



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE BGAF1 Y SU INTERACCIÓN
CON LA HXK4 DE ZEA MAYS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO.

P R E S E N T A:

ANDRÉS BURGOS PALACIOS.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Sobeida Sánchez Nieto.**

VOCAL: **Profesor: Samuel Canizales Quinteros.**

SECRETARIO: **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova.**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Francisca Morayna Gutiérrez Luna**

2º SUPLENTE: **Profesor: Manuel Gutierrez Aguilar.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 102, DEPTO. DE BIOQUÍMICA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Beatriz King Díaz.

SUSTENTANTE:

Andrés Burgos Palacios.

Agradecimientos.

El trabajo de tesis “***Producción y purificación de BGAF1 y su interacción con la HXK4 de Zea mays***”, realizado por **Andrés Burgos Palacios** fue desarrollado por la dirección de la **Dra. Sobeida Sánchez Nieto** y con la dirección técnica de la **M. en C. Beatriz King Díaz** en el lab 102 del departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El trabajo de tesis recibió financiamiento:

Facultad de Química de la UNAM, PAIP 5000-9125

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

También recibió apoyo a través del Programa 127 “Formación Básica en la Investigación” de la Facultad de Química.

A los miembros del Honorable Jurado, Dra. Sobeida Sánchez Nieto, Dr. Samuel Canizales Quinteros y Dra Tzvetanka Dimitrova Dinkova, por sus oportunos comentarios y sus valiosas sugerencias al presente trabajo.

Índice	
Resumen	7
Abreviaturas	8
Introducción	9
<i>β-Glucosidasa</i>	9
<i>Factor agregante de la β-glucosidasa (BGAF)</i>	11
<i>Hexocinasas</i>	15
Hipótesis	27
Objetivos	27
Estrategia experimental.	28
<i>Materiales y métodos</i>	29
<i>Análisis in silico de la secuencia BGAF</i>	29
<i>Clonación BGAF1</i>	29
<i>Inmunoréplica tipo Western.</i>	37
<i>Ensayo de interacción proteína-proteína.</i>	38
Resultados	40
<i>Clonación del gen BGAF y confirmación de su secuencia.</i>	40
<i>Subclonación del gen BGAF1</i>	45
<i>Obtención de BGAF recombinante</i>	46
Discusión.	58
Conclusiones.	63
Perspectivas.	63
Referencias	64
Anexos	69
<i>Anexo 1. Contenido y preparación de las soluciones.</i>	69
<i>Anexo 2. Protocolo de obtención de células competentes</i>	73
<i>Anexo 3. Secuencia del gen que codifica para Factor Agregante 1 de la Beta Glucosidasa (BGAF1) de Zea Mays.</i>	73
<i>Anexo 4. Membrana de PVDF teñida con Amido-black.</i>	74

Índice de figuras

Figura 1. Reacción catalizada por la β -glucosidasa utilizando como sustrato DIMBOA-Glucosa.	10
Figura 2. Dominios característicos de BGAF.	12
Figura 3. Modelo de la interacción entre la BGAF y β -Glucosidasa.....	13
Figura 4. Localización y función de la HXK de plantas en la canalización del ATP en el sitio activo de la enzima.....	17
Figura 5. Interacción de la HXK con VHA-B1 y RTP5B mediante ensayo de doble híbrido.....	20
Figura 6. Diagrama de flujo del ensayo de inmunoprecipitación que demuestra la interacción de HXK con VHA-B1 y RTP5B.....	22
Figura 7. Esquema del desarrollo experimental usado en este trabajo.....	28
Figura 8. Alineamiento de secuencias de BGAF1, entre la reportada y la clonada.....	41
Figura 9. Comparación de las secuencias de aminoácidos de BGAF1 y la secuencia traducida de la clona obtenida en este trabajo.....	42
Figura 10. Comparación de las predicciones de las estructuras tridimensionales de ZmBGAF1, entre la reportada y la clonada.....	45
Figura 11. Patrón de digestión con enzimas de restricción al vector pDONR221-BGAF1.	45
Figura 12 Patrón de digestión con enzimas de restricción al vector pDEST42-BGAF1.	46
Figura 13. Curva temporal de inducción de BGAF1 recombinante.....	47
Figura 14. Producción de proteína recombinante a 37°C.....	48
Figura 15. Perfil de las proteínas obtenidas del protocolo de purificación de la fracción soluble que contiene a la BGAF en una columna de Ni ²⁺	50
Figura 16. Interacción de la BGAF con la resina de Ni ²⁺	51
Figura 17. Inducción de proteína recombinante a 25°C durante toda la noche.	52
Figura 18. Purificación de BGAF1 producida a 25°C.....	53
Figura 19. Perfil de purificación de la proteína recombinante HX4 Δ 30-HA	55

Figura 20. Ensayo de interacción inmunoréplica tipo Far-Western entre BGAF1 y HXK4Δ30.....	57
Figura 21. Revelado de las proteínas en la membrana de PVDF usada para Far Western teñida con Amido-Black.	74

Índice de tablas

Tabla 1. Ubicación de las HXK en plantas y su posible función en la célula. 16	
Tabla 2. Proteínas con interacción potencial con las HXKs y afectar fisiológicamente la respuesta de la planta ante diferentes condiciones nutrimentales y ambientales.	24
Tabla 3. Lista parcial de proteínas de la fracción microsomal de coleótilos de maíz que eluyen junto con la hexocinasa.....	26
Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la subclonación BGAF1 en el vector pDNOR221.....	32
Tabla 5. Curva estándar para cuantificación de proteínas por Bradford.....	36

Resumen

Las Hexocinasas (HXKs) de plantas son proteínas multifunción, tienen capacidad de fosforilar hexosas, sensores de la abundancia de glucosa, capaces de formar complejos represores de genes fotosintéticos y algunas con capacidad de fosforilar proteínas. Buscando nuevas proteínas que pudiesen interactuar con HXKs de maíz, se realizaron ensayos de “pull-down” usando como carnada a la HXK4 de maíz soluble (ZmHXK4 Δ 30) unida a una resina y al hacer pasar la fracción mitocondrial, se logró eluir con imidazol, tanto a la HXK como a otras proteínas, entre ellas el Factor Agregante de la Beta Glucosidasa 1 (BGAF1). BGAF es una proteína que interviene en la regulación de la actividad de las β -Glucosidasas (BGLU), algunas de éstas se relacionan con la formación de cuerpos de estrés en el retículo endoplásmico. La interacción con la HXK podría implicarla en el mecanismo de formación de cuerpos de estrés sugiriendo un mecanismo novedoso para ésta proteína en la regulación de la expresión de genes. Por lo que se decidió evaluar la interacción *in vitro* entre la ZmHXK4 y ZmBGAF1 mediante un ensayo de Far Western. Para lograr el objetivo se clonó y se produjo a ZmBGAF1 recombinante fusionada en la región C-Terminal con los epítopes V5 y cola de HIS. Se desarrolló un protocolo de inducción y purificación de ésta. Al parecer la proteína no expone la etiqueta de Histidinas cuando está en la fracción soluble por lo que su purificación es muy pobre, aún cuando sea posteriormente disuelta en urea. Pero sí se logró establecer el protocolo de inducción, producción y purificación de ZmHXK4 Δ 30 con el epítipo HA y cola de HIS obteniendo un rendimiento de 1.4 a 1.6 mg de HXK por cada 1000 mL de cultivo. Se realizó el ensayo de interacción entre una fracción soluble que contenía a la BGAF1-V5-His recombinante y la ZmHXK4 Δ 30-HA-His purificada. Mediante el ensayo de inmunoréplica tipo Far Western se encontró interacción entre ambas proteínas. Una banda de peso molecular aproximado de 75 kDa fue reconocida tanto por el anticuerpo anti-V5 como con el anti-HA, lo que sugiere que ZmHXK4 Δ 30 se une a una forma dimérica de ZmBGAF1.

Abreviaturas

ABA:	Ácido abscísico
BGAF:	Factor Agregante de la Beta-Glucosidasa
BGLU:	Beta-Glucosidasa
DO:	Densidad óptica
GFP:	Proteína verde fluorescente
GLL:	Proteínas tipo lipasas GDSL
Glu-6P:	Glucosa 6 fosfato
Glu:	Glucosa
HA:	Hemaglutinina
HXK:	Hexocinasa
HXL:	Hexocinasa-Like
JAp:	Proteínas inducidas por ácido jasmónico
JRL:	Lectinas Relacionadas con Jacalinas
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
RE:	Retículo Endoplasmático
RPT5B:	Partícula reguladora 19S de la subunidad del proteasoma
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
VDAC:	Canal Aniónico Dependiente de Voltaje
VHA-B1:	Subunidad B1 de la ATPasa Vacuolar

Introducción

Las Hexocinasas (HXKs) son proteínas multifuncionales (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017), en plantas se ha detectado que tienen capacidad de fosforilar hexosas (Claeyssen y Rivoal 2007), ser sensoras de la abundancia de glucosa (Moore *et al.*, 2003), capaz de formar complejos represores de genes fotosintéticos (Cho *et al.*, 2006), y también se ha observado su capacidad de fosforilar proteínas (Hu *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2018). Por lo que buscando nuevas proteínas que pudiesen interactuar con las HXKs de maíz, se realizaron ensayos de “pull-down” usando a la hexocinasa recombinante como carnada y mitocondrias de coleoptilos de 72 h de germinación, infectados con y sin *Fusarium*, observando la presencia de proteínas de estrés, entre ellas la β -Glucosidasa (BGLU) y la Factor Agregante de la β glucosidasa (BGAF1) cuando el maíz estaba contaminado (comunicación personal King-Díaz Beatríz). Interacción que podría ser importante en términos de la participación de la HXK en la regulación de la fisiología de la planta ante situaciones de estrés por patógenos. A continuación se describen a BGLU, BGAF1 y HXK.

β -Glucosidasa

La β -Glucosidasa o BGLU (EC 3.2.1.21) es una enzima que se encuentra en *arqueas*, *eubacterias* y *eukarya*; cataliza la hidrólisis de aril y aquil- β -D-glucósidos y β -oligosacáridos (Reese, 1997). En plantas la principal función de la BGLU es la defensa de las partes jóvenes de la planta contra los patógenos y herbívoros mediante la liberación de agliconas tóxicas a partir de sus glucósidos, como por ejemplo los ácidos hidroxámicos, entre ellos el 2-O- β D-glucopiranosil-4-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazina-3-ona, también llamada DIMBOA-Glc (Figura 1), implicado en la defensa contra áfidos (Miemeyer, 1988). Aunque hay una variedad de moléculas glicosiladas que son blanco de las β -glucosidasas como, por ejemplo, el indoxil-beta-glucósido y la zeatina-9-glucósido que son las formas poco activas de la auxina y la citocinina, ambas fitohormonas. En las hojas de té las BGLU participan en la hidrólisis de compuestos que producen aromas (Zhou *et al.*, 2017).

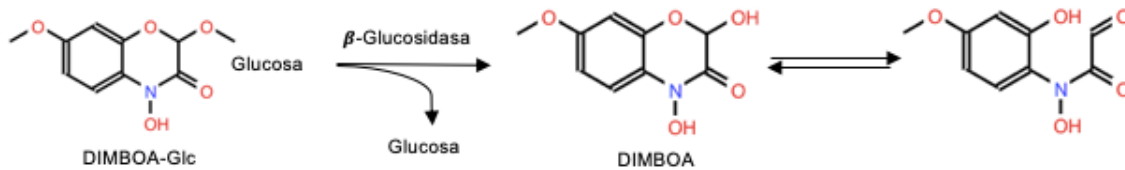


Figura 1. Reacción catalizada por la β -glucosidasa utilizando como sustrato DIMBOA-Glucosa.

La BGLU a menudo se compartimenta a nivel subcelular ya sea en el plastidio, citosol, mitocondria, vacuola o apoplasto (Gomez-Anduro *et al.*, 2011). A nivel tisular se puede encontrar principalmente en las partes vegetativas jóvenes (Kristoffersen *et al.*, 2000), las cuales son más susceptibles al ataque por patógenos, por lo que la presencia de agliconas glucosiladas y de la BGLU permite que éstas partes se encuentren protegidas (Pankoke *et al.*, 2013). Sin embargo, hay que mencionar que la localización subcelular de la enzima y la de sus sustratos es distinta, lo cual evita la producción de moléculas tóxicas cuando no se necesitan (Kristoffersen *et al.*, 2000).

La familia de las β -glucosidasas en plantas está compuesta de al menos 20 miembros. Por ejemplo, *Arabidopsis* contiene 47 genes, el genoma del arroz tiene 34, mientras que en maíz solo se han encontrado 26 (Gomez-Anduro *et al.*, 2011). A pesar de tener una función catalítica similar, la hidrólisis de los enlaces β -glicosídicos, las BGLU pueden diferir en su especificidad por sustratos o propiedades de unión y como ya se ha mencionado, en su localización subcelular. En contraste con la col, la coliflor o el brócoli, las plantas de maíz no emplean conjugados de inolato-glucosa para la defensa de patógenos, lo que podría explicar porqué en arroz y maíz hay menos copias del gen *bglu*, a pesar de tener un genoma mucho más grande (Gomez-Anduro *et al.*, 2011).

Adicionalmente, se conoce que algunas BGLU tienen el motivo YHMYKTDV, el cual permite la unión de la enzima con la proteína factor agregante de la BGLU o BGAF (Yu *et al.*, 2009). Los aminoácidos lisina y treonina son clave dentro de esta

secuencia para la unión a BGAF. En maíz, solo se conservan en BGLU1 (β -glucosidasa isoforma 1) y BGLU2, las otras BGLU, aunque presentan a la lisina, el motivo es distinto, YHRYKEDV. Por lo tanto, se sugiere que BGLU1 y BGLU2 pueden tener la capacidad de unirse a BGAF (Gomez-Anduro *et al.*, 2011). El complejo BGLU y BGAF parece ser importante para la respuesta ante el estrés por patógenos (Nagano *et al.*, 2005).

Factor agregante de la β -glucosidasa (BGAF)

La Factor Agregante de la Beta-Glucosidasa 1 de *Zea Mays* (ZmBGAF1) es una proteína que pertenece a la familia de las lectinas, proteínas que contienen un dominio no catalítico, pero que les permite selectivamente reconocer y unirse de manera reversible a glucanos específicos, que pueden encontrarse en forma libre o como parte de glicoproteínas y lípidos (Lannoo y Van Damme, 2014). En maíz, se unen de manera altamente específica a galactosa y manosa, teniendo una mayor preferencia por la primera, lo que hace que se clasifique en la familia de las jacalinas (Kittur *et al.*, 2007; Tachibana *et al.*, 2006).

La mayoría de las lectinas se expresan de manera constitutiva en semillas y tejidos vegetativos. Aunque algunas se expresan de manera específica ante el estrés ambiental o por patógenos. Además, las lectinas conocidas de plantas suelen estar constituidas de 1 o más dominios de lectina acoplados a un dominio no relacionado como de aerolisina, quitinasa, F-box, Kelch cinasa, LRR, TIR o dirigente (Lannoo y Van Damme, 2014).

ZmBGAF1 es una proteína modular estructuralmente caracterizada por contener dos dominios (Figura 2), el dominio de respuesta a patógenos o dirigente situado en el N-terminal (residuos 32-149) y el dominio de lectina relacionado con jacalina (JRL) localizado en el extremo C-terminal (residuos 174-304) (Blanchard *et al.*, 2000).

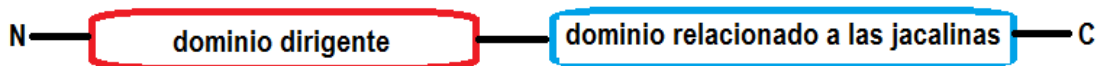


Figura 2. Dominios característicos de BGAF.

Las propiedades de lectina de BGAF se han determinado mediante su actividad hemaglutinante de eritrocitos de conejo. Por ejemplo, la concentración mínima requerida de ZmBGAF recombinante para hemaglutinar a los eritrocitos de conejo tratados con tripsina es de 0.08 $\mu\text{g} / \text{mL}$, valor similar a BGAF nativa que fue 0.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (Kittur *et al.*, 2007).

ZmBGAF1 además de pertenecer a la familia de lectinas, también pertenece a la familia de proteínas inducidas por ácido jasmónico¹ o JAp (Blanchard *et al.*, 2000). Al bloquear la respuesta JAp se observan plantas más susceptibles a patógenos (McConn *et al.*, 1997). Recientemente, en arroz, se demostró que la sobreexpresión de una proteína quimérica que contenía el dominio dirigente asociado al dominio JRL, contribuye a la resistencia de un amplio espectro de patógenos como *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solanii* y *Xanthomonas oryzae*. La sobreexpresión de OsJAC1 y de sus ortólogos en trigo y avena, llevó también a la resistencia a la enfermedad del tizón en avena (revisado en Esch y Schaffrath, 2017). En sorgo, se observó que BGAF es capaz de inhibir el crecimiento de *E. coli* (Kunal, 2017).

Además de la asociación de BGAF1 con azúcares se ha demostrado que BGAF1 es capaz de unirse a la BGLU (Blanchard *et al.*, 2000) y que el dominio JLR parece estar relacionado con ambas actividades (Qing-Hu *et al.*, 2013). Se ha postulado que las repeticiones G(P/R)WGGSSG de la estructura primaria de la BGAF están implicadas en el reconocimiento y unión con la BGLU (Blanchard *et al.*, 2001), lo que lleva a la formación de agregados insolubles de alto peso molecular (Figura 3).

¹ El ácido jasmónico participa en la respuesta inmune de la planta en la vía de defensa sistémica inducida (Wees *et al.*, 2000).

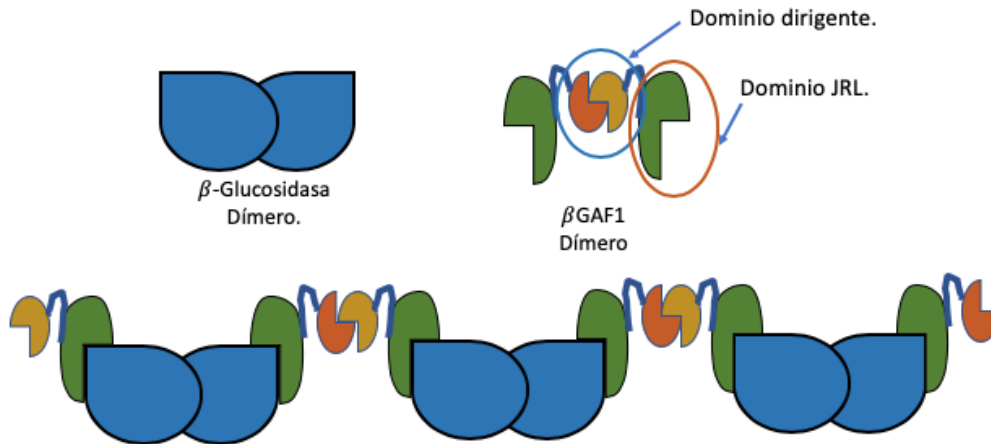


Figura 3. Modelo de la interacción entre la BGAF y β-Glucosidasa.

La especificidad de la interacción entre la BGAF1 y BGLU de maíz es muy alta ya que BGAF1 no se une a las BGLU de hongos del género *Trichoderma* y *Aspergillus* y tampoco de plantas como almendra, cereza negra, sorgo, arroz y avena (Blanchard *et al.*, 2000). Sin embargo, los ensayos de EMSA (electrophoretic mobility shift assay²) y los de unión competitiva *in vitro* indican que el dominio JRL solo se une a BGLU sin causar que se agregue. La agregación de las proteínas ocurre cuando BGAF forma un homodímero al interactuar entre los dominios dirigentes (Figura 3; Kittur *et al.*, 2007). Debido a que cada molécula de BGAF tiene un sitio de unión a BGLU en el dominio JRL, un dímero de BGAF se uniría a dos dímeros de BGLU, formando una cadena lineal en la que el dímero de BGAF y el dímero de BGLU se alternan entre sí como se muestra en la Figura 3 (Kittur *et al.*, 2007).

La interacción entre BGLU y BGAF1 es estabilizada mediante interacciones no covalentes e hidrofóbicas. Se ha observado que BGAF1 interactúa específicamente *in vivo* o durante su extracción con dímeros de BGLU nativos, lo que hace que se

² EMSA. El ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés) se basa en determinar las diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas de forma libre y cuando éstas forman un complejo de unión proteína-proteína (Fillebeen *et al.*, 2014).

agreguen en formas multiméricas de 1.5×10^6 D o más de tamaño (Blanchard et al., 2000).

Parece que la unión de BGAF1 a la BGLU no tiene un efecto detectable sobre la actividad enzimática de la BGLU y sus parámetros cinéticos, lo que sugiere que la unión de BGAF1 no bloquea estéricamente el sitio activo o no cambia la conformación para afectar la actividad enzimática. Lo anterior se corroboró al encontrar que el sitio de unión de BGAF1 sobre la BGLU, formado por los dominios entre la Glu 50-Asn 127 y Phe 466-Ala 512, está lejos del sitio activo de la BGLU (Blanchard et al., 2000).

Una función plausible de la interacción BGAF-BGLU, es la protección de BGLU de las proteasas endógenas o provenientes de secreciones de patógenos invasores a través de que BGAF la agrega. Durante la interacción BGAF protege pero no modifica la actividad de BGLU y la mantiene en el sitio de la herida, evitando su difusión a otras partes de la planta en donde se ha demostrado que provoca efectos nocivos (Hopke *et al.*, 1994).

Las heridas provocadas por insectos cuando se alimentan de la planta, inducen la formación del complejo BGAF-BGLU, el cual entraría en contacto con las glucoproteínas ya sea en la cavidad oral del insecto o bien en la matriz peritrófica³. En el primer caso, evitaría que el insecto se siga alimentando, debido a un estallido local del producto de la β -glucosidasa, por ejemplo, la hidrólisis de DIMBOA-Glc en la cavidad oral. En el segundo caso, el complejo BGAF-BGLU podría dañar la matriz peritrófica, formando huecos, al unirse a la matriz de glicoproteínas, ya que BGAF es capaz de unirse a estas proteínas (Hopkins *et al.*, 2001).

Por otra parte, se ha observado que la BGLU, PYK10/BGLU23, interactúa con complejos proteicos para la formación de cuerpos de estrés en el retículo endoplásmico (RE) (Nakano *et al.*, 2012). Las moléculas activas de PYK10 forman

³ Matriz peritrófica. Es una malla de quitina embebida en una matriz de proteína y carbohidratos, cuya principal función es la protección de las células del intestino medio en insectos (Terra, 1990).

grandes complejos al unirse a otras β -glucosidasas como BGLU21 y BGLU22, además de unirse a cinco lectinas relacionadas con jacalina (JRL) y una proteína de tipo GDSL lipasa (GLL). Los niveles de expresión de JRL y GLL son menores en mutantes que no tienen cuerpos de estrés en RE. La localización subcelular de PYK10 es diferente a la de JRL y GLL, por lo que se sugiere que su interacción ocurre cuando la estructura subcelular es destruida por patógenos. Existen lectinas tipo polimerizador y lectinas de tipo inhibidor que regulan el tamaño del complejo PYK10 de forma antagónica (Nagano *et al.*, 2008). Por lo que el papel de las proteínas que interaccionan con BGLU podrían ser importantes ante el estrés por patógenos.

Hexocinasas

Las HXKs en plantas como se mencionó anteriormente, son proteínas multifuncionales, ya que además de estar involucradas en la fosforilación de hexosas, que es su función más conocida, también participan en la fosforilación de proteínas (Hu *et al.*, 2016) y en la percepción de la abundancia de glucosa (Glu) y su transducción para modificar la expresión de genes (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2019; Kim *et al.*, 2013; Kristoffersen *et al.*, 2000). A continuación, se describen brevemente estas funciones.

Función catalítica

En las plantas, la HXK fosforila diferentes hexosas como la D-Glu, la D-fructosa, la D-manosa y la D-galactosa, utilizando como donador de fosfato preferentemente al ATP, aunque puede usar también GTP y UTP (Claeyssen y Rivoal 2007). Las hexosas-fosfato son un metabolito clave en varias vías metabólicas como la glucólisis, la vía oxidativa de las pentosas fosfato, la síntesis de almidón, síntesis de ácidos grasos, la formación de nucleótidos y los esqueletos para la síntesis de la pared celular (Kim, *et al.*, 2013)

La familia de HXKs por ejemplo, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, está compuesta de 6 genes, tres de ellos codifican para HXKs con capacidad catalítica,

mientras que los otros tres genes codifican para proteínas estructuralmente similares a las HXKs pero carecen de actividad catalítica, por lo que se les ha designado como proteínas hexocinasa-like o HXL (Karve *et al.*, 2008). En *Triticum aestivum* hay 26 genes putativos que codifican para HXKs, con al menos 6 genes con alta homología a HKL, mientras que en *Z. mays* la familia se compone de 9 genes, 6 codifican para proteínas con capacidad catalítica comprobada y 3 genes que probablemente codifican para proteínas que carecen de actividad catalítica (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Adicionalmente, las HXKs no solo son diferentes en cuanto a su actividad catalítica sino también en su localización subcelular, misma que juega un papel importante para su función. La localización de la HXK en alguno de los compartimentos subcelulares depende de la carencia o presencia de una secuencia localizada en su amino-terminal (Tabla 1).

Tabla 1. Ubicación de las HXK en plantas y su posible función en la célula.

Tipo HXK	Señal/Ubicación	Función	Referencia
A	Secuencia hidrofóbica 30 aminoácidos en el N-terminal, señal cloroplástica. Esencialmente se encuentra en dicotiledóneas.	Metabólica	(Karve et al., 2010)
B	Secuencia hidrofóbica de 24 aminoácidos, en el N-terminal, señal de anclaje a la mitocondria. En algunas HXKs también se ha encontrado adyacente a la señal mitocondrial también una secuencia señal de localización nuclear.	Sensora y metabólica	(Cho et al., 2009)
C	No tiene secuencia señal y son HXKs citosólicas.	Metabólica	(Nilsson et al., 2011)
D	Secuencia hidrofóbica de señal de anclaje a la mitocondria en el N-Terminal.	Sensora y metabólica	(Nilsson et al., 2011)

Las **HXKs de tipo A** contienen una secuencia hidrofóbica de 30 aminoácidos en el extremo amino que codifica para una señal de localización de cloroplasto. Debido a

que los métodos predictivos no identificaron a la HXK A en maíz, sorgo y trigo se ha propuesto que esta enzima no se encuentra en monocotiledóneas, sin embargo, se encontró algunas predicciones filogenéticas la colocan en el cloroplasto de arroz (Karve *et al.*, 2010; Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Las **HXKs tipo B** presentan una secuencia que se predice es una hélice altamente hidrofóbica, formada por 24 aminoácidos y que tiene como función insertar a la proteína en la membrana mitocondrial (Figura 4 y Tabla 1). Algunas de estas proteínas también se han encontrado en el núcleo y se ha planteado que tiene que ver con otra de las funciones de la enzima que es la de ser sensora de la abundancia de Glu (Cho *et al.*, 2009).

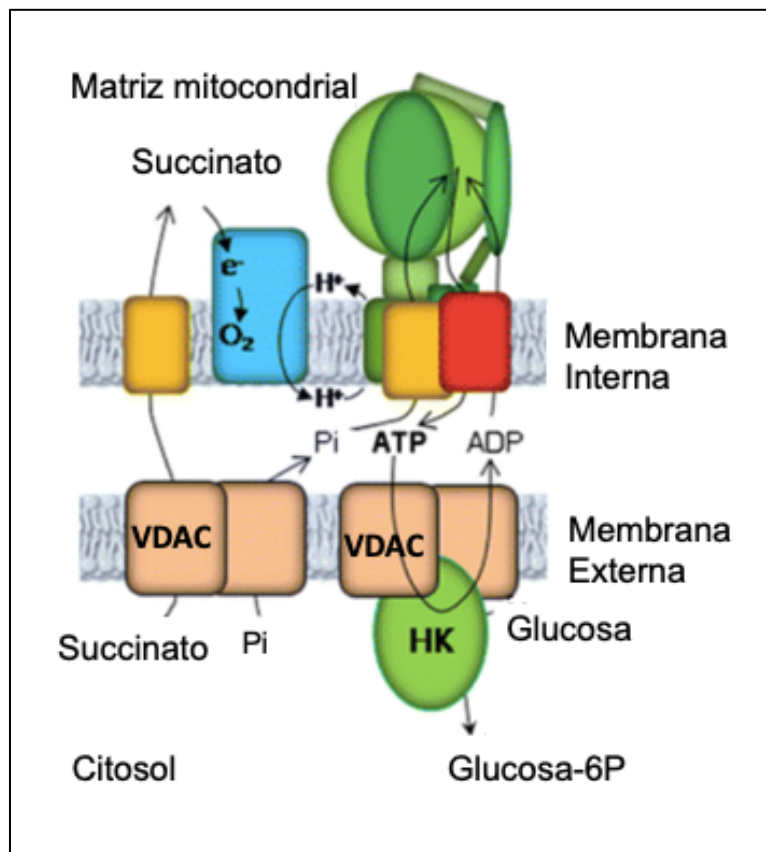


Figura 4. Localización y función de la HXK de plantas en la canalización del ATP en el sitio activo de la enzima.

La HXK unida a la membrana externa mitocondrial interacciona con el Canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) quien le proporciona ATP que viene de la membrana interna mitocondrial a través del translocador de adenin-nucleotidos (cuadro rojo), al fosforilarse la hexosa el ADP producido regresa a la membrana interna mitocondrial y de allí a la ATPasa

a través del mismo translocador de adenin nucleótidos. Tomado de Alcántar-Aguirre et al., 2013.

En mamíferos, la HXK se encuentra en la membrana externa de la mitocondria, tiene contacto con el canal de aniones dependiente de voltaje o VDAC y en plantas se ha encontrado que la enzima puede llevar a cabo el acoplamiento del uso del ATP mitocondrial para la síntesis de las hexosas-fosfato (Figura 4), sugere que la HXK tiene contactos con VDAC (Alcántar-Aguirre *et al.*, 2013). Por lo anterior, es muy factible que la HXK anclada a la membrana externa mitocondrial tenga una alta eficiencia para la fosforilación de hexosas puesto que tiene disponible cercanamente al ATP.

Las HXK Tipo C no tienen péptidos señal o aminoácidos hidrofóbicos que le sirvan para anclarse a la membrana, por lo que son HXKs citosólicas y están presentes en plantas monocotiledóneas como el maíz, sorgo, arroz y trigo, aunque también están presentes en el musgo *Physcomitrella patens* (Nilsson *et al.*, 2011).

Las HXKs tipo D son proteínas mitocondriales, sin embargo, su péptido de anclaje mitocondrial es diferente en secuencia del péptido encontrado en las HXKs tipo B, aunque conserva la característica hidrofóbica de los aminoácidos. Este tipo de HXKs solo se ha identificado en el musgo *P. patens* (Nilsson *et al.*, 2011).

Se ha observado que dependiendo de la planta se presentan ciertos tipos de HXKs. Por ejemplo, en *Arabidopsis* AtHXK1 y 2 son HXKs tipo B, mientras que AtHXK3 es una HXK tipo A (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017). En *Z. mays*, las HXK4, 5, 6 y 9 son tipo B, y las HXK7 y 8 son tipo C (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019).

Función sensora de la abundancia de glucosa

La Glu y los intermediarios metabólicos de la vía glucolítica, no solo modifican el flujo de las vías metabólicas sino también pueden influir en el desarrollo de la planta, afectando la transcripción de algunos genes y por tanto el desarrollo, crecimiento y la respuesta a diferentes tipos de estrés. Una de las vías que responde a azúcares depende de la HXK (Rolland *et al.*, 2006).

Se ha demostrado en *A. thaliana* que la HXK1 es un sensor de glucosa, que puede responder a la abundancia de Glu y a hormonas, para controlar la expresión genética y el crecimiento de las plantas. Mutantes carentes de la capacidad de fosforilar a la Glu son capaces de percibir la señal de abundancia del azúcar, lo que permitió separar la función sensora de la catalítica (Moore *et al.*, 2003).

Análisis genéticos y de inmunoprecipitación, demostraron interacciones novedosas de las HXKs que permitieron explicar cómo afectan la expresión de genes. En particular, tres experimentos demostraron la interacción en el núcleo de la HXK1 mitocondrial con dos proteínas no relacionadas con el metabolismo de la Glu, la subunidad B1 de la ATPasa Vacuolar (VHA-B1) y la partícula reguladora 19S de la subunidad del proteosoma (RPT5B) (Cho *et al.*, 2006).

El primero de los experimentos fue la determinación del complejo trimérico *in vivo*, para ello Cho y colaboradores (2006) obtuvieron los núcleos de hojas de *A. thaliana* que expresaban una forma de HXK etiquetada con la secuencia de aminoácidos (Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys), que es denominada Flag, después los núcleos se colocaron en una resina anti-Flag agarosa, las fracciones eluidas fueron separadas en un gel de poliacrilamida-SDS y las bandas que se detectaron al teñir el gel con azul de Coomassie, se secuenciaron, obteniéndose alrededor de 50 proteínas, entre ellas VHAB1 y RTP5B.

La segunda estrategia experimental que permitió determinar las interacciones entre la HXK y VHAB1 y RTP5B fue el ensayo de doble híbrido en levadura. En este caso la AtHXK1 se expresó en levadura como una fusión con uno de los dos dominios de un factor de transcripción (dominio BD, "Binding Domain"), fusión denominada carnada; por otro lado, se tenía una biblioteca de genes fusionados cada uno con el dominio complementario del mismo factor de transcripción que se usó en la carnada, denominado AD ("Activating Factor) o presa-AD. Cuando ambas, la carnada y la presa se encontraron cercanas los dominios BD y AD interaccionaron, lo que llevó a la activación de la transcripción de un gene reportero (Figura 5).

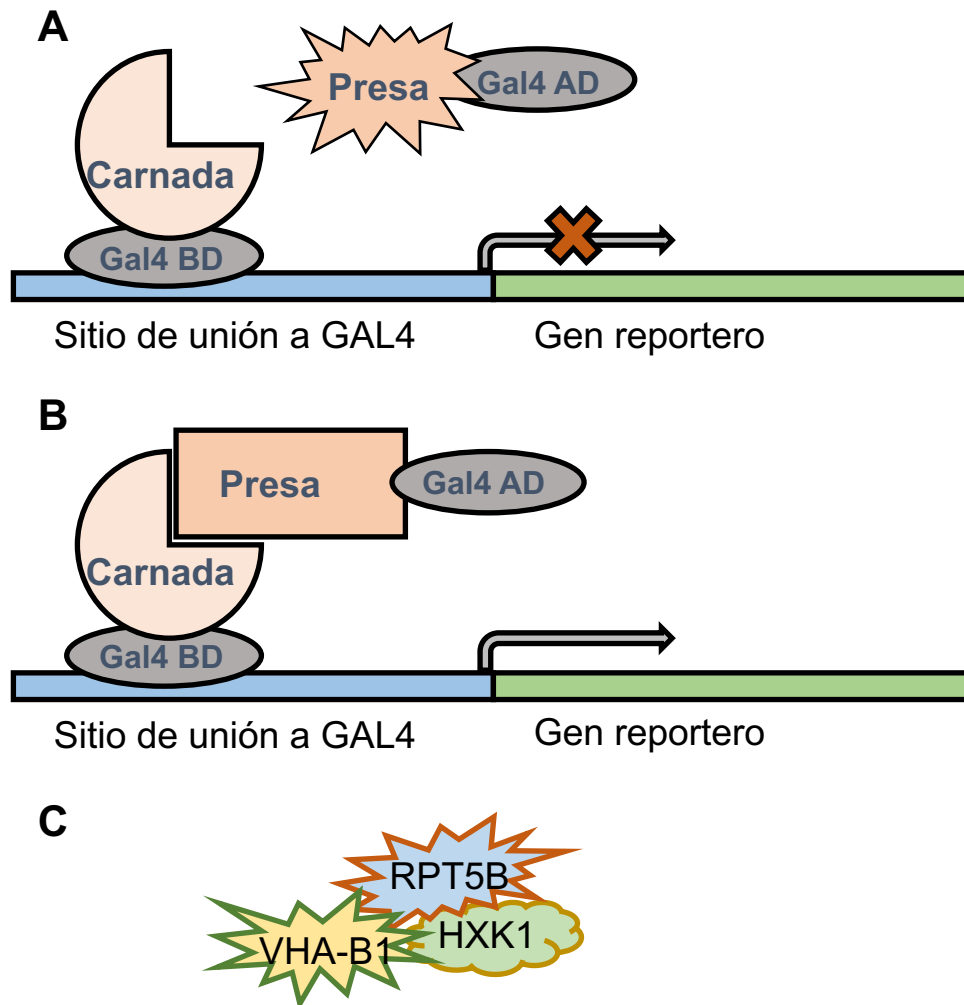


Figura 5. Interacción de la HXK con VHA-B1 y RTP5B mediante ensayo de doble híbrido.

A. Ensayo de doble híbrido en donde no hay interacción entre la proteína carnada y la presa **B.** Ensayo de doble híbrido en donde si hay interacción entre la presa y la carnada, lo que lleva a la expresión del gen reportero. Tomada y modificada de <https://www.profacgen.com/yeast-two-hybrid-screening.htm>. **C.** Modelo del trímero de proteínas. Tomada de Cho et al., 2006.

Por último, Cho y colaboradores (2006) a través de la inmunoprecipitación de proteínas corroboraron la interacción entre las tres proteínas (Figura 6). Para ello aislaron protoplastos de *A. thaliana* que expresaban a la HXK-Flag para después transformarlos con un vector que contenía a VHAB1 o a RTP5B, cada una etiquetada con la secuencia de hemaglutinina (Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala; HA) o con la proteína verde fluorescente (GFP). Los lisados de los protoplastos se obtuvieron 6 h después de la transformación con el DNA y las proteínas fueron

inmunoprecipitadas al colocarlas en contacto con el anticuerpo anti-Flag unido a una resina de agarosa. Las muestras fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS y posteriormente fueron detectadas específicamente en una inmunoréplica tipo Western con un anticuerpo anti-HA o anti-GFP.

El complejo trimérico ha sido encontrado en núcleo y se propone que al interactuar con dos factores de transcripción modula negativamente la transcripción específica de la expresión de algunos genes fotosintéticos, independientemente del metabolismo de Glu. El mecanismo de translocación tanto de la HXK1 como de VHAB1 y RPT5B al núcleo se desconoce (Cho *et al.*, 2006). Aunque si se ha hay HXKs que presentan la señal de localización nuclear, que se encuentran en el núcleo, pero se desconoce si forman el complejo trimérico de represión (Cho *et al.*, 2006, Cho *et al.*, 2009).

Múltiples respuestas se producen por efecto de la señalización de Glu mediada por la HXK, una de ellas implica un aumento en el contenido de Ácido abscísico (ABA), pues se induce la síntesis de éste, además de la expresión de genes dependientes del mismo. A través de ABA se reduce la apertura estomatal lo cual impacta en la reducción de la tasa fotosintética, proceso independiente de la represión de los genes fotosintéticos (Aguilera-Alvarado y Sánchez-Nieto, 2017).

Adicionalmente, se ha demostrado que la vía de señalización dependiente de HXK interactúa de manera positiva con la vía dependiente de auxinas y de forma negativa con la vía de señalización dependiente de citosinas. La primera es una fitohormona que está involucrada tanto en la promoción del crecimiento como en la inhibición del crecimiento, dependiendo del tejido y / o la concentración de glucosa y la segunda es una fitohormona esencial que interviene en el meristemo de los brotes y en la formación de hojas, división celular, biogénesis y senescencia del cloroplasto (Hwang *et al.*, 2001; Olsson *et al.*, 2003; Rolland *et al.*, 2006).

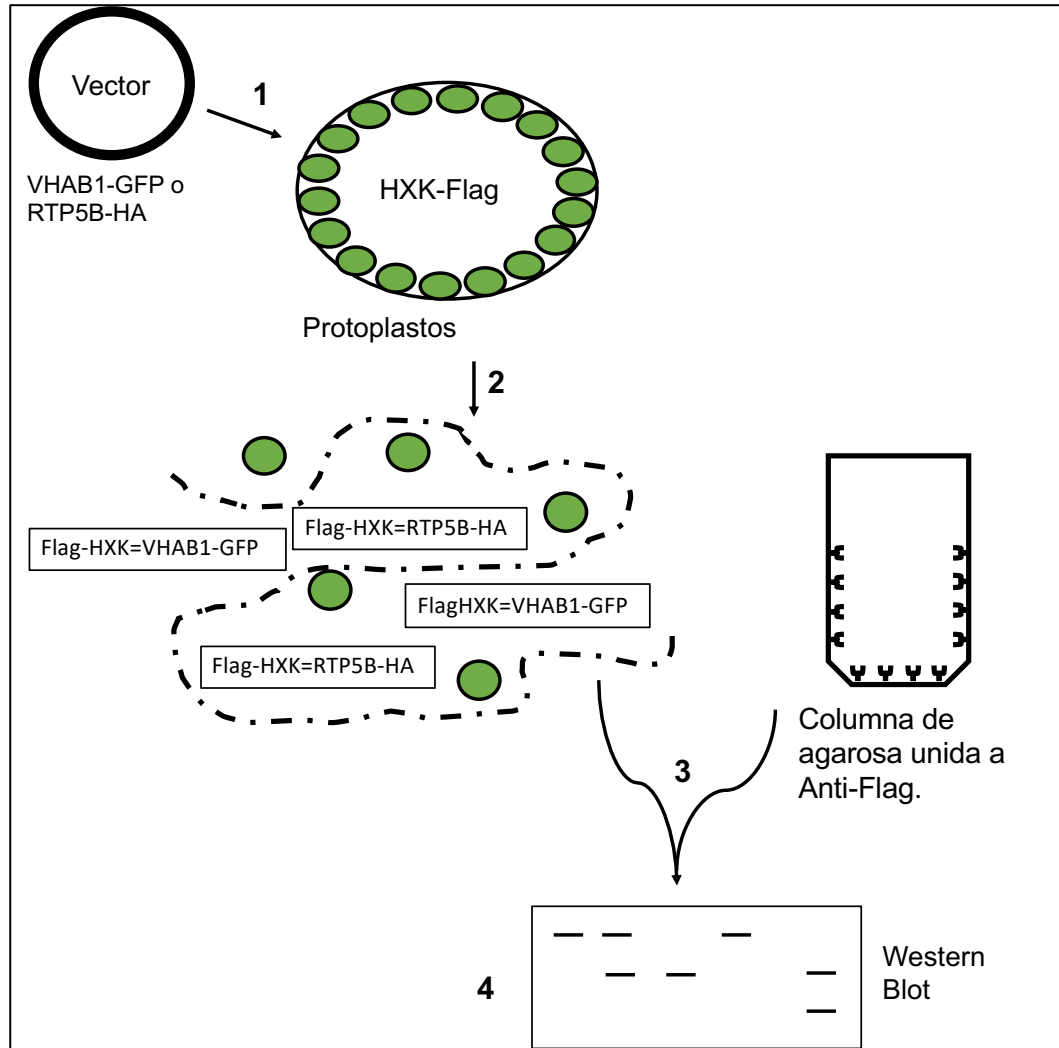


Figura 6. Diagrama de flujo del ensayo de inmunoprecipitación que demuestra la interacción de HXK con VHA-B1 y RTP5B.

Aislamiento de protoplastos de hojas de la mutante de *A. thaliana* que produce HXK-Flag y su transformación con un vector que codifica para VHAB1 o RTP5B etiquetados con HA o GFP. **2.** Lisado de los protoplastos **3.** Pull-down de las proteínas del lisado en la resina de Agarosa-Anti-Flag y su posterior elución. **4.** Separación de las proteínas por SDS Page y la posterior inmunoréplica tipo Western con un anticuerpo anti-HA o con anti-GFP.

Función reguladora de la HXK en la tolerancia a estrés salino

El laboratorio del Dr. Hao en China, demostró que la HXK1 de *Malus domestica* no solo es capaz de fosforilar hexosas sino también a MdbHLH3, que es un factor transcripcional (Hu *et al.*, 2016) y al intercambiador Na^+/H^+ de manzana, MdNHX1 (Sun *et al.*, 2018).

La interacción entre MdNHXK1 y MdHXK1 fue demostrada mediante un ensayo de pull-down, utilizando como carnada a MdNHX1-His unida a una resina de afinidad por histidinas, y añadiendo a la columna a MdHXK1-GST (Glutación-S-Transferasa) al separar las fracciones eluidas en un gel de poliacrilamida-SDS y después de realizar la inmunoréplica tipo Western, encontraron que ambas proteínas se encontraban en la misma fracción utilizando anticuerpos específicos para cada una de las etiquetas de las dos proteínas recombinantes.

La interacción entre la HXK y las proteínas de manzana también se corroboró mediante complementación de la fluorescencia bimolecular o BiFC (Hu *et al.*, 2006 y Sun *et al.*, 2018). El fundamento de BiFC es el revelado de un complejo fluorescente, como resultado de la asociación de dos segmentos de una proteína fluorescente cuando están próximos (Kerppola, 2008).

Durante la interacción HXK fosforila el factor de transcripción y ocasiona que el factor transcripcional sea más estable llevando a la inducción de la síntesis de antocianinas, todo ello como respuesta al estrés salino. Las antocianinas por su capacidad antioxidante contienden con el estrés oxidativo que provoca el estrés salino. Mientras que la fosforilación del intercambiador Na^+/H^+ por la HXK también mejora su estabilidad, así como su capacidad de transporte de Na^+ al interior de la vacuola, permitiendo la sobrevivencia de la planta ante estrés salino (Sun *et al.*, 2018).

Antecedentes directos

Como se mencionó anteriormente, las HXKs tanto en situaciones fisiológicas como en condiciones de estrés nutricional o ambiental pueden interactuar con diferentes proteínas, lo que lleva a la planta a respuestas que le permiten ajustarse ante las condiciones nutricionales, de estrés o fisiológicas (Tabla 2).

Tabla 2. Proteínas con interacción potencial con las HXKs y afectar fisiológicamente la respuesta de la planta ante diferentes condiciones nutricionales y ambientales.

HXK	Proteínas con las que interacciona	Función	Referencias
HXK mitocondrial	Canal aniónico de voltaje o VDAC	Canalización de los sustratos y productos de manera óptima.	Alcántar-Aguirre <i>et al.</i> , 2013.
HXK mitocondrial con capacidad de migrar al núcleo	Subunidad B1 de la ATPasa Vacuolar (VHA-B1) y la partícula reguladora 19S de la subunidad del proteasoma (RPT5B)	Para reprimir algunos genes fotosintéticos en respuesta a la abundancia de glucosa	Cho <i>et al.</i> , 2006
HXK mitocondrial de manzana	Fosforila al factor de transcripción MdbHLH3	Induce la síntesis de antocianinas ante estrés salino	Hu <i>et al.</i> , 2016
HXK mitocondrial de manzana	Fosforila al intercambiador Na ⁺ /H ⁺ de manzana, MdNHX1.	Aumenta la actividad del intercambiador Na ⁺ /H ⁺ , ante el estrés salino	Sun <i>et al.</i> , 2018

En maíz se han caracterizado a 6 de sus 9 HXKs, encontrándose que ZmHXK4 a 9, tienen capacidad catalítica y que son diferentes en cuanto a sus parámetros cinéticos, en su localización y capacidad sensora (Aguilera-Alvarado *et al.*, 2019 y Alvarado-Aguilera, 2019).

Buscando nuevas proteínas que pudieran interactuar con las HXKs de maíz se realizaron ensayos de pull-down (comunicación personal con la M en C. Beatriz King Díaz), como carnada se usaron a tres de las ZmHXKs mitocondriales, pero en versiones a las que se les removió la región de anclaje a la mitocondria puesto que esto las hacia solubles.

Una de ellas, la ZmHXK4 Δ 30-His unida a una resina de Ni²⁺, His-Tag (Roche), interaccionó con varias proteínas que fueron obtenidas de la fracción mitocondrial de coleoptilos de semillas de maíz de 72 h de crecimiento y que se encontraban infectadas con un hongo del género *Fusarium* (Tabla 3). Encontrándose a VDAC y la subunidad B de la ATPasa vacuolar como proteínas conocidas y a BGAF1 entre otras. En este trabajo nos planteamos investigar a BGAF1, que como se mencionó anteriormente es una proteína que agrega y regula la actividad de la BGLU y que está implicada a las respuestas de estrés tipo biótico (Nagano et al., 2005), por lo que podría ser una proteína que interaccione con la HXK para contender contra ese tipo de estrés.

Para determinar si efectivamente HXK4 y BGAF interactúan, se propuso en este trabajo producir las dos proteínas recombinantes y realizar ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro*.

Tabla 3. Lista parcial de proteínas de la fracción microsomal de coleóptilos de maíz que eluyen junto con la hexocinasa.

Las proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas. (King-Díaz, comunicación personal). Se escribieron en la lista las proteínas que tienen un mayor *Coverage*, además de otras ya habían sido reportadas en la literatura, como proteínas que interaccionan con hexocinasa y otras que se han visto, están involucradas en estrés en plantas.

Proteína	Peso molecular (KDa)
HEXOCINASA	54.8
Heat shock 70 kDa protein <i>Zea mays</i>	65.7
Vacuolar proton pump3 OS <i>Zea mays</i>	46.2
Beta glucosidase chloroplastic OS <i>Zea mays</i>	52.2
Putative ATPase V1 complex subunit B protein isoform 1 OS <i>Zea mays</i>	47.2
ATP synthase subunit beta OS <i>Zea mays</i>	45.9
Zinc finger CCCH type family protein OS <i>Zea mays</i>	24.8
Beta glucosidase aggregating factor1 OS <i>Zea mays</i>	19.1
V type proton ATPase subunit E3 OS <i>Zea mays</i>	26.6
Voltage dependent anion channel protein 1a OS <i>Zea mays</i>	29.5
Beta lactamase OS <i>Zea mays</i>	31.5
Jasmonate induced protein OS <i>Zea mays</i>	24.1
Ribosomal protein S3 Fragment OS Maize bushy stunt phytoplasma	27.1

Hipótesis

Las proteínas ZmHXK4 Δ 30 y ZmBGAF1 recombinantes interactúan *in vitro*.

Objetivos

Objetivo general

Demostrar la interacción *in vitro* de la ZmHXK4 Δ 30 con la β -Glucosidasa Factor Agregante de maíz.

Objetivos particulares

1. Producir la BGAF1 recombinante de maíz.
 - 1.1. Clonar al gen que codifica para la BGAF1 (número de acceso GRMZM2G172204) en su versión con la etiqueta V5.
 - 1.2. Diseñar y optimizar la metodología para la producción y purificación de la BGAF recombinante.
2. Producir a la proteína recombinante de la HXK4 de maíz en su versión trunca (sin la región que la ancla a la mitocondria) y con la etiqueta de hemaglutinina.
3. Demostrar la interacción entre ZmBGAF1 y ZmHX4 Δ 30 mediante Far Western Blot.

Estrategia experimental.

Para cumplir los objetivos del trabajo se siguió la estrategia experimental que se muestra en la Figura 7 y consistió en la clonación de BGAF1, la obtención de la proteína recombinante y su uso para ensayos de interacción proteína-proteína con la HXK4 de *Zea Mays*. Para esta última se obtuvieron las condiciones óptimas para su inducción y purificación.

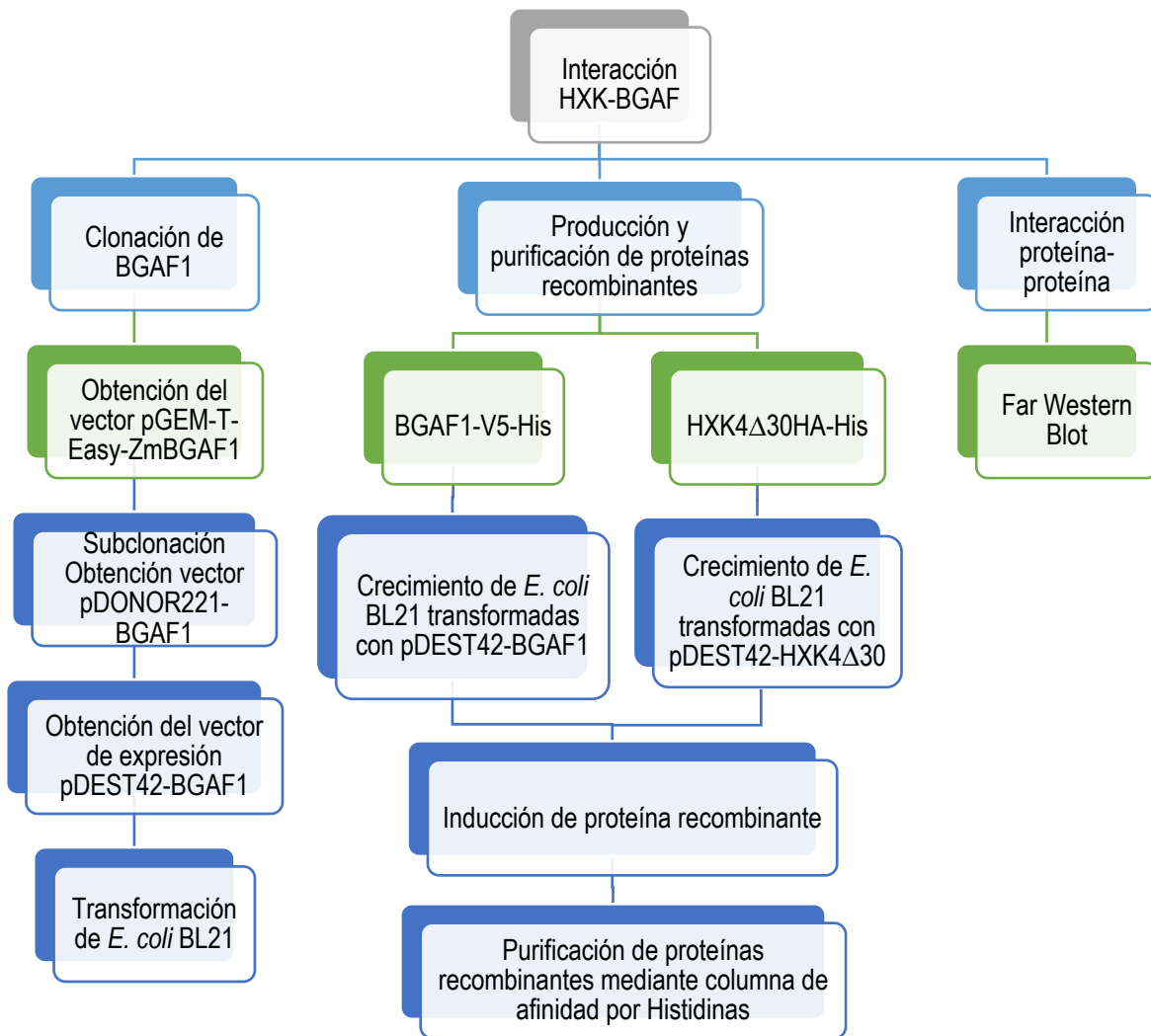


Figura 7. Esquema del desarrollo experimental usado en este trabajo.

Materiales y métodos

Análisis *in silico* de la secuencia BGAF

ZmBGAF fue identificada mediante espectrometría de masas como una proteína que podría estar interaccionando con ZmHX4Δ30 *in vitro* durante un ensayo de pull down (Tabla 3). Se obtuvo la secuencia que codifica para la ZmBGAF con número de GenBank: ONM52669.1 y se realizó un blast para determinar si había otras ZmBGAF que fueran similares a la secuencia de interés para este trabajo. La secuencia de nucleótidos se tradujo a proteína para analizar la secuencia de aminoácidos mediante el uso de Blastx, además de permitir obtener el modelo de la estructura terciaria de la proteína mediante la aplicación Zhanlab de la Universidad de Michigan (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>).

Clonación BGAF1

Obtención de la secuencia que codifica para BGAF1.

La secuencia codificante para la proteína BGAF1 se amplificó por PCR, para ello se utilizó cDNA obtenido de RNA de ejes embrionarios de maíz (*Z. mays* var. VS-535) de semillas germinadas durante 30 h (proporcionado por la M. en C. Monserrat López-Coria). Se diseñaron los oligonucleótidos para obtener la región del marco de lectura abierto del gen mediante la aplicación SnapGene®. Los oligonucleótidos usados fueron sentido 5'-ATCTCAAGTGTGTAGACGAGACA-3' y antisentido 5'-TCACAGGGATCGCACGTA-3'. Se preparó la reacción de PCR en un volumen final de 25 µL, con 5 µL de amortiguador Advantage 5X, 2 µL de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 µL de cDNA, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos en una concentración de 10 µM, 0.3 µL de Advantage HD Polimerasa (Takara), y 13.7 µL de H₂O libre de nucleasas. Para la PCR se siguió el siguiente programa: temperatura de desnaturalización de 95 °C por 2 min y 10 s, se realizaron 35 ciclos con una temperatura de alineamiento de 62 °C durante 1 min, y finalmente la temperatura de elongación de 72 °C durante 1 min.

El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % con 0.5 µg/mL de bromuro de etidio, en amortiguador de carga (ver anexo 1) y purificado con el sistema de extracción Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research número de catálogo D400) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Se utilizó como marcador de pesos moleculares el GeneRuler 1kb (Thermo Scientific).

Adenilación y Ligación en vector pGEM-T Easy. Una vez purificado el producto de PCR, se añadió una adenina al extremo 3', para lo cual se preparó la reacción en un volumen final de 10 µL, con 1 µL de amortiguador Taq (KCl + MgCl₂ 10X), 1 µL de Taq DNA polimerasa (Thermo Scientific) 5 U/µL, 0.4 µL de 5 mM dATP, 200 ng del producto del PCR, 0.6 µL del 25 mM de MgCl₂, y H₂O libre de nucleasas c.b.p. 10 µL. Se incubó a 70 °C durante 30 min.

La reacción de ligación entre el producto de PCR adenilado y el vector de clonación pGEM T-easy se realizó en un volumen final de 10 µL que contuvo 5 µL de Rapid Ligation Buffer 2X (Promega), 1 µL de plásmido pGEM-T Easy (50 ng), 2 µL del producto de la reacción de adenilación, 1 µL de T₄ DNA ligasa (3 U / µL) y H₂O libre de nucleasas c.b.p. 10 µL. Se agitó y se incubó a 4 °C durante 14 h.

Transformación. Se transformaron células competentes de la cepa DH5α de *Escherichia coli* con choque térmico. Se añadió 5 µL del vector **pGEM-T Easy-BGAF1** a 100 µL de células competentes (ver anexo 2), la mezcla se incubó 30 min en hielo, después por 2 min a 42 °C y luego se dejó otros 2 min en hielo. Después, se agregaron 900 µL de medio SOC (anexo 1) y se permitió su recuperación a 37 °C durante 2 h y agitación constante. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se removió con micropipeta el sobrenadante para dejar 80-100 µL de medio. Se resuspendió el botón y se plaqueo en medio Luria-Bertani (LB; Anexo 1) suplementado con ampicilina 100 µg / µL, IPTG 0.75 mM y X-Gal 50 µg / µL. Se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Se seleccionaron varias colonias aislada de color blanco, las cuales se inocularon por separado en medio LB líquido con ampicilina 100 µg / µL durante 18 h a 37 °C. A estas células se les extrajo el DNA plasmídico con el Kit de purificación: Zyppy™ Plasmid Midiprep Kit (Zymo Research, número de catálogo D4025) de acuerdo con el protocolo descrito por el fabricante. El plásmido fue cuantificado en el Espectrofotómetro NanoDrop™ 2000.

Verificación de la secuencia de *BGAF*. Se realizó un ensayo de restricción al vector recombinante pGEM-T easy-BGAF1 con la enzima EcoRI en un medio de reacción que contenía 2 µL de amortiguador EcoRI, 200 ηg del plásmido purificado, 1 µL de la enzima EcoRI y H₂O c.b.p. 20 µL. Se incubo de 2.5 h a 37 °C. Se llevó a cabo la separación electroforética de los fragmentos en un gel de agarosa 0.7 % con 0.5 µg / mL de bromuro de etidio.

Subclonación de *BGAF* en vector Gateway pDNOR221.

Se realizó la subclonación del gen *BGAF* para obtener un gran número de copias del mismo, lo que facilita su manejo y permite secuenciarlo. Además la subclonación ahorra tiempo, ofrece una clonación más simple y altamente eficiente. El protocolo para la subclonación del gen de interés en el vector pDNOR221 mediante la tecnología Gateway incluye la purificación del vector pGEM T-easy-BGAF1 y la realización de una reacción de PCR con los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 4. Con el PCR se le añade a la secuencia del gen *BGAF1* las colas de attB para que éste por recombinación, catalizado por la BP clonasa, se integre al vector pDONR221 (vector de entrada). Posteriormente se realiza otra recombinación, con ayuda de la LR clonasa, en el vector pDEST42 (vector de expresión). El vector de entrada permite obtener un gran número de copias del gen, al replicarse el plásmido, por lo que es conveniente usar cepas bacterianas que promuevan la replicación del mismo, por ejemplo *E. coli DH5α*. El vector de expresión, como su nombre lo indica, permite la expresión del gen, debido a que contiene en su secuencia el operador de Lactosa el cuál es inducible con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

Tabla 4. Oligonucleótidos usados para la subclonación BGAF1 en el vector pDNOR221.

Oligonucleótido	Secuencia (5'--3')
Sentido	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAATGGCCAGCCTCCAAGT</u>
Antisentido	5' <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT</u> CAGGGATCGCACGTAAACGC-3'

Los nucleótidos subrayados con una línea corresponden a la secuencia que recombina con la sección AttL del vector de entrada. Los nucleótidos subrayados con doble línea corresponden a los nucleótidos que son parte del gen BGAF1. El producto de PCR esperado es de 980 pb.

El producto de PCR fue separado por electroforesis en gel de agarosa al 0.7 % en amortiguador TAE (Anexo 1) y purificado con el sistema de extracción Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después se realizó la ligación del producto de PCR purificado con el vector de entrada pDONR221 mediante la enzima BP clonasa, siguiendo el protocolo descrito para la Tecnología Gateway (Invitrogen).

Se transformaron las células competentes de la cepa DH5α de *E. coli* con el vector pDONR221-BGAF1. Se incubaron las bacterias en medio LB con kanamicina 50 µg/µL a 37 °C, durante toda la noche a 175 rpm y la posterior extracción del plásmido con el sistema de aislamiento Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research).

Se realizó un ensayo de restricción al vector con la enzima Mlu1 FastDigest (Thermo scientific) en un medio de reacción que contuvo 2 µL de Buffer Mlu1, 200 ng del plásmido purificado, 1 µL de la enzima Mlu1 y H₂O c.b.p. 20 µL. Se incubó 10 min a 37 °C. Se llevó a cabo la separación electroforética de los fragmentos en un gel de agarosa 0.7 % con 0.5 µg / mL de bromuro de etidio.

Adicionalmente, el plásmido purificado, se envió a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, se usaron los oligonucleótidos universales: M13/Puc reverse (5'-TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC-3') y T7' (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'). La secuencia se encuentra en el anexo 3.

Recombinación del vector pDNOR221 con el vector pDEST42.

Se realizó la recombinación con la enzima LR clonasa, siguiendo el protocolo descrito para la Tecnología Gateway (Invitrogen). Se transformaron las células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* con el vector pDEST42-BGAF1. Las bacterias fueron crecidas en medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ (1:1000) y la posterior extracción del vector pDEST42- β GAF1 con el sistema de aislamiento Zymoclean™ Gel DNA Recovery (Zymo Research). Se le realizó un ensayo de restricción al vector con la enzima Mlu1 como se describió anteriormente.

Por último, se transformaron las células competentes de la cepa *E. coli* BL21 con el vector pDEST42-BGAF1 y se incubaron las bacterias en medio LB con ampicilina 100 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ y cloranfenicol 50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$. Se guardó el cultivo de bacterias en glicerol (1 volumen de cultivo: 3 volúmenes de glicerol 50 % estéril) a -70 °C.

Obtención y purificación de la proteína recombinante BGAF

Sobreexpresión de BGAF. A 25 mL de medio LB adicionado con 25 μL de ampicilina (50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) y 25 μL de cloranfenicol (50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) se le añadieron 25 μL del cultivo de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pDEST42-BGAF1, se incubó a 37 °C a 175 rpm durante toda la noche. Se usó ese cultivo para inocular 300 mL de medio adicionado con los dos antibióticos, ampicilina y cloranfenicol a la concentración mencionada, en un matraz de 1 L, se incubó a 37 °C a 175 rpm hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 ηm para iniciar la inducción. Se añadió IPTG para tener una concentración final de 1 mM y se incubó durante toda la noche a 25 °C a 175 rpm. Al concluir el tiempo de inducción el cultivo se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min y las pastillas celulares se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

Sobreexpresión de HXK4. A 15 mL de medio LB adicionado con 15 μL de ampicilina 50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ y 15 μL de cloranfenicol 50 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ se le añadió 15 μL del cultivo congelado de *E. coli* BL21 transformadas con el vector pDEST42-HXK4 Δ 30-HA (vector obtenido por la M. en C. Carolina Rodríguez Saavedra), se incubó a 37 °C a 175 rpm hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 ηm . Se usó ese cultivo para inocular 500 mL de medio adicionado con los antibióticos ya mencionados y a la

concentración mencionada en un matraz de 2 L, se incubó a 37 °C a 175 rpm hasta alcanzar una DO de 0.6 a 600 ηm para poder iniciar la inducción. Se añadió IPTG para una concentración final de 1 mM y se dejó incubando durante 3.5 h a 37° C a 175 rpm. Al concluir el tiempo de inducción el cultivo se centrifugó a 4,000 rpm durante 10 min y los botones celulares se mantuvieron a -70 °C hasta su uso.

Purificación de proteína recombinante con una columna de afinidad para etiquetas de histidina.

Las proteínas recombinantes usadas en este trabajo contienen una secuencia de histidinas en su extremo carboxilo terminal para ser usadas en su purificación. Adicionalmente, cada una de las proteínas presentan otras etiquetas: la proteína BGAF1 presenta la secuencia V5 (GKPIPPLLGLDST) seguida de las 6 histidinas, mientras que ZmHXK4 contiene la etiqueta de hemaglutinina (HA) seguida de 6 histidinas.

Se utilizó una resina de níquel como grupo funcional para purificar a las proteínas recombinantes a través de la secuencia de histidinas. Todos los pasos de la purificación se realizaron en frío. Los amortiguadores y soluciones utilizados se detallan en el anexo 1. El protocolo que se siguió fue el siguiente:

Lisis celular. Se partió de dos botones celulares equivalentes cada uno a 500 mL de cultivo. Se resuspendió cada una de las pastillas en 2.5 mL de amortiguador de lisis celular (anexo 1) y se juntó el contenido de ambos tubos en un tubo de 50 mL. La suspensión celular se sometió a sonicación en dos ciclos: el primero, 5 min a 130 watts de potencia en pulsos de 25 %, con pulsos de 30 s y descanso de 15 s entre cada bloque de pulsos, y el segundo ciclo se realizó por 5 min a 130 watts de potencia en pulsos de 20 %, con pulsos de 30 s y descanso de 15 s entre cada bloque de pulsos. El sonicador usado fue el Ultrasonic Processor, Cole-Parmer Instrumens, modelo CPX130. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min y se guardó tanto el sobrenadante (aproximadamente 5 mL) como el botón. Bajo las

condiciones previamente descritas, se obtuvo a la ZmBGAF1 de forma soluble al igual que a ZmHXK4 Δ 30-HA.

Equilibrio de la resina. La purificación de la proteína se realizó mediante la técnica de “batch” o lote. Primero se equilibró la resina, para ello se colocó en un tubo falcón de 15 mL, 1.5 mL de la resina Ni²⁺, His-Tag (Roche). La resina se equilibró con amortiguador de equilibrio de resina (Anexo 1) para lo cual se realizaron 7 lavados de 5 mL cada uno con dicha solución. En cada lavado de la resina, se agitó con vórtex durante 10 s, después se centrifugó a 4,000 rpm a 4 °C durante 90 s, el sobrenadante se desechó.

Unión de la proteína a la columna de níquel. Una vez equilibrada la resina, se deja interactuar durante toda la noche a 4°C con agitación horizontal constante con la proteína obtenida, ya sea del botón o el sobrenadante obtenido del final del protocolo de lisis celular. Pasado el tiempo de interacción, la resina fue centrifugada a 4,000 rpm a 4 °C durante 90 s y el sobrenadante resultante se guardó.

La resina con la proteína unida fue lavada para eliminar la unión inespecífica de otras proteínas, mediante 7 lavados con amortiguador de equilibrio de resina (3 mL cada vez), el procedimiento es igual que el realizado para el equilibrio de la resina, con la diferencia de que esta vez se guardaron los sobrenadantes entre cada lavado.

Elución de la proteína ZmBGAF1 recombinante. La proteína recombinante se eluyó con 1 mL del gradiente de 0.1 a 0.5 M de Imidazol en amortiguador de equilibrio de resina. La resina se agitó durante 5 s en vórtex y posteriormente se centrifugó a 3,950 rpm a 4°C durante 90 s, el sobrenadante entre cada elución se recuperó y se guardó a -80 °C.

Elución de la proteína ZmHXK4 Δ 30 recombinante. La proteína recombinante se eluyó con 1 mL del gradiente de 0.5 a 1.5 M de Imidazol en amortiguador de equilibrio de resina. La resina se agitó durante 5 s en vórtex y posteriormente se centrifugó a 3,950 rpm a 4°C durante 90 s, el sobrenadante entre cada lavado se recuperó y se guardó a -80 °C.

Determinación de proteínas por Bradford

El método de cuantificación de proteínas por Bradford consiste en la formación de un compuesto de coloración azul, producido por la unión de los residuos de aminoácidos aromáticos y básicos de las proteínas con el colorante azul de Coomassie (azul brillante G-250). La absorbancia se lee a 595 nm. La curva estándar fue de Albúmina de Suero Bovino (BSA) y cada una de las muestras se determinó por duplicado.

Se realizó la curva estándar, como se describe en la Tabla 5 de acuerdo al protocolo Bulletin Lit33 de Bio-Rad. Utilizando el espectrofotómetro Multiskan Go Microplate Spectrophotometer (Thermo scientific). Las muestras se midieron por duplicado, conforme a lo descrito anteriormente para la curva estándar, con la diferencia de que se agregó la muestra en lugar del BSA.

Tabla 5. Curva estándar para cuantificación de proteínas por Bradford.

Pozo	Blanco	1	2	3	4	5	6
H ₂ O (μL)	150	150	150	150	150	150	150
BSA (μL)	0	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0
Reactivo Bradford (μL)	150	150	150	150	150	150	150

Separación de las proteínas mediante electroforesis (Laemmli, 1970). Los geles de poliacrilamida-SDS al 12 % (anexo 1), se cargaron con 10 μg de muestra mezclada con 3 μL de amortiguador de carga (anexo 1) y H₂O c.b.p. 25 μL, la electroforesis se realizó utilizando el amortiguador de corrida (anexo 1). Posterior al corrimiento electroforético, los geles se colocaron en solución teñidora de Coomassie (Anexo 1) y después de 2 h en agitación orbital constante fueron desteñidos con solución desteñidora (anexo 1). Las imágenes de los geles fueron capturadas utilizando el sistema Chemidoc (Chemidoc™ XRS, BIO-RAD).

Inmunoréplica tipo Western.

Las proteínas primero se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12 %, para después realizar la transferencia húmeda de las proteínas a una membrana, según se detalla a continuación (Towbin *et al.*, 1979).

Electrotransferencia. Se cortó un rectángulo de 9 x 6 cm de una membrana de transferencia (Immobilon-P, PVDF, 0.45 μ m, Millipore), la cual se remojó por 5 min en metanol. Por otro lado, en una charola de plástico de 30x30x5 cm, se agregó amortiguador de transferencia (anexo 1), aproximadamente 90 mL, se montó el casete de electrotransferencia colocando los siguientes componentes dentro de la charola con el amortiguador de transferencia y en el siguiente orden: casete negro, esponja, 2 hojas de papel filtro, el gel de poliacrilamida-SDS, la membrana de PVDF para la transferencia, 2 hojas de papel filtro, esponja y finalmente el casete rojo. Después de colocar las dos hojas de papel filtro sobre la membrana de PVDF se hizo rodar un tubo para eliminar las burbujas que pudieran quedar entre el gel y el papel de PVDF. Después de que el casete quedo armado se introdujo en la cámara para electrotransferencia (CBS Scientific EBU204, Fisher Scientific), se cargó con amortiguador de transferencia, se colocó una barra magnética al fondo y se tapó la cámara, para luego colocar la cámara de transferencia sobre una placa de agitación y se conectó a la fuente de poder. Se dejó la transferencia a 15 V durante toda la noche a 4 °C y con agitación constante.

Bloqueo de la membrana. Una vez realizada la electrotransferencia, se colocó la membrana en 25 mL de solución bloqueadora (anexo 1) incubándose durante 1 h con agitación constante. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces 5 min por vez con 10 mL de TTBS (anexo 1) por cada lavado.

Interacción con anticuerpos. Una vez lavada la membrana, se le añadió 1 mL del anticuerpo anti-V5 1:2500 (monoclonal de rata, sc-271926, marca Santa Cruz) o anti-HA 1:3000 (monoclonal de rata, sc-7392 marca Santa Cruz), ambos diluidos en solución TBS (anexo 1) y se dejó interactuar durante toda la noche a 4 °C. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó la membrana con solución TTBS, se realizaron 5 lavados con 10 mL cada uno. A ambas membranas se les agregó el segundo anticuerpo anti-IgG_K de conejo conjugado con peroxidasa (monoclonal de rata, sc-

516102, marca santa Cruz) en una dilución 1:10,000 en 1 mL de solución TBS y leche Svelty al 1 %, se incubó durante 3 h y posteriormente se lavó la membrana con solución TTBS, se realizaron 5 lavados con 10 mL cada uno.

Revelado. Se agregaron 750 μ L de 1 HRP sustrato peróxido a la membrana seguido de 750 μ L 2 HRP sustrato luminol-Reagent (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore). Las imágenes de las membranas fueron capturadas inmediatamente utilizando el equipo Chemidoc (ChemidocTM XRS, BIO-RAD).

Ensayo de interacción proteína-proteína.

Far-Western. Es un método útil para estudiar las interacciones proteína-proteína. Esta técnica implica la separación de la proteína de interés mediante electroforesis y su posterior transferencia a membrana de nitrocelulosa o de PVDF, después se permite su interacción con otra proteína que se encuentra en solución. La interacción entre ambas proteínas puede ser detectada en la membrana por diferentes métodos. Uno de ellos utiliza un anticuerpo específico, siempre y cuando cada proteína presente una etiqueta distinta (Hall 2004; Colina-Tenorio 2018).

En este trabajo la inmunoréplica tipo Far Western se realizó utilizando como carnada a la proteína recombinante BGAF1-V5, para lo cual, se separaron 30 μ g de una fracción de proteínas que contenía a BGAF1-V5, así como también a ZmHXK4 Δ 30-HA y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa según se describió en el apartado inmunoréplica tipo Western. Una vez realizada la electrotransferencia, se colocó la membrana en un recipiente y se tiñó con la solución de amido black (anexo 1) y posteriormente se bloquearon durante 1 h con 25 mL de solución bloqueadora (anexo 1). Luego se lavó la membrana cinco veces con 10 mL TTBS por 5 min cada vez (anexo 1)

Después 150 μ g de HXK4 Δ 30-HA disuelta en un volumen final de 4 mL de TBS y leche Svelty al 1 % fue vertida sobre la membrana, y se incubó durante 5 h con agitación constante. Al terminar la incubación las membranas fueron lavadas cinco veces por 5 min con TTBS.

Interacción con anticuerpo. A la membrana se le añadió 1 mL de anti-HA 1:3000 (monoclonal de rata, sc-7392 marca Santa Cruz), diluido en solución TBS, se dejó

interactuar durante toda la noche a 4°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se lavó la membrana con solución TTBS, se realizaron 5 lavados con 10 mL cada uno. Posteriormente se le agregó el segundo anticuerpo anti-IgG_K de conejo conjugado con peroxidasa (marca Santa Cruz) en una dilución 1:10,000 en 1 mL de solución TTBS y leche Svelty al 1 %, se incubó durante 2 h y por último se lavó la membrana con solución TTBS, se realizaron 5 lavados con 10 mL cada uno.

Revelado. Se agregaron 750 µL de 1 HRP sustrato peróxido a la membrana seguido de 750 µL 2 HRP sustrato luminol-Reagent, (Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate, Millipore), se mezclaron con la micropipeta asegurando que toda la membrana quedará bien impregnada de los reactivos, las imágenes de las membranas fueron capturadas inmediatamente utilizando el equipo Chemidoc, (Chemidoc™ XRS, BIO-RAD).

Resultados

Clonación del gen BGAF y confirmación de su secuencia.

Con el propósito de corroborar la interacción entre ZmHXK4 y BGAF1 se realizó la clonación de ZmBGAF1. La secuencia para amplificar tiene como número de acceso AF232008.2, de acuerdo a los datos obtenidos de la huella peptídica de la proteína que interacciona con la HXK. Se diseñaron los oligonucleótidos para lograr su amplificación: sentido 5'-ATCTCAAGTGTGTAGACGAGACA-3' y antisentido 5'-TCACAGGGATCGCACGTA-3'.

El producto de PCR fue ligado al vector pGEM-T-Easy. Se realizó el ensayo de restricción para confirmar que se logró clonar e insertar en el vector el gen de interés (datos no mostrados) y también se secuenció el vector (Figura 8), corroborando la identidad de la secuencia.

La secuencia de nucleótidos de BGAF1 clonada en el vector pGEM-T-Easy es similar a la secuencia para la BGAF1 de maíz (AF232008.2) reportada por Blanchard y colaboradores (2000). Como se observa, hay 10 nucleótidos de diferencia entre ambas secuencias (Figura 8).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1640 bits(888)	0.0	908/918(99%)	0/918(0%)	Plus/Plus
Query 1	ATGGCCAGCCTCCAAGTCACTCCTACTTCGGCGTTCACTCAGTGGAAATGAGCTGAAGTTC			60
Sbjct 1	ATGGCCAGCCTCCAAGTCACTCCTACTTCGGCGTTCACTCAGTGGAAATGAGCTGAAGTTC			60
Query 61	GAAGGCCTGTACTTGTTCACAACTACGTTGGGCTCAGGCGCCAACCAAACCTCAGGTCATA			120
Sbjct 61	GAAGGCCTGTACTTGTTCACAACTACGTTGGGCTCAGGCGCCAACCAAACCTCAGGTCATA			120
Query 121	AGCAACAAGGCGCCGATTGGCATCGGTGCCACCGTAGTTAACTGGACAGTGTGTGAC			180
Sbjct 121	AGCAACAAGGCGCCGATTGGCATCGGTGCCACCGTAGTTAACTGGACAGTGTGTGAC			180
Query 181	GGGCCAGGGCCGAACGCAAAGCTTATGGCCGTGCACAGGGCTTGCATATCCAAGCCGGC			240
Sbjct 181	GGGCCAGGGCCGAACGCAAAGCTTATGGCCGTGCACAGGGCTTGCATATCCAAGCCGGC			240
Query 241	AACTGGGTCAACTCCTTCAGCCTAGTGTTCGGGATCAAAGGTTTCAGTGGGTCCACGCTT			300
Sbjct 241	AACTGGGTCAACTCCTTCAGCCTAGTGTTCGGGATCAAAGGTTTCAGTGGGTCCACGCTT			300
Query 301	GAAGTGACCGGGATAGTAGTTGAATTCGGGAGTGGGCTATTGTTGGGGGCACCGGTCAG			360
Sbjct 301	GAAGTGACCGGGATAGTAGTTGAATTCGGGAGTGGGCTATTGTTGGGGGCACCGGTCAG			360
Query 361	TTTGCCATGGCAAATGGTGTCTATCTCCAAGAAGCTCCATGGGAAGACAAGCGAAGGGGAC			420
Sbjct 361	TTTGCCATGGCAAATGGTGTCTATCTCCAAGAAGCTCCATGGGAAGACAAGCGAAGGGGAC			420
Query 421	ATCATACTCAACTCACCATCCATGCTTTCTGTCCGGTGCCTGGAGCGCAAAGCGCTTCGGCC			480
Sbjct 421	ATCATACTCAACTCACCATCCATGCTTTCTGTCCGGTGCCTGGAGCGCAAAGCGCTTCGGCC			480
Query 481	ACAAAAGTTGGACCGTGGGGTGGGAGCGGGCTCTCCGATGGACATCACGGCAGAGCCC			540
Sbjct 481	ACAAAAGTTGGACCGTGGGGTGGGAGCGGGCTCTCCGATGGACATCACGGCAGAGCCC			540
Query 541	CAGCGTCTGAAGAGCATCACCGTTGCTACTGGCATCGCCGTGACCTCGATTGCCCTTCTCC			600
Sbjct 541	CAGCGTCTGAAGAGCATCACCGTTGCTACTGGCATCGCCGTGACCTCGATTGCCCTTCTCC			600
Query 601	TACGTCGACTCCGCGCGCCAAACCCAATCTGCTGGTGGCTGGGGCGGTTCCGGTGGAGAA			660
Sbjct 601	TACGTCGACTCCGCGCGCCAAACCCAATCTGCTGGTGGCTGGGGCGGTTCCGGTGGAGAA			660
Query 661	ACTGAGCCGGTGATCCAGCTCGTCCACTCCGAGGTGCTCACGGAGCTGTCCGGGACGATC			720
Sbjct 661	ACTGAGCCGGTGATCCAGCTCGTCCACTCCGAGGTGCTCACGGAGCTGTCCGGGACGATC			720
Query 721	GGCAACGTCGACGGCCTCACCGTCATAACCTCCATCAAGTTCGTCACAAGCCTCAAGACC			780
Sbjct 721	GGCAACGTCGACGGCCTCACCGTCATAACCTCCATCAAGTTCGTCACAAGCCTCAAGACC			780
Query 781	TACGGGCCTTTTCGGAGCATGGGGGAGCGGAGTGACACTCCATTTCGGGATCCCGGTGCAG			840
Sbjct 781	TACGGGCCTTTTCGGAGCATGGGGGAGCGGAGTGACACTCCATTTCGGGATCCCGGTGCAG			840
Query 841	CAAGGGAGTGCCATCGTCCGGCTTCTTCGCACGAGCTGGGATCTACCTCGACGCCCTTGGC			900
Sbjct 841	CAAGGGAGTGCCATCGTCCGGCTTCTTCGCACGAGCTGGGATCTACCTCGACGCCCTTGGC			900
Query 901	GTTTACGTGCGATCCCTG 918			
Sbjct 901	GTTTACGTGCGATCCCTG 918			

Figura 8. Alineamiento de secuencias de BGAF1, entre la reportada y la clonada.

BGAF1 de maíz. QUERY es la secuencia clonada en este trabajo y Sbjct es la secuencia reportada por Blanchard (2000) con número de acceso AF232008.2. En los cuadros rojos se señalan las diferencias entre las dos secuencias. El análisis se realizó mediante la herramienta BLAST de la página del NCBI.

Análisis *in silico* de la secuencia traducida del gen para BGAF y predicción de su estructura terciaria.

Se tradujo la secuencia del gen clonado del maíz VS535 (este trabajo) y se comparó con la secuencia de aminoácidos de BGAF1 de maíz H95 (Blanchard *et al.*, 2000). Se encontró que las secuencias tienen una identidad del 98 % y que hay diferencias entre ambas en 7 aminoácidos: N28K, V30Q, I69V, S159L, I174M, N269D y V294I (Figura 9).

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	
602 bits(1552)	0.0	Compositional matrix adjust.	299/306(98%)	303/306(99%)	0/306(0%)	
Query 1	MASLQVTPTS	AFTQWNLKFEGLYLFHNYV	SGGANQTQVISNKAPIGIGATVVNNWTVCD		60	
Sbjct 1	MASLQVTPTS	AFTQWNLKFEGLYLFHNYV	SGGANQTQVISNKAPIGIGATVVNNWTVCD		60	
Query 61	GPGPNAKLIARAQGLHIQAGNWNVNSFSLV	FVVDQRFSGSTLEV	TGIVVESGEWAIVGGTGQ		120	
Sbjct 61	GPGPNAKL+ARAQGLHIQAGNWNVNSFSLV	FVVDQRFSGSTLEV	TGIVVESGEWAIVGGTGQ		120	
Query 121	FAMANGVISKKLHGKTSEGDIIQLTIHAF	CPVLGATKR	ATKVG	GPWGGSGG	SFDITAE	180
Sbjct 121	FAMANGVISKKLHGKTSEGDIIQLTIHAF	CPVLGATKR	ATKVG	GPWGGSGG	SFDITAE	180
Query 181	QRLKSITVATGIAVTSIAFSYVDSAGQTQSA	GRWGGSGG	ETEPVIQLGDSEVL	TELSGTI	240	
Sbjct 181	QRLKSITVATGIAVTSIAFSYVDSAGQTQSA	GRWGGSGG	ETEPVIQLGDSEVL	TELSGTI	240	
Query 241	GNVDGLTVITSIKFVTS	SLKTYGPF	GAWCGSDT	PFPAIPVQQGS	AIVGFFARAGVYLDALG	300
Sbjct 241	GNVDGLTVITSIKFVTS	SLKTYGPF	GAWCGSDT	PFPAIPVQQGS	AIVGFFARAG+YLDALG	300
Query 301	VYVRSL	306				
Sbjct 301	VYVRSL	306				

— Dominio dirigente. Secuencia de Octapéptidos.
— Dominio JLR. Cambios de aminoácidos.

Figura 9. Comparación de las secuencias de aminoácidos de BGAF1 y la secuencia traducida de la clona obtenida en este trabajo.

QUERY es la secuencia clonada en este trabajo y Sbjct es la secuencia reportada por Blanchard (2000) con número de acceso AF232008.2. El análisis de comparación se realizó mediante la herramienta de BLAST de la página de NCBI.

Adicionalmente, se buscaron los dominios importantes para su función. Hacia la región amino entre los aminoácidos 32-149 se encuentra el dominio dirigente, y entre los aminoácidos 174-304 se encuentra el dominio JLR. Contiene además la secuencia de dos octapéptidos (G(P/R)WGGSGG), que aparecen separadas por 40 aminoácidos (Figura 9), los cuales se ha visto que están implicados en la unión con la BGLU (Blanchard *et al.*, 2000).

Blanchard y colaboradores (2000) determinaron que la BGAF1 es una lectina que es capaz de unir azúcares. Debido a que la que se clonó en este trabajo tiene diferencias en varios aminoácidos, se solicitó la predicción de la posible estructura tridimensional de ambas proteínas mediante la aplicación Zhanlab de la Universidad de Michigan (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu>), para determinar si mantenía el sitio de unión por el carbohidrato y por tanto su función. La secuencia de aminoácidos de la clona obtenida en este trabajo se obtuvo a través de la predicción hecha en el programa Snap Gene.

Ambas proteínas presentan una estructura terciaria similar, la reportada en la literatura muestra 19 hojas beta (Figura 10 A), mientras que la BGAF1 clonada en este trabajo podría contener 20 hojas beta (figura 10 B). El dominio dirigente hacia el amino-terminal es una región muy desordenada, que se encuentra en las dos proteínas (en color azul en la figura 10 C).

El dominio de jacalinas se encuentra en la región carboxilo terminal de ambas proteínas, se encuentra más estructurada y es en ella en donde se encuentra el sitio de unión a manosa (en color amarillo en la figura 10 C). El gen que se clonó se traduce a una proteína que si tiene el sitio característico de unión a manosa y en el que se encuentra un sólo cambio en un aminoácido, V294I, en comparación con la previamente reportada (Figura 10). Ya que ambos aminoácidos son hidrofóbicos, podría sugerirse que la proteína que se produjo en este trabajo podría mantener su capacidad de unir al carbohidrato, aunque esto hay que corroborarlo experimentalmente.

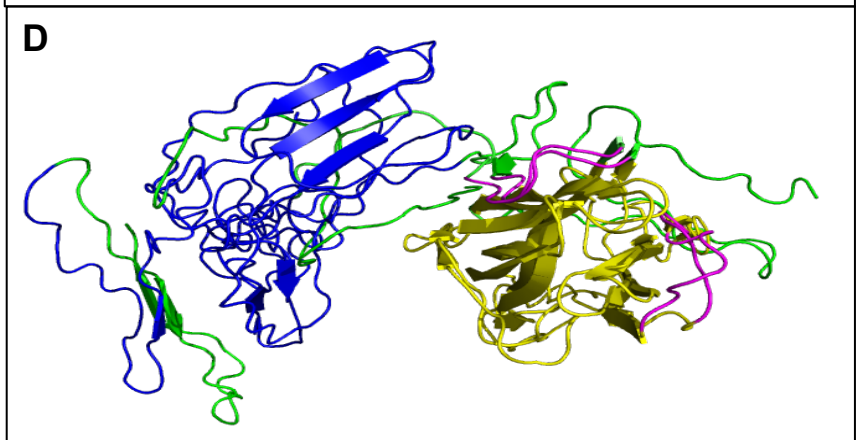
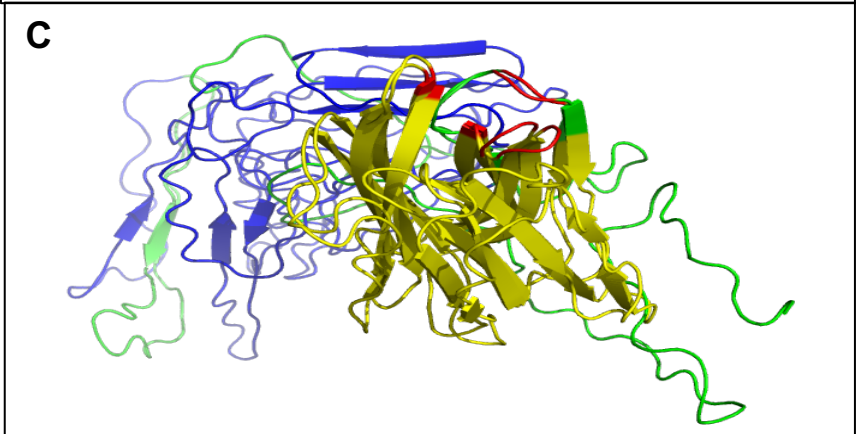
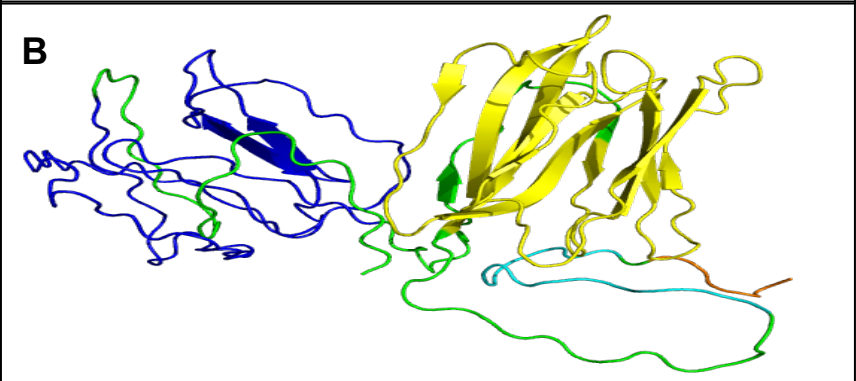
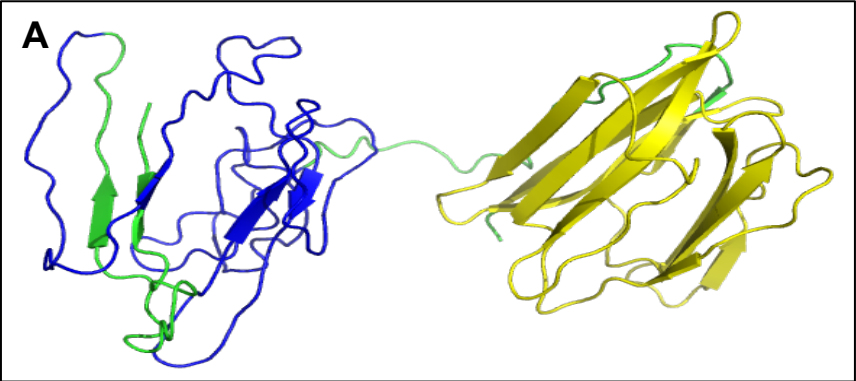


Figura 10. Comparación de las predicciones de las estructuras tridimensionales de ZmBGAF1, entre la reportada y la clonada.

A. Predicción de la estructura tridimensional reportada por Blanchard (2000) con número de acceso AF232008.2. **B.** El modelo de la estructura de BGAF1 clonada del maíz V535 se muestra con los aminoácidos de las secuencias V5 y His, en color cian y naranja, respectivamente. **C.** Alineamiento de las estructuras observadas en A y B, vista frontal, se remarcan los aminoácidos que interaccionan con la manosa (en rojo). **D.** Alineamiento de las estructuras observadas en A y B, vista desde arriba, en rosa se destacan las dos secuencias de octapéptidos (G(P/R)WGGSGG), que podrían estar involucrados en la unión de la BGLU. El alineamiento de ambas estructuras se realizó mediante el programa PyMOL.

Subclonación del gen *BGAF1*

Al corroborar que se tenía el gen que codifica para la BGAF1 se continuó con su subclonación. El proceso se realizó mediante la recombinación Gateway. También se corroboró la recombinación entre la secuencia del gen que codifica para la BGAF1 con las colas de attB (adicionadas mediante PCR al vector pGEM-T-Easy-BGAF1) y el vector de entrada pDONR221, mediante ensayos de restricción. Como control se restringió el vector vacío, el cual tiene tres sitios de corte para la enzima Mlu1 y cuando el vector ya tiene el gen de interés, en este caso BGAF1, se pierde un sitio de reconocimiento para la enzima, por lo que Mlu1 solo produce dos fragmentos de restricción (Figura 11).

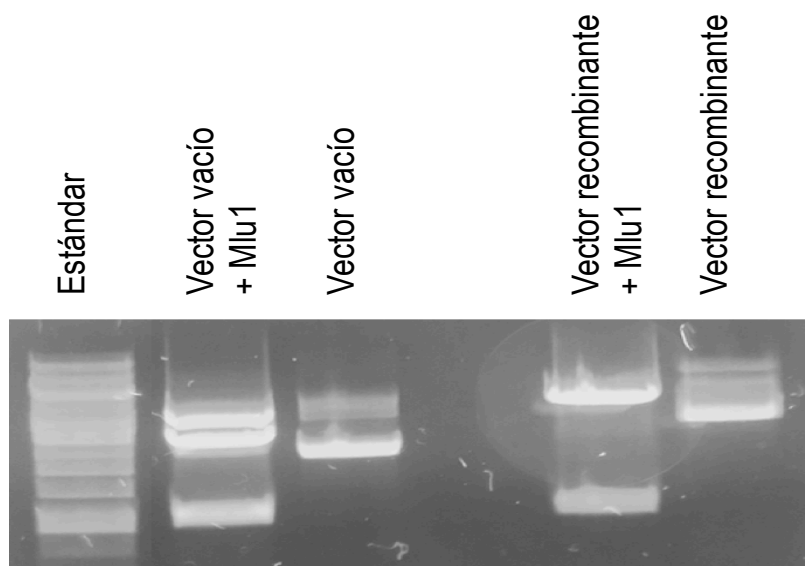


Figura 11. Patrón de digestión con enzimas de restricción al vector pDONR221-BGAF1.

Gel de agarosa 0.7%, los ensayos de restricción se realizaron con la enzima Mlu1.

El segundo paso en el protocolo de la tecnología Gateway fue recombinar el vector pDONR221-BGAF1 con el vector de expresión pDEST42, con ayuda de la enzima LR clonasa. Los vectores pDONR221 y pDEST42 contienen secuencias que les permiten tener resistencia a los antibióticos kanamicina y ampicilina respectivamente, por lo que *E. coli* DH5 α transformada solo con el vector pDONR221 no recombinado no crece en el medio que contiene ampicilina.

Se extrajo el vector pDEST42-BGAF1 de las bacterias transformadas y se realizó el ensayo de restricción. El vector vacío restringido con Mlu1 produce tres bandas, mientras que el vector recombinado digerido con Mlu1, sólo produce dos bandas del peso molecular esperado (Figura 12).

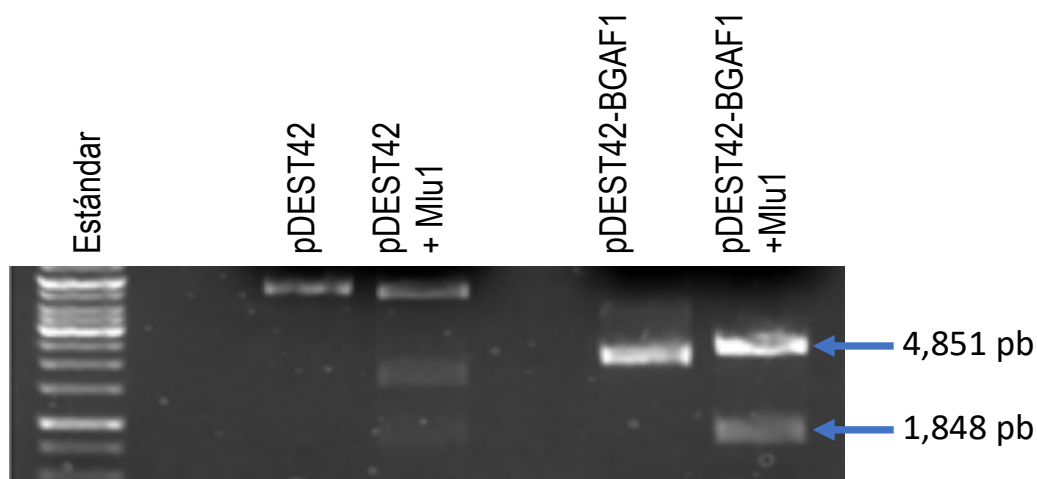


Figura 12 Patrón de digestión con enzimas de restricción al vector pDEST42-BGAF1.

Gel de agarosa 0.7% teñido con bromuro de etidio, el ensayo de restricción del vector se realizó utilizando Mlu1.

Obtención de BGAF recombinante

Para producir a la proteína recombinante se transformaron células de *E. coli* BL21-RIL con el vector pDEST42-BGAF1 y se creció en medio LB con ampicilina y cloranfenicol. La cepa contiene el plásmido RIL que contiene los genes que RNAt argU, ileY y leuW, estos genes codifican para los tRNAs que reconocen los codones de arginina AGA y AGG, el codón de isoleucina AUA y el codón de leucina CUA, respectivamente.

El vector pDEST42 codifica para la proteína represora LacI, la cual regula al operador lac que está previo al inicio de los genes de la BGAF1, evitando la transcripción en ausencia de un inductor del operón lac, por lo que la presencia del análogo de lactosa, el isopropil-tiogalactosido o IPTG, permite que la proteína represora se desprenda de la región del operador lac y pueda ser reconocido por la polimerasa y empezar la transcripción del gen de interés (LaVallie 1995).

Una vez que el cultivo *E. coli* BL21 con el inserto pDEST42-BGAF1 alcanzó la densidad óptica adecuada, se le agregó IPTG. Se evaluó el tiempo óptimo de la inducción de la proteína BGAF1 recombinante, muestreando cada 30 min durante 4 h a 37 °C. Al realizar la electroforesis se encontraron dos bandas de proteínas que aparecieron a partir de la primera hora de inducción, a aproximadamente 27 kDa, sin embargo dicha doble banda no se volvió a observar, por lo que podría ser la misma proteína degradada, y a 3.5 h se obtuvo la mayor cantidad de proteína recombinante (Figura 13).

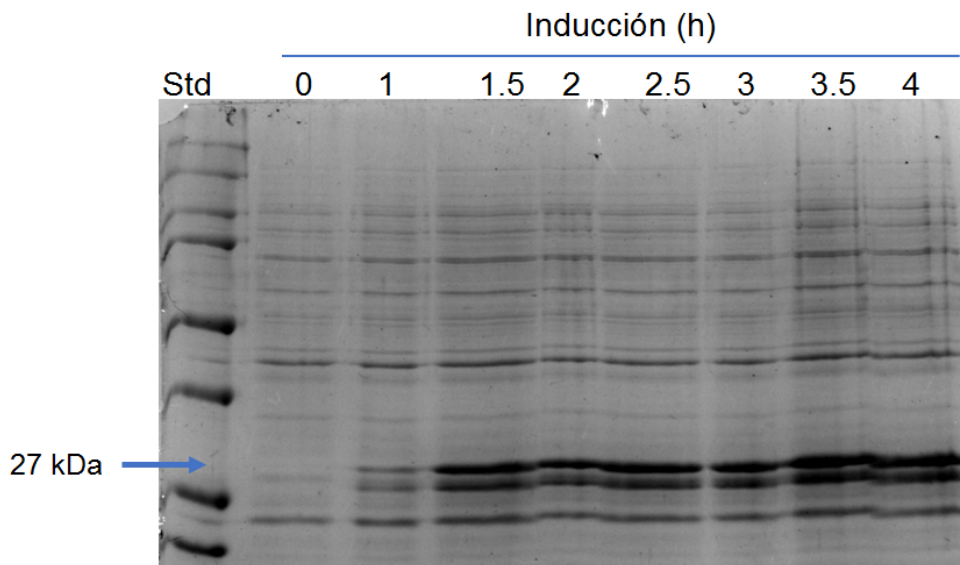


Figura 13. Curva temporal de inducción de BGAF1 recombinante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% de las alícuotas tomadas a diferentes tiempos después de la adición de IPTG a las células *E. coli* BL21-pDEST42-BGAF. El gel fue teñido con azul de Coomassie. Desde la primera hora se observa la aparición de dos bandas de a aproximadamente 27 kDa, aunque la mayor inducción se observa a 3.5 h.

Se realizó la lisis de las células obtenidas después de 3.5 h de inducción y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min para obtener el botón y el sobrenadante, donde se analizó cual fracción contenía a la BGAF. Como se observa en la figura 14, la mayor parte de la proteína permaneció en la fracción no soluble.

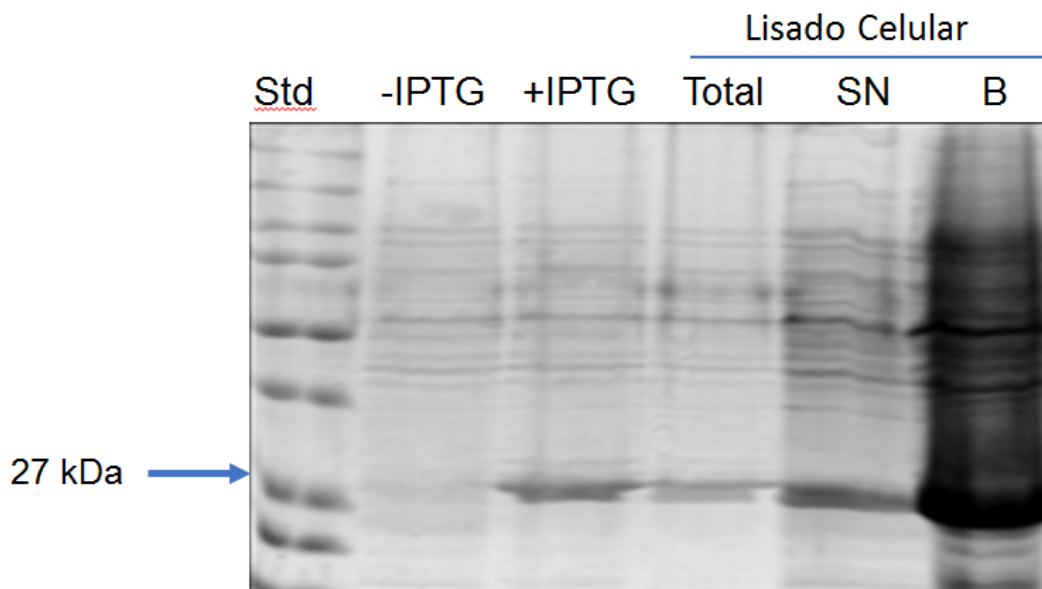


Figura 14. Producción de proteína recombinante a 37°C.

Corrimiento electroforético en gel de poliacrilada-SDS de las fracciones celulares totales inducidas o no con IPTG y de las fracciones obtenidas después de lisar las células (Lisado Total) y su presencia en el sobrenadante (SN) o botón de estas células (B). El gel fue teñido con azul de Coomassie. La proteína se observa aproximadamente a 27 kDa, tanto en el B como en el SN del lisado celular.

Debido a que la proteína recombinante BGAF1 se produjo con dos etiquetas, V5 seguida de poliHis, a través de insertar la secuencia del gen en el vector pDEST42, omitiendo los nucleótidos del codón de paro, la purificación de la proteína recombinante se realizó mediante su interacción con una resina de Ni^{2+} , que permite la unión específica de las His.

La fracción soluble se hizo pasar a través de la resina y se colectó la fracción no unida (NU), después se lavó la resina 7 veces con 3 mL de amortiguador de equilibrio de resina y se realizó la elución con concentraciones crecientes de imidazol, todas las fracciones fueron colectadas.

Como se evidencia en la figura 15A, no se observa que haya una proteína alrededor de los 27 kDa, que es la proteína de interés, mientras que una banda de 50 kDa se obtuvo cada vez más intensa a medida que la concentración de imidazol se incrementa desde 0.1 hasta 0.6 M. Debido a esto se separaron en el gel también las fracciones NU y las de los diferentes lavados (L), observando que la proteína se fue despegando conforme se lavó la resina, pese a que la concentración de Imidazol es apenas de 50 mM. El ensayo se repitió en varias ocasiones cambiando la concentración de sal en la solución de lavado y el resultado fue el mismo, en la fracción no unida y en los lavados se van quedando las proteínas que no interaccionan con la resina y entre ellas la proteína de interés (Figura 15B).

Debido a que la mayor parte de la proteína de interés se queda en la fracción no unida a la columna, se consideró que la cola de histidinas probablemente no estaba expuesta al solvente, por lo que al sobrenadante se le añadió 6 M de urea y se realizó de nuevo el proceso de purificación, además de que se suplementaron todos los amortiguadores con 6 M urea. Este tratamiento permitió la interacción de la proteína recombinante con la resina y en las eluciones con imidazol (Figura 16), también se observó que ya no aparece la banda de 50 KDa. También se realizaron ensayos usando una menor concentración de detergente, sin embargo, no fueron exitosos al no lograr la interacción de la proteína con la resina (datos no mostrados).

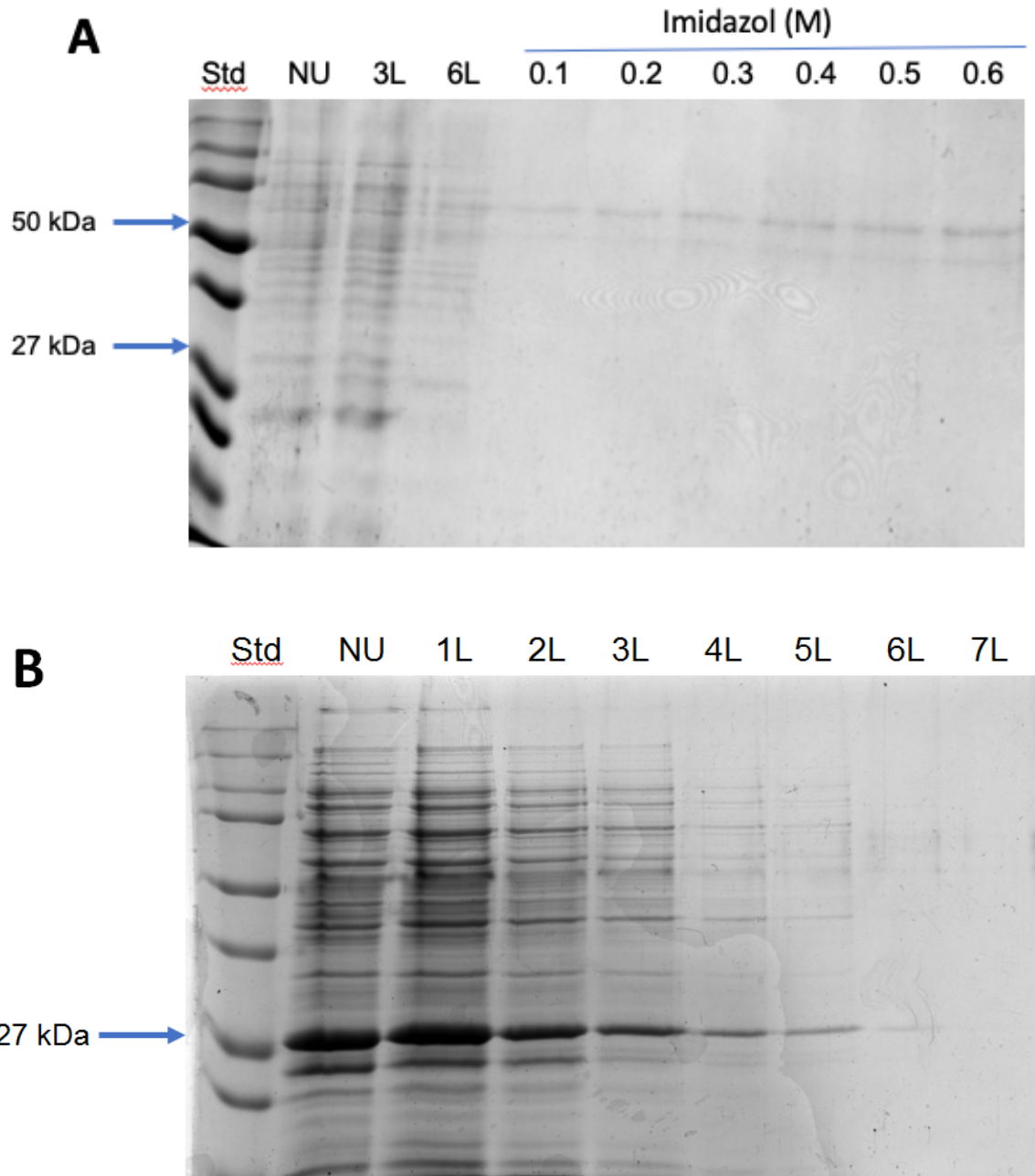


Figura 15. Perfil de las proteínas obtenidas del protocolo de purificación de la fracción soluble que contiene a la BGAF en una columna de Ni²⁺.

A. Separación electroforética de las fracciones no unida (NU), los lavados (L), 3L y 6L. La proteína que eluyó con el gradiente de Imidazol, banda de peso molecular mayor a 50 kDa. **B.** Corrimiento electroforético de las fracciones de los lavados. Se observa la pérdida progresiva de la proteína de interés conforme se lava. Ambos geles fueron teñidos con azul de Coomassie.

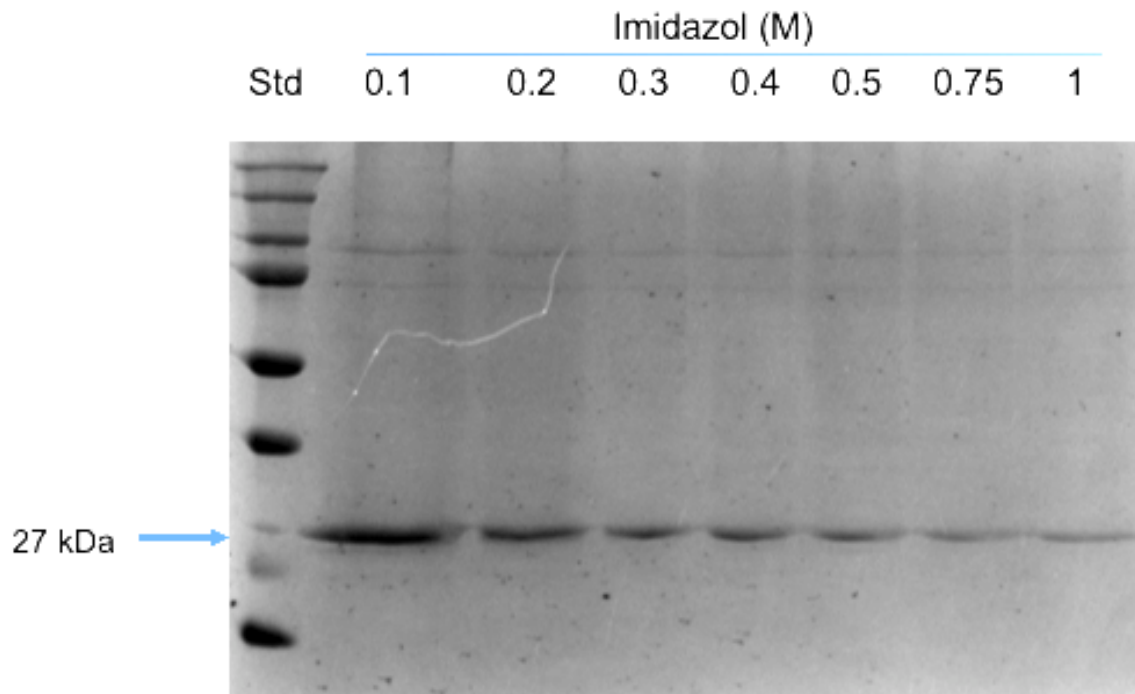


Figura 16. Interacción de la BGAF con la resina de Ni²⁺.

Separación electroforética de las fracciones que se obtuvieron de la purificación de la proteína recombinante tratada con urea. La tinción se realizó con azul de Coomassie. Se confirma que la BGAF1 tiene una etiqueta de histidinas que permite la unión a una resina de Ni²⁺, sin embargo eluyó con bajas concentraciones de imidazol.

Para los estudios de interacción proteína-proteína (HXK-BGAF1), se requiere que ambas proteínas se encuentren de manera soluble, por lo que se modificó la temperatura y el tiempo de inducción para permitir que la proteína se plegara de manera adecuada y así aumentar su proporción en la fracción soluble. La inducción a 25 °C durante toda la noche permite el aumento de la proteína BGAF1 en la fracción soluble (Figura 17). Las células crecidas durante un tiempo similar, pero sin IPTG no producen BGAF1.

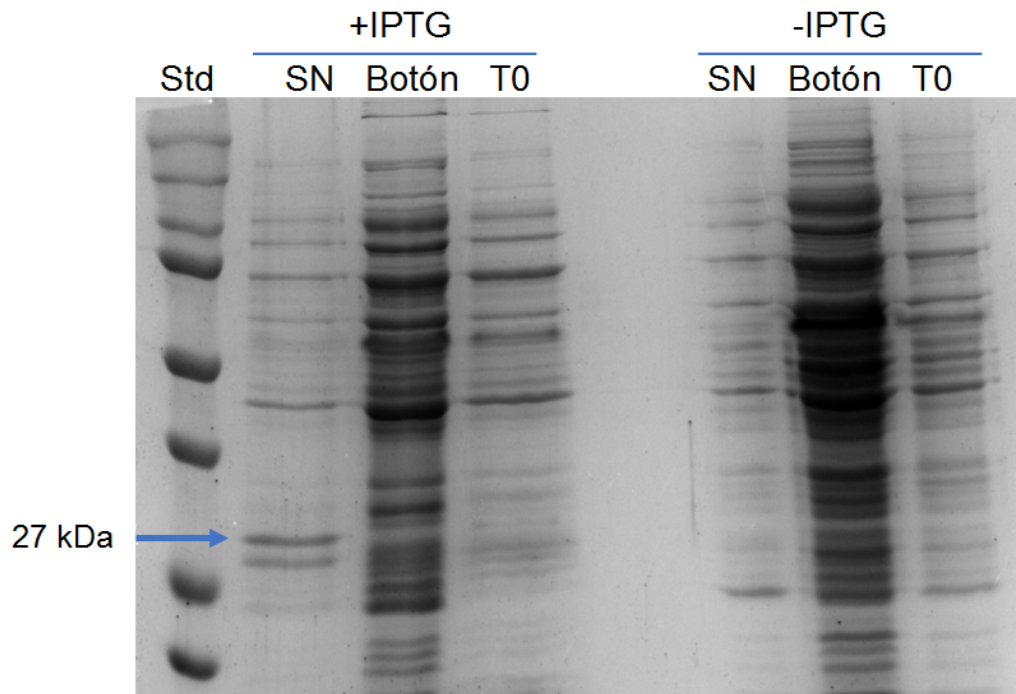


Figura 17. Inducción de proteína recombinante a 25°C durante toda la noche. Se cultivaron *E. coli* BL21-pDEST42-BGAF1 y *E. coli* BL21 sin vector. Se indujo la producción de la proteína añadiendo IPTG y creciendo las células durante toda la noche a 25 °C. El gel fue teñido con azul de Coomassie. Es evidente la aparición de una banda entre 25 y 37 kDa en el carril correspondiente al sobrenadante cuando se agregó IPTG. T0 es el punto donde se inició la inducción.

Se volvió a realizar la purificación de la proteína recombinante, mediante la interacción del sobrenadante de un cultivo de células crecidas toda la noche a 25°C en presencia de IPTG con una resina de Ni²⁺. Después de colocar el sobrenadante se colectó la fracción NU y se procedió a lavar 7 veces con 3 mL de amortiguador de equilibrio de resina y después se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol. Todas las fracciones fueron colectadas. Como se observa en la Figura 18, a pesar de tener una gran cantidad de proteína en el sobrenadante, la mayor parte de la proteína de interés que se encuentra en aproximadamente 27 kDa no se une a la columna. Si hay proteína que se queda unida a la columna y eluye con la adición de imidazol, las bandas que se observan son principalmente cuatro, tres entre los 25 y 37 kDa, y otra más en aproximadamente 70 kDa.

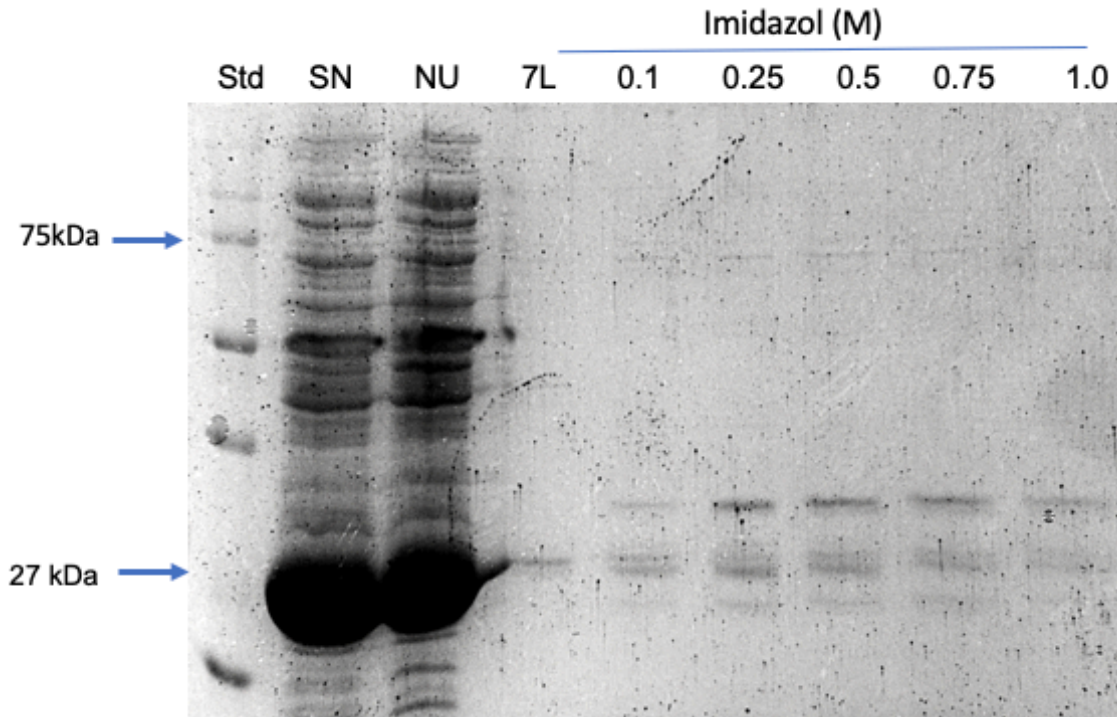


Figura 18. Purificación de BGAF1 producida a 25°C.

Corrimiento electroforético de las fracciones de la purificación de la proteína recombinante BGAF1. El gel se tiñó con azul de Coomassie. Se observa en el sobrenadante (SN) una banda en 27 kDa perteneciente a la proteína de interés. Se pierde una gran cantidad de proteína, ya que el perfil de proteínas es prácticamente el mismo entre el SN y la fracción NU. El gradiente de imidazol muestra bandas de proteínas que se unen, entre 25 y 37 kDa y una más en aproximadamente 70kDa.

La BGAF se puede obtener tanto de manera soluble como en el botón, sin embargo, no se obtiene en cantidades grandes, por lo que se decidió usar el sobrenadante después de la lisis y centrifugación de las células para tener una cantidad de proteína que permitiera medir la interacción. Lo anterior debido a que aún cuando se obtenía más proteína en su forma solubilizada con urea, no fue posible quitarle el detergente sin que se perdiera proteína, además de que la pérdida del detergente no asegura que la proteína este en su forma nativa. Por lo que para realizar los ensayos de interacción proteína-proteína se usó la proteína obtenida en la fracción soluble, carril SN de la figura 18.

Inducción y purificación de la HXK4 Δ 30-HA

Los ensayos de pull-down y que sugieren que BGAF podría estar interaccionando con la HXK, fueron realizados con HXK4 Δ 30-V5. En el laboratorio se tenía clonado al gen codifica para la enzima, pero con un tag distinto, el de hemaglutinina (HA; trabajo de la M. en C. Carolina Rodríguez Saavedra), pero no se había probado si se producía la proteína. Para los ensayos de interacción proteína-proteína, era necesario que ambas proteínas recombinantes contuvieran etiquetas diferentes, se procedió a la obtención del vector y la transformación de las células de *E. coli* BL21-RIL para la producción de la proteína HXK4 Δ 30-HA.

Se indujo la producción de la proteína durante 3.5 h a 37 °C. Como se observa en el gel de poliacrilamida-SDS se partió de la fracción del sobrenadante y la proteína se encontró en el peso molecular esperado aproximadamente 50 kDa, se observa que se enriquece en las fracciones eluidas con 0.1 a 0.5 M de Imidazol (Figura 19A). Se corroboró la presencia de la etiqueta de HA mediante un anticuerpo específico en un ensayo de inmunoréplica tipo Western contra dicho epítotope (Figura 19 B), la dilución del anticuerpo utilizada fue 1:2500, se observa la unión del anticuerpo en una banda en aproximadamente 50 kDa que corresponde a la HXK4 Δ 30-HA.

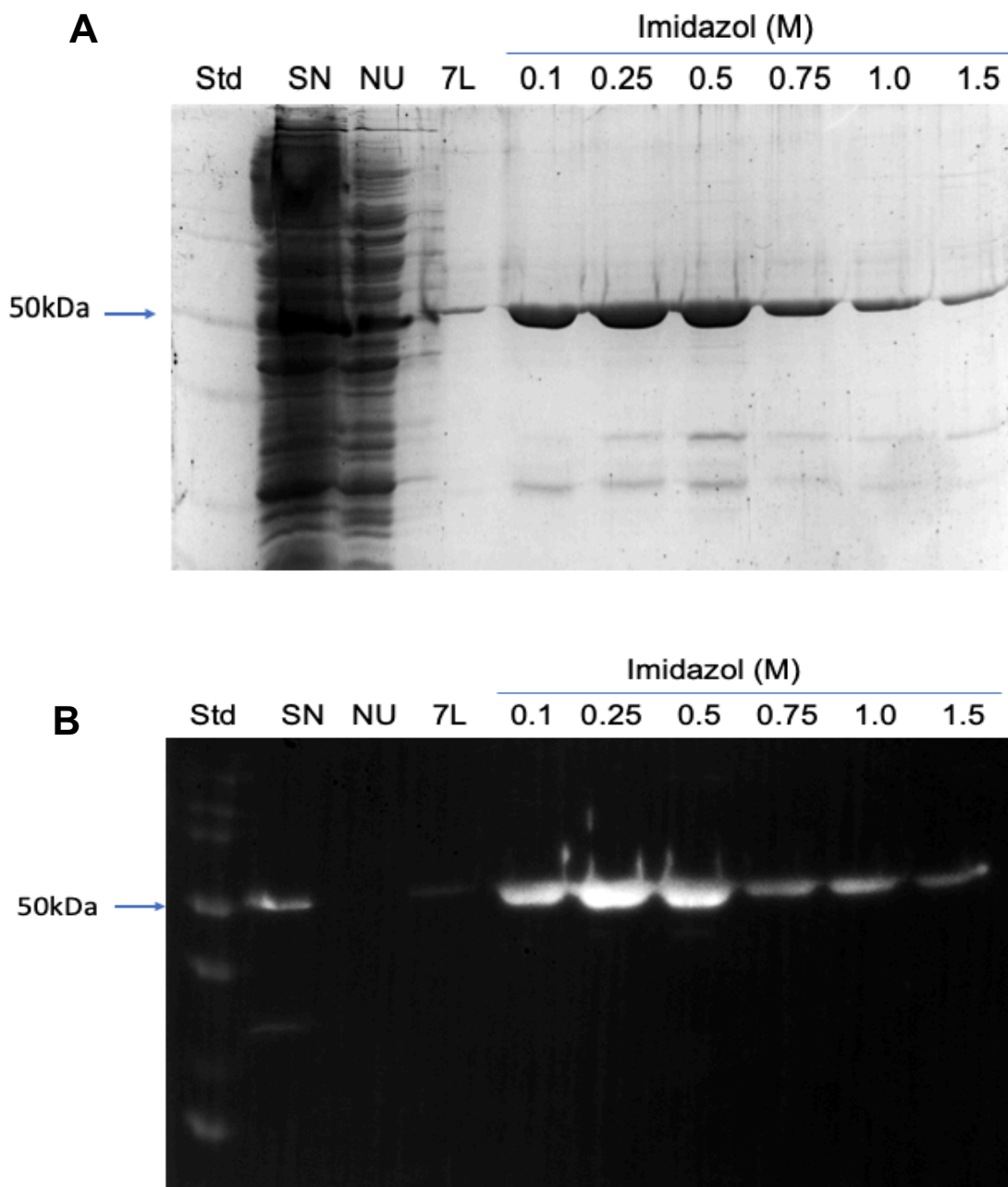


Figura 19. Perfil de purificación de la proteína recombinante HX4 Δ 30-HA

A. Separación mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS y su tinción por coomassie de las fracciones del perfil de elución de la proteína HX4 Δ 30-HA mediante la interacción del HisTag en la columna de Ni²⁺. **B.** Detección de la Hemaglutinina en ZmHX4 Δ 30-HA a través de un anticuerpo específico en un ensayo de inmunoréplica tipo Western.

Ensayo de interacción proteína-proteína: Inmunoréplica tipo Far Western.

Para el ensayo de Far Western primero se separaron en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % 30 μg de proteína del sobrenadante de células que producen BGAF1 (proteína que se observa como SN en la Figura 18) y 20 μg de ZmHXK4 Δ 30-HA. Se realizó la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de PVDF (tinción con amido-black en el anexo 4) y se bloqueo con leche Svelty al 5 % durante 1 h, y después de los lavados, se llevaba a cabo alguna de las siguientes condiciones:

1) Poner en contacto la membrana con el anticuerpo anti-HA, en donde solo ZmHXK4 Δ 30-HA sería reconocida y no BGAF1-V5. Este control era necesario para determinar que solo la proteína ZmHXK4 Δ 30-HA era detectada por el anticuerpo, tal y como se observa en la Figura 20A.

2) Poner en contacto la membrana con la mezcla de las fracciones que tienen enriquecida a ZmHXK4 Δ 30-HA (mezcla de las fracciones 0.1, 0.25 y 0.5 M del gradiente de imidazol, desaladas), su incubación a temperatura ambiente durante 5 h y su posterior lavado. En esta membrana se darían las condiciones para que puedan interaccionar ZmBGAF1 y ZmHXK4 Δ 30-HA. La interacción se reveló al incubar la membrana con anti-HA. Se observa en la Figura 20B la aparición de una banda tenue en aproximadamente 70 kDa.

3) Para determinar si la banda revelada con el anticuerpo en el ensayo de inmunoréplica tipo Far Western también reaccionaba con anticuerpo anti-V5, se utilizó otra membrana para detectar la presencia de ZmBGAF1, incubando con anti-V5. Como se observa en la Figura 20C se detectan cuatro proteínas, dos que se encuentran entre los pesos moleculares de 25 y 37 kDa, pero que son de baja intensidad, y otras dos bandas de pesos moleculares mayores y que tienen una intensidad alta, están entre los pesos de 50 y 70 kDa (Figura 20C).

En la membrana incubada con ZmHXK4 Δ 30-HA y revelada con el anticuerpo HA, solo se encontró 1 banda de aproximadamente 70 kDa. Considerando que BGAF1 en forma monomérica podría encontrarse en los pesos moleculares entre 27 y 32 kDa, el que se encuentre reacción con el anticuerpo anti-V5 en un peso molecular cercano a los 70 kDa podría sugerir que BGAF1 se encuentra formando dímeros y que son estos los que están interaccionando fuertemente con la HXK.

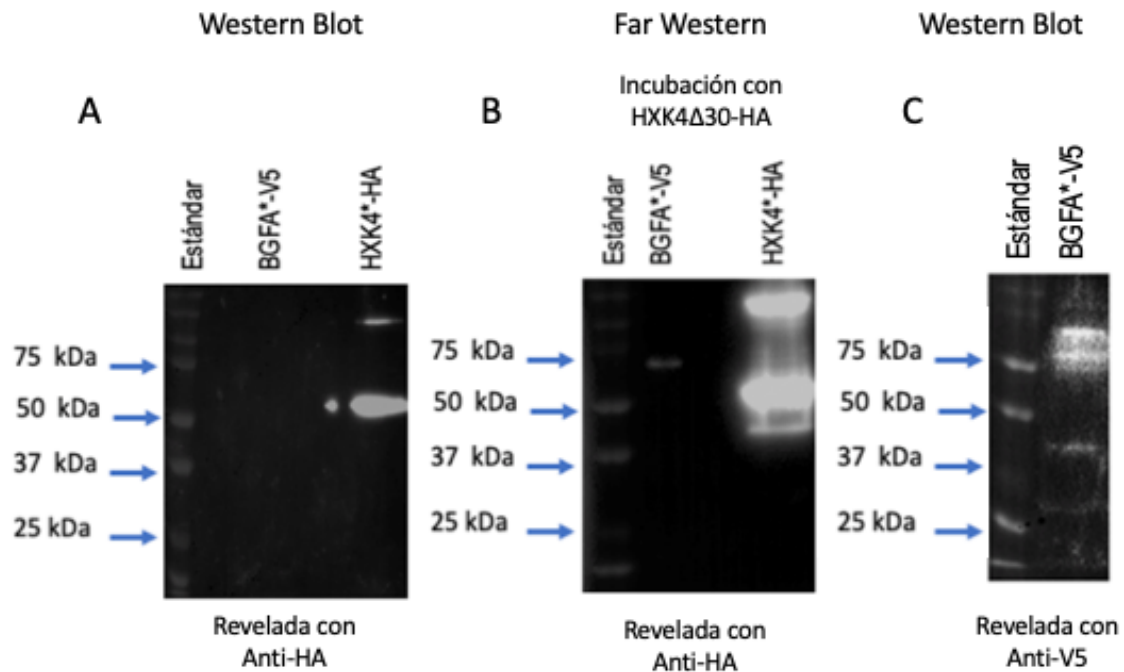


Figura 20. Ensayo de interacción inmunoréplica tipo Far-Western entre BGAF1 y HXK4 Δ 30.

A Se separó el sobrenadante del lisado de células que produjeron a BGAF1-V5 y a ZmHXK4 Δ 30-HA purificada en un gel de poliacrilamida SDS al 12 %, se transfirió la membrana a una membrana de PVDF y se reveló con el anticuerpo anti-HA. **B.** Se separó el sobrenadante del lisado de células que produjeron a BGAF1-V5 y a ZmHXK4 Δ 30-HA purificada mediante un gel de poliacrilamida-SDS y su posterior transferencia a una membrana de PVDF, la membrana fue incubada con ZmHXK4 Δ 30-HA y posteriormente se reveló con el anticuerpo anti-HA. **C.** El sobrenadante del lisado del cultivo celular que produce BGAF1 fue separado en un gel de poliacrilamida-SDS al 12 % y transferido a una membrana de PVDF, la membrana se hizo reacción con el anticuerpo anti-V5.

Discusión.

Características de la secuencia de BGAF de maíz

La BGAF1 reportada de maíz es una proteína con 306 aminoácidos con un peso molecular propuesto de 31.7 kDa. La proteína recombinante se ha expresado en el sistema heterólogo de bacteria, producido en *E. coli* en una cantidad moderada. Se ha reportado que su movilidad electroforética es más alta que la aislada de tejido vegetal, encontrándose en un peso molecular de 27.5 kDa (Blanchard et al, 2000). Lo anterior es similar a lo encontrado en este trabajo, ya que la proteína se predice que tiene un peso molecular de 32 kDa y la banda de proteína producida se encuentra en un peso molecular aproximado de 27 kDa. Esto puede explicarse por el contenido de aminoácidos hidrofóbicos, el cual es alrededor de un 33 % ya que las proteínas altamente hidrofóbicas tienden a unirse al SDS en una proporción mayor en comparación con las hidrofílicas, por lo que migran ligeramente más rápido en el SDS-PAGE (Kittur *et al.*, 2007).

Aunque con los resultados de detección de la proteína recombinante con el anticuerpo V5 también se encontró reacción, aunque moderada, no solo con una banda de 27 kDa sino también con una de aproximadamente 32 kDa (Figura 20C), lo cual podría sugerir que hay una porción de la proteína que si puede separarse en el gel en el peso molecular predicho.

Se encontró que la secuencia reportada no es idéntica a la que se clonó, lo anterior puede explicarse porque en este trabajo se usó un maíz distinto al del reporte del 2001, aquí fue usado el maíz VS535 y en el trabajo de ellos el maíz H95, por lo que dichos cambios podrían deberse a la variedad del maíz y no necesariamente a una mutación durante la extracción del gen o la subclonación del mismo.

El maíz que se uso en este trabajo es una variedad con un ciclo intermedio precoz, su grano es blanco cristalino, con mazorca mayor de 20 cm, elotera, la plata crece 230-260 cm, tiene buena tolerancia al acame, con un rendimiento potencia de 6.5 Ton./Ha, un tiempo de cosecha de 115-120 días y tiene tolerancia enfermedades

forliares (Marquez-Sánchez, 2008; Gomez-Montiel *et al.*, 2016). Lo anterior hace ventajoso el trabajo con este maíz.

Por otra parte, uno de los aminoácidos que son distintos entre ambas secuencias se encuentra en el dominio JRL, que es el que une a la manosa, sin embargo, es un cambio de un aminoácido hidrofóbico por otro hidrofóbico V294I, por lo que es posible que la actividad de unión no se vea afectada. Sin embargo, es necesario realizar ensayos de interacción con manosa para determinar su capacidad de unión.

Es interesante que la mayor parte de la proteína no se encuentre estructurada, lo que posiblemente le ayude en su interacción con otras proteínas. Respecto a la unión con el factor agregante se encontró que en la secuencia traducida de la BGAF1 clonada, contiene la secuencia de dos octapéptidos (G(P/R)WGGSGG), que aparecen separadas por 40 aminoácidos, los cuales se demostró que están implicados en la unión con la BGLU (Blanchard *et al.*, 2001).

BGAF recombinante se produce abundantemente pero su purificación es pobre.

BGAF se produjo en abundancia, cuando se realiza la inducción e incubación de las células transformadas con el vector pDEST42-BGAF1 a 37 °C, se produce la proteína pero queda en la fracción insoluble. La proteína solubilizada con urea es capaz de unirse a la columna de afinidad para etiquetas de His y se purifica, aunque no en una proporción comparable con la que se produce. Se ha propuesto que, aunque la velocidad de transcripción y traducción es menor a bajas temperaturas, la velocidad de plegamiento de la proteína es prácticamente la misma a 20 °C que a 37 °C, lo que sería benéfico para producir proteínas correctamente plegadas y evitar la formación de cuerpos de inclusión (Caspeta *et al.*, 2009). La producción de la proteína utilizando una temperatura de 25 °C y durante un mayor tiempo, si permitió su plegamiento de tal forma que se favoreció encontrar una mayor proporción de BGAF en la fracción soluble.

Pese a que la proteína se encontró en la fracción soluble no se unió a la resina de Ni²⁺ por lo que no permitió su purificación. Lo anterior podría deberse a que la proteína no contuviera la etiqueta de His, y que fuera un error al clonarla, sin embargo, la proteína si reacciona con un anticuerpo que se une a V5, el cual es adicionado junto a la cola de Histidinas al hacer la recombinación en pDEST42, por lo que la etiqueta si se encontraba. Pensando en ello, se tomó la fracción soluble y se le añadió detergente, se realizó la purificación de la proteína usando la urea en todo el proceso y como se observa en la Figura 16 la proteína si se une a la resina. Por lo que la explicación a lo encontrado podría sugerir que la BGAF1 en su estado nativo tenga a la secuencia de las histidinas oculta. En el modelo de la proteína mostrado en la Figura 10 pareciera que la secuencia de His se encuentra expuesta, sin embargo, en esa región del carboxilo terminal se observan asas que junto con la región de la His podrían interactuar y/o dejar oculta la etiqueta. Una posibilidad para que esto no ocurriera hubiera sido colocar la etiqueta en la región amino de la proteína, sin embargo, en esa zona la proteína se observa no estructurada y podría ocurrir lo mismo.

Kittur y colaboradores (2007) purificaron a la proteína usando una resina de afinidad de lectina de lactosil-agarosa, que tiene como característica la unión a la proteína a través de su interacción con la zona dirigente. La proteína nativa fue purificada de brotes de maíz homogeneizados y la proteína recombinante se obtuvo a partir de cultivos de *E. coli*, los homogeneizados se hicieron interactuar con la resina previamente mencionada. Por lo que la propuesta para mejorar los resultados y obtener a la proteína pura es usar este tipo de resina.

Hay interacción *in vitro* entre una fracción no pura de BGAF y la HXK4 purificada

Para los ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro*, hay varios tipos de ensayos que se pueden realizar, incluidos pull-down y co-inmunoprecipitación, sin embargo se eligió el método de inmunoréplica tipo Far Western, debido a que es un método que permite detectar el peso molecular de las proteínas con las que hay

interacción, es selectivo debido al uso de anticuerpos y permite detectar interacción aún con una cantidad baja de proteína. No obstante, es bien sabido que muchos tipos de interacción proteína-proteína sí ocurren de hecho incluso después de que una de las proteínas se haya reducido y desnaturalizado al realizar el PAGE-SDS y la inmunoréplica tipo Western (Hall, 2004).

Afortunadamente, para llevar a cabo los ensayos de interacción proteína-proteína sí se logró obtener de una forma enriquecida y en concentraciones altas a ZmHXK4 Δ 30-HA, 1.4 a 1.6 mg de HXK por cada 1000 mL de cultivo. El peso molecular aproximado de la proteína es de 50 kDa y se produjo con una etiqueta distinta a la que presenta BGAF1-V5. A concentraciones bajas se detectaba la proteína en 50 kDa y a concentraciones altas también se lograba detectar a una proteína de peso molecular muy alto (aproximadamente 110 kDa, Figura 20B).

Mientras que la fracción que se usó de BGAF1 no fue purificada y al realizar una inmunoréplica tipo Western fue identificada usando el anticuerpo anti-V5. En esta fracción se encontró reacción con proteínas, se observa muy poca señal en bandas que están en los rangos de 25 a 37 kDa, y las bandas de 50 a 75 kDa tienen una mayor señal, lo que sugiere que la ZmBGAF1 se encuentra en forma de monómero y posiblemente como dímero. Dichos resultados coinciden con lo reportado por Kittur y colaboradores en 2007, quienes observaron el dímero de BGAF1 en aproximadamente 64 kDa. Sin embargo, es necesario secuenciar estas proteínas para que de manera inequívoca podamos afirmar lo anterior.

En el ensayo de inmunoréplica tipo Far Western, se mantuvo inmovilizada a BGAF-V5 y de manera soluble a ZmHXK4 Δ 30-HA. La banda de interacción se reveló con el anticuerpo anti-HA detectándose una banda en aproximadamente 75 kDa, misma que reacciona con el anticuerpo anti-V5. Sin embargo, dicha interacción no se observa con la proteína de 25 a 37 kDa que también fueron detectadas con el anti-V5. Kittur y colaboradores en 2007 concluyeron que la BGAF1 tiene que estar como homodímero para poder interactuar y agregar a la Beta-Glucosidasa 1. Por lo que

podemos sugerir que la ZmHXK4 Δ 30-HA interacciona con el dímero de ZmBGAF1, pero no con su monómero *in vitro*. Sin embargo, se hacen necesarios más experimentos para corroborarlo, no solo *in vitro* sino también *in vivo*. La identificación de las proteínas que reaccionaron con el anticuerpo dará una primera clave sobre la interacción de estas proteínas.

Conclusiones.

Se clonó el gen que codifica para la ZmBGAF1 y se generó un protocolo para su producción y purificación. Aunque la purificación se logra solamente en presencia de urea y en una cantidad de 800 µg/L de medio.

Se obtuvieron las condiciones óptimas de producción y purificación de la ZmHX4Δ30-HA, el rendimiento logrado fue de 1.4 a 1.6 mg/L de medio.

Se observó una posible interacción de la ZmBGAF1 y ZmHX4Δ30 recombinantes *in vitro* en un ensayo de Far-Western en una banda de 70 kDa.

Perspectivas.

1. Para corroborar la presencia de las proteínas en el gel, se enviaron a secuenciar tres bandas 70 kDa, 65 kDa y 27 kDa a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI).
2. Debido a que un solo ensayo no es suficiente para demostrar la interacción entre dos proteínas, es necesario obtener a la proteína enriquecida en BGAF1 en forma soluble, esto lo podríamos lograr usando cromatografía de afinidad en una columna de lactosil-agarosa o bien mantenerla unida a la resina para realizar un “pull down” en donde se le haga pasar ZmHXK4Δ30-HA e identificar si efectivamente estas dos proteínas se encuentran interaccionando.
3. Adicionalmente, se tiene que demostrar la interacción entre ZmBGAF1 y ZmHX4Δ30 *in vivo*, lo cual se puede lograr a través de ensayos complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) en protoplastos de maíz.
4. Por último, para obtener la caracterización funcional de la proteína es necesario realizar ensayos de interacción con manosa para determinar su capacidad de unión.

Referencias

- Aguilera-Alvarado G. P. y Sánchez-Nieto S. 2017. Plant Hexokinases are Multifaceted Proteins. *Plant & Cell Physiology*. 58(7):1151-1160
- Aguilera-Alvarado G. P., Guevara-García A. A., Estrada Antolín S. A., y Sánchez-Nieto S. 2019. Biochemical properties and subcellular localization of six members of the HXK family in maize and its metabolic contribution to embryo germination. *BMC Plant Biology* 19 (1): 27.
- 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: 1571-1583.
- Blanchard D. J., Muzaffer C., Chen J., y Esen A., 2000. A specific β -glucosidase-aggregating factor is responsible for the β -glucosidase null phenotype in maize. *Plant Physiol*. 122(2): 563-572.
- Blanchard D. J., Muzaffer C., Chen J., y Esen A., 2001. Identification of β -Glucosidase Aggregating Factor (BGAF) and Mapping of BGAF Binding Regions on Maize β -Glucosidase. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 11895-11901.
- Caspeta L., Flores N., Pérez N. O., Bolívar F. y 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, 468–482.
- Cho J., Ryoo N., Eom J. S., Lee D. W., Kim H. B., Jeong S. W., Lee Y. H., Kwon Y.K., Cho M.H., Bhoo S. H., Hahn T. R., Park Y., Hwang I., Sheen J. y Jeon J. S. 2009. Role of the Rice Hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as Glucose Sensors. *Planta Physiol*. 149: 745-759.
- Cho Y. H., Yoo S.-D., and Sheen J. 2006. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127 (3): 579-589.
- Claeysen E., and Rivoal J. 2007. Isozymes of plant hexokinase: Occurrence, properties and functions. *Phytochemistry* 68 (6): 709-731.

- Colina-Tenorio, M. L. 2018. Estudio de las interacciones que guarda la subunidad ASA1 en el brazo periférico de la ATP sintasa de *Polytomella sp.* Tesis de Doctorado. IFC, UNAM.
- Esch L, Schaffrath U. 2017. An Update on Jacalin-Like Lectins and Their Role in Plant Defense. *Int J Mol Sci*; 18(7): 1592.
- Fillebeen C., Wilkinson N., Pantopoulos K. 2014 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for the Study of RNA-Protein Interactions: The IRE/IRP Example. *J. Vis. Exp.* 94, e52230, doi:10.3791/52230
- Gómez Montiel N. O., Palemón Alberto F., Reye García G., Hernández Galeno C. del A., Cantú Almaguer M. A., Juárez López P. y Ascencio Álvarez A. 2016. Rendimiento de grano y características fenotípicas de maíz: Efecto de ambiente y dosis de fertilización. *Revista Mexicana de ciencias Agrícolas* 7, (8): 1801-1813.
- Gómez-Anduro G., Cenicerros-Ojeda E. A., Casados-Vázquez L. E., Bencivenni C., Sierra-Beltrán A., Murillo-Amador B., y Tiessen A. 2011. Genome-wide analysis of the beta-glucosidase gene family in maize (*Zea mays* L. var B73). *Plant Molecular Biology* 77 (1-2): 159-183.
- Hall R.A. (2004) Studying Protein-Protein Interactions via Blot Overlay or Far Western Blot. In: Fu H. (eds) *Protein-Protein Interactions. Methods in Molecular Biology*, 261: 167-174.
- He X, Li L, Xu H, Xi J, Cao X, Xu H, Rong S, Dong Y, Wang C, Chen R, Xu J, Gao X, Xu Z. 2017. A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, OsJRL, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. *Plant Biol (Stuttg)* 19(2):257-267.
- Hopke J., Donath J., Blechert S., y Boland W. 1994. Herbivore-induced volatiles: The emission of acyclic homoterpenes from leaves of *Phaseolus lunatus* and *Zea mays* can be triggered by a β -glucosidase and jasmonic acid. *FEBS Letters* 352 (2): 146-150.
- Hopkins T. L., y Harper M. S. 2001. Lepidopteran peritrophic membranes and effects of dietary wheat germ agglutinin on their formation and structure. *Insect Biochemistry and Physiology* 47 (2): 100-109.

- Hu D. G., Sun C. H., Zhang Q. Y., An J. P., You C. X., Hao Y.J., 2016. Glucose sensor MdHXK1 phosphorylates and stabilizes MdbHLH3 to promote anthocyanin biosynthesis in apple. *PLoS Genet* 12: e1006273
- Hwang I., and Sheen J. 2001. Two-component circuitry in Arabidopsis cytokinin signal transduction. *Nature* 413: 383-389.
- Karve A., Rauh B. L., Xia X., Kandasamy M., Meagher R. B., Sheen J. y Moore B. 2008. Expression and evolutionary features of the hexokinase gene family in Arabidopsis. *Planta* 228: 411-425.
- Karve R., Lauria M., Virnig A., Xia X., Rauh B., and Moore B. L. 2010. Evolutionary Lineages and Functional Diversification of Plant Hexokinases. *Molecular Plant* 3 (2): 334-346.
- Kerppola T. K. 2008. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys.* (37): 465-487.
- Kim Y. M., Heinzel N., Giese J. O., Koeber J., Melzer M., Rutten T., Von Wirén N., Sonnewald U., and Hajirezaei M. R. 2013. A dual role of tobacco hexokinase 1 in primary metabolism and sugar sensing. *Plant Cell Environ* 36 (7): 1311-27.
- Kittur F. S., Lalgondar M., Yu H. Y., Bevan D. R., and Esen A. 2007. Maize β - Glucosidase-aggregating Factor Is a polyspecific Jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for β -Glucosidase aggregation. *The Journal of Biological Chemistry* 282(10): 7299-7311.
- Kristoffersen P., Brzobohaty B., y Höhfeld I. 2000. Developmental regulation of the maize Zm-p60.1 gene encoding a β -glucosidase located to plastids. *Planta*; 210 (3): 407-415.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lannoo N, Van Damme EJ. 2014. Lectin domains at the frontiers of plant defense. *Front Plant Sci* 5: 397.
- LaVallie E. 1995. Production of recombinant proteins in Escherichia coli. *Current Protocols in Protein Science* 0 (1):5.1.1-5.1.8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0501s00>

- Marquez-Sánchez, F. 2008. From creole corn varieties (*Zea mays L.*) to transgenic hybrids. I: Germplasm collection and improved cultivars. *Agricultura, sociedad y desarrollo* 5 (2): 151-166.
- McConn M., Creelman R. A., Bell E., Mullet J. E., y Browse J., 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *PNAS* 94 (10): 5473-5477.
- Miemeyer H. 1988. Hydroxamic acids (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. *Phytochemistry* 27 (11): 3349-3358.
- Moore B., Zhou L., Rolland F., Hall Q., Chen W. H., Yan-Xia L., Hwang I., Jones T., and Sheen J., 2003. Role of the *Arabidopsis* Glucose Sensor HXK1 in Nutrient, Light, and Hormonal Signaling. *Science* 300 (5617): 332-336.
- Nagano A. J., Fukao Y., Fujiwara M., Nishimura M. y Hara-Nishimura I. 2008. Antagonistic jacalin-related lectins regulate the size of ER body-type beta-glucosidase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 49 (6): 969-980.
- Nagano A. J., Fukao Y., Fujiwara M., Nishimura M. y Hara-Nishimura I. 2005. Activation of an ER-body-localized β -Glucosidase via a Cytosolic Binding Partner in Damaged Tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46 (7): 1140-1148
- Nakano R. T., Matsushima R., Nagano A. J., Fukao Y., Fujiwara M., Kondo M., Nishimura M., y Hara-Nishimura I. 2012. ERMO3/MVP1/GOLD36 is involved in a cell type-specific mechanism for maintaining ER morphology in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*; 7 (11): e49103.
- Nilsson A., Olsson T., Ulfstedt M., Thelander M., y Hans R. 2011. Two novel types of hexokinases in the moss *Physcomitrella patens*." *BMC Plant Biol* 11-32.
- Olsson T., Thelander M., and Ronne H. 2003. A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *J. Biol. Chem.* 278: 44439 - 44447.
- Pankoke H., Buschmann T., y Müller C. 2013. Role of plant β -glucosidases in the dual defense system of iridoid glycosides and their hydrolyzing enzymes in *Plantago lanceolata* and *Plantago major*. *Phytochemistry* 94: 99-107.

- Qing-Hu M., Wei-Bo Z., y Yun-Chao L. 2013. Jacalin domain in wheat jasmonate-regulated protein Ta-JA1 confers agglutinating activity and pathogen resistance. *Biochimie* 95 (2): 359-365.
- Reese. E.T. 1997. Degradation of Polymeric Carbohydrates by Microbial Enzymes. In: Loewus F.A., Runeckles V.C. (eds) *The structure, biosynthesis, and degradation of wood. Recent Advances in Phytochemistry* 11: 311-367.
- Rolland F., Baena-Gonzalez E., y Sheen J. 2006. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol* 57: 675-709.
- Sun M. H., Ma Q. J., Hu D. G., Zhu X. P., You C. X., Shu H. R. y Hao Y. J., 2018. The glucose sensor MdHXK1 phosphorylates a tonoplast Na⁺ /H⁺ exchanger to improve salt tolerance. *Plant Physiology* 176: 2977–2990.
- Tachibana K., Nakamura S., Wang H., Iwasaki H., Tachibana K., Maebara K., Cheng L., Hirabayashi J. y Narimatsu H., 2006. Elucidation of binding specificity of Jacalin toward O-glycosylated peptides: quantitative analysis by frontal affinity chromatography. *Glycobiology* 16 (1): 46–53.
- Terra, W. R. (1990). Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology* 35,181-200.
- Towbin H., Staehelin T., y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76 (9) 4350-4354.
- Wees S. C. M. Van, Swart E. A. M. de, Pelt J. A. van, Loon L. C. van, Pieterse C. M. J. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:8711–8716
- Yu H. Y., Kittur F. S., Bevan D. R., y Esen A. 2009. Lysine-81 and Threonine-82 on Maize β -Glucosidase Isozyme Glu1 Are the Key Amino Acids Involved in β -Glucosidase Aggregating Factor Binding. *Biochemistry* 48 (13): 2924-2932.
- Zhou Y., Zeng L., Gui J., Li J., Tang. J, Dong F., Yang Z., y Meng Q. 2017. Functional characterizations of β -glucosidases involved in aroma compound formation in tea (*Camellia sinensis*). *Food Research International*; 96: 206-214.

Anexos

Anexo 1. Contenido y preparación de las soluciones.

AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES PARA GEL AGAROSA

Amortiguador de corrida TAE 50X (para 1L)

Tris free base pH= 8.0	242 g
Ac. acético glacial	57.1 mL
*EDTA disódico	100 mL
H ₂ O Destilada	c.b.p 1 L

* 0.5 M EDTA: Agregar 186.1 g de sal de EDTA disódico en 800 mL de agua, ajustar el pH a 8 con NaOH, llevar al aforo a 1 L, agitar vigorosamente y esterilizar por autoclave.

Gel de agarosa 0.7 %

Agarosa	0.245 g
*Bromuro de etidio	35 µL
TAE 50X	750 µL
H ₂ O Destilada	c.b.p 35 mL

* Se colocaron 50.0 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL y 950 µL de agua estéril.

Medios de cultivo

Medio SOC (Medio de caldo superóptimo con represión por catabolito)

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 Luria-Bertani o LB

Peptona 140	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	1 L

AMORTIGUADORES PARA LA PURIFICACIÓN DE LA BGAF1.

Amortiguador de lisis

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 8.0	50 mM
NaCl	500 mM
Tritón X-100	1 %

Amortiguador de equilibrio de resina

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 8.0	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	50 mM
H ₂ O _d	c.b.p 100 mL
*Benzamidina	5 mM

*1 Tableta con inhibidores de proteasas (cOmplete ULTRA Tablets, Mini EDTA-Free, 05892791001 Roche)

*Se añaden justo antes de usar.

AMORTIGUADORES Y SOLUCIONES PARA GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Amortiguador de carga (para preparar 1 mL)

[Stock]	Volumen añadido
TRIS/HCl 1 M pH 6.8	350 µL
SDS 20 %	250 µL
Glicerol 50 %	150 µL
Ditiotreitol (DTT) 1M	160 µL
Azul de Bromofenol 20 %	20 µL
H ₂ O c.b.p.	1 mL

Amortiguador de corrida

Tris Base	6.06 g (50 mM)
Glicina	28.53 g (380 mM)
SDS	10 g (1 %).
H ₂ O c.b.p.	1 L

Solución teñidora de azul de Coomassie

Coomassie Brilliant Blue G0.125 % p/v

Metanol	50 % v/v
Ácido acético	10 % v/v

Solución desteñidora

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

SOLUCIONES Y ORDEN PARA LA PREPARACIÓN DE UN GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS AL 12 % CON UN GROSOR DE 0.75 MM Y UN TAMAÑO DE 8.4x5.0 cm.

	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida:Bisacrilamida (30:0.8)%	2.0 mL	0.66 mL
TRIS/HCl 2M pH 8.8	1.0 mL	0.6 mL
SDS 20%	25 µL	25 µL
H₂O	1.943 mL	3.672 mL
TEMED	2 µL	10 µL
Persulfato de Amonio 10 %	40 µL	40 µL

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS PARA INMUNOTRANSFERENCIA TIPO WESTERN

Amortiguador de transferencia.

Tris	3.03 g (25 mM)
Glicina	14.41 g (192 mM)
SDS	1 g (0.1 %)
Metanol	200 mL (20 %)
H ₂ O c.b.p.	1 L
pH 8.3	

Amortiguador TBS

Tris pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM

Amortiguador TTBS

Tris pH 7.5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0.05 %

Solución bloqueadora.

Leche Svelty deslactosada	5 g
TTBS	100 mL

Solución Amido Black para teñir proteínas en membrana de PVDF

0.1% de rojo de Amido Black en 10% de ácido acético.

SOLUCIONES AMORTIGUADORA PARA LA INMUNORRÉPLICA TIPO FAR WESTERN.

Amortiguador de Fosfatos.

Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH 8.0	50 mM
---	-------

Anexo 2. Protocolo de obtención de células competentes

Se inocularon 100 μ L de la cepa DH5 α o BL21 de *E. coli* en 10 mL de medio LB en un matraz de 125 mL, después se incubó a 37°C a 250 rpm durante toda la noche. Al día siguiente 2 mL del precultivo se adicionaron a 200 mL de medio LB en un matraz de 1 L y se incubó a 37°C a 200 rpm hasta que la densidad óptica de 0.36 a 590 nm. Se repartió el contenido en tubos falcón estériles de 50 mL y se centrifugó a 300 rpm durante 7 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 10 mL de 60 mM CaCl₂ fría. Se recolectaron todos los botones resuspendidos en un solo tubo y se dejó reposar en hielo durante 30 min. Después, se centrifugó a 300 rpm durante 7 min a 4 °C y el sobrenadante se decantó, el botón fue resuspendido en 2.5 mL de CaCl₂. Se repartió en alícuotas de 100 μ L y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

Anexo 3. Secuencia del gen que codifica para Factor Agregante 1 de la Beta Glucosidasa (BGAF1) de *Zea Mays*.

Secuencia obtenida de la página de Ensembl plant. En negro y sombreado se encuentran los oligonucleótidos que fueron usados para la amplificación del gen que codifica para β GAF1. Los nucleótidos subrayados con una línea corresponden al codón de inicio. Los nucleótidos subrayados con doble línea corresponden al codón de paro. El producto de PCR es de 947 pb.

>Zm00001d019312:Zm00001d019312_T003 cDNA:protein_coding.

```
ACAACACAAGAGCTACTACTACAGCTCCTCATCTCAAGTGTGTAGACGAGACAGAGAGACA  
CTGAGAGAGCGCCATGGCCAGCCTCCAAGTCACTCCTACTTCGGCGTTCCTGAGTGGAAC  
GAGCTGAAGTTCGAAGGCCTGTACCTGTTCCACACGCCCTGGGCTCAGGCGCCAACCAAG  
CTCGGGTCATAGACAACAAGGCGCCGATTGGCATCGGTGCCACCGTAGTTAACAACCTGGAC  
AGTGTATGACGGGCCAGGGCCGAACGAAAGCTGGTTGCCCGTGCACAGGGCTTGCATATC  
CAAGCCGGCAACTGGGTCAACTCCTTCAGCCTAGTGTTCGTGGATCAAAGGTTTCAGTGGGT  
CCACGCTTGAAGTGACCGGGATAGTAGTTGAATCCGGGGAGTGGGCTATTGTTGGGGGCAC  
CGGTCAGTTTGCCATGGCAAACGGTGTTCATCTTCAAGAAGTTCCATGAGCAGAGAAGCGAA
```

GGGAACATCATACAACCTCACCATCCATGCTTTCTGTCCGCGCTCGGCCGCAAAGTTGGAC
CGTGGGGTGGGAGCGGGCGGGTCTCCGGTGGACATCACGGCAGAGCCCCAGCGTCTGAAGAG
CATCACCGTTGCTACTGGCATCGCCGTGACCTCGATTGCCTTCTCCTACGTGCGACTCCGCC
GGCCAAACCCAATCTGCTGGTGCCTGGGGCGGTTCCGGTGGAGAAACTGAGCCGGTGATCC
AGCTCGGCGACTCCGAGGTGCTCACGGAGCTGTCCGGGACGATCGGCAACGTGCGACGGCCA
CACCGTCATAACCTCCATCAAGTTCGTCACAAGCCTCAAGACCTACGGCCCTTTCGGAGCA
TGGGGGGACGGGAGTGACACTCCGTTTCGCGATCCCCGTGCAGCAAGGGAGTGCCATCGTTG
GCTTCTTCGCACGAGCTGGGGTCTACCTCGACGCCCTTGGCGTT **TACGTGCGATCCCTGTG**

A

Anexo 4. Membrana de PVDF teñida con Amido-black.

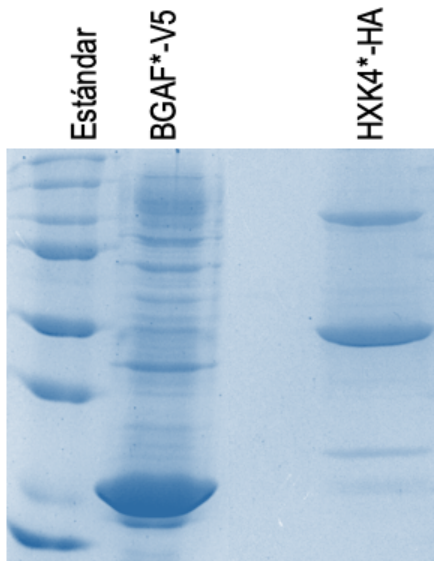


Figura 21. Revelado de las proteínas en la membrana de PVDF usada para Far Western teñida con Amido-Black.

Se separó el sobrenadante del lisado de células que produjeron a BGAF1-V5 y a ZmHXK4 Δ 30-HA purificada mediante un gel de poliacrilamida-SDS y su posterior transferencia a una membrana de PVDF.