298,475-8,301,181 | 768 | 255 | A0A1D6JN63 |
| 18 | ZmVDAC6 | chr1: 9,306,992-9,316,363 | 1275 | 424 | A0A317Y8M0 |

B. Análisis de las estructuras primarias, secundarias y terciarias de la familia ZmVDAC

Para determinar si las secuencias escogidas se traducían a una VDAC típica, se analizaron las secuencias traducidas de cada una de las 18 secuencias (**Tabla 15**). En el **Anexo 1**, se encuentra el alineamiento múltiple de las 18 secuencias a nivel de aminoácidos en donde se observa que hay al menos 9 secuencias con algunas diferencias en los aminoácidos con respecto a las demás isoformas (**Tabla 16**).

Tabla 16. Secuencias de VDAC que presentan extensiones o regiones de residuos faltantes en comparación con las 18 secuencias ZmVDAC analizadas.

| Secuencia | Regiones extendidas | Regiones Faltantes |
|-------------|--|---|
| ZmVDAC6 | <ul style="list-style-type: none"> • 140 aminoácidos más en el N-terminal. • 6 aminoácidos más a partir del residuo 166. | |
| ZmOMMPorin1 | <ul style="list-style-type: none"> • Inserción de 4 aminoácidos a partir del residuo 236. | <ul style="list-style-type: none"> • El carboxilo-terminal es 15 aminoácidos más corto. • Falta de 4 residuos de aminoácidos a partir de la posición 4. |
| ZmVDAC2_0 | <ul style="list-style-type: none"> • 28 aminoácidos más a partir del residuo 42. | <ul style="list-style-type: none"> • Le faltan dos residuos a partir del aminoácido 222. |
| ZmVDAC2_1 | <ul style="list-style-type: none"> • 38 aminoácidos más a partir del residuo 42. | <ul style="list-style-type: none"> • Le faltan dos residuos a partir del aminoácido 232. |
| ZmPorin1_1 | <ul style="list-style-type: none"> • 28 aminoácidos más a partir del residuo 39. | |
| ZmMOMPP4 | <ul style="list-style-type: none"> • 11 aminoácidos más en el N-terminal. | <ul style="list-style-type: none"> • Falta de 4 residuos de aminoácidos a partir de la posición 20. |
| ZmOMM | <ul style="list-style-type: none"> • Inserción de 2 aminoácidos a partir del residuo 263. | |
| ZmVDAC3_0 | | <ul style="list-style-type: none"> • Le faltan los residuos 370 y 371. |
| ZmVDAC2_2 | | <ul style="list-style-type: none"> • Le faltan dos residuos a partir del aminoácido 194. |

ZmVDAC6 sería la secuencia con el mayor número de diferencias con respecto al resto de las secuencias, seguida de ZmOMMPorin quién además de presentar inserciones, carece de 15 aminoácidos en el extremo carboxilo-terminal. También ZmVDAC2_0, ZmVDAC2_1 y ZmPorin1 presentan una inserción entre 28 y 38 aminoácidos que podría cambiar el plegamiento de la proteína. ZmMOMPP4 presentan un N-terminal más largo. ZmOMM difiere de las otras 17 secuencias en la inserción de dos aminoácidos, contrario a ZmVDAC3_0 y ZmDAC2_2, quienes carecen de dos aminoácidos al igual que ZmVDAC2_0 y ZmVDAC2_1.

Para conocer si las secuencias podían formar láminas β , se obtuvieron las predicciones de las estructuras secundarias para cada una de las secuencias en el servidor MINNOU y PSIPRED. En la figura 9, se muestra el análisis de ZmVDAC1b aunque todas las secuencias fueron analizadas y presentaron las mismas estructuras secundarias que ZmVDAC1b. El análisis de las estructuras secundarias con MINNOU muestra la presencia en el extremo amino terminal, de una α -hélice seguido de 19 láminas β (**Figura 9A**) y aunque el servidor PSIPRED también encuentra las 19 láminas β , predice dos α -hélices en la región amino terminal (**Figura 9B**). La predicción coincide con el número de láminas β que se presentan en las proteínas VDAC de otros organismos, y también con que se ha encontrado que tienen una α -hélice en el N-terminal (De Pinto *et al.*, 2021). De manera particular llama la atención que la secuencia ZmVDAC6 presenta un número diferente de láminas β que el que presentan las otras secuencias, al igual que un número mayor de aminoácidos.

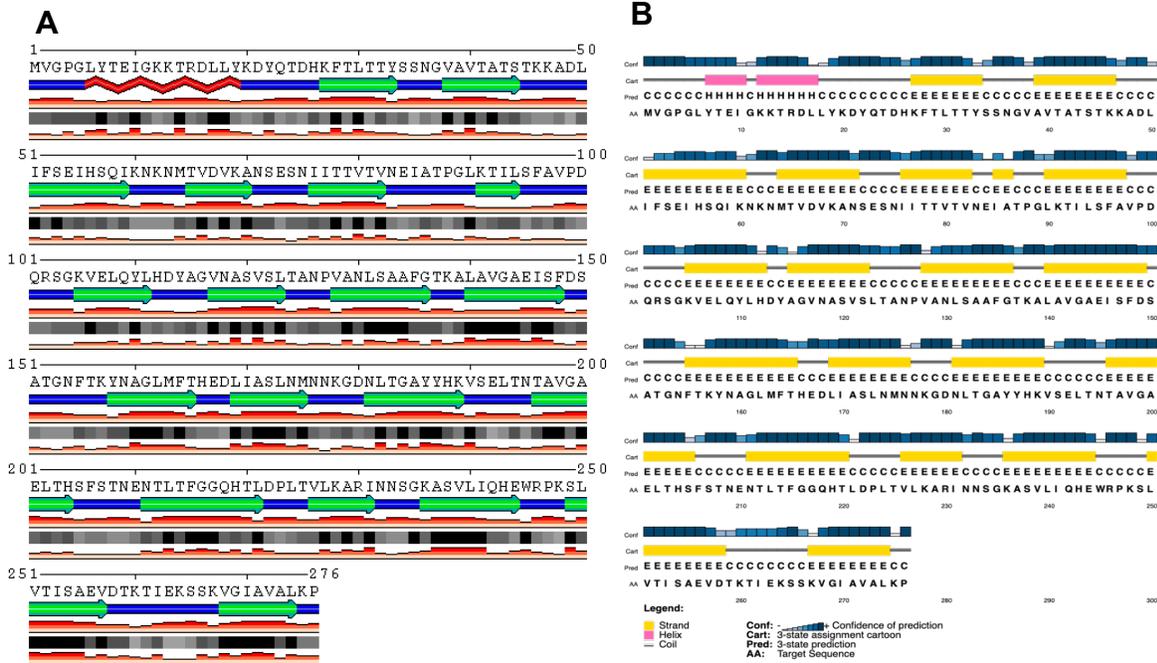
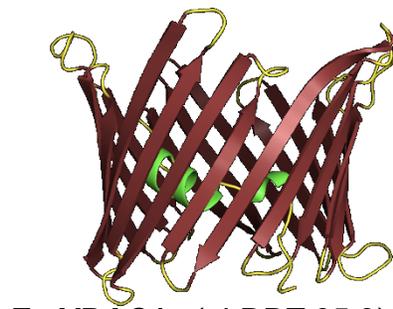


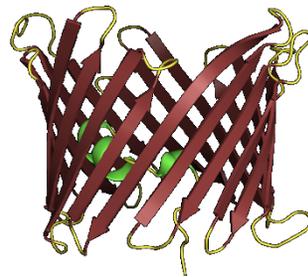
Figura 9. Estructura secundaria de ZmVDAC1b.

A. Predicción obtenida del servidor MINNOU, se muestra 19 láminas β (verde) y 1 hélice (rojo). **B.** Predicción obtenida del servidor PSIPRED, presenta 19 láminas β (amarillo) y 2 hélices α (rosa), la confiabilidad de la predicción del asa enlazadora de las dos α hélices es baja.

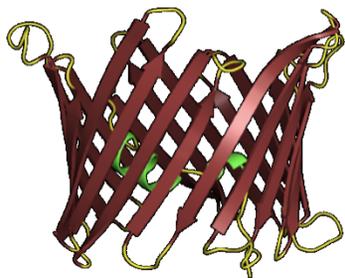
Para determinar si las proteínas presentaban una conformación espacial como barril β , se generaron los modelos tridimensionales de las proteínas usando el servidor Alpha Fold 2 (**Figuras 10 y 11**). La mayoría de las secuencias forma un barril, compuesto por láminas β dispuestas de forma antiparalela con arreglos distribuidos en una forma de estructura cerrada. Además, en todas las estructuras los residuos del extremo amino terminal forman al menos dos α -hélices y en algunos casos, como las estructuras ZmPorin1_0, ZmOPMPPPOR1 y ZmMOMPP2 presentan de manera adicional una tercera hélice α . En el caso de ZmPorin1_0 se encuentra entre las láminas β 14 y 15 y para las otras dos secuencias entre las láminas β 13 y 14 (**Figura 10**). La presencia de las α -hélices en el extremo amino se ha sugerido puede estar involucrada en la regulación de la apertura y cierre del canal (Mannella, 2021), por lo que es importante que la estructura predicha si contenga la α -hélice en el N-terminal.



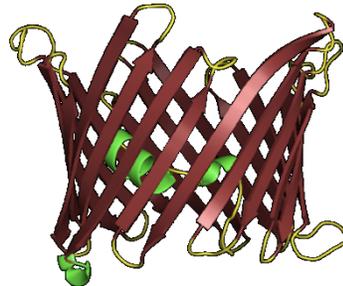
ZmVDAC1a (pLDDT 95.3)



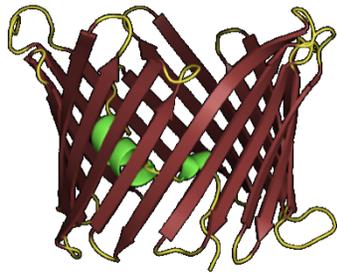
ZmVDAC1b (pLDDT 94.4)



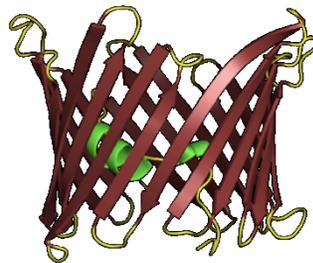
ZmVDAC2_2 (pLDDT 94.4)



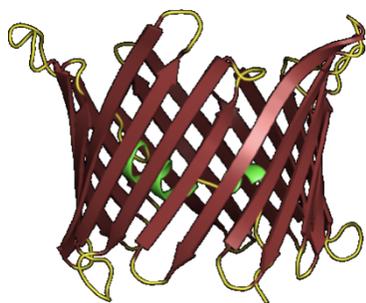
ZmPorin1_0 (pLDDT 93.9)



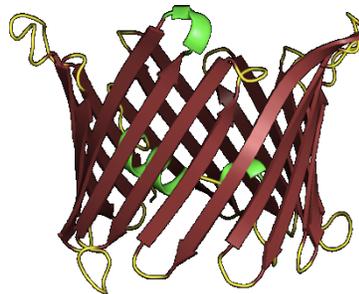
ZmVDAC3_1 (pLDDT 93.9)



ZmVDAC4 (pLDDT 93.4)



ZmOMMPP (pLDDT 94.2)



ZmMOMPP2 (pLDDT 95)

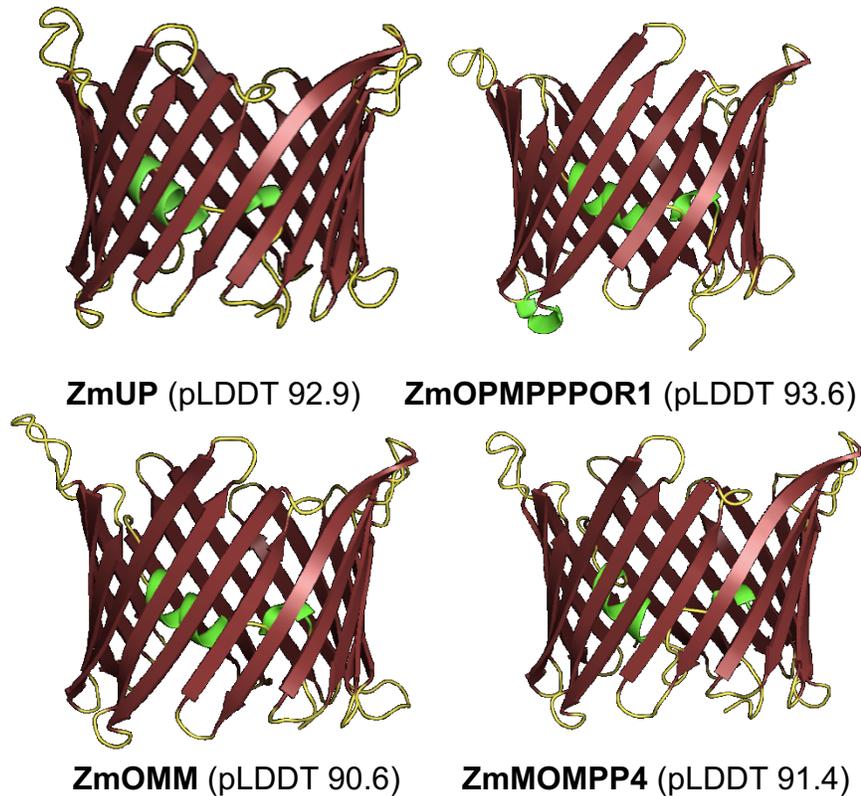


Figura 10. Predicción de las estructuras terciarias de ZmVDAC con el valor de pLDDT ≥ 90 .

Estructuras modeladas obtenidas mediante el servidor AlphaFold 2, las asas se presentan en color amarillo, láminas β representadas en color vino y α -hélice en verde.

Alpha Fold proporciona no solo la estructura de la proteína, sino también varios valores. El valor de pLDDT (Predicted local distance difference test) es útil, ya que se relaciona con la confianza de la predicción de la estructura en una escala de 0 a 100. De las 18 proteínas modeladas se consideraron que solo 12 estructuras eran confiables por presentar un valor de pLDDT ≥ 90 (**Figura 10**), es decir, a partir del valor donde se considera que las predicciones son muy precisas y además donde las proteínas presentan las cadenas laterales correctamente orientadas (Tunyasuvunakool *et al.*, 2021).

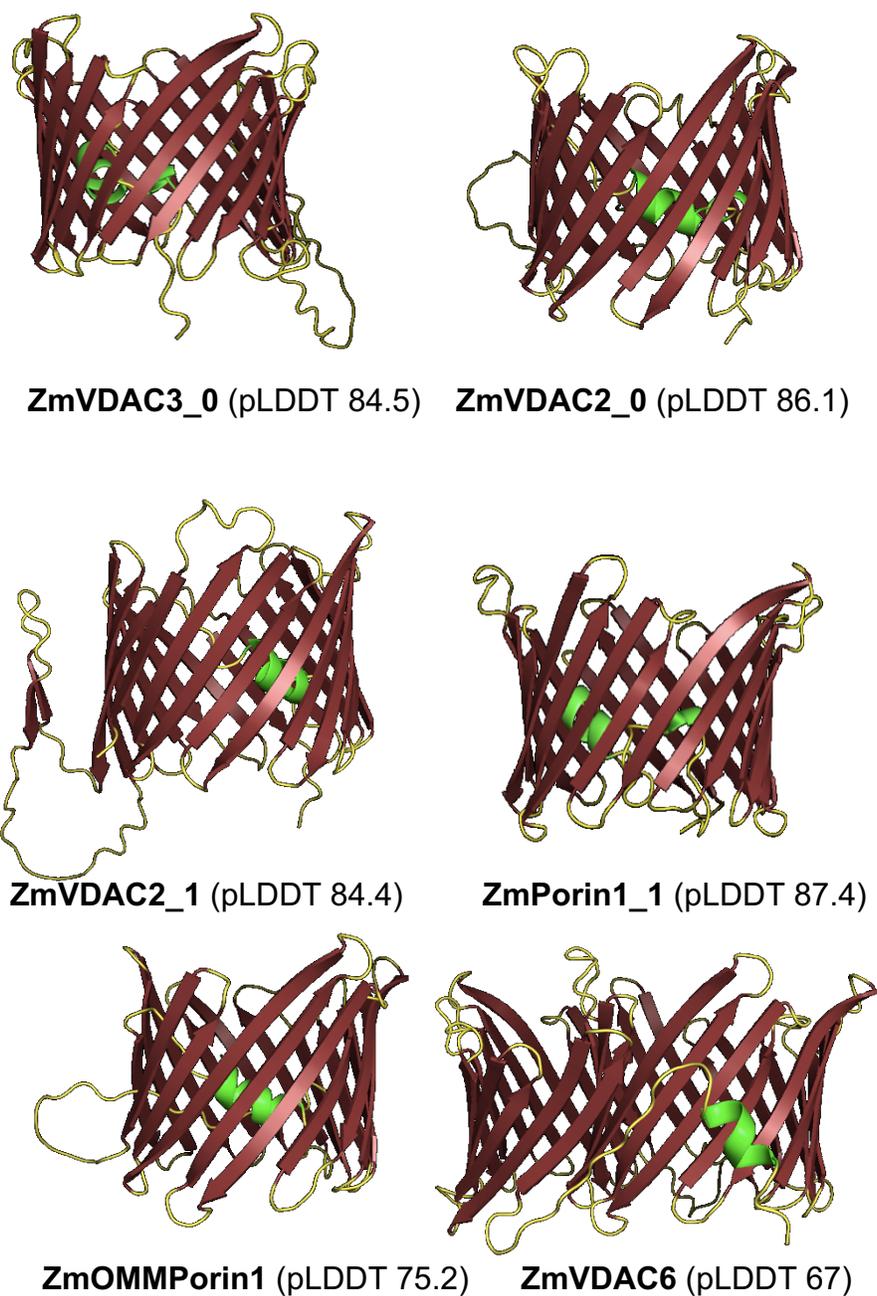


Figura 11. Predicción de las estructuras terciarias de ZmVDAC con el valor de pLDDT < 90.

Modelos tridimensionales obtenidos mediante el servidor AlphaFold 2, las asas se presentan en color amarillo, láminas β representadas en color vino y α -hélice en verde.

En las estructuras con un valor pLDDT < 90 (**Figura 11**) se pueden observar que aparecen asas largas que conectan una hoja β con otra y que no se encuentran en las estructuras con valores pLDDT \geq 90 (**Figura 10**), o bien arreglos como el de ZmVDAC6 en donde hay un número mayor de láminas β que no forman un barril y que hace que la α -hélice de la región amino no quede por dentro de la estructura.

Adicionalmente, al modelo de AlphaFold2 se utilizó otro criterio para tener un análisis robusto de las estructuras 3D, el valor de RMSD (root mean square deviation), el cual da una métrica de similitud entre conformaciones moleculares. Para obtener este valor se realizaron los alineamientos estructurales entre cada una de las isoformas de ZmVDAC con la estructura modelo de ratón, MmVDAC (PDB: 3emn, Ujwal *et al.*, 2008) y con una estructura control de plantas, AtVDAC (*Arabidopsis thaliana*) la cual presenta una puntuación de 5 en la escala heurística, es decir, que es una secuencia de la que se tiene una gran confianza de ser VDAC (Uniprot). Las comparaciones se realizaron utilizando el programa PyMOL (**Tabla 17**).

El RMSD como se mencionó anteriormente se emplea para medir la similitud estructural entre dos conformaciones, así como para determinar la calidad de la reproducción de una estructura desconocida a partir una ya conocida, a través de las coordenadas atómicas entre las dos moléculas que se superponen. De esta manera, entre menor sea el valor de RMSD, mayor es el grado de similitud entre ambas estructuras (Liebeschuetz *et al.*, 2012). Para las ZmVDAC, solo 13 de las 18 estructuras presentan un valor de RMSD menor al control comparado de AtVDAC con MmVDAC (RMSD 2.49), por lo tanto, se consideran conformaciones moleculares de alta similitud. Mientras que las estructuras 3D de 5 de las secuencias modeladas ZmVDAC1a, ZmMOMPP4, ZmVDAC2_0, ZmOMMPorin1 y ZmVDAC6 no cumplen con este criterio.

Tabla 17. Valor de RMSD entre las ZmVDAC y AtVDAC1 comparadas con MmVDAC1 en el programa PyMOL.

| Isoforma | RMSD comparado con MmVDAC1 | Cobertura de residuos |
|-----------------|-----------------------------------|------------------------------|
| ZmVDAC4 | 2.23 | 272 |
| ZmOMMPP | 2.25 | 272 |
| ZmVDAC3_1 | 2.26 | 272 |
| ZmPorin1_1 | 2.27 | 272 |
| ZmUP | 2.28 | 272 |
| ZmOPMPPPOR1 | 2.28 | 272 |
| ZmOMM | 2.32 | 272 |
| ZmVDAC2_1 | 2.32 | 240 |
| ZmPorin1_0 | 2.34 | 272 |
| ZmVDAC1b | 2.45 | 272 |
| ZmVDAC2_2 | 2.45 | 272 |
| ZmMOMPP2 | 2.45 | 272 |
| ZmVDAC3_0 | 2.46 | 272 |
| AtVDAC1 | 2.49 | 264 |
| ZmVDAC1a | 2.52 | 272 |
| ZmMOMPP4 | 2.66 | 272 |
| ZmVDAC2_0 | 2.71 | 272 |
| ZmOMMPorin1 | 2.98 | 240 |
| ZmVDAC6 | 3.90 | 240 |

Si bien los valores de RMSD nos dan una medida cuantitativa de la semejanza estructural, podemos hacer la comparación visual de una estructura control con cada una ZmVDAC. Aquí se presenta una comparación entre ZmVDAC1b con MmVDAC1 y se observa que ambas estructuras son similares (**Figura 12**), siendo el valor de RMSD de 2.45 (**Tabla 17**). El grado de semejanza entre las secuencias de ratón y maíz es alto a pesar de que la identidad de la secuencia primaria entre ambas proteínas es de apenas del 21.61 %, es decir, guardan una estrecha relación en cuanto a la conformación a pesar de provenir de especies distintas.

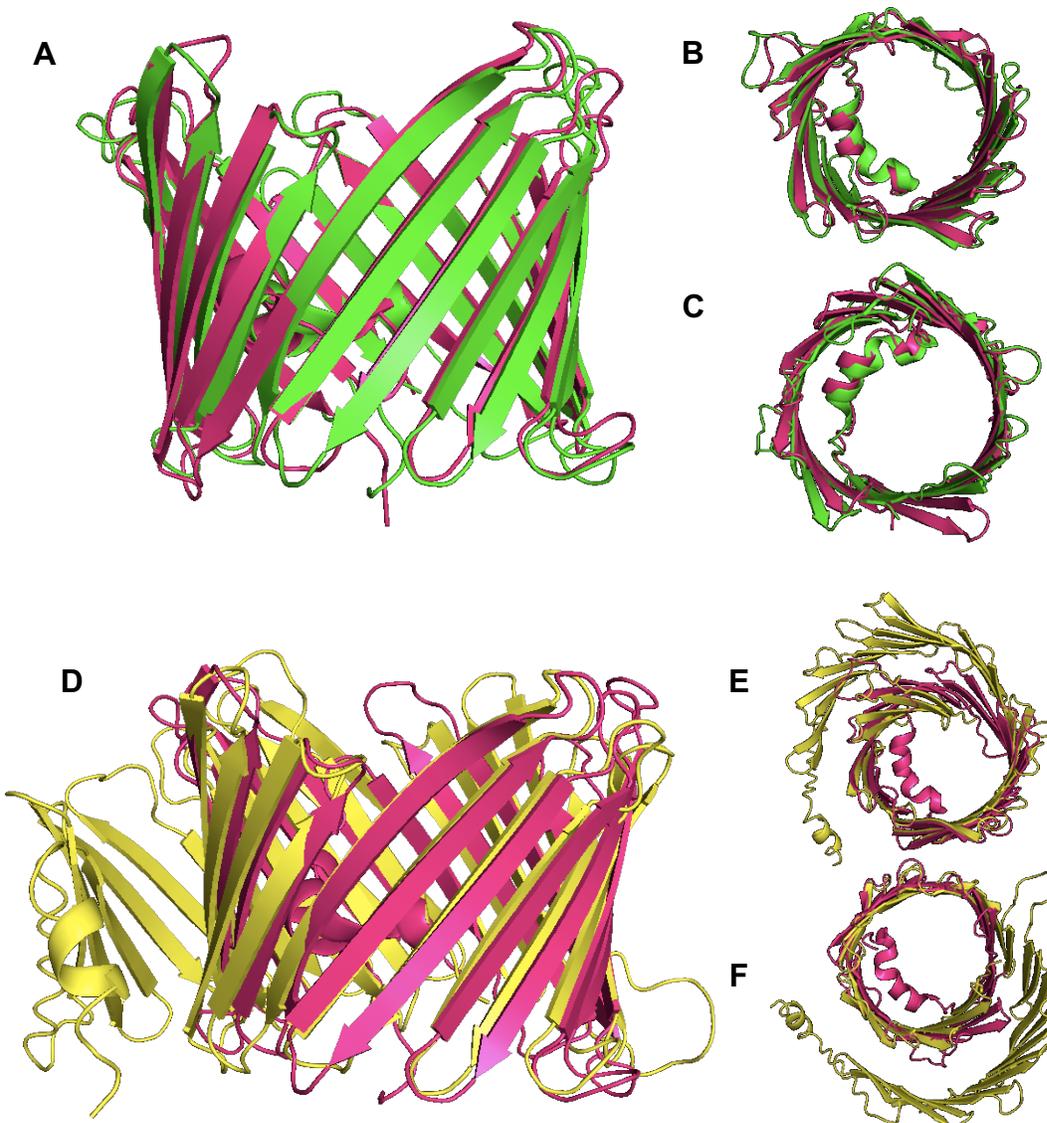


Figura 12. Superposición de las estructuras ZmVDAC1b y ZmVDAC6 con MmVDAC1.

Estructuras predichas por AlphaFold 2 de ZmVDAC1b (A, B y C, verde) con pLDDT 94.4 y ZmVDAC6 (D, E y F, amarillo) pLDDT 67.0, superpuestas con VDAC1 de ratón (rosa) reportada en la base de datos del Protein Data Bank (PDB:3emn), $\text{RMSD}_{\text{ZmVDAC1b}}=2.45$, $\text{RMSD}_{\text{ZmVDAC6}}=2.90$. **A y D.** Vista lateral. **B y E.** Vista en el plano transversal en vista inferior. **C y F.** Vista en el plano transversal en vista superior.

Utilizando ambos criterios, el valor de pLDDT (**Figuras 10 y 11**) y el RMSD (**Tabla 17**) y considerando además las inserciones o deleciones en las secuencias de aminoácidos (**Tabla 16**), se predice que las estructuras de ZmVDAC6,

ZmOMMPorin1 y ZmVDAC2_0, no cumplen con los criterios de alta confiabilidad de que la estructura presente la conformación predicha y/o que la estructura no es tan cercana a la estructura de un barril β clásico. Además, las estructuras de ZmVDAC2_1, ZmVDAC3_0, y ZmPorin1_1 si bien presentan RMSD menores al del control AtVDAC1, los valores de pLDDT indicarían una baja resolución de la estructura, aunado a los cambios observados en las extensiones o residuos faltantes de las secuencias. Si la estructura que se predice es la que presentarían *in vivo*, las asas de unión entre las láminas β resultarían ser más prolongadas en comparación con el resto de las proteínas o se observarían algunas láminas β fuera de la estructura del barril, incluso, como es el caso de ZmVDAC6 con la presencia de un espiral de láminas β y no de un barril (**Figura 12D**). Todo lo anterior como producto de las inserciones o deleciones en aminoácidos que ya habíamos notado que se presentan en las 6 proteínas y que podría sugerirse afectará su función, puesto que la similitud estructural es una característica de las VDAC en diferentes reinos. A pesar de lo anterior, no se puede descartar que la mayoría de estas proteínas podrían ser proteínas funcionales, excepto por ZmVDAC6.

C. Intrones y exones de los genes *ZmVDAC*

Otro criterio de análisis *in silico* que se usó para identificar las secuencias de VDAC que efectivamente podrían ser traducidas a proteínas, fue obtener la distribución de exón/intrón de cada uno de los 18 genes que putativamente codifican para VDACs, así como las regiones UTR. En todos los genes analizados existen 6 exones y 5 intrones, sin embargo, no se lograron identificar para todos las regiones UTR en los extremos 5' y 3' de las secuencias. Solo en 10 secuencias se encontraron ambas regiones UTR (**Figura 13**).

Con este análisis se descartan como miembros de la familia ZmVDAC, 8 de las 18 secuencias, todas las que no tienen las dos regiones UTR, ya que es muy posible que no puedan ser utilizados por los ribosomas para llevar a la síntesis las proteínas (Hinnebusch *et al.*, 2016). Cabe señalar que dentro de estas 8 secuencias descartadas se encuentran **ZmVDAC6**, **ZmOMMPorin1**, **ZmVDAC2_0**,

ZmVDAC2_1, ZmVDAC3_0, ZmPorin1_1 que también presentan un valor de pLDDT < 90, que predice baja confiabilidad de la estructura y que presentan asas largas que unen las láminas β o bien que no se configuran como barril β .

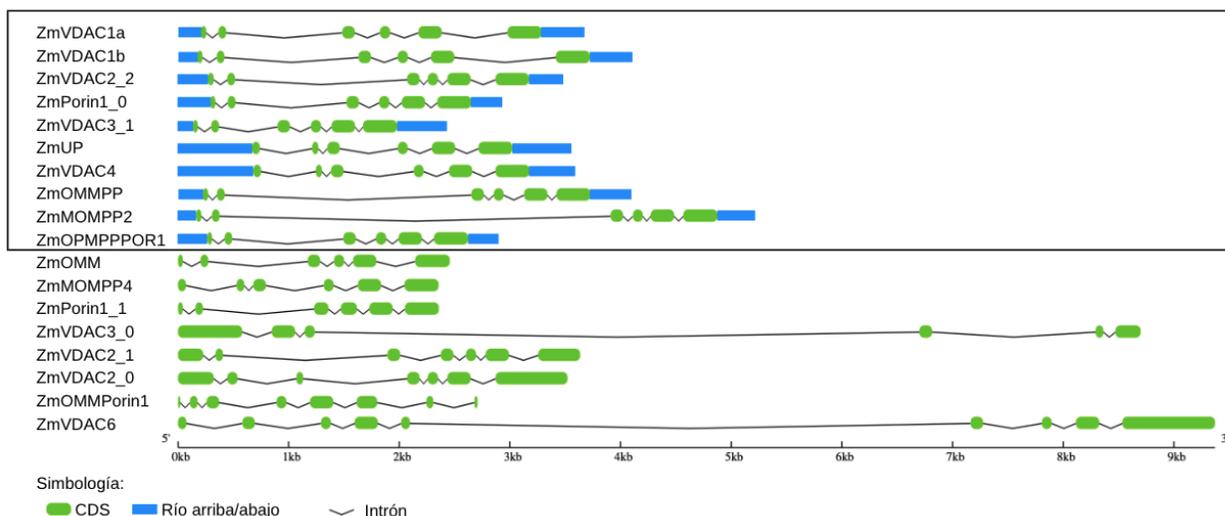


Figura 13. Intrones y exones de los genes ZmVDAC

Las primeras 10 secuencias (recuadro negro) contienen regiones UTR en los extremos 5' y 3'. ZmOMM, ZmMOMPP4, ZmPorin1_1, ZmVDAC3_0, ZmVDAC2_1, ZmVDAC2_0, ZmOMMPorin1 y ZmVDAC6 no presentan regiones UTR.

D. Análisis de ZmOPMPPPOR1 y ZmPorin1_0

Si bien anteriormente se habían eliminado las secuencias duplicadas, aquí se presenta el análisis de dos secuencias, ZmOPMPPPOR1 y ZmPorin1_0, que seguramente están duplicadas en la base de datos, puesto que ambas se localizan en un locus muy cercano o sobrelapado en el cromosoma 8 (**Tabla 15**), pero que no se había descartado aun porque presentan diferencias en la matriz de identidad, es decir, 98.55 % de identidad a nivel de aminoácidos y 98.3 % a nivel de nucleótidos. Las diferencias entre ambas secuencias se encuentran en los primeros residuos de las secuencias (**Figura 14**). A nivel de DNA, se observan dos repetidos del triplete GTG al inicio de la secuencia de ZmOPMPPPOR1 con respecto a ZmPorin1_0, lo que probablemente provoca la modificación del ORF y repercute en la adición de 2 aminoácidos en la secuencia. Lo anterior sugiere fuertemente que ZmOPMPPPOR1 y ZmPorin1_0 sean la misma secuencia, por lo que, en este trabajo se decidió que ZmPorin1_0 fuera la secuencia que codifica para una VDAC,

parámetros por defecto. Un total de 39 secuencias de VDAC en plantas se agruparon en cuatro clados (**Figura 15**). Específicamente, las secuencias de ZmVDAC se dividieron en tres clados. Los clados A y B contienen cada uno, dos secuencias de ZmVDAC y el clado D presenta las cinco secuencias restantes de las ZmVDAC. En general, las dicotiledóneas están evolutivamente más lejanas al maíz, lo que podría ser la razón por la cual las proteínas ZmVDAC no se agruparon en el clado C. La secuencia MmVDAC1 se incorporó como un “outgroup” con una relación más lejana para determinar las relaciones evolutivas del resto de las VDAC en plantas.

Para nombrar a los miembros de la familia ZmVDAC se tomó como uno de los criterios el clado al que pertenece y la cercanía a las secuencias de VDAC de otras plantas que se ha confirmado su actividad o por lo menos se han inferido las secuencias por homología, y quedaron nombradas de ZmVDAC1 a ZmVDAC5. El criterio para poder establecer el nombre de dos isoformas presentes en un mismo nodo interno fue incluir una letra después del número asignado.

Para nombrar las secuencias de ZmVDAC1a y ZmVDAC1b con números de acceso en Uniprot Q9SPD9 y A0A1D6I2X6, respectivamente, se tomaron como referencias las secuencias de OsVDAC1 y TaVDAC1 que se encuentran en el mismo clado. Algo similar se hizo con ZmVDAC3a (ZmPorin1_0) y ZmVDAC3b (ZmVDAC3_1) que quedó en el mismo clado que OsVDAC3 y la nomenclatura de ZmVDAC2 (ZmVDAC2_2) se infirió respecto a la secuencia OsVDAC2 y TaVDAC2 que se encuentran en un mismo nodo.

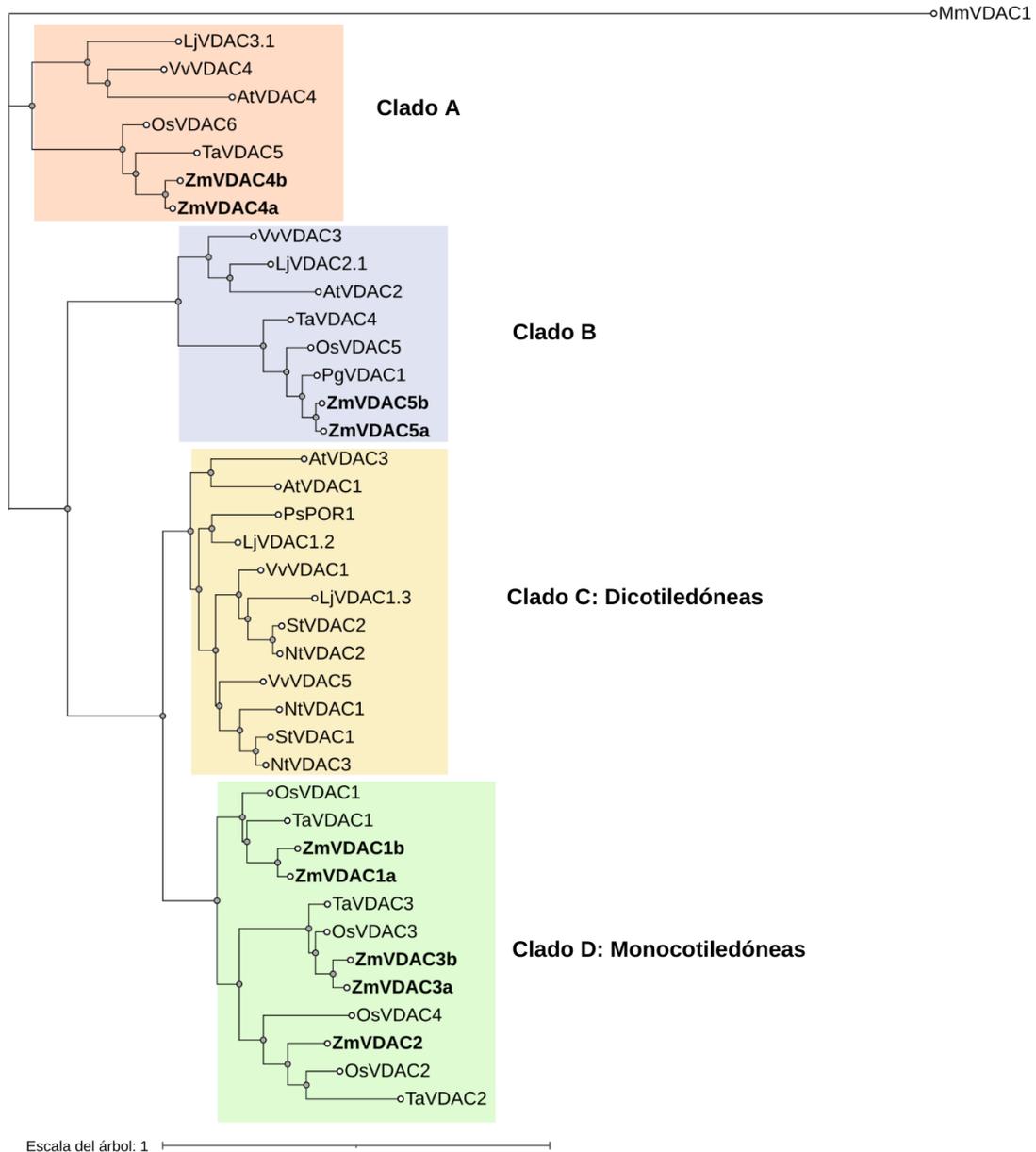


Figura 15. Árbol filogenético con algunas secuencias de VDAC en plantas.

La filogenia de la familia ZmVDAC fue inferida con el método de máxima verosimilitud con el modelo LG, el parámetro de ajuste G y 100 repeticiones de “bootstraps”. El árbol mostrado es aquel que presentó el menor valor de BIC (Valor Informativo Balesiano). Clado A: naranja, clado B: azul, clado C: amarillo y clado D: verde. Os: *Oryza sativa* (arroz), Ta: *Triticum aestivum* (trigo), St: *Solanum tuberosum* (papa), Vv: *Vitis vinifera* (uva), At: *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis), Pg: *Pennisetum glaucum* (mijo perla), Lj: *Lotus japonicus* (trébol de cuernos), Nt: *Nicotiana tabacum* (nicotiana), Ps: *Pisum sativum* (chícharo), Mm: *Mus musculus* (ratón).

Por último, las secuencias ZmOMMPP y ZmMOMPP2, se nombraron como ZmVDAC5a y ZmVDAC5b, respectivamente, debido a la similitud con OsVDAC5 que tiene el número de acceso en Uniprot Q84P97 y presenta una mejor evidencia de que la proteína pueda existir con respecto a PgVDAC1 que se encuentra en una cercanía más próxima a estas dos secuencias. En cuanto a ZmVDAC4 a pesar de encontrarse cercana de los taxones TaVDAC5 y OsVDAC6, también lo está con AtVDAC4, y como está última presenta una mejor anotación, se le otorgó la nomenclatura con respecto a la secuencia de *A. thaliana*.

Localización genética de la familia *ZmVDAC*

Los 9 genes que putativamente codifican para las VDAC se encuentran en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 7, 8 y 9, en su mayoría se localiza en los brazos largos de los mismos (**Figura 16**).

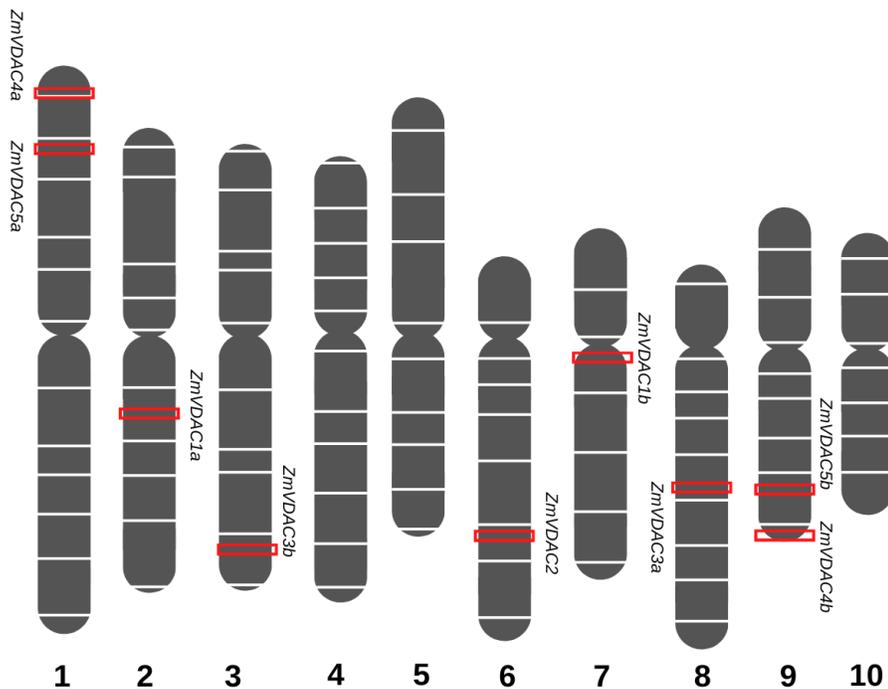


Figura 16. Localización cromosómica de los genes *ZmVDAC*.
En recuadros rojos la localización aproximada del gen en el cromosoma.

Características de los miembros de la familia ZmVDAC.

Identidad entre miembros de la familia

La longitud de las 9 secuencias para VDAC oscila entre 275 y 276 residuos de aminoácidos (aa), con una masa molecular calculada entre 29.2 kDa a 29.8 kDa. Además, las 9 proteínas putativas ZmVDAC presentan valores de pI de 7.3 a 9.2. Solo 4 proteínas predichas, presentan puntos isoeléctricos alrededor de 9 (**Tabla 18**).

Tabla 18. Propiedades de las proteínas ZmVDAC.

| Nº | Nombre inicial | Nuevo nombre | Número de nucleótidos | Número de aminoácidos | pI teórico | Masa (kDa) |
|----|----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------|
| 1 | ZmVDAC1a | ZmVDAC1a | 831 | 276 | 7.9 | 29.5 |
| 2 | ZmVDAC1b | ZmVDAC1b | 831 | 276 | 7.9 | 29.6 |
| 3 | ZmVDAC2_2 | ZmVDAC2 | 831 | 276 | 7.8 | 29.2 |
| 4 | ZmPorin1_0 | ZmVDAC3a | 828 | 275 | 7.9 | 29.8 |
| 5 | ZmVDAC3_1 | ZmVDAC3b | 828 | 275 | 7.3 | 29.8 |
| 6 | ZmUP | ZmVDAC4a | 831 | 276 | 9.0 | 29.6 |
| 7 | ZmVDAC4 | ZmVDAC4b | 831 | 276 | 9.1 | 29.6 |
| 8 | ZmOMMPP | ZmVDAC5a | 828 | 275 | 9.1 | 29.2 |
| 9 | ZmMOMPP2 | ZmVDAC5b | 828 | 275 | 9.2 | 29.2 |

Para aportar mayor información sobre la familia ZmVDAC se llevó a cabo un análisis para identificar las regiones de aminoácidos conservadas, para lo cual se comparó a ZmVDAC con 29 secuencias de VDACS de plantas (**Anexo 10**).

Para determinar el grado de conservación de una secuencia de aminoácidos se utilizó el valor E, el cual se define como la probabilidad de que la similitud de una secuencia se encuentre al azar en cualquier proteína, por lo que valores bajos de E son los que confirman que una secuencia es conservada. Se identificaron 6 regiones con un valor de E bajo. Estas seis regiones se encontraron en todas las secuencias de VDAC analizadas, incluidas las ZmVDAC. Es importante mencionar que a través de este análisis se encontró la región conocida como “firma de porina” muy cercana a extremo carboxilo (motivo 1, **Figura 17**), la cual ha sido reportada en otras

especies (Tateda *et al.*, 2011), por lo que se trata de un sitio importante para reconocer a la familia VDAC. Mientras que las otras regiones conservadas parecen estar relacionadas en dar la orientación a las láminas β , ya que la mayoría se encuentra precediendo a una lámina o conectándolas.

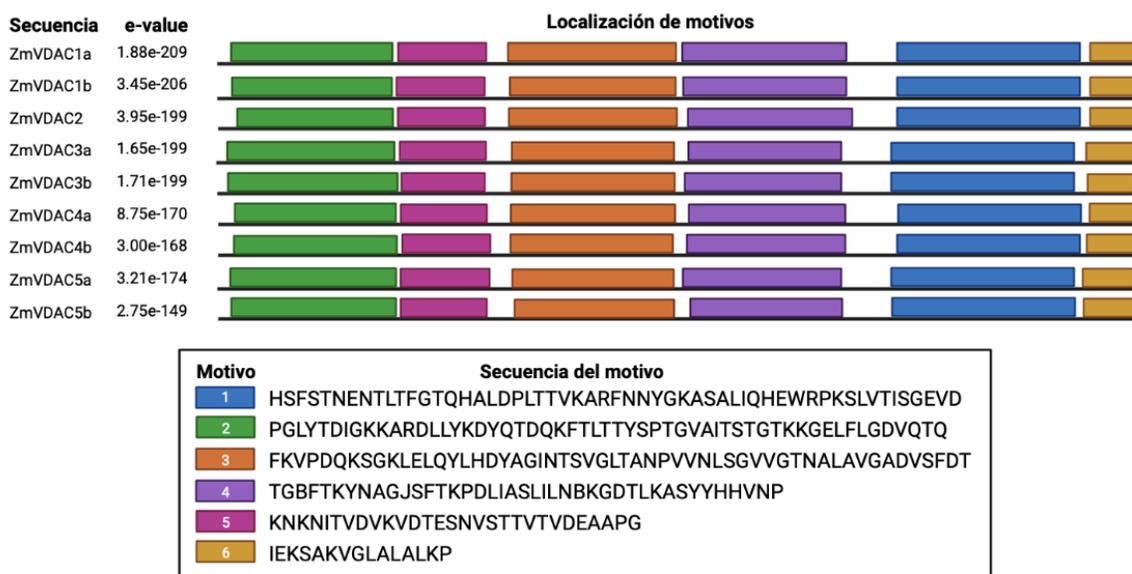


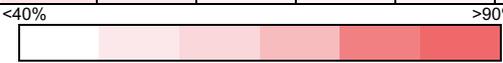
Figura 17. Regiones que se encuentran conservadas en las secuencias de aminoácidos de la familia ZmVDAC.

Las seis regiones presentaron una longitud en la secuencia de aminoácidos entre 15 y 55 residuos.

A pesar de que las estructuras tridimensionales parecen ser muy similares entre VDAC de diferentes especies, era posible que las secuencias no fueran tan similares, por lo que analizamos la identidad entre los miembros de la familia ZmVDAC (**Tabla 19**). Al comparar las secuencias de aminoácidos entre subfamilias como ZmVDAC1a y ZmVDAC1b, o ZmVDAC3a y ZmVDAC3b o ZmVDAC5a y ZmVDAC5b, se observa que presentan una identidad mayor al 90 %, posiblemente resultado de eventos evolutivos de duplicación del genoma del maíz. Mientras que la identidad con los otros miembros se reduce hasta aproximadamente el 40 %.

Tabla 19. Matriz de identidad a nivel de aminoácidos de las secuencias VDAC encontradas en maíz. Matriz realizada en el servidor Clustal 2.1 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con las secuencias reportadas en la base de datos.

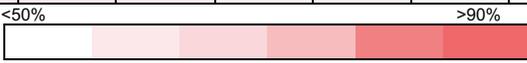
| | ZmVDAC1a | ZmVDAC1b | ZmVDAC2 | ZmVDAC3a | ZmVDAC3b | ZmVDAC4a | ZmVDAC4b | ZmVDAC5a | ZmVDAC5b |
|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ZmVDAC1a | 100 | | | | | | | | |
| ZmVDAC1b | 91.3 | 100 | | | | | | | |
| ZmVDAC2 | 69.2 | 67.8 | 100 | | | | | | |
| ZmVDAC3a | 65.8 | 65.8 | 66.5 | 100 | | | | | |
| ZmVDAC3b | 64.4 | 63.6 | 65.1 | 91.6 | 100 | | | | |
| ZmVDAC4a | 46.4 | 47.2 | 42.9 | 44.3 | 44.7 | 100 | | | |
| ZmVDAC4b | 46.4 | 46.4 | 42.2 | 43.9 | 44.7 | 94.2 | 100 | | |
| ZmVDAC5a | 46.2 | 46.6 | 45.6 | 40.2 | 39.4 | 41.1 | 41.4 | 100 | |
| ZmVDAC5b | 47.3 | 47.6 | 46.3 | 42.0 | 40.9 | 41.1 | 40.7 | 96.4 | 100 |



Asimismo, a nivel de nucleótidos, la identidad entre las secuencias mencionadas anteriormente también es superior al 90 % (**Tabla 20**).

Tabla 20. Matriz de identidad a nivel de nucleótidos de las secuencias VDAC encontradas en maíz. Matriz realizada en el servidor Clustal 2.1 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con las secuencias reportadas en la base de datos.

| | ZmVDAC1a | ZmVDAC1b | ZmVDAC2 | ZmVDAC3a | ZmVDAC3b | ZmVDAC4a | ZmVDAC4b | ZmVDAC5a | ZmVDAC5b |
|----------|----------|----------|---------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| ZmVDAC1a | 100 | | | | | | | | |
| ZmVDAC1b | 92.78 | 100 | | | | | | | |
| ZmVDAC2 | 74.41 | 92.78 | 100 | | | | | | |
| ZmVDAC3a | 71.39 | 71.52 | 71.53 | 100 | | | | | |
| ZmVDAC3b | 70.88 | 70.64 | 70.69 | 92.61 | 100 | | | | |
| ZmVDAC4a | 53.75 | 53.89 | 53.01 | 53.92 | 52.99 | 100 | | | |
| ZmVDAC4b | 52.96 | 52.83 | 51.81 | 52.59 | 52.32 | 91.93 | 100 | | |
| ZmVDAC5a | 57.27 | 57.76 | 57.98 | 55.43 | 55.88 | 54.18 | 52.46 | 100 | |
| ZmVDAC5b | 58.01 | 58.76 | 57.61 | 56.17 | 56.13 | 54.58 | 52.32 | 95.53 | 100 |



Modificaciones postraduccionales

Las VDACs se conoce que son sujetas a modificaciones postraduccionales, por lo que se buscaron secuencias que fueran susceptibles a estas modificaciones. Se encontraron cuatro sitios de sumoilación, aunque con poca probabilidad de que la modificación ocurra, ya que el Valor P fue 0.047 a 0.093. No se encontraron predicciones de sitios para ubiquitinación ni succinilación.

En cuanto a los posibles sitios de fosforilación, se ha sugerido la existencia de los mismos, pero la localización no se ha identificado. Por esta razón, se realizaron las predicciones de para AtVDAC1 y las secuencias ZmVDAC, se encontraron tres sitios que podrían ser sujetos a esta modificación de acuerdo con el servidor GPS (**Figura 18**), ya que contaron con un puntaje mayor a 10 de valor P y fueron encontrados en las asas del barril β orientados hacia el citoplasma (sitio donde es más probable de sufrir fosforilaciones).

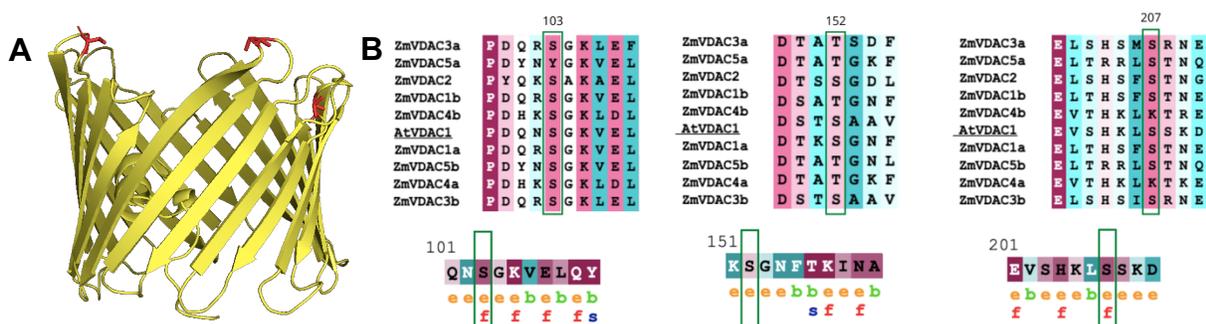


Figura 18. Sitios posibles de fosforilación de AtVDAC1.

A. Tres residuos de aminoácidos ubicados en las asas del espacio citoplásmico (rojo) de *A. thaliana* con un puntaje >10, predicción realizada por el servidor GPS.

B. Conservación de los aminoácidos posibles a fosforilar con respecto a las 9 secuencias de ZmVDAC. En la posición 103, el residuo Ser se encuentra en todas las secuencias, excepto en ZmVDAC5a donde en su lugar existe una Tyr que también puede ser fosforilable. En la posición 152, el residuo Thr y Ser se encuentran en las secuencias de ZmVDAC, lo mismo ocurre con la posición 207, ambos aminoácidos presentan un gran potencial a fosforilarse. e: residuo expuesto, b: residuo no expuesto, f: residuo implicado en la funcionalidad de la proteína, s: residuo de importancia estructural.

En ratas, se ha detectado mediante espectrometría de masas que el residuo T33 de VDAC1 es un sitio potencialmente fosforilable que se encuentra altamente

conservado (Distler *et al.*, 2007, **Figura 19A**), la región en la que se encuentra viene dada por la secuencia “IDLKTK”, observando la secuencia en MmVDAC, esta región existen muy conservada en mamíferos, pero no así en plantas, donde el residuo de Thr se encuentra adyacente a dos aminoácidos fosforilables en la mayoría de las VDAC (**Figura 19B**). De acuerdo con la estructura de VDAC en plantas, esta región tendría una localización similar en la primera lámina β a la que presenta la estructura de RnVDAC1.

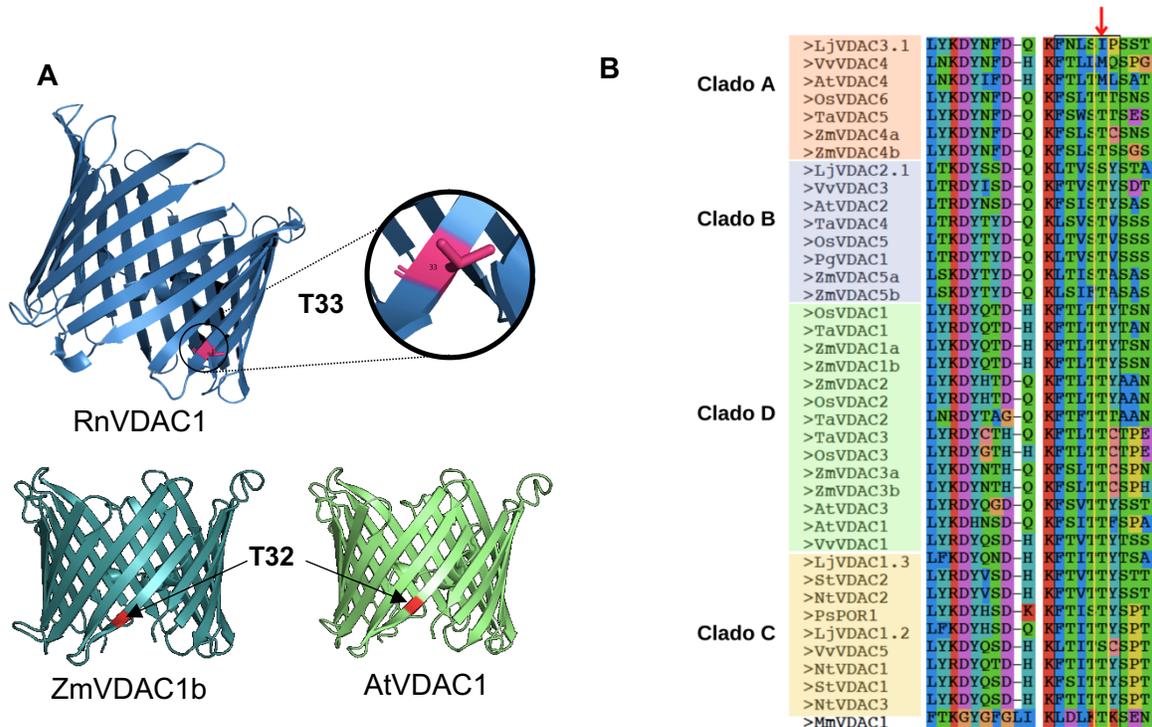


Figura 19. Residuo fosforilable T33 de *Rattus norvegicus*.

A. Aminoácido treonina en la posición 33 de la estructura RvVDAC1 ubicado como parte de las láminas β del barril, mismo que se conserva en las estructuras de ZmVDAC1b y AtVDAC1. **B.** El residuo de treonina se conservado en todos los clados de plantas (recuadro amarillo), incluidas las secuencias de la familia ZmVDAC, excepto en las tres primeras secuencias del clado A correspondientes a LjVDAC3.1, VvVDAC4 y AtVDAC4.

Secuencias reguladoras en *cis* de los genes VDAC

Debido a su abundancia, actividad y localización celular estratégica en la mitocondria, VDAC ha sido relacionado a la respuesta a distintos tipos de estrés, participación en diversos procesos celulares como la glucólisis, regulación del

transporte de metabolitos, la apoptosis, entre otros (Shoshan-Barmatz & Ben-Hail, 2012).

Una pista sobre la participación de los VDACs en diferentes procesos celulares la podría dar la presencia de elementos reguladores en la zona promotora, ya que son los responsables de controlar la transcripción génica y la expresión diferencial de los mismos (Arsovski *et al.*, 2015). Por lo anterior, se buscaron los elementos *cis* en una región de 2,000 pb arriba del origen de replicación de cada gen de los miembros de la familia *ZmVDAC*.

En todos los miembros de *ZmVDAC* se encontraron diferentes elementos de respuesta (**Figura 20**). El mayor número de elementos encontrados son para la respuesta a luz. Asimismo, existe un número considerable de secuencias asociadas a la regulación de la expresión tejido-específica, se encontró que todos los VDACs tienen elementos para la expresión en las semillas (excepto *ZmVDAC1a* y *ZmVDAC5a*), mesófilo, nódulos (excluyendo *ZmVDAC3b*) y polen. La mayoría de los genes VDAC tienen elementos de respuesta a hormonas, principalmente por abscísico (ABA), aunque también por citoquinina, ácido giberélico (GA) y etileno. Se encontraron elementos de respuesta a diversos tipos de estrés, como el hídrico (todos los genes *ZmVDAC*) y a temperatura. También se presentan secuencias involucradas en el metabolismo del carbono (*ZmVDAC1a*, *ZmVDAC1b*, *ZmVDAC2*, *ZmVDAC3a*, *ZmVDAC3b*, *ZmVDAC4a* y *ZmVDAC4b*), así como la regulación por iones, como es el caso de Ca^{2+} (*ZmVDAC5a* y *ZmVDAC5b*). Por lo que será interesante realizar tratamientos en las plantas de maíz para determinar si efectivamente hay una expresión diferencial de alguno o varios de los miembros de *ZmVDAC* con diferentes intensidades de luz, hormonas, Ca^{2+} y estrés por temperaturas altas o bajas e hídrico.

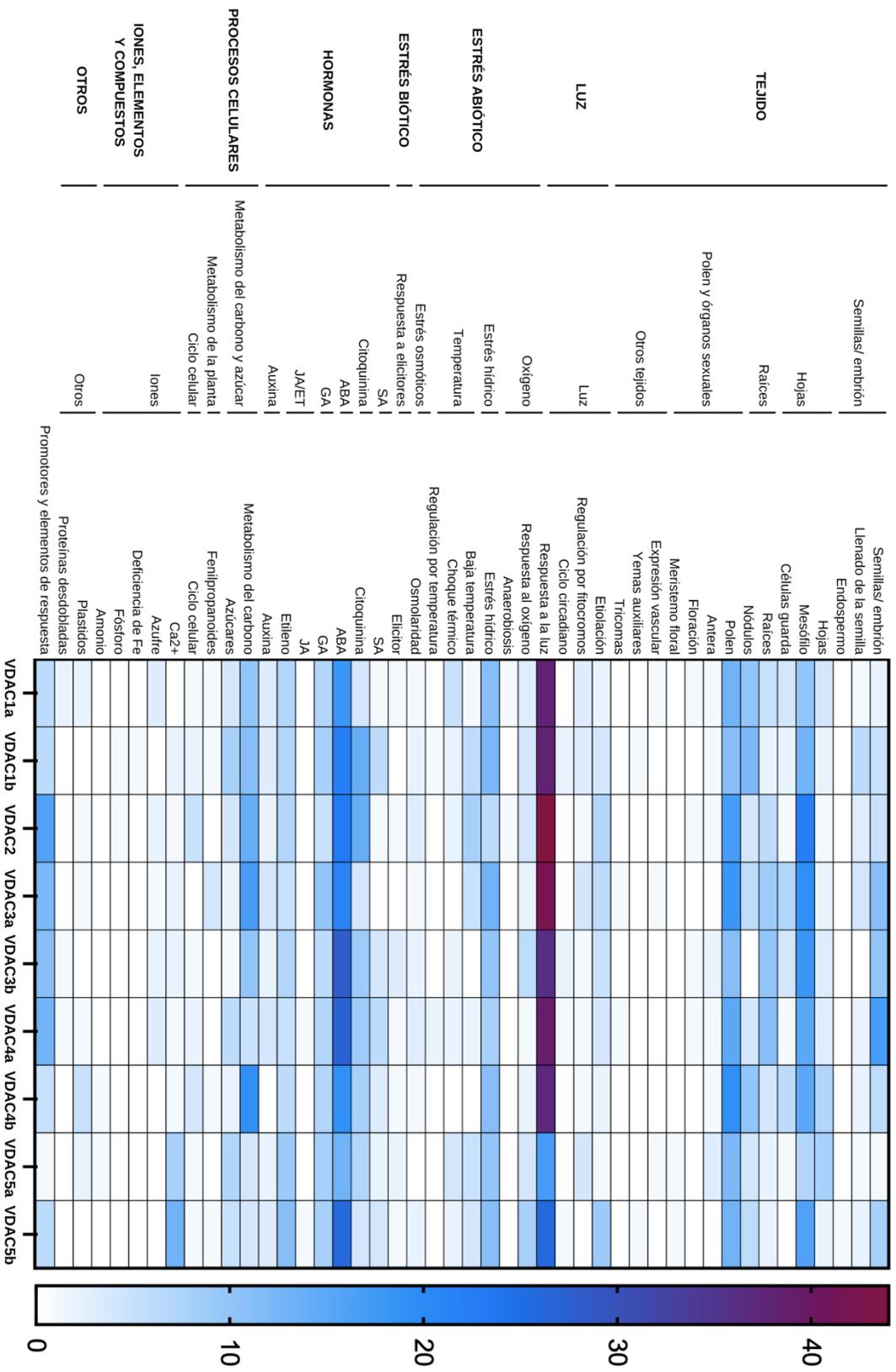


Figura 20. Análisis de elementos que actúan en cis en la región promotora de la familia de genes VDAC del maíz.
 El diagrama presenta el resultado de una agrupación de acuerdo a las funciones en las que están involucrados los elementos promotores cis de los genes VDAC de maíz. Cada fila representa una secuencia expresada diferencialmente y cada columna, el gen VDAC en el que se presenta. La escala de colores ilustra el nivel de expresión de cada secuencia: morado, indica mayor número de secuencias; azul, número medio y blanco menor número de secuencias. SA: ácido salicílico, ABA: ácido abscísico, GA: ácido giberélico, JA: ácido jasmónico.

Clonación del gen *ZmVDAC1b*

En nuestro grupo de trabajo se encontró mediante ensayos de interacción de proteínas, usando a la hexocinasa 4 de maíz (*ZmHXK4*) como presa unida a una columna de afinidad, que al pasarle un extracto de coleóptilos de maíz con 72 h de germinación se unían proteínas mitocondriales entre ellas *VDAC*, por lo que se plantearon dos interrogantes: ¿Cuál de las *VDAC* se encuentra interaccionando *ZmHXK4*? ¿Cuál es la relevancia fisiológica de esa interacción? Para dar respuesta a estas interrogantes planteó clonar al menos una *VDAC* de maíz. Con la información de las secuencias tomada de este trabajo se realizaron ensayos de expresión de genes en los cuales se detectó que *ZmVDAC1b* era una de las isoformas de *VDAC* que se encontraban mayormente expresados cuando la planta se sometía a un proceso de estrés biótico (Rodríguez-Saavedra, trabajo en progreso), por lo anterior, se decidió clonar en este trabajo a *ZmVDAC1b*.

Subclonación del gen *ZmVDAC1b* mediante la Tecnología Gateway

A partir de un gen sintético, se realizó una reacción de PCR con la finalidad de agregar en los extremos adaptadores universales a la secuencia y generar los sitios *attB1/ attB2*, mismos que permitirían el reconocimiento por complementariedad y la recombinación en el vector de entrada *pDONR221* por medio de la enzima *BP clonasa*. Para corroborar la amplificación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa del vector con los extremos *attB*, el peso molecular final esperado es de 895 pb, como control se utilizó el gen sintético que presenta un peso molecular de 831 pb (**Figura 21**).

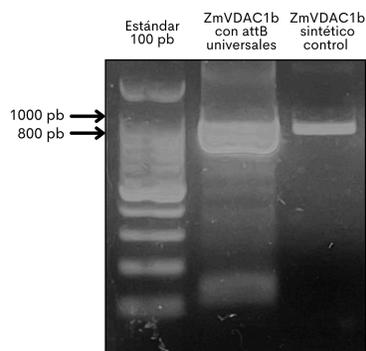


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del gen *ZmVDAC1b* con los adaptadores universales *attB*.

En el primer carril se presenta el estándar de 100 pb, en el segundo carril el gen *ZmVDAC1b* con los adaptadores attB en 895 pb y en el carril 3 el control del gen *ZmVDAC1b* sintético sin adaptadores en 831 pb.

Posteriormente, se procedió con la purificación de la banda del segundo carril del gel de agarosa y se realizó la reacción con la enzima BP clonasa para insertarlo en el vector pDONR221. La construcción se utilizó para transformar a la cepa *E. coli* DH5 α y se realizó una PCR de colonia confirmatoria (**Figura 22**). Dos de las colonias picadas y crecidas en un medio con resistencia a kanamicina fueron positivas.

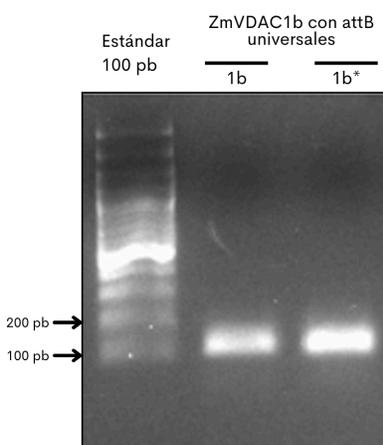


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de la PCR confirmatoria del gen *ZmVDAC1b*.

Las colonias 1b y 1b* presentan el gen *ZmVDAC1b* en aproximadamente 113 pb, con el par de oligonucleótidos sentido y antisentido amplificando en el gen de interés.

El ensayo de restricción con las enzimas MluI y BspHI en el vector pDONR221-*ZmVDAC1b* dio el patrón de bandas esperado para ambas reacciones (**Figura 23**).

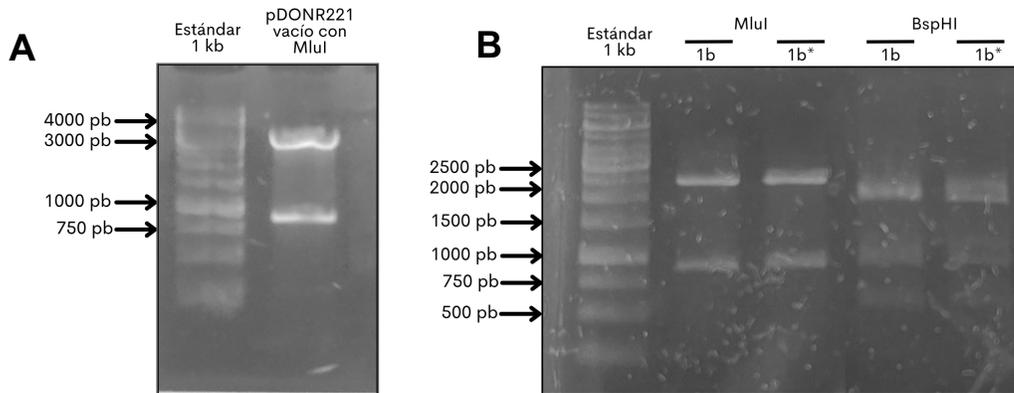


Figura 23. Ensayo de restricción del vector vacío pDONR221 y de la construcción pDONR221-ZmVDAC1b.

A. Vector pDONR221 con restricción de la enzima MluI, bandas en 3,829 pb y 932 pb. **B.** Construcciones del vector pDONR221-ZmVDAC1b de dos colonias transformadas con la enzima MluI (2,444 pb y 932 pb) y BspHI (1893 pb, 927 pb y 556 pb).

Se cuantificó en el Nanodrop 2000 el producto de la reacción con la BP clonasa, es decir, el vector pDONR221-ZmVDAC1b, dando una concentración de 643.7 ng/ μ L con los parámetros 260/280 de 1.93 y 260/230 de 2.19, los cuales indican una pureza óptima. Después de proceder con la reacción LR empleando la construcción pDONR221-ZmVDAC1b y el vector de expresión pDEST42, seguido de la transformación y purificación del plásmido, se realizó un ensayo de restricción con la enzima MluI. La construcción pDEST42-ZmVDAC1b sí fue digerida de acuerdo a los patrones de bandas esperados (**Figura 24**).

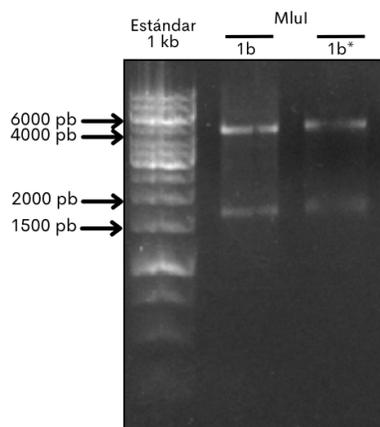


Figura 24. Ensayo de restricción del vector pDEST42-ZmVDAC1b de dos colonias seleccionadas.

Construcción de pDEST42-ZmVDAC1b con la enzima de restricción, bandas en 4,851 pb y 1,762 pb para ambas colonias de las cuales se extrajo el vector recombinante.

Posterior a la transformación del vector en la cepa *E. coli* BL21-RIL, se realizó la inducción de la proteína recombinante con IPTG a 6 h de tiempo de inducción. Se observó la presencia de bandas con mayor intensidad respecto a t_0 en aproximadamente 30 kDa a partir del tiempo a las 2 h (**Figura 25A, Anexo 11A**).

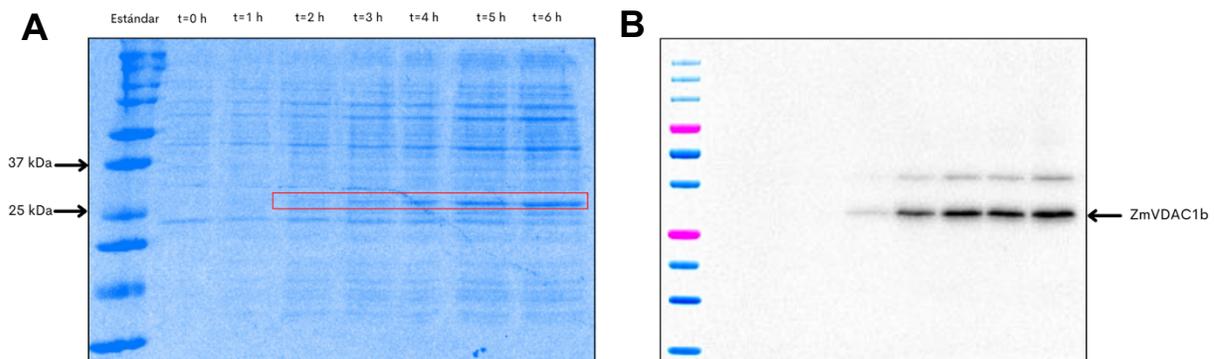


Figura 25. Identificación de ZmVDAC1b recombinante en bacteria.

A. Gel de poliacrilamida-SDS al 15 % con la separación de las proteínas provenientes de la alícuotas desde el tiempo 0 h a las 6 h de inducción. El gel se tiñó con azul de Coomassie **B.** Inmuno-réplica tipo Western para detectar a ZmVDAC1b recombinante con el epítipo V5, ubicado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. En el primer carril se muestra el marcador de peso molecular y en los siguientes carriles se cargaron las alícuotas de los tiempos de inducción de la misma forma que se hizo en el gel de poliacrilamida.

Para comprobar la presencia de la proteína ZmVDAC1b, se realizó un ensayo de Western Blot con el anticuerpo Anti-V5-HRP, que reconoce al tag V5 presente en el extremo carboxilo de la proteína, mismo que le confirió el vector pDEST42. La proteína ZmVDAC1b está en el peso esperado (~30 kDa) y la inducción de la proteína comienza a partir de las 2 h (**Figura 25B**).

Subclonación del gen *ZmVDAC1b* mediante enzimas de restricción

Debido a que no se logró la subclonación mediante la tecnología Gateway se realizó esta a través de enzimas de restricción. Una serie de pasos se siguieron para obtener la clona pDEST42-VDAC1b. En el primero se subclonó el gen para *ZmVDAC1b* del vector pGEM T easy-*ZmVDAC1b* realizando a) la purificación del vector pBluescript II KS(+), b) la restricción del vector pBluescript II KS(+) con la enzima EcoRI, c) la restricción del vector que contiene el gen con EcoRI, d) la ligación del gen y el vector pBluescript II KS(+).

Para confirmar que el vector pBluescript II KS(+)-*ZmVDAC1b* se hubiera obtenido, se purificó el vector y adicionalmente como control también se purificó el vector vacío. Se restringieron ambos vectores con las enzimas XbaI y Sall (**Figura 26**). El vector vacío pBluescript II KS(+) restringido produce dos segmentos, uno de 2,904 pb y otro en 57 pb. En el vector pBluescript II KS(+)-*ZmVDAC1b*, al restringirse presentó una banda de 932 pb, que correspondía al peso esperado del gen *ZmVDAC1b* (**Figura 26**).

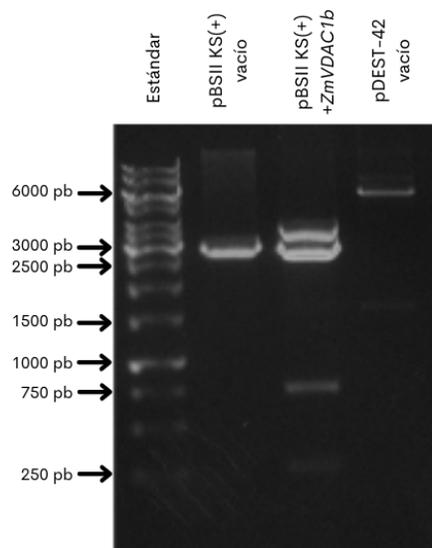


Figura 26. Ensayo de restricción de los vectores pBluescript II KS (+) vacío, pBluescript II KS (+) con *ZmVDAC1b* y pDEST-42 vacío.

Gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio, los ensayos de restricción se realizaron con las enzimas XbaI y Sall. El vector pBluescript II KS (+) vacío corresponde a la colonia azul, mientras que el vector de clonación con el gen *ZmVDAC1b* está presente en las colonias blancas crecidas en cajas petri con medio LB/Amp/X-gal/IPTG. El vector pDEST-42 vacío también se digirió con ambas enzimas de restricción.

El segundo paso del proceso para obtener la clona pDEST42-VDAC1b fue la subclonación del gen en el vector pDEST42, también usando la estrategia de las enzimas de restricción. Para lo cual se utilizó la banda de 932 pb, producto de la enzimas de restricción XbaI y SalI sobre el vector pBluescript II KS (+)- ZmVDAC1b y se realizó la digestión del vector pDEST42 con las mismas enzimas (**Figura 27**). Ambos productos se ligaron para producir un vector recombinante de 6,810 pb. Posteriormente, se corroboró mediante un ensayo de restricción con la enzima MluI, que el gen se encuentra insertado, ya que se produjeron dos bandas con los pesos moleculares esperados, 4,851 pb y 1,959 pb. (**Figura 27**)

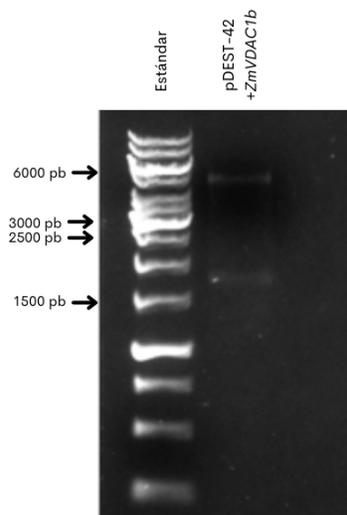


Figura 27. Ensayo de restricción del vector pDEST-42 con ZmVDAC1b. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, el ensayo de restricción se realizó con la enzima MluI.

Producción de ZmVDAC1b recombinante

Para producir a la proteína recombinante se transformaron las células BL21-RIL con el vector pDEST42-ZmVDAC1b. La cepa utilizada tiene la característica de contener copias adicionales de los genes *argU*, *ileY* y *leuW*, con la capacidad de codificar tRNA que reconocen los codones de arginina, isoleucina y el codón de leucina, respectivamente, lo que asegura una cantidad adecuada de tRNA para la producción de proteínas de plantas (Chamberlin *et al.*, 1970). Por su parte, el vector pDEST42 es un vector de expresión procariota de alto número de copias y

controlada por el promotor del bacteriófago T7. La expresión del gen es inducida por la producción de la RNA polimerasa T7, dependiente de DNA presente en *E. coli* infectada por el bacteriófago T7 que codifica para *lacI*, una proteína represora, que se encuentra previo al gen *ZmVDAC1b*, la presencia del represor se une al operador para inhibir la transcripción en *E. coli*, por lo que el uso de un agente inductor como el IPTG que se une a la proteína represora, permite tener un mayor control sobre la expresión de las proteínas recombinantes (Greener *et al.*, 1996).

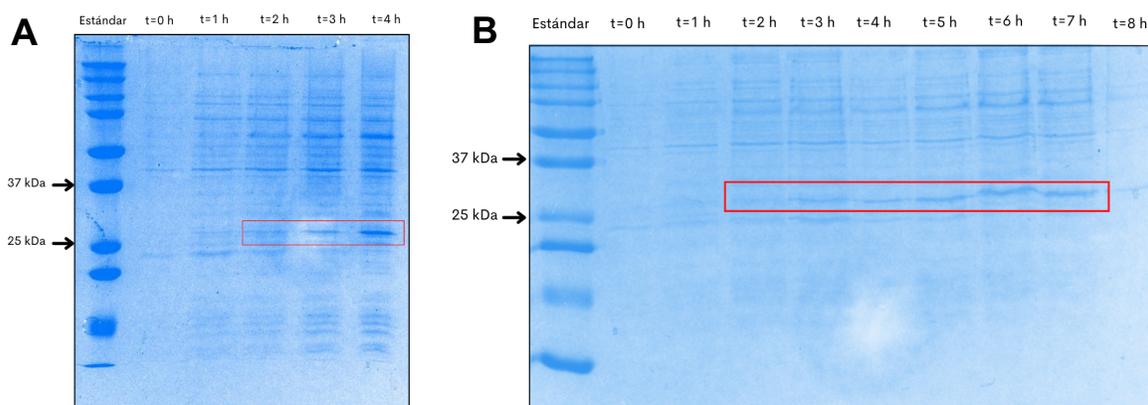


Figura 28. Curvas temporales de inducción de ZmVDAC1b recombinante

A. Inducción de ZmVDAC1b durante 4 h. **B.** Inducción de ZmVDAC1b durante 8 h. Se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 15 % de las alícuotas recolectadas a los diferentes tiempos de inducción, las células recolectadas eran de la cepa BL21-RIL de *E. coli* con el vector pDEST42-ZmVDAC1b. En el rectángulo rojo se señala la aparición de una banda correspondiente a una proteína de aproximadamente 30 kDa, cuya intensidad se observa a partir de las 3 horas de inducción. El gel se tiñó con azul de Coomassie durante 12 h.

El cultivo de células transformantes se indujo con 0.5 mM IPTG y se realizaron muestreos cada hora por 4 h (**Figura 28A**). Al realizar el corrimiento electroforético de una alícuota de los cultivos en un gel de poliacrilamida-SDS, se visualizaron tres bandas de proteínas en aproximadamente 30 kDa (**Anexo 11B**) a partir de las 2 h de inducción. Se probaron también tiempos más prolongados tratando de tener una mayor cantidad de proteína (**Figura 28B, Anexo 11C**). La proteína de interés se observa alrededor de 30 kDa a partir de las 2 h de inducción y hasta las 7 h, siendo a las 6 h el tiempo donde se presentó una mayor cantidad de proteína.

DISCUSIÓN.

ZmVDAC es una familia multigénica con 9 miembros.

Los primeros estudios sobre las proteínas VDAC en maíz se enfocaron en demostrar que los extractos proteicos de membranas plastidiales colocados en bicapas planares, producían curvas típicas de conductancia del transportador como selectividad aniónica débil y sensibilidad al voltaje. Para sorpresa de los investigadores las curvas de respuesta a las diferencias de voltaje eran casi idénticas a las aisladas en mamíferos (Smack, 1985). Más adelante Fischer y colaboradores en 1994, clonaron a partir de una biblioteca de cDNA de plastidios de las raíces de maíz a ZmOPMPPPOR1 (P42057), secuencia anotada en la base de datos Uniprot, con un peso molecular predicho de la proteína de 29.97 kDa. Sin embargo, los autores no hicieron un análisis funcional de la proteína, pero realizaron un alineamiento de aminoácidos con secuencias de otras VDAC que se conocían en ese tiempo, como levadura, amiba y humano, encontrando un 47 % de identidad.

A casi 40 años de iniciado el estudio de la familia ZmVDAC aún no se habían logrado establecer el número de miembros de la familia hasta el presente trabajo. Tampoco se ha logrado la caracterización de la función de cada uno de los miembros de la familia ZmVDAC misma que sería importante para establecer su función.

Uno de los principales objetivos de este trabajo era identificar a los miembros de la familia ZmVDAC, se encontraron 38 secuencias que putativamente codifican para los miembros de la familia de VDAC de maíz. Después de la revisión de esas secuencias en este trabajo proponemos que los miembros de la familia son 9 y se nombraron como sigue (entre paréntesis se encuentra el ID de Uniprot): ZmVDAC1a (Q9SPD9), ZmVDAC1b (A0A1D6I2X6), ZmVDAC2 (Q9SPD7), ZmVDAC3a (K7VJ77), ZmVDAC3b (B4FX24), ZmVDAC4a (A0A804LDA0), ZmVDAC4b (B6T1E3), ZmVDAC5a (A0A1D6JS28) y ZmVDAC5b (C4IYM7).

Para llegar a las secuencias anteriores se analizaron las 38 secuencias que se encontraron en la base de datos Uniprot. Después se descartaron aquellas que no

poseían una anotación en al menos dos bases de datos, puesto que muchas de las secuencias encontradas provienen de una secuenciación masiva y podrían estar mal anotadas. De esta depuración quedaron 18 y fueron las que se analizaron para conocer si su secuencia traducida presentaba las características de la familia, entre ellas el plegamiento tridimensional. Por ello se realizó un análisis mediante AlphaFold2. Solo 12 de las proteínas obtuvieron un valor alto de pLDDT ≥ 90 %, que representa un valor de alta confianza de que las proteínas se pliegan como barril β (Tunyasuvunakool *et al.*, 2021). Estas proteínas presentan las típicas 19 láminas β que se encuentran plegadas de manera antiparalela, además las secuencias contienen en la región amino una α -hélice, que se ha sugerido es importante para el cierre y apertura del canal y su especificidad (Fang & Maldonado, 2018; Thomas *et al.*, 1993).

Hubo 6 proteínas que a pesar de que pueden formar una estructura de porina presentan en la estructura cambios en la longitud de las asas: ZmVDAC2_0, ZmVDAC2_1, ZmVDAC3_0, ZmVDAC6, ZmPorin1_1 y ZmOMMPorin1. Adicionalmente, ZmVDAC6 presenta un mayor número de láminas β y el modelo de la proteína es una espiral y no un barril β . Las discrepancias estructurales podrían afectar la función de las 6 proteínas antes mencionadas, puesto que podrían interferir con la interacción con otras proteínas o incluso lípidos que se sabe regulan su actividad, pero no tenemos más datos para demostrarlo, así que continuamos tomando las 18 secuencias en los siguientes análisis antes de considerarlas fuera de la familia VDAC, aun ZmVDAC6 que claramente es diferente de las otras proteínas.

Otro criterio para determinar que efectivamente las 18 secuencias analizadas podrían ser VDAC, fue analizar la estructura de cada gen. Así se encontró que 9 secuencias no contenían tanto el 3' como el 5' UTR (ZmVDAC2_0, ZmVDAC2_1, ZmVDAC3_0, ZmVDAC6, ZmPorin 1_1, ZmOMMPorin1, ZmMOMPP4 y ZmOMM), La región 5' UTR es fundamental para el reclutamiento de ribosomas en el RNAm, la regulación de la traducción, la estabilidad del RNAm y la elección del codón de

inicio, si bien, la secuencia no se traduce, desempeña un papel importante en el control de la eficiencia de la traducción y en la configuración del proteoma celular (Hinnebusch *et al.*, 2016). Por otra parte, la estabilidad y la traducción espacio temporal correcta de los RNAm están garantizadas por el 3' UTR, que contiene señales reguladoras. Además, en las regiones UTR, se unen diferentes efectores, como proteínas de unión a RNA, miRNA u otros ncRNA (Navarro *et al.*, 2021). Por lo que ambas UTR son un componente genético importante en la regulación de los procesos de traducción de las proteínas, ya que brindan una especificidad funcional a los genes (Srivastava *et al.*, 2018). Hay que mencionar que dentro de estas 9 secuencias en donde hay ausencia total o parcial de las regiones UTR se encuentran las 6 secuencias que presentan asas adicionales o un plegamiento no propio de una VDAC. Debido a este último análisis 9 secuencias no se consideraron dentro de las secuencias que pueden traducirse a una VDAC.

Adicionalmente, se hizo un análisis más cercano de ZmOPMPPOR1, la clona obtenida por Fischer y colaboradores en 1994, ya que presenta un porcentaje de identidad alto a la secuencia ZmPorin1_0, esta última la nombramos en este trabajo como ZmVDAC3a. Las diferencias entre ambas secuencias se encuentran en los primeros 6 nucleótidos, en donde se observa que hay dos repetidos más de la secuencia GTG en ZmOPMPPOR1, lo que provoca la modificación del ORF y repercute en el cambio de aminoácidos en la secuencia. Adicionalmente, el número y la longitud de intrones son similares entre ambas secuencias y se encuentran en el cromosoma 8 con una cercanía muy alta en ese cromosoma. Todo lo anterior sugiere fuertemente que ZmOPMPPOR1 y ZmVDAC3a son la misma secuencia. Por lo que, en este trabajo decidimos que ZmVDAC3a es la secuencia que codifica para VDAC, puesto que los repetidos GTG tampoco se encuentran en las otras ZmVDAC.

Al final de estos análisis se propone que la familia ZmVDAC se compone de 9 miembros. Siendo una familia multigénica al igual que la de otros eucariontes (Tateda *et al.*, 2011). En plantas, se pueden encontrar desde 3 hasta 27 secuencias que codifican para VDACs (Clausen *et al.*, 2004; Hemono *et al.*, 2020; Xu *et al.*,

2021; Yu *et al.*, 2022). Por lo anterior no es sorpresa que la familia VDAC de maíz sea multigénica.

La existencia de un número variable de isoformas en maíz, se puede explicar porque se trata de un organismo hexaploide con varias copias de genes, en donde se pudieron involucrar procesos como la duplicación de genes completos y que lleva a contribuir a la aparición de nuevas funciones (Oh *et al.*, 2021). La existencia de una familia multigénica para los genes ZmVDAC, puede conferir ventajas evolutivas, no solo una redundancia funcional entre las isoformas, sino que ante la falta o el mal funcionamiento por parte de alguna de las isoformas podría ser sustituida por otra, es decir, las plantas presentan estos fenómenos de duplicidad de genes que les dan la plasticidad para que ante eventos de estrés mantengan la actividad o función de sus proteínas, asegurando la supervivencia de la especie. Adicionalmente, los eventos de duplicación de genes relativamente recientes han brindado al reino vegetal la oportunidad de diversificar los roles fisiológicos de sus proteínas, por lo que es posible que lo mismo haya sucedido con la familia ZmVDAC.

Nomenclatura y filogenia de la familia ZmVDAC.

Los miembros que se identificaron pertenecen a la familia VDAC son: ZmVDAC1a, ZmVDAC1b, ZmVDAC2_2, ZmPorin1_0, ZmVDAC3_1, ZmUP, ZmVDAC4, ZmOMMPP y ZmMOMPP2, según la anotación con la que se encuentran identificadas en las bases de datos. Para establecer una nomenclatura de la familia ZmVDAC se realizó un análisis de las relaciones filogenéticas de las isoformas de ZmVDAC, las proteínas VDAC de plantas y una de mamífero. Enraizando el árbol con la secuencia de ratón, MmVDAC1, puesto que esta no presenta una relación evolutiva tan estrecha con las de plantas. Mientras que las secuencias de plantas se distribuyen dentro de cuatro clados principales, encontrándose que hay divergencia entre monocotiledóneas y dicotiledóneas, puesto que uno de los clados contiene únicamente VDAC de plantas dicotiledóneas y otro exclusivamente de monocotiledóneas. En el caso particular de maíz, los nueve miembros se distribuyen

en tres clados y de acuerdo a esa distribución fue que se nombró a cada miembro, sobre todo dando los nombres de acuerdo a la VDAC que ya se ha demostrado su caracterización. La forma de anotarlas en este trabajo fue similar al que se realizó al renombrar a algunas de las TaVDAC (Yu *et al.*, 2022).

El clado D que contiene exclusivamente VDAC de monocotiledóneas, incluye a las isoformas ZmVDAC1 (1a y 1b), ZmVDAC2 y ZmVDAC3 (3a y 3b), agrupadas con las secuencias ortólogas de arroz y trigo. Existen regiones compartidas a nivel de aminoácidos entre el clado C y D, que no están presentes en el resto de los clados, dadas las características fisicoquímicas de los residuos que conforman a las secuencias, es posible que estas mutaciones hayan sido las determinantes para la divergencia filogenética.

El clado A incluye las isoformas de ZmVDAC4 relacionadas con las secuencias de trigo, arroz, arabidopsis y uva, sin embargo, el nombre utilizado para poder renombrarla fue considerando la secuencia AtVDAC4, que pertenece a una familia que se anotó antes y de la cual ya se ha determinado la actividad de sus miembros. En el clado B se presentan múltiples isoformas de VDAC de monocotiledóneas y dicotiledóneas, incluidas las isoformas ZmVDAC5 que se encuentran más cercanas evolutivamente con las secuencias de monocotiledóneas.

La familia ZmVDAC presenta secuencias altamente conservadas y una estructura 3-D similar a las VDAC ya cristalizadas.

Las proteínas ZmVDAC presentan de 275 a 276 aminoácidos y masas molares calculadas no mayores a 30 kDa. Las nueve isoformas presentan identidades en las secuencias de aminoácidos que van desde 40.1%, hasta 96.4%. El punto isoeléctrico teórico de las secuencias de aminoácidos parece indicar que se trata de proteínas con propiedades básicas. Cinco isoformas de AtVDAC también tienen propiedades básicas (Hemono *et al.*, 2020), así como las VDAC en mamíferos (Messina *et al.*, 2012), por lo que, las propiedades alcalinas de las proteínas podría ser necesaria para su función.

Por otra parte, también se encontró que a pesar de que hay diferencias entre las diferentes VDAC, presentan secuencias de aminoácidos con un alto grado de conservación, al menos se encontraron 6 secuencias altamente conservadas tanto entre las 9 ZmVDAC como con las otras 25 secuencias de VDAC de plantas analizadas.

La secuencia conservada 1, se ha distinguido por encontrarse en todos los barriles β de organismos eucariontes (Tateda *et al.*, 2011), se ubica en el extremo carboxilo entre las láminas β 15 a la 17 y su importancia radica en que alberga dentro de la secuencia la etiqueta de VDAC, o que también ha sido reportada como “firma de porina mitocondrial” (aunque el término “porina”, poco a poco ha estado en desuso), misma que se encuentra presente en *A. thaliana*, *L.japonicus*, *P. sativum*, *N. tabacum*, *O. sativa* y *T. aestivum*, y aunque está altamente conservada en todas las VDAC, su funcionalidad aún queda por resolverse.

En maíz, 7 de las 9 isoformas de ZmVDAC (1a, 1b, 2, 3a, 3b, 4a y 4b), contienen la secuencia firma idéntica de porina de 23 aminoácidos y las 9 VDAC conservan la secuencia 1 en la que se alberga estos residuos de aminoácidos. En las isoformas ZmVDAC5a y ZmVDAC5b existen residuos que divergieron de la “firma de porina”. Se ha sugerido que estos residuos están relacionados con la interacción de TOM para su traslocación hacia el espacio intermembrana de la mitocondria (Moitra & Rapaport, 2021), sin embargo AtVDAC5 que es una proteína que carece de algunos residuos en el C-terminal aún es de localización membranal (Tateda *et al.*, 2009), por lo que el que ZmVDAC5a y ZmVDAC5b presenten residuos no conservados en la secuencia firma de porina podría no tener repercusión en su localización. Se ha propuesto también que cambios en el residuo 255 de E por D dentro de la secuencia conservada 1 puede llevar a cambios en la orientación de la proteína en la membrana (Klinger *et al.*, 2019), este no sería el caso para alguna de las ZmVDAC, ya que está conservado en las 9 isoformas hipotéticas de maíz.

En el caso de la secuencia conservada 2, ubicada en el extremo N-terminal, es la secuencia que precede a la primera cadena β (β_1), con una longitud variable entre especies, llegando a tener 77 residuos en *D. melanogaster* y 11 residuos en HsVDAC2 (Shuvo *et al.*, 2016), con un promedio en plantas de 25 aminoácidos aproximadamente (Homblé *et al.*, 2012). La secuencia 2 podría ser la responsable de las interacciones entre el N-terminal y la pared del barril, clave para el proceso de activación, que conducirían a presentar un estado cerrado de VDAC parcialmente colapsado (Fang & Maldonado, 2018), dicho de otro modo, la secuencia conservada 2 podría estar involucrada en la apertura y cierre del canal.

Las regiones conservadas 3, 4, 5 y 6 forman láminas β y que se relacionan con la estructura del barril, es decir, la alta conservación de esas secuencias sugiere que podrían estar involucrados en el mantenimiento de la estructura de la proteína.

Por otra parte, el análisis 3-D de las proteínas de la familia ZmVDAC, reveló un alto grado de conservación a nivel de estructura, su extremo amino contiene a la(s) hélices α , así como a las 19 láminas β que guardan una relación estructural muy similar con MmVDAC1, estructura que se resolvió mediante la cristalografía de rayos X (Ujwal *et al.*, 2008). La comparación realizada con una estructura cristalizadas y resuelta como es la de MmVDAC1 y los modelos 3-D de las ZmVDAC permitió encontrar valores que predicen una alta similitud de estructuras, los valores RMSD, a pesar de ser de organismos evolutivamente distantes. Por su parte, la comparación con AtVDAC1 demuestra que las VDAC de plantas y mamíferos son estructuralmente muy cercanas. Se propone que en un futuro se realice el árbol filogenético con porinas de bacterias, las cuales se consideran los ancestros de las VDAC debido al origen de las mitocondrias propuesto por la teoría endosimbiótica, aunque esas porinas se componen por un número mayor e impar de cadenas β (Wimley, 2003) y tanto los residuos de los extremos amino y carboxilo de la proteína están orientados hacia el lado extracelular y el lado periplásmico en la bacteria (Schulz, 2002), posiblemente estas diferencias son el resultado de la divergencia de los genes.

De manera general, la estructura de barril β , se encuentra conservada en las 9 proteínas ZmVDAC, por lo que, la especialización de las funciones en las VDAC de maíz podría surgir de cambios en algunos residuos, además, la presencia de estructuras secundarias adicionales, como el caso de la presencia de una tercera hélice α entre las asas del barril en las isoformas ZmVDAC3a y ZmVDAC5b, que podrían sugerir funciones específicas, aunque esto debería demostrarse experimentalmente.

Una característica importante de VDAC es la presencia de α -hélices en el N-terminal, las que se encuentran cargadas positivamente. A menudo las hélices en el N-terminal funcionan como secuencias señal de direccionamiento mitocondrial, sin embargo, en las VDAC que son proteínas que se importan a través de proteínas del complejo TOM, este extremo no está involucrado en el direccionamiento mitocondrial (Court *et al.*, 1996), sino que se ha demostrado que la hélice es un dominio móvil, involucrado en la apertura y cierre del canal (Thomas *et al.*, 1993), dominio que se encontró en todas las ZmVDAC.

El análisis *in silico* propone que las isoformas de ZmVDAC podrían sufrir modificaciones postraduccionales.

La fosforilación es la PTM más frecuente en las proteínas, se cree que más de un tercio de las proteínas están fosforiladas (Hubbard & Cohen, 1993) y VDAC no es la excepción. En especies como ratón y rata, se han identificado sitios de fosforilación en las VDAC mediante espectrometría de masas, en particular el aminoácido treonina de la posición 33 en *Rattus norvegicus*, es un residuo fosforilable situado en el interior del barril β localizada en la primera cadena β cercana al citosol (Distler *et al.*, 2007). Este residuo está ampliamente conservado en todas la VDAC de maíz y *A. thaliana*, por lo que se sugiere podría ser fosforilable. Se ha sugerido que hay proteínas cinasas y fosfatasa localizadas en el citosol y el espacio intermembrana que podrían atacar este residuo y que además, podrían

explicar los diferentes papeles que desempeñan las isoformas de VDAC, como los estados de apertura y cierre del canal (Distler *et al.*, 2007).

Adicionalmente, se predicen en ZmVDAC sitios que pueden ser potencialmente fosforilados y que se encuentran localizados en las asas citosólicas de VDAC, fosforilación que debe ser demostrada experimentalmente.

Las isoformas de ZmVDAC tienen elementos de respuesta a luz, estrés y hormonas.

Para evaluar los posibles patrones de respuesta de los genes *ZmVDAC*, se buscaron los elementos que actúan en *cis* en una región de 2,000 pb río arriba del sitio de inicio de cada gen. Todos los genes *ZmVDAC* presentan elementos de respuesta a la luz, siendo los elementos mayoritarios en las secuencias, esto sugiere su relación con procesos como la fotosíntesis de la planta. Se identificaron diferentes elementos de respuesta a estrés abiótico, como sequía y que están estrechamente relacionados con la respuesta a hormonas. Se ha demostrado que ABA, la hormona del estrés, suprime la acumulación de transcritos de VDAC en *A. thaliana* (Yan *et al.*, 2009). Los genes *ZmVDAC* podrían jugar un papel importante en respuesta al estrés abiótico, como se ha visto anteriormente en sequía, estrés hídrico, temperatura o estrés salino, donde se ha propuesto que el aumento en la toma de Na⁺ y la consecuente toxicidad iónica lleva a que VDAC participe detectando y promoviendo la liberación de Ca²⁺, para favorecer el transporte de Na⁺ a las vacuolas a través de la vía SOS (Salt Overly Sensitive) y reducir el daño ocasionado por la salinidad (Li *et al.*, 2021). En alfalfa, VDAC, presenta un papel positivo en la mejora de la tolerancia al frío y la sequía (Yang *et al.*, 2021). El encontrar los elementos de respuesta a estrés hídrico y ABA en los *ZmVDAC*, sugiere su participación en los procesos de estrés hídrico o sequía.

Por otra parte, AtVDAC2 y AtVDAC4 están involucrados en el correcto desarrollo de la hoja y del polen (Tateda *et al.*, 2011), y en maíz se encontraron promotores de expresión para esos tejidos para ZmVDAC1a al ZmVDAC4b, sugerente de una

participación similar a sus homólogos en *Arabidopsis*. Aunque también se ha sugerido que AtVDAC2 y AtVDAC4 tienen un papel en la eficiencia del metabolismo de carbono y su participación en el daño oxidante de las mitocondrias causado por especies reactivas de oxígeno (Qin *et al.*, 2009). Actividades que hace falta por demostrar en las VDAC de maíz.

Producción de ZmVDAC1b recombinante en bacteria

Según el análisis bioinformático, los 9 miembros de la familia ZmVDAC son candidatos para producir proteínas funcionales. En este trabajo se produjo a la proteína recombinante ZmVADC1b. La selección de la producción de esta proteína fue basada inicialmente a que la transcripción de ese gen ha sido probada en nuestro grupo de trabajo y se ha visto que aumenta cuando la planta se encuentra infectada en presencia del hongo patógeno *F. verticillioides* (Rodríguez-Saavedra comunicación personal). Adicionalmente, considerando los criterios para la selección de las secuencias putativas seguidos en este trabajo, la isoforma ZmVDAC1b fue una de las que presentó uno de los mejores valores de RMSD, o valor de superposición de MmVDAC1 y ZmVDAC1b, que fue de 2.45, y mejor que el valor encontrado que AtVDAC1 (isoforma caracterizada) con un valor de RMSD es de 2.49, recordando que entre menor sean los valores de RMSD hay mayor similitud en la estructura de la proteína (Neveu *et al.*, 2018).

Se logró producir la proteína por dos metodologías, la primera de ellas, por medio de la Tecnología Gateway en donde el vector obtenido presenta el tag V5 altamente inmunogénico en el carboxilo terminal, empleado para su identificación mediante ensayos de Western Blot. Además, en la construcción se presenta el tag 6xHis, útil para la purificación de la proteína en trabajos posteriores.

La segunda estrategia empleada, requirió enzimas de restricción, se llegó a la obtención del vector de expresión con el gen *ZmVDAC1b*, sin embargo, a diferencia de la Tecnología Gateway, esta construcción tiene una limitante importante, no incluye los tags en el extremo carboxilo de la proteína, lo que implicó que la proteína

no fuera identificada por medio de un Western Blot. A pesar de que el vector no fue el ideal, se lograron obtener células transformantes para ZmVDAC1b y se establecieron las mismas condiciones para la obtención de la proteína recombinante que se probaron con la construcción por Tecnología Gateway. En el gel de poliacrilamida-SDS, se observan las bandas en el peso esperado de ZmVDAC1b a partir de las 2 h de inducción, siendo el $t_6=6$ h el tiempo en donde se obtiene la mayor cantidad de proteína. Las condiciones de inducción se tomaron inicialmente de Magri *et al.*, 2019, en donde usaron una temperatura de inducción 28 °C, y es posible que a esta temperatura se favorezca el correcto plegamiento de las proteínas puesto que es una proteína membranal. Condición que se ha propuesto que ayuda a aumentar el rendimiento y la concentración máxima de proteína recombinante, sobre todo que es una proteína que se inserta en la membrana (Caspeta *et al.*, 2009).

Por lo anterior, comprobamos que ZmVDAC1b no solo transcribe sino también se traduce a proteína. La proteína recombinante puede usarse en estudios para caracterizar la actividad de transporte del barril, pueda ser usada en posteriores proyectos sobre la caracterización funcional tanto *in vitro* como *in vivo* de VDAC y determinar su interacción con miembros de la familia de la hexocinasa, proteína que se está estudiando en el grupo de trabajo (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019; Loyola-Hernández, 2019; Morgado-Martínez, 2020, Burgos-Palacios, 2019 y 2021).

CONCLUSIONES

- Se identificaron 9 secuencias que tienen el mayor potencial de traducirse en una proteína VDAC en maíz. Con base en su relación filogenética se nombraron como: ZmVDAC1a, ZmVDAC1b, ZmVDAC2, ZmVDAC3a, ZmVDAC3b, ZmVDAC4a, ZmVDAC4b, ZmVDAC5a y ZmVDAC5b.
- Las proteínas ZmVDAC tienen una estructura de barril β compuesto con 19 cruces transmembrana, contienen de 1 a 2 α -hélices en la región N-terminal. Aunque también se observó la presencia de una α -hélice en el asa entre las cadenas β en algunas de la VDAC descritas. Estructura característica y muy conservada en todos los organismos eucariontes.
- En las regiones promotoras de los genes *ZmVDACs* hay elementos en *cis* de respuesta a estreses abióticos como sequía y temperatura, así como a hormonas y respuesta a la luz.
- Existen residuos en las asas del barril β potenciales a ser fosforilables, así como en parte interna del transportador, como el aminoácido T32 en ZmVDAC1b.
- Se subclonó el gen *ZmVDAC1b* en el vector de expresión pDEST42 y se generó el protocolo para la producción de la proteína.
- Se identificó a la proteína ZmVDAC1b en un ensayo de Western Blot, mediante el método de quimioluminiscencia a través del epítipo V5 unido en el extremo carboxilo de la proteína

PERSPECTIVAS

- Obtener las 8 construcciones restantes de las isoformas de la familia ZmVDAC y expresarlas en planta.
- Determinar si alguna ZmVDAC es capaz de interactuar físicamente con alguna proteína mitocondrial.
- Producir plantas sobreexpresoras de ZmVDAC.
- Caracterizar los fenotipos de plantas sobreexpresoras de ZmVDAC en presencia y ausencia de algún tipo de estrés.

REFERENCIAS

- Aiello, R., Messina, A., Schiffler, B., Benz, R., Tasco, G., Casadio, R., & De Pinto, V. (2004). **Functional Characterization of a Second Porin Isoform in *Drosophila melanogaster*.** *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25364–25373. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310572200>
- Alcántar-Aguirre, F. C., Chagolla, A., Tiessen, A., Délano, J. P., & González de la Vara, L. E. (2013). **ATP produced by oxidative phosphorylation is channeled toward hexokinase bound to mitochondrial porin (VDAC) in beetroots (*Beta vulgaris*).** *Planta*, 237(6), 1571–1583. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1866-4>
- Alexandra J Harvey. (2019). **Mitochondria in early development: linking the microenvironment, metabolism and the epigenome.** *Society for Reproduction and Fertility*, 157(5), 159–179.
- Arsovski, A. A., Pradinuk, J., Guo, X. Q., Wang, S., & Adams, K. L. (2015). **Evolution of cis-regulatory elements and regulatory networks in duplicated genes of *Arabidopsis thaliana*.** *Plant Physiology*, pp.00717.2015. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00717>
- Bayrhuber, M., Meins, T., Habeck, M., Becker, S., Giller, K., Villinger, S., Vornrhein, C., Griesinger, C., Zweckstetter, M., & Zeth, K. (2008). **Structure of the human voltage-dependent anion channel.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(40), 15370–15375. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808115105>
- Benz, R. (1994). **Permeation of hydrophilic solutes through mitochondrial outer membranes: review on mitochondrial porins.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 1197(2), 167–196. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)90004-3](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)90004-3)
- Caspeta, L., Flores, N., Pérez, N. O., Bolívar, F., & Ramírez, O. T. (2009). **The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: A scale-down study.** *Biotechnology and Bioengineering*, 102(2), 468–482. <https://doi.org/10.1002/bit.22084>
- Chamberlin, M., McGrath, J., & Waskell, L. (1970). **New RNA Polymerase from *Escherichia coli* infected with Bacteriophage T7.** *Nature*, 228(5268), 227–231. <https://doi.org/10.1038/228227a0>
- Choudhary, O. P., Ujwal, R., Kowallis, W., Coalson, R., Abramson, J., & Grabe, M. (2010). **The Electrostatics of VDAC: Implications for Selectivity and Gating.** *Journal of Molecular Biology*, 396(3), 580–592. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.006>
- Clapham, D. E. (2007). **Calcium Signaling.** *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Clausen, C., Ilkavets, I., Thomson, R., Philippar, K., Vojta, A., Mohlmann, T., Neuhaus, E., Fulgosi, H., & Soll, J. (2004). **Intracellular localization of VDAC proteins in plants.** *Planta*, 220(1), 30–37. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1325-3>
- Colombini, M. (2016). **The VDAC channel: Molecular basis for selectivity.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(10), 2498–2502. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.01.019>
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., & Forte, M. (1996). **VDAC, a Channel in the Outer Mitochondrial Membrane.** In *Ion Channels* (pp. 169–202). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1775-1_5
- Court, D. A., Kleene, R., Neupert, W., & Lill, R. (1996). **Role of the N- and C-termini of porin in import into the outer membrane of *Neurospora* mitochondria.** *FEBS Letters*, 390(1), 73–77. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00629-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00629-1)
- da Silva, A. F., Mariotti, F. R., Máximo, V., & Campello, S. (2014). **Mitochondria dynamism:**

- of shape, transport and cell migration.** *Cellular and Molecular Life Sciences*.
<https://doi.org/10.1007/s00018-014-1557-8>
- de Angeli, A., Thomine, S., Frachisse, J.-M., Ephritikhine, G., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2007). **Anion channels and transporters in plant cell membranes.** *FEBS Letters*, 581(12), 2367–2374. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.003>
- De Pinto, V., Messina, A., Lane, D. J. R., & Lawen, A. (2010). **Voltage-dependent anion-selective channel (VDAC) in the plasma membrane.** *FEBS Letters*, 584(9), 1793–1799. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.049>
- De Pinto, V., Mizrachi, D., Homblé, F., Pandey, G. K., Ravi, B., Kanwar, P., Sanyal, S. K., & Bheri, M. (2021). **VDACs: An Outlook on Biochemical Regulation and Function in Animal and Plant Systems.** *Front. Physiol*, 12, 683920. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.683920>
- Distler, A. M., Kerner, J., & Hoppel, C. L. (2007). **Post-translational modifications of rat liver mitochondrial outer membrane proteins identified by mass spectrometry.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1774(5), 628–636. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.03.012>
- Fang, D., & Maldonado, E. N. (2018). **VDAC Regulation: A Mitochondrial Target to Stop Cell Proliferation** (pp. 41–69). <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.002>
- Gincel, D., Silberberg, S. D., & Shoshan-Barmatz, V. (2000). **Modulation of the voltage-dependent anion channel (VDAC) by glutamate.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 32(6), 571–583. <https://doi.org/10.1023/A:1005670527340>
- Gonçalves, R. P., Buzhynskyy, N., Prima, V., Sturgis, J. N., & Scheuring, S. (2007). **Supramolecular Assembly of VDAC in Native Mitochondrial Outer Membranes.** *Journal of Molecular Biology*, 369(2), 413–418. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.063>
- Graham, B. H., & Craigen, W. J. (2005). **Mitochondrial voltage-dependent anion channel gene family in *Drosophila melanogaster*: Complex patterns of evolution, genomic organization, and developmental expression.** *Molecular Genetics and Metabolism*, 85(4), 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.03.009>
- Greener, A., Callahan, M., & Jerpseth, B. (1996). **An Efficient Random Mutagenesis Technique Using an *E. coli* Mutator Strain.** In *In Vitro Mutagenesis Protocols* (pp. 375–386). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-332-5:375>
- Gross, L. E., Klinger, A., Spies, N., Ernst, T., Flinner, N., Simm, S., Ladig, R., Bodensohn, U., & Schleiff, E. (2021). **Insertion of plastidic β -barrel proteins into the outer envelopes of plastids involves an intermembrane space intermediate formed with Toc75-V/OEP80.** *The Plant Cell*, 33(5), 1657–1681. <https://doi.org/10.1093/plcell/koab052>
- Habib, S. J., Waizenegger, T., Lech, M., Neupert, W., & Rapaport, D. (2005). **Assembly of the TOB Complex of Mitochondria.** *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6434–6440. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411510200>
- Hecht, M. H. (1994). **De novo design of beta-sheet proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(19), 8729–8730. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.19.8729>
- Hemond, M., Ubrig, É., Azeredo, K., Salinas-Giegé, T., Drouard, L., & Duchêne, A.-M. (2020). **Arabidopsis Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs): Overlapping and Specific Functions in Mitochondria.** *Cells*, 9(4), 1023. <https://doi.org/10.3390/cells9041023>
- Hiller, S., Abramson, J., Mannella, C., Wagner, G., & Zeth, K. (2010). **The 3D structures of VDAC represent a native conformation.** *Trends in Biochemical Sciences*, 35(9), 514–521. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.005>
- Hiller, S., Garces, R. G., Malia, T. J., Orekhov, V. Y., Colombini, M., & Wagner, G. (2008). **Solution structure of the integral human membrane protein VDAC-1 in detergent**

- micelles.** *Science (New York, N.Y.)*, 321(5893), 1206–1210. <https://doi.org/10.1126/science.1161302>
- Hinnebusch, A. G., Ivanov, I. P., & Sonenberg, N. (2016). **Translational control by 5'-untranslated regions of eukaryotic mRNAs.** *Science*, 352(6292), 1413–1416. <https://doi.org/10.1126/science.aad9868>
- Hodge, T., & Colombini, M. (1997). **Regulation of Metabolite Flux through Voltage-Gating of VDAC Channels.** *Journal of Membrane Biology*, 157(3), 271–279. <https://doi.org/10.1007/s002329900235>
- Homblé, F., Krammer, E.-M., & Prévost, M. (2012). **Plant VDAC: Facts and speculations.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1486–1501. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.028>
- Hubbard, M. J., & Cohen, P. (1993). **On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation.** *Trends in Biochemical Sciences*, 18(5), 172–177. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90109-Z](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90109-Z)
- Jentsch, T. J., Hübner, C. A., & Fuhrmann, J. C. (2004). **Ion channels: Function unravelled by dysfunction.** *Nature Cell Biology*, 6(11), 1039–1047. <https://doi.org/10.1038/ncb1104-1039>
- Jores, T., Lawatscheck, J., Beke, V., Franz-Wachtel, M., Yunoki, K., Fitzgerald, J. C., Macek, B., Endo, T., Kalbacher, H., Buchner, J., & Rapaport, D. (2018). **Cytosolic Hsp70 and Hsp40 chaperones enable the biogenesis of mitochondrial β -barrel proteins.** *Journal of Cell Biology*, 217(9), 3091–3108. <https://doi.org/10.1083/jcb.201712029>
- Kanwar, P., Samtani, H., Sanyal, S. K., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & Pandey, G. K. (2020). **VDAC and its interacting partners in plant and animal systems: an overview.** *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(5), 715–732. <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1756214>
- Kerner, J., Lee, K., Tandler, B., & Hoppel, C. L. (2012). **VDAC proteomics: Post-translation modifications.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1520–1525. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.11.013>
- Klinger, A., Gosch, V., Bodensohn, U., Ladig, R., & Schleiff, E. (2019). **The signal distinguishing between targeting of outer membrane β -barrel protein to plastids and mitochondria in plants.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1866(4), 663–672. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.01.004>
- Krammer, E.-M., Vu, G. T., Homblé, F., & Prévost, M. (2015). **Dual Mechanism of Ion Permeation through VDAC Revealed with Inorganic Phosphate Ions and Phosphate Metabolites.** *PLOS ONE*, 10(4), e0121746. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121746>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms.** *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kusano, T., Tateda, C., Berberich, T., & Takahashi, Y. (2009). **Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death.** *Plant Cell Reports*, 28(9), 1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0741-z>
- Landy, A. (1989). **Dynamic, Structural, and Regulatory Aspects of Lambda Site-specific Recombination.** *Ann. Rev. Biochem.* 58, 913–949.
- Lauterwasser, J., Fimm-Todt, F., Oelgeklaus, A., Schreiner, A., Funk, K., Falquez-Medina, H., Klesse, R., Jahreis, G., Zerbes, R. M., O'Neill, K., van der Laan, M., Luo, X., & Edlich, F. (2021). **Hexokinases inhibit death receptor-dependent apoptosis on the mitochondria.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.2021175118>
- Lee, S. M., Hoang, M. H. T., Han, H. J., Kim, H. S., Lee, K., Kim, K. E., Kim, D. H., Lee, S. Y., & Chung, W. S. (2009). **Pathogen inducible voltage-dependent anion channel**

- (AtVDAC) isoforms are localized to mitochondria membrane in Arabidopsis.** *Molecules and Cells*, 27(3), 321–327. <https://doi.org/10.1007/s10059-009-0041-z>
- Li, N., Zhang, Z., Chen, Z., Cao, B., & Xu, K. (2021). **Comparative Transcriptome Analysis of Two Contrasting Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.) Genotypes Reveals That Ion Homeostasis Is a Crucial Biological Pathway Involved in the Rapid Adaptive Response to Salt Stress.** *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.683891>
- Li, Z.-Y., Xu, Z.-S., He, G.-Y., Yang, G.-X., Chen, M., Li, L.-C., & Ma, Y. (2013). **The Voltage-Dependent Anion Channel 1 (AtVDAC1) Negatively Regulates Plant Cold Responses during Germination and Seedling Development in Arabidopsis and Interacts with Calcium Sensor CBL1.** *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 701–713. <https://doi.org/10.3390/ijms14010701>
- Liebeschuetz, J. W., Cole, J. C., & Korb, O. (2012). **Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(6), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9551-4>
- Lock, J. T., & Parker, I. (2020). **IP3 mediated global Ca²⁺ signals arise through two temporally and spatially distinct modes of Ca²⁺ release.** *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.55008>
- Magri A, Karachitos A, Di Rosa MC, Reina S, Conti Nibali S, Messina A, Kmita H. & De Pinto V. (2019) **Recombinant yeast VDAC2: a comparison of electrophysiological features with the native form.** *FEBS Open Bio*, 9(7), 1184-1193. doi: 10.1002/2211-5463.12574.
- Maldonado, E. N. (2017). **VDAC–Tubulin, an Anti-Warburg Pro-Oxidant Switch.** *Frontiers in Oncology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00004>
- Mannella, C. A. (2021). **VDAC-A Primal Perspective.** *Int. J. Mol. Sci*, 22, 1685. <https://doi.org/10.3390/ijms22041685>
- Martin, W. F., Garg, S., & Zimorski, V. (2015). **Endosymbiotic theories for eukaryote origin.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), 20140330. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0330>
- Mazure, N. M. (2017). **VDAC in cancer.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1858(8), 665–673. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.03.002>
- McCommis, K. S., & Baines, C. P. (2012). **The role of VDAC in cell death: Friend or foe?** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1444–1450. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.025>
- Messina, A., Reina, S., Guarino, F., & De Pinto, V. (2012). **VDAC isoforms in mammals.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1466–1476. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>
- Moitra, A., & Rapaport, D. (2021). **The Biogenesis Process of VDAC – From Early Cytosolic Events to Its Final Membrane Integration.** *Frontiers in Physiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.732742>
- Navarro, E., Mallén, A., & Hueso, M. (2021). **Dynamic Variations of 3'UTR Length Reprogram the mRNA Regulatory Landscape.** *Biomedicines*, 9(11), 1560. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111560>
- Neveu, E., Popov, P., Hoffmann, A., Miglioni, A., Besseron, X., Danoy, G., Bouvry, P., & Grudinin, S. (2018). **RapidRMSD: rapid determination of RMSDs corresponding to motions of flexible molecules.** *Bioinformatics*, 34(16), 2757–2765. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty160>
- Oh, J., Lee, S.-G., & Park, C. (2021). **PIC-Me: paralogs and isoforms classifier based on machine-learning approaches.** *BMC Bioinformatics*, 22(S11), 311. <https://doi.org/10.1186/s12859-021-04229-x>

- Pfanner, N., Warscheid, B., & Wiedemann, N. (2019). **Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(5), 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>
- Pittalà, M. G. G., Conti Nibali, S., Reina, S., Cunsolo, V., Di Francesco, A., De Pinto, V., Messina, A., Foti, S., & Saletti, R. (2021). **VDACs Post-Translational Modifications Discovery by Mass Spectrometry: Impact on Their Hub Function.** *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12833. <https://doi.org/10.3390/ijms222312833>
- Qin, G., Meng, X., Wang, Q., & Tian, S. (2009). **Oxidative Damage of Mitochondrial Proteins Contributes to Fruit Senescence: A Redox Proteomics Analysis.** *Journal of Proteome Research*, 8(5), 2449–2462. <https://doi.org/10.1021/pr801046m>
- Ravi, B., Kanwar, P., Sanyal, S. K., Bheri, M., & Pandey, G. K. (2021). **VDACs: An Outlook on Biochemical Regulation and Function in Animal and Plant Systems.** In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.683920>
- Reina, S., Pittalà, M. G. G., Guarino, F., Messina, A., De Pinto, V., Foti, S., & Saletti, R. (2020). **Cysteine Oxidations in Mitochondrial Membrane Proteins: The Case of VDAC Isoforms in Mammals.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00397>
- Rosano, C. (2011). **Molecular model of hexokinase binding to the outer mitochondrial membrane porin (VDAC1): Implication for the design of new cancer therapies.** *Mitochondrion*, 11 (3), 513-519. DOI: 10.1016/j.mito.2011.01.012
- Rosencrans, W. M., Aguilera, V. M., Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2021). **α -Synuclein emerges as a potent regulator of VDAC-facilitated calcium transport.** *Cell Calcium*, 95, 102355. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102355>
- Rosencrans, W. M., Rajendran, M., Bezrukov, S. M., & Rostovtseva, T. K. (2021). **VDAC regulation of mitochondrial calcium flux: From channel biophysics to disease.** *Cell Calcium*, 94, 102356. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2021.102356>
- Rostovtseva, T. K. (2012). **VDAC structure, function, and regulation of Mitochondrial and Cellular Metabolism.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(6), 1437. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.03.018>
- Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2008). **VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 40(3), 163–170. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9145-y>
- Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2021). **Membrane Transport | Mitochondrial Outer Membrane and the VDAC Channel.** *Encyclopedia of Biological Chemistry: Third Edition*, 2, 990–996. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21371-X>
- Rostovtseva, T. K., Queralt-Martín, M., Rosencrans, W. M., & Bezrukov, S. M. (2020). **Targeting the Multiple Physiologic Roles of VDAC With Steroids and Hydrophobic Drugs.** *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00446>
- Rostovtseva, T. K., Tan, W., & Colombini, M. (2005). **On the Role of VDAC in Apoptosis: Fact and Fiction.** *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 37(3), 129–142. <https://doi.org/10.1007/s10863-005-6566-8>
- Sabirov, R. Z., Dutta, A. K., & Okada, Y. (2001). **Volume-Dependent Atp-Conductive Large-Conductance Anion Channel as a Pathway for Swelling-Induced Atp Release.** *Journal of General Physiology*, 118(3), 251–266. <https://doi.org/10.1085/jgp.118.3.251>
- Sanyal, S. K., Kanwar, P., Fernandes, J. L., Mahiwal, S., Yadav, A. K., Samtani, H., Srivastava, A. K., Suprasanna, P., & Pandey, G. K. (2020). **Arabidopsis Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channels Are Involved in Maintaining Reactive Oxygen Species Homeostasis, Oxidative and Salt Stress Tolerance in**

- Yeast.** *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00050>
- Schein, S. J., Colombini, M., & Finkelstein, A. (1976). **Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria.** *The Journal of Membrane Biology*, 30(1), 99–120. <https://doi.org/10.1007/BF01869662>
- Schulz, G. E. (2002). **The structure of bacterial outer membrane proteins.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1565(2), 308–317. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(02\)00577-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(02)00577-1)
- Scott, I., & Logan, D. C. (2008). **Mitochondrial morphology transition is an early indicator of subsequent cell death in Arabidopsis.** *New Phytologist*, 177(1), 90–101. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02255.x>
- Shoshan-Barmatz, V., & Ben-Hail, D. (2012). **VDAC, a multi-functional mitochondrial protein as a pharmacological target.** *Mitochondrion*, 12(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2011.04.001>
- Shoshan-Barmatz, V., Pittala, S., & Mizrachi, D. (2019). **VDAC1 and the TSPO: Expression, Interactions, and Associated Functions in Health and Disease States.** *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3348. <https://doi.org/10.3390/ijms20133348>
- Shuvo, S. R., Ferens, F. G., & Court, D. A. (2016). **The N-terminus of VDAC: Structure, mutational analysis, and a potential role in regulating barrel shape.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(6), 1350–1361. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.03.017>
- Srivastava, A. K., Lu, Y., Zinta, G., Lang, Z., & Zhu, J.-K. (2018). **UTR-Dependent Control of Gene Expression in Plants.** *Trends in Plant Science*, 23(3), 248–259. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.003>
- Tateda, C., Kusano, T., & Takahashi, Y. (2012). **The Arabidopsis voltage-dependent anion channel 2 is required for plant growth.** *Plant Signaling & Behavior*, 7(1), 31–33. <https://doi.org/10.4161/psb.7.1.18394>
- Tateda, C., Watanabe, K., Kusano, T., & Takahashi, Y. (2011). **Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in Arabidopsis.** *Journal of Experimental Botany*, 62(14), 4773–4785. <https://doi.org/10.1093/jxb/err113>
- Tateda, C., Yamashita, K., Takahashi, F., Kusano, T., & Takahashi, Y. (2009). **Plant voltage-dependent anion channels are involved in host defense against Pseudomonas cichorii and in Bax-induced cell death.** *Plant Cell Reports*, 28(1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0630-x>
- Tewari, S. G., Zhou, Y., Otto, B. J., Dash, R. K., Kwok, W.-M., & Beard, D. A. (2015). **Markov chain Monte Carlo based analysis of post-translationally modified VDAC gating kinetics.** *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00513>
- Thomas, L., Blachly-Dyson, E., Colombini, M., & Forte, M. (1993). **Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion-selective channel.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12), 5446–5449. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5446>
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Židek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A. A., Hassabis, D. (2021). **Highly accurate protein structure prediction for the human proteome.** *Nature*, 596(7873), 590–596. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- Ujwal, R., Cascio, D., Colletier, J.-P., Faham, S., Zhang, J., Toro, L., Ping, P., & Abramson, J. (2008). **The crystal structure of mouse VDAC1 at 2.3 Å resolution reveals mechanistic insights into metabolite gating.**

- <https://doi.org/10.1073/pnas.0809634105>
- Varughese, J. T., Buchanan, S. K., Pitt, A. S., Cesar, J., & Ferreira, B. (2021). **The Role of Voltage-Dependent Anion Channel in Mitochondrial Dysfunction and Human Disease.** <https://doi.org/10.3390/cells10071737>
- Vothknecht, U. C., & Szabo, I. (2020). **Channels and transporters for inorganic ions in plant mitochondria: Prediction and facts.** *Mitochondrion*, 53, 224–233. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.05.007>
- Wimley, W. C. (2003). **The versatile β -barrel membrane protein.** *Current Opinion in Structural Biology*, 13(4), 404–411. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(03\)00099-X](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(03)00099-X)
- Xu, T., Wang, X., Ma, H., Su, L., Wang, W., Meng, J., & Xu, Y. (2021). **Functional Characterization of VDACs in Grape and Its Putative Role in Response to Pathogen Stress.** *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.670505>
- Yan, J., He, H., Tong, S., Zhang, W., Wang, J., Li, X., & Yang, Y. (2009). **Voltage-Dependent Anion Channel 2 of *Arabidopsis thaliana* (AtVDAC2) Is Involved in ABA-Mediated Early Seedling Development.** *International Journal of Molecular Sciences*, 10(6), 2476–2486. <https://doi.org/10.3390/ijms10062476>
- Yang, M., Duan, X., Wang, Z., Yin, H., Zang, J., Zhu, K., Wang, Y., & Zhang, P. (2021). **Overexpression of a Voltage-Dependent Anion-Selective Channel (VDAC) Protein-Encoding Gene, MsVDAC, from *Medicago sativa* Confers Cold and Drought Tolerance to Transgenic Tobacco.** *Genes*, 12(11), 1706. <https://doi.org/10.3390/genes12111706>
- Yu, M., Yu, Y., Song, T., Zhang, Y., Wei, F., Cheng, J., Zhang, B., & Zhang, X. (2022). **Characterization of the voltage-dependent anion channel (VDAC) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) and its potential mechanism in response to drought and salinity stresses.** *Gene*, 809, 146031. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.146031>

ANEXOS

Anexo 1. Alineamiento múltiple de las 18 ZmVDAC incluidas en al menos dos bases de datos de manera inicial.

| | 1 | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| ZmVDAC1a | | | | | | | |
| ZmVDAC1b | | | | | | | |
| ZmVDAC2_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC2_1 | | | | | | | |
| ZmVDAC3_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC2_2 | | | | | | | |
| ZmPorin1_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC3_1 | | | | | | | |
| ZmUP | | | | | | | |
| ZmVDAC4 | | | | | | | |
| ZmOMMPP | | | | | | | |
| ZmMOMPP2 | | | | | | | |
| ZmOMM | | | | | | | |
| ZmOPMPPPOR1 | | | | | | | |
| ZmVDAC6 | MPFYALRQMI | YTVGLIICVV | LISDWNLTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSGR | TTVDVIIDSD | SKVSTTVTVD |
| ZmPorin1_1 | | | | | | | |
| ZmMOMPP4 | | | | | | | |
| ZmOMMPorin1 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | 71 | | | | | | |
| ZmVDAC1a | | | | | | | |
| ZmVDAC1b | | | | | | | |
| ZmVDAC2_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC2_1 | | | | | | | |
| ZmVDAC3_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC2_2 | | | | | | | |
| ZmPorin1_0 | | | | | | | |
| ZmVDAC3_1 | | | | | | | |
| ZmUP | | | | MSKG | PVPFANI | | |
| ZmVDAC4 | | | | MSKG | PVPFANI | | |
| ZmOMMPP | | | | | | | |
| ZmMOMPP2 | | | | | | | |
| ZmOMM | | | | | | | |
| ZmOPMPPPOR1 | | | | | | | |
| ZmVDAC6 | EALTGLKTSF | AFKVPDHKSG | KLDLQYAHNR | FSMNSTIGLT | STPLVELAAT | VGTSELAIGA | EFGFDSTSAA |
| ZmPorin1_1 | | | | | | | |
| ZmMOMPP4 | | | | MSKG | PVPFANI | | |
| ZmOMMPorin1 | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | 141 | | | | | | |
| ZmVDAC1a | MVGPGLYT | EIGKKTRDLL | YKDYQ | TDHKFT | LT | TYTSNGVA | |
| ZmVDAC1b | MVGPGLYT | EIGKKTRDLL | YKDYQ | TDHKFT | LT | TYSSNGVA | |
| ZmVDAC2_0 | MAAAGPGLYS | EIGKKARDLL | YKDYH | TDQKFT | LT | TYAANGAVSF | HSTLRLKATT |
| ZmVDAC2_1 | MAAAGPGLYS | DIGKKARGLL | YKDYH | TDRKFT | LT | TYAANGAFKA | RVTMDMKHCV |
| ZmVDAC3_0 | MAAAGPGLYS | DIGKKARGLL | YKDYH | TDRKFT | LT | TYAANGAFKA | RVTMDMKHRV |
| ZmVDAC2_2 | MAAAGPGLYS | EIGKKARDLL | YKDYH | TDQKFT | LT | TYAANGA | VRAMIAGSMG |
| ZmPorin1_0 | MAPGLYT | DIGKKTRDLL | YKDYH | THQKFS | LT | TCSPNGVA | |
| ZmVDAC3_1 | MAPGLYT | DIGKKTRDLL | YKDYH | THQKFS | LT | TCSPHGIA | |
| ZmUP | GKRAK | DLL | YKDYH | FDQKF | SLS | TCSNSGLN | |
| ZmVDAC4 | GKRAK | DLL | YKDYH | FDQKF | SLS | TSSGSGLN | |
| ZmOMMPP | MKGPGLFS | DIGKKAKDLL | SKDYT | YDQKLT | IS | TASASGLG | |
| ZmMOMPP2 | MKGPGLFS | DIGKKAKDLL | SKDYT | YDQKLS | IF | TASASGVG | |
| ZmOMM | MGPGGLYS | DIGRKARDLL | TGGFN | TGQQLV | LI | THCSNCTR | |
| ZmOPMPPPOR1 | MVVAVGLYT | DIGKKTRDLL | YKDYH | THQKFC | LT | TSSPNGVA | |
| ZmVDAC6 | VTKYNSGVGY | NKSDFSVSLL | LADKGETLKA | SYVHLFNPTN | | GATVAEEN | |
| ZmPorin1_1 | MAPGLYT | DIGKKTRDLL | YKDYH | THQKFS | LT | TCSPNGVVS | PSLLINHHFL |
| ZmMOMPP4 | GKRAK | LFNNLL | YKDYH | FDQKF | SLS | TCSNSGLN | LYL |
| ZmOMMPorin1 | MYF | ICYDLL | YKDYH | FDQKF | SLS | TCSNSGLN | |

211

| | | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|
| ZmVDAC1a | ----- | ----- | VTAS | STKKADLILG | EIQSQIKNKN | MTIDVKANSE | SNITTTITVD | EIATPGLKTI |
| ZmVDAC1b | ----- | ----- | VTAT | STKKADLIFS | EIHSQIKNKN | MTVDVKANSE | SNITTTVTVN | EIATPGLKTI |
| ZmVDAC2_0 | ----- | ----- | SDF | ILLLQAITAA | STRKDEAIFN | VTVDVKATSE | SNVITTTIVH | ELGTPGLKAI |
| ZmVDAC2_1 | DGDGAPVHVQ | DKTESAITAA | STRKDEAIFN | KIQGQLKHNN | VTVDVKATSE | SKVATATITVH | ELATPGLKAF | |
| ZmVDAC3_0 | DGDGAPVHVQ | DKTES | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| ZmVDAC2_2 | ----- | ----- | AITAA | STRKDEAIFN | EIQSQLKHNN | VTVDVKATSE | SNVITTTIVH | ELATPGLKAI |
| ZmPorin1_0 | ----- | ----- | ITAA | GTRKNESIFG | ELHTQIKNKK | LTVDVKANSE | SDLLTTITVD | EFGTPGLKSI |
| ZmVDAC3_1 | ----- | ----- | ITAA | GTRKNESIFG | DLHTQIKNKK | LTVDVKANSE | SDLLTTITVD | EIGTPGLKSI |
| ZmUP | ----- | ----- | LTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSSR | TTVDVIIDSD | SKVSTTVTVD | E-ALTGLKTS |
| ZmVDAC4 | ----- | ----- | LTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSSR | TTIDVTVDS | SKVSTTVTVD | E-ALTGLKTS |
| ZmOMMPP | ----- | ----- | LTST | AVKKGGLYSL | DVSSVYKYKN | TTVDVKVDTE | SNISTTLTVL | D-ALPCKTLV |
| ZmMOMPP2 | ----- | ----- | LTST | AVKKGGLYSL | DVSSVYKYKN | TTVDVKLDTE | SNISTTLTVL | D-ALPCKTLV |
| ZmOMM | ----- | ----- | IAAS | STKSNEFIIS | EIQSQLKHNN | VTVDVKANSE | ANLSTTVTVE | ELGVLGLKKI |
| ZmOPMPPOR1 | ----- | ----- | ITAA | GTRKNESIFG | ELHTQIKNKK | LTVDVKANSE | SDLLTTITVD | EFGTPGLKSI |
| ZmVDAC6 | ----- | ----- | LTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSSR | TTVDVIIDSD | SKVSTTVTVD | E-ALTGLKTS |
| ZmPorin1_1 | ---SAPPQRT | PHFICAITAA | GTRKNESIFG | ELHTQIKNKK | LTVDVKANSE | SDLLTTITVD | EFGTPGLKSI | |
| ZmMOMPP4 | ----- | ----- | LTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSSR | TTVDVIIDSD | SKVSTTVTVD | E-ALTGLKTS |
| ZmOMMPorin1 | ----- | ----- | LTAT | GVKINEDFIG | DIRTQHKSSR | TTVDVIIDSD | SKVSTTVTVD | E-ALTGLKTS |

281

| | | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|--|
| ZmVDAC1a | LSFAVPDQRS | GKVELQYLHD | YAGVNASIGL | TANPVVNLSA | AFGTKAVALG | ADISLDTATG | NLTKYNAALR | |
| ZmVDAC1b | LSFAVPDQRS | GKVELQYLHD | YAGVNASVSL | TANPVVNLSA | AFGTKALAVG | AEISFDSATG | NFTKYNAGLM | |
| ZmVDAC2_0 | LCVPPPYQKS | AKAELQYLHH | HAGVAASVGL | NANPVVNLSS | VFGTKAIAVG | ADAADFDTSSG | DLTKYNAGLS | |
| ZmVDAC2_1 | LCVPPPYQKS | AKAELQYLHH | HAGVAASVGL | NANPVVNLSS | VFGTKTAVAG | ADAADFDTSSG | NLTKYNAGLS | |
| ZmVDAC3_0 | LCVPPPYQKS | AKAELQYLHH | HAGVAASVGL | NANPVVNLSS | VFGTKTAVAG | ADVAFDTSSG | NLTKYNAGLS | |
| ZmVDAC2_2 | LCVPPPYQKS | AKAELQYLHH | HAGVAASVGL | NANPVVNLSS | VFGTKAIAVG | ADAADFDTSSG | DLTKYNAGLS | |
| ZmPorin1_0 | INLVVPDQRS | GKLEFQYLHE | YAGVNASVGL | NSNPMVNLSS | AFGSKALSVG | VDFVSDTATS | DFTKYNAAALS | |
| ZmVDAC3_1 | LTLVVPDQRS | GKLELQYLHE | YTCVNASIGL | NSNPMVNLSS | AFGSKALSVG | VDFVSDTETS | NFTKYNAAALS | |
| ZmUP | FAFKVPDHKS | GKLDLQYAHN | RFSMNSTIGL | TSTPLVELAA | TVGTSELAIG | AEFGFDSTSA | AVTKYNSGVG | |
| ZmVDAC4 | FAFKVPDHKS | GKLDLQYAHN | RFSMNSTIGL | TSAPLVELAA | TVGTSELSIG | AEFGFDSTSA | AVTKYNSGIG | |
| ZmOMMPP | TSVKLPDYNY | GKVELQYFHE | NATFATVVG | KPSPVIDLSG | TVGAQGVAFG | AEAGYDTATG | KFTKYYTAAIG | |
| ZmMOMPP2 | TSVKLPDYNS | GKVELQYFHE | NATFATVVG | KPTPVIDLSS | TVGAQGVAFG | AEAGYDTATG | KFTKYYTAAIG | |
| ZmOMM | ITIPYPHPAF | GRLEIQYLHD | YAGVNASVGL | NRKPLVNLSS | VFGNKAAIAG | ADVVDGATG | DFTKYNAGLS | |
| ZmOPMPPOR1 | INLVVPDQRS | GKLEFQYLHE | YAGVNASVGL | NSNPMVNLSS | AFGSKALSVG | VDFVSDTATS | DFTKYNAAALS | |
| ZmVDAC6 | FAFKVPDHKS | GKLDLQYAHN | RFSMNSTIGL | TSTPLVELAA | TVGTSELAIG | AEFGFDSTSA | AVTKYNSGVG | |
| ZmPorin1_1 | INLVVPDQRS | GKLEFQYLHE | YAGVNASVGL | NSNPMVNLSS | AFGSKALSVG | VDFVSDTATS | DFTKYNAAALS | |
| ZmMOMPP4 | FAFKVPDHKS | GKLDLQYAHN | RFSMNSTIGL | TSTPLVELAA | TVGTSELAIG | AEFGFDSTSA | AVTKYNSGVG | |
| ZmOMMPorin1 | FAFKVPDHKS | GKLDLQYAHN | RFSMNSTIGL | TSTPLVELAA | TVGTSELAIG | AEFGFDSTSA | AVTKYNSGVG | |

351

| | | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|--|
| ZmVDAC1a | FTHEDLVASL | NLNNKGDSLT | GAYYHKVSEL | TNTAVGAELT | HSFSTNENTL | TFGGQHALDP | LTVLKARINN | |
| ZmVDAC1b | FTHEDLIASL | NMNNKGDNLT | GAYYHKVSEL | TNTAVGAELT | HSFSTNENTL | TFGGQHTLDP | LTVLKARINN | |
| ZmVDAC2_0 | YTPDFVAAA | TLNNKGDNIA | ASYHVSVP | -TTAVGGELS | HSFSTNGNTI | TFGTQHALDP | LTTVKARFNN | |
| ZmVDAC2_1 | YSTSDFVAAA | TLNNKGDKIT | ASYHVSVP | -TTAVGGELS | HSFSTNGNTI | TFGTQHALDR | LTTVKARFNN | |
| ZmVDAC3_0 | YSTSDFVAAA | TLNNKGDKIA | ASYHVSVP | -TTAVGGELS | HSFSTNGNTI | TFGTQHALDR | LTTVKARFNN | |
| ZmVDAC2_2 | YTPDFVAAA | TLNNKGDNIA | ASYHVSVP | -TTAVGGELS | HSFSTNGNTI | TFGTQHALDP | LTTVKARFNN | |
| ZmPorin1_0 | LTSPDLIASL | HLNNHGDTLV | ASYHVLVKNH | SGTAVGAELS | HSMSRNESTL | IFGSQHSALDP | HTTIKTRFNN | |
| ZmVDAC3_1 | LANPDLIASL | HLNNHGDTLV | ASYHVLVKNH | SGTAVGAELS | HSISRNESTL | IFGSQHSALDP | HTTIKTRFNN | |
| ZmUP | YNKSDFSASL | LLADKGETLK | ASYVHLFNPT | NGATVAAEVT | HKLKTENYF | TLGSSHALDP | STLLKTRFSN | |
| ZmVDAC4 | YNKSDFSASL | LLADKGETLK | ASYVHLFNPT | NGATVAAEVT | HKLKTENYF | TVGSSHALDP | STLLKTRFSN | |
| ZmOMMPP | VTKPDYHAAF | ILADKGDITK | VSGVYHLDEK | OKASAVAELT | RRLSTNQNTL | TVGGLYTVDS | QTAVKARLNN | |
| ZmMOMPP2 | VTKPDYHAAF | ILADKGDITK | VSGVYHLDEK | OKASAVAELT | RRLSTNQNTL | TVGGLYTVDP | QTAVKARLNN | |
| ZmOMM | FTNADLNAAV | TLNNKGDSLT | ASYHVLVDE | KNTAVGVEVA | RNFSTKANRV | TFGMRHALDP | TTTVKARYSS | |
| ZmOPMPPOR1 | LTSPDLIASL | HLNNHGDTLV | ASYHVLVKNH | SGTAVGAELS | HSMSRNESTL | IFGSQHSALDP | HTTIKTRFNN | |
| ZmVDAC6 | YNKSDFSASL | LLADKGETLK | ASYVHLFNPT | NGATVAAEVT | HKLKTENYF | TLGSSHALDP | STLLKTRFSN | |
| ZmPorin1_1 | LTSPDLIASL | HLNNHGDTLV | ASYHVLVKNH | SGTAVGAELS | HSMSRNESTL | IFGSQHSALDP | HTTIKTRFNN | |
| ZmMOMPP4 | YNKSDFSASL | LLADKGETLK | ASYVHLFNPT | NGATVAAEVT | HKLKTENYF | TLGSSHALDP | STLLKTRFSN | |
| ZmOMMPorin1 | YNKSDFSVSL | LLADKGETLK | ASYVHLFNPT | NGATVAAEVT | HKLKTENYF | TLGSSHALDP | STLLKTRFSN | |

421

| | | | | | | | |
|-------------|------------|------------|------|------------|------------|------|-----------|
| ZmVDAC1a | SGKASALIQH | EW---- | RPKS | LVTISAEVDT | KTIE-- | KSSK | VGIAVALKP |
| ZmVDAC1b | SGKASVLIQH | EW---- | RPKS | LVTISAEVDT | KTIE-- | KSSK | VGIAVALKP |
| ZmVDAC2_0 | YGMASALIQH | EW---- | RPKS | LVTISTEVDT | KAIE-- | KSSK | VGLSLVLKP |
| ZmVDAC2_1 | CGMASALIQH | KW---- | RPKS | LVTISMEVDT | KAIE-- | KSSK | IGLSLVLKP |
| ZmVDAC3_0 | CGMASALIQH | KW---- | RPKS | LVTISMEVDT | KAIE-- | KSSK | IGLSLVLKP |
| ZmVDAC2_2 | YGMASALIQH | EW---- | RPKS | LVTISTEVDT | KAIE-- | KSSK | VGLSLVLKP |
| ZmPorin1_0 | YGMASALVQH | EW---- | RPKS | FVTISGDVDT | KAIE-- | KSTK | VGLSLVLKH |
| ZmVDAC3_1 | YGMASALVQH | EW---- | RPKS | FITVSGEVDT | RAIE-- | KSTK | VGLSLVLKH |
| ZmUP | SGKVGLLCQH | EW---- | RPKS | LVTLSAEYDP | KVVS-- | APSR | IGVAISLKP |
| ZmVDAC4 | SGKVGLLCQH | EW---- | RPKS | LVTLSAEYDL | KVVS-- | APSR | IGMAISLKP |
| ZmOMMPP | NGTLAALLQH | EL---- | KPKS | LLTISGEFDT | KALD-- | RPPK | FGLALALKP |
| ZmMOMPP2 | TGTLAALLQH | EL---- | KPKS | LLTISGEFDT | KALD-- | RSPK | FGLALALKP |
| ZmOMM | NGMASALIQH | EW---- | RPKS | FCTLSTEVDV | NRFDFLQTPK | | FGLSLVLKP |
| ZmOPMPPPOR1 | YGMASALVQH | EW---- | RPKS | FVTISGDVDT | KAIE-- | KSTK | VGLSLVLKH |
| ZmVDAC6 | SGKVGLLCQH | EW---- | RPKS | LVTLSAEYDP | KVVS-- | APSR | IGVAISLKP |
| ZmPorin1_1 | YGMASALVQH | EW---- | RPKS | FVTISGDVDT | KAIE-- | KSTK | VGLSLVLKH |
| ZmMOMPP4 | SGKVGLLCQH | EW---- | RPKS | LVTLSAEYDP | KVVS-- | APSR | IGVAISLKP |
| ZmOMMPorin1 | SKKAASENDN | CASADSRGFT | | LIGSSNESKA | KT | | |

Anexo 2. Secuencias de aminoácidos de los 9 miembros de la familia ZmVDAC y que fueron incluidas en el árbol filogenético.

>ZmVDAC1a

MVGPGLYTEIGKKTRDLLYKDYQTDHKFTLTITYTSNGVAVTASSTKKADLILGEIQSQIK
 NKNMTIDVKANSESNIITTITVDEIATPGLKTILSFAPVDQRSQKVELQYLHDYAGVNAS
 IGLTANPVVNLAAFGTKAVALGADISLDTATGNLTKYNAALRFTHEDLVASLNLNNKGD
 SLTGAYYHKVSELNTAVGAELTHSFSTNENTLTFGGQHALDPLTVLKARINNSGKASAL
 IQHEWRPKSLVTISAEVDTKTIEKSSKVGIAVALKP

>ZmVDAC1b

MVGPGLYTEIGKKTRDLLYKDYQTDHKFTLTITYSSNGVAVTATSTKKADLIFSEIHSQIK
 NKNMTVDVKANSESNIITTVTVNEIATPGLKTILSFAPVDQRSQKVELQYLHDYAGVNAS
 VSLTANPVANLSAAGTKALAVGAEISFDSATGNFTKYNAGLMFTHEDLIASLNMNNKGD
 NLTGAYYHKVSELNTAVGAELTHSFSTNENTLTFGGQHTLDPLTVLKARINNSGKASVL
 IQHEWRPKSLVTISAEVDTKTIEKSSKVGIAVALKP

>ZmVDAC2

MAAAGPGLYSEIGKKARDLLYKDYHTDQKFTLTITYAANGAATAASTRKDEAIFNEIQSQ
 LKHNNVTVDVKATSESNVITTITVHELGTPLKAILCVPPFYQKSAKAEQYLHHHAGVA
 ASVGLNANPVVNLSGVFGTKAIVGADAAFDTSAGDLTKYNAGLSYTTPDFVAAATLNNK
 GDNIAASYHVSPTTAVGGELSHSFSTNGNTITFGTQHALDPLTTVKARFNNGMASAL
 IQHEWRPKSLVTISTEVDTKAIEKSSKVGLSLVLKP

>ZmVDAC3a

MAPGLYTDIGKKTRDLLYKDYNTHTQKFSLLTTCSPNGVAITAAGTRKNESIFGELHTQIKN
 KKLTVDVKANSESDLLTTITVDEFGTPGLKSIINLVVPDQRSQKLEFQYLHEYAGVNASV
 GLNSNPMVNLGAFGSKALSVGVDVSFDATSDFTKYNAALSLTSPDLIASLHLNNHGDT
 LVASYHLVKNHSGTAVGAELSHSMSRNESTLIFGSQHSPLDPTTIKTRFNNGMASALV
 QHEWRPKSFVTISGDVDTKAIEKSTKVGLSLVLKH

>ZmVDAC3b

MAPGLYTDIGKKTRDLLYKDYNTHTQKFSLLTTCSPHGAITAAGTRKNESTFGDLHTQIKN
 NKLTVDVKANSESDLLTTITVDEIGTPGLKSILTLVVPDQRSQKLELQYLHEYTGTVNASI
 GLNSNPMVNLGAFGSKALSVGVDVSFDTETSNTFTKYNAALSLANPDLIASLHLNNHGDT

LVASYYYHLVKHHSGTAVGAELSHSISRNESTLIFGSQHSLDPHTTVKARFNNYGMASALV
QHEWRPKSFITVSGEVDTRAIEKSTKVGLSLVLKH

>ZmVDAC4a

MSKGPVPFANIGKRAKDILLYKDYNFDQKFSLSLSTCSNSGLNLTATGVKINEDFIGDIRTQH
KSGRTTVDVIIDSDSKVSTTVTVDEALTGLKTSFAFKVDPDHKSGKLDLQYAHNRFSMNST
IGLTSTPLVELAATVGTSELAIGAEFGFDSTSAAVTKYNSGVGYNKSDFSASLLADKGE
TLKASYVHLFNPTNGATVAAEVTHKLKTKENYFTLGSSHALDPSTLLKTRFSNSGKVGLL
CQHEWRPKSLVTLAEYDPKVVSAPSRIGVAISLKP

>ZmVDAC4b

MSKGPVPFANIGKRAKDILLYKDYNFDQKFSLSLSTSSGSGLNLTATGVKINEDFIGDIRTQH
KSSRTTIDVTVDSDSKVSTTVTVDEALTGLKTSFAFKVDPDHKSGKLDLQYAHNRFSLNST
IGLTSAPLVELAATVGTSELSIGAEVGFSTSAAVTKYNSGIGYNKSDFSASLLADKGE
TLKASYVHLFNPTNGATVAAEVTHKLKTRENYFTVGSSEHALDPSTLLKMRFSNSGKVGLL
CQHEWRPKSLVTLAEYDLKVVSAPSRIGMAISLKP

>ZmVDAC5a

MKGPGLFSDIGKKAKDILLYSKDYTYDQKLITISTASASGLGLTSTAVKKGGLYSLDVSSVYK
YKNTTVDVKVDTESNISTTTLTVLDALPCTKLVTSVKLPDYNYGKVELQYFHENATFATVV
GTKPSPVIDLSGTVGAQGVAFGAEGYDTATGKFTKYTAAIGVTKPDYHAAFILADKGD
IKVSGVYHLDEKQKASAVAELTRRLSTNQNTLTVGGLYTVDSQTAVKARLNNGTLAALL
QHELKPKSLLTISGEFDTKALDRPPKFGLALALKP

>ZmVDAC5b

MKGPGLFSDIGKKAKDILLYSKDYTYDQKLSIFTASASGVGLTSTAVKKGGLYSLDVSSVYK
YKNTTVDVKLDTESNISTTTLTVLDALPSTKLVTSVKLPDYNSGKVELQYFHENATFATVV
GTKPTPVIDLSGTVGAQGVAFGAEGYDTATGKFTKYTAAIGVTKPDYHAAFILADKGD
IKVSGVYHLDEKQKASAVAELTRRLSTNQNTLTVGGLYTVDPQTAVKARLNNTGTLAALL
QHELKPKSLLTISGEFDTKALDRSPKFGLALALKP

Anexo 3. Amortiguadores y disoluciones para preparación y corrimiento de geles de agarosa

• **Bromuro de etidio (0.5 mg/mL)**

| | |
|------------------------------|--------|
| Bromuro de etidio (10 mg/mL) | 50 µL |
| Agua estéril | 950 µL |

• **Amortiguador TAE 50X**

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris base | 242.0 g |
| Ácido acético glacial | 57.1 mL |
| EDTA disódico (0.5 M) * | 100 mL |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 mL |

*Agregar 186.1 g de la sal disódica de EDTA en 800 mL de agua destilada, ajustar el pH a 8 con NaOH, aforar a 1 L, agitar vigorosamente y esterilizar en la autoclave.

- **Amortiguador de corrida TAE 1X**

| | |
|-----------------------|---------|
| Amortiguador TAE 50X | 20 mL |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 mL |

Para preparación de geles:

0.35 g de agarosa para geles al 1 % y 0.70 g para geles al 2%, en 35 mL de amortiguador TAE 1X, con pulsos de calentamiento en horno de microondas hasta disolver. Se agregan 35 μ L de bromuro de etidio cuando la temperatura de la disolución sea menor (aproximadamente 45-50 °C).

Anexo 4. Medios para crecimiento de bacterias

- **Medio SOC (Super Optimal broth + Catabolic repressor)**

| | |
|----------------------|--------|
| Triptona | 2 % |
| Extracto de levadura | 0.5 % |
| NaCl | 10 mM |
| KCl | 2.5 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| Glucosa | 20 mM |

- **Medio LB (Luria-Bertani)**

| | |
|----------------------|---------|
| Peptona 140 | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| Agua destilada | 1000 mL |

- **Cajas Petri LB/Amp/IPTG/X-gal**

| | |
|--|--------------|
| Agar bacteriológico BD Bioxon ® | 0.525 g |
| Medio LB | 0.70 g |
| Ampicilina (100 μ g/mL) | 35 μ L |
| IPTG (5 mM) | 17.5 μ L |
| X-gal disuelto en dimetilformamida (80 μ g/mL) | 56 μ L |

Anexo 5. Amortiguadores y disoluciones para elaboración de geles de poliacrilamida-SDS y tinción con azul de Coomasie

| Componente | Gel concentrador (4 %) | Gel separador (15 %) |
|---|-----------------------------------|---------------------------------|
| Acrilamida: Bisacrilamida (30:0.8) % | 0.4 mL | 2.5 mL |
| Tris-HCl 2 M pH=8.8. | - | 1 mL |
| Tris-HCl 0.5 M pH=6.8. | 0.36 mL | - |
| SDS 20 % | 15 µL | 25 µL |
| Agua destilada | 2.17 mL | 1.43 mL |
| TEMED | 6 µL | 5 µL |
| Persulfato de amonio 10 % | 48 µL | 40 µL |

• **Amortiguador de carga**

| | |
|-------------------------|---------|
| Tris-HCl 1M pH= 6.8 | 350 µL |
| SDS 20 % | 250 µL |
| Glicerol 50 % | 150 µL |
| Ditiotreitol 1 M | 160 µL |
| Azul de bromofenol 20 % | 20 µL |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 µL |

• **Amortiguador de corrida**

| | |
|-----------------------|---------|
| Tris base | 6.06 g |
| Glicina | 18.53 g |
| SDS | 10 g |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 mL |

• **Disolución teñidora de Azul de Coomasie**

| | |
|----------------------------|-------------|
| Coomassie Brilliant Blue G | 0.125 % p/v |
| Metanol | 50 % v/v |
| Ácido acético | 10 % v/v |

• **Disolución desteñidora**

| | |
|---------------|----------|
| Metanol | 45 % v/v |
| Ácido acético | 10 % v/v |

Anexo 6. Amortiguadores y disoluciones para el ensayo de Western Blot

- **Amortiguador de transferencia**

| | |
|----------------------------------|---------|
| Buffer de fosfatos pH= 6.8 (1 M) | 15 mL |
| Metanol | 200 mL |
| SDS 20 % | 2.5 mL |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 mL |

- **Amortiguador TBS (Tris Buffer Salino)**

| | |
|--------------------------|---------|
| Tris/ HCl pH=7.5 (20 mM) | 10 mL |
| NaCl (150 mM) | 37.5 mL |
| Agua destilada c.b.p. | 1000 mL |

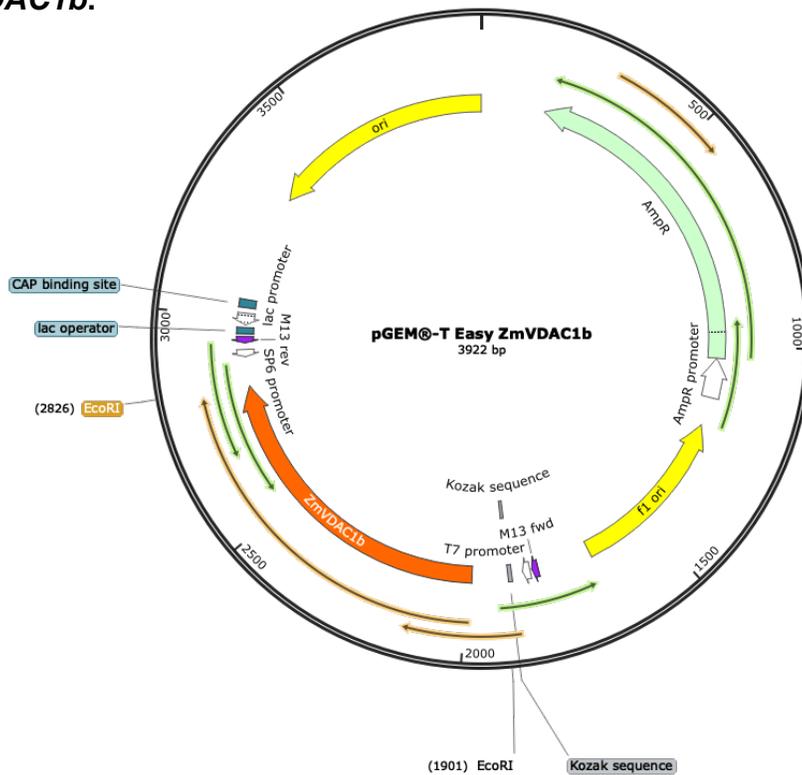
- **Amortiguador TTBS (Tris Buffer Salino + 0.1 % de Tween 20)**

| | |
|-------------------------|---------|
| Tween 20 | 1 mL |
| Amortiguador TBS c.b.p. | 1000 mL |

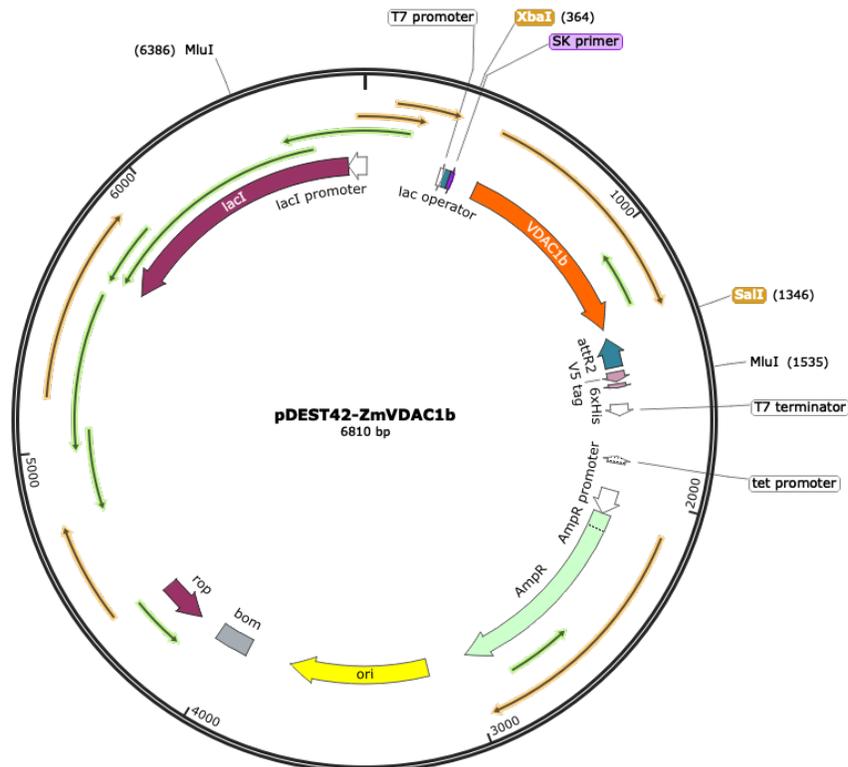
- **Disolución bloqueadora**

| | |
|---------------------------|--------|
| Leche Svelty deslactosada | 5 g |
| Amortiguador TTBS | 100 mL |

Anexo 7. Construcción *in silico* del vector pGEM-T Easy con el gen *ZmVDAC1b*.



Anexo 8. Construcción *in silico* del vector pDEST42 con el gen *ZmVDAC1b* mediante enzimas de restricción.



Anexo 9. Base de datos de las secuencias que se identificaron codifican para algún miembro de la familia VDAC de maíz y los filtros que se usaron para definir la familia VDAC.

| Secuencias en Uniprot | | |
|------------------------------|-------------------|--|
| Nº | ID Uniprot | Nombre Uniprot |
| 1 | Q9SPD9 | Voltage-dependent anion channel protein 1a |
| 2 | A0A1D6I2X6 | Voltage-dependent anion channel protein1b |
| 3 | Q9SPD7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 4 | K7VJ77 | Porin1 |
| 5 | B4FX24 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 6 | B6T1E3 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 7 | A0A1D6JS28 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 8 | C4IYM7 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 9 | A0A804LDA0 | Uncharacterized protein |
| 10 | A0A1D6JN64 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 11 | B6TAU9 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 12 | P42057 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 13 | A0A1D6FWS5 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 14 | A0A3L6EA00 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 15 | A0A3L6DRN5 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 16 | A0A1D6FYA4 | Porin1 |
| 17 | A0A1D6JN63 | Outer mitochondrial membrane porin1 |
| 18 | A0A317Y8M0 | Mitochondrial outer membrane protein porin 6 |
| 19 | Q9SPD8 | Voltage-dependent anion channel protein 1b |
| 20 | B6TAR9 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 21 | A0A1D6JS30 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 22 | A0A1D6PJM4 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 23 | B6SS48 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 24 | B6UCL4 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 25 | A0A1D6FYA6 | Porin1 |
| 26 | A0A1D6NKW9 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 27 | B6U9C1 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 28 | B4FH98 | Uncharacterized protein |
| 29 | B6SLD1 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 30 | B6SUS7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 31 | A0A1D6JS29 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 32 | A0A1D6I2X3 | Voltage-dependent anion channel protein1b |

| 33 | A0A1D6FYA3 | Porin1 |
|---|------------|--|
| 34 | A0A8J8YCF8 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 35 | A0A317Y6T5 | Mitochondrial outer membrane protein porin 5 |
| 36 | A0A3L6DZ69 | Mitochondrial outer membrane protein porin 1 |
| 37 | A0A3L6DT68 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 38 | A0A3L6DG89 | Mitochondrial outer membrane protein porin 5 |
| Secuencias encontradas en más de una base de datos | | |
| Nº | ID Uniprot | Nombre Uniprot |
| 1 | Q9SPD9 | Voltage-dependent anion channel protein 1a |
| 2 | A0A1D6I2X6 | Voltage-dependent anion channel protein1b |
| 3 | Q9SPD7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 4 | K7VJ77 | Porin1 |
| 5 | B4FX24 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 6 | B6T1E3 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 7 | A0A1D6JS28 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 8 | C4IYM7 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 9 | A0A804LDA0 | Uncharacterized protein |
| 10 | P42057 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 11 | B6TAU9 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 12 | A0A1D6JN64 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 13 | A0A1D6FWS5 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 14 | A0A3L6EA00 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 15 | A0A3L6DRN5 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 16 | A0A1D6FYA4 | Porin1 |
| 17 | A0A1D6JN63 | Outer mitochondrial membrane porin1 |
| 18 | A0A317Y8M0 | Mitochondrial outer membrane protein porin 6 |
| Secuencias con un valor de pLDDT \geq90 | | |
| Nº | ID Uniprot | Nombre Uniprot |
| 1 | Q9SPD9 | Voltage-dependent anion channel protein 1a |
| 2 | A0A1D6I2X6 | Voltage-dependent anion channel protein1b |
| 3 | Q9SPD7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 4 | K7VJ77 | Porin1 |
| 5 | B4FX24 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 6 | B6T1E3 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 7 | A0A1D6JS28 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 8 | C4IYM7 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 9 | A0A804LDA0 | Uncharacterized protein |
| 10 | P42057 | Outer plastidial membrane protein porin |
| 11 | B6TAU9 | Outer mitochondrial membrane protein porin |

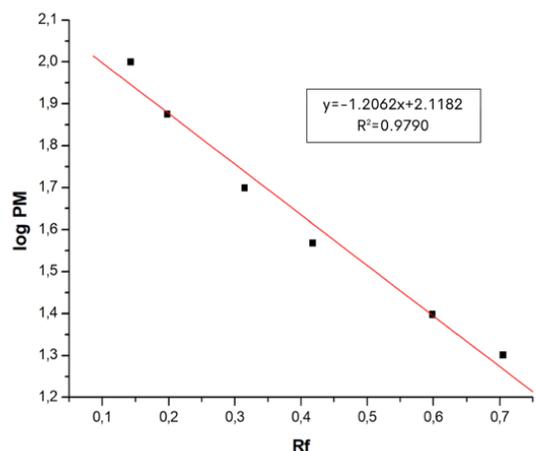
| | | |
|---|-------------------|--|
| 12 | A0A1D6JN64 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| Secuencias con regiones UTR, intrones/exones | | |
| Nº | ID Uniprot | Nombre Uniprot |
| 1 | Q9SPD9 | Voltage-dependent anion channel protein 1a |
| 2 | A0A1D6I2X6 | Voltage-dependent anion channel protein 1b |
| 3 | Q9SPD7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 4 | K7VJ77 | Porin1 |
| 5 | B4FX24 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 6 | A0A804LDA0 | Uncharacterized protein |
| 7 | B6T1E3 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 8 | A0A1D6JS28 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 9 | C4IYM7 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |
| 10 | P42057 | Outer plastidial membrane protein porin |
| Secuencias no repetidas | | |
| Nº | ID Uniprot | Nombre Uniprot |
| 1 | Q9SPD9 | Voltage-dependent anion channel protein 1a |
| 2 | A0A1D6I2X6 | Voltage-dependent anion channel protein 1b |
| 3 | Q9SPD7 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 4 | K7VJ77 | Porin1 |
| 5 | B4FX24 | Mitochondrial outer membrane protein porin 3 |
| 6 | A0A804LDA0 | Uncharacterized protein |
| 7 | B6T1E3 | Mitochondrial outer membrane protein porin 4 |
| 8 | A0A1D6JS28 | Outer mitochondrial membrane protein porin |
| 9 | C4IYM7 | Mitochondrial outer membrane protein porin 2 |

Anexo 10. Características y números de acceso de las secuencias de las proteínas incluidas en el análisis de los motivos de VDAC.

| Espece | Isoforma | ID Uniprot | Nucleótidos | Aminoácidos |
|-----------------------------|------------------|-------------------------------|-------------|-------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | <i>AtVDAC1</i> | Q9SRH5 (VDAC1_ARATH) | 831 | 276 |
| | <i>AtVDAC2</i> | Q9FJX3 (VDAC2_ARATH) | 831 | 276 |
| | <i>AtVDAC3</i> | Q9SMX3 (VDAC3_ARATH) | 825 | 274 |
| | <i>AtVDAC4</i> | Q9FKM2 (VDAC4_ARATH) | 825 | 274 |
| <i>Oryza sativa</i> | <i>OsVDAC1</i> | Q6K548 (VDAC1_ORYSJ) | 825 | 274 |
| | <i>OsVDAC2</i> | Q6L515 (VDAC2_ORYSJ) | 843 | 280 |
| | <i>OsVDAC3</i> | Q7F4F8 (VDAC3_ORYSJ) | 828 | 275 |
| | <i>OsVDAC4</i> | Q0JJV1 (VDAC4_ORYSJ) | 954 | 317 |
| | <i>OsVDAC5</i> | Q84P97 (VDAC5_ORYSJ) | 834 | 277 |
| | <i>OsVDAC6</i> | Q10S27 (VDAC6_ORYSJ) | 831 | 276 |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | <i>NtVDAC1</i> | A9CM20 (A9CM20_TOBAC) | 831 | 276 |
| | <i>NtVDAC2</i> | A9CM21 (A9CM21_TOBAC) | 831 | 276 |
| | <i>NtVDAC3</i> | A9CM22 (A9CM22_TOBAC) | 831 | 276 |
| <i>Triticum aestivum</i> | <i>TaVDAC1</i> | P46274 (VDAC1_WHEAT) | 828 | 275 |
| | <i>TaVDAC2</i> | A0A3B5Z3Y7 (A0A3B5Z3Y7_WHEAT) | 867 | 288 |
| | <i>TaVDAC3</i> | Q41591 (Q41591_WHEAT) | 828 | 275 |
| | <i>TaVDAC4</i> | W5DXN4 (W5DXN4_WHEAT) | 834 | 277 |
| | <i>TaVDAC5</i> | A0A3B6JP43 (A0A3B6JP43_WHEAT) | 825 | 274 |
| <i>Pisum sativum</i> | <i>PsPDR1</i> | P42054 (VDAC_PEA) | 831 | 276 |
| <i>Solanum tuberosum</i> | <i>StVDAC1</i> | 42055 (VDAC1_SOLTU) | 831 | 276 |
| | <i>StVDAC2</i> | P42056 (VDAC2_SOLTU) | 831 | 276 |
| <i>Vitis vinifera</i> | <i>VvVDAC1</i> | A0A438HDA2 (A0A438HDA2_VITVI) | 831 | 276 |
| | <i>VvVDAC3</i> | A5AQ65 (A5AQ65_VITVI) | 831 | 276 |
| | <i>VvVDAC4</i> | D7SQ96 (D7SQ96_VITVI) | 834 | 277 |
| | <i>VvVDAC5</i> | A5BE54 (A5BE54_VITVI) | 831 | 276 |
| <i>Lotus japonicus</i> | <i>LjVDAC1.2</i> | Q6W2J4 (Q6W2J4_LOTJA) | 831 | 276 |
| | <i>LjVDAC1.3</i> | 6W2J3 (Q6W2J3_LOTJA) | 831 | 276 |
| | <i>LjVDAC2.1</i> | Q6W2J2 (Q6W2J2_LOTJA) | 831 | 276 |
| | <i>LjVDAC3.1</i> | Q6W2J1 (Q6W2J1_LOTJA) | 834 | 277 |
| <i>Pennisetum glaucum</i> | <i>PgVDAC1</i> | Q7Y1C6 (Q7Y1C6_CENAM) | 834 | 277 |

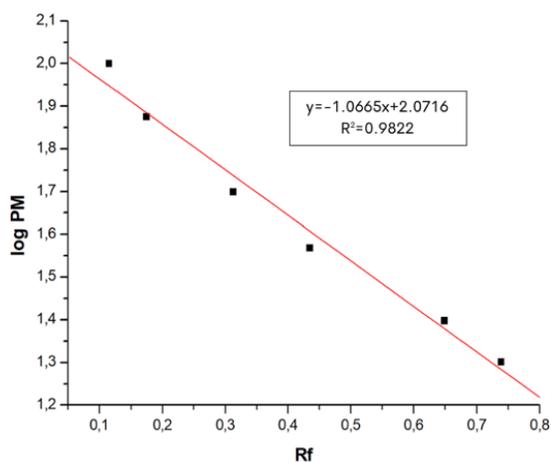
*En amarillo, aquellas secuencias con mejor anotación en la base de datos Uniprot

Anexo 11. Gráficas de Rf vs log PM de los gels teñidos con azul de Coomasie.



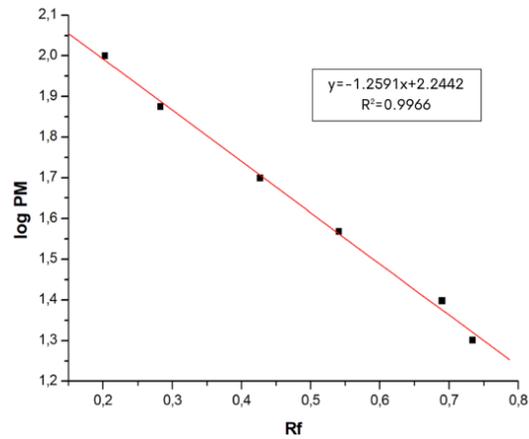
| Tiempo (h) | Rf | PM (kDa) |
|------------|-------|----------|
| 2 | 0.533 | 29.874 |
| 3 | 0.550 | 28.496 |
| 4 | 0.550 | 28.496 |
| 5 | 0.556 | 28.025 |
| 6 | 0.559 | 27.793 |

A. Rf vs log (peso molecular) PM del gel de poliacrilamida-SDS de 6 horas de inducción de la cepa *E. coli* BL21-RIL con el vector pDEST42- ZmVDAC1b obtenido mediante la Tecnología Gateway.



| Tiempo (h) | Rf | PM (kDa) |
|------------|-------|----------|
| 2 | 0.588 | 27.829 |
| 3 | 0.558 | 29.957 |
| 4 | 0.594 | 27.422 |

B. Rf vs log (peso molecular) PM del gel de poliacrilamida-SDS de 4 horas de inducción de la cepa *E. coli* BL21-RIL con el vector pDEST42- ZmVDAC1b obtenido mediante enzimas de restricción.



| Tiempo (h) | Rf | PM (kDa) |
|------------|-------|----------|
| 2 | 0.650 | 26.655 |
| 3 | 0.650 | 26.655 |
| 4 | 0.652 | 26.501 |
| 5 | 0.660 | 25.894 |
| 6 | 0.670 | 25.154 |
| 7 | 0.658 | 26.044 |

C. Rf vs log (peso molecular) PM del gel de poliacrilamida-SDS de 8 horas de inducción de la cepa *E. coli* BL21-RIL con el vector pDEST42- ZmVDAC1b obtenido mediante enzimas de restricción.