



Centro de Investigación Científica de Yucatán,

A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“Estudio de la participación de mecanismos de transporte en la  
distribución tisular de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone  
mexicana*”**

Tesis que presenta

**Lloyd Jorge Alfredo Loza Müller**

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2021

---

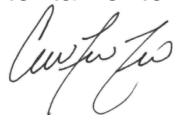
*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.*  
*POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



**RECONOCIMIENTO**

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Lloyd Jorge Alfredo Loza Muller** titulado “**Estudio de la participación de mecanismos de transporte en la distribución tisular de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana***” fue realizado en la **Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas**, bajo la línea de investigación de “Metabolismo secundario e ingeniería metabólica”, en el laboratorio número veinticinco del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** bajo la dirección del **Dr. Felipe Vázquez Flota**, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dra. Cecilia Hernández Zepeda  
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 5 de Julio de 2021

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

Lloyd Jorge Alfredo Loza Muller

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* (chicalote)” bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota (proyecto CB-2016-028588) CONACyT otorgando la beca doctoral No. 289293 al Dr. Lloyd Jorge Alfredo Loza Muller para la realización de ese trabajo.

---

## RECONOCIMIENTOS Y AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Felipe Vázquez Flota por su incondicional dirección durante el Doctorado; su criterio y sus enseñanzas que me ayudaron para mejorar como persona y desarrollarme de manera académica y profesional en el ámbito científico.

Al Dr. Nobukazu Shitan por su incondicional invitación para poder realizar una estancia de investigación en la Universidad Farmacéutica de Kobe y su colaboración en la expresión de los transportadores en levaduras.

A mi familia en especial a mi madre Florencia Josaine Muller Piller por darme su apoyo incondicional durante todo el periodo en el que realice mi Doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiado a través del proyecto de Ciencia Básica: (CB-2016-028588 con título: "Localización de los sitios de síntesis y acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en *Argemone mexicana* (chicalote)").

Al CONACYT por la beca otorgada No. 289293 durante el transcurso del Doctorado en Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por permitirme realizar el Doctorado y por la prestación de las instalaciones para la realización de esta tesis.

A la Universidad Farmacéutica de Kobe por la prestación de las instalaciones durante la estancia doctoral en Kobe, Japón.

A los miembros de mi comité tutorial y predoctoral que formaron parte de mi formación académica; Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Edmundo Lozoya Gloria, Dra. Renata Rivera Madrid, Dra. Lourdes Miranda Ham, Dr. Gregorio Godoy Hernández y el Dr. Ignacio Islas Flores; gracias a todos ellos por su valiosa contribución y su criterio para orientarme como persona y de manera profesional.

A mi comité revisor de la tesis; Dr. Felipe Vázquez Flota, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Edmundo Lozoya Gloria, Dra. Renata Rivera Madrid, Dr. Víctor Aguilar Hernández, Dr. Gregorio Godoy Hernández y Dr. Jorge Alberto Rubio Piña.

---

A las técnicas M.C Ángela Ku González y M. en C. Miriam Monforte González, por su apoyo técnico y académico durante la realización de esta tesis y su criterio.

A mis compañeros del laboratorio 25, Nacho, Ángel, Karen, Zuri, Neptis, Elia, Majo, Gladys que en algún momento compartieron conmigo momentos difíciles, de reflexión, discusión y diversión; gracias a todos ellos por esos momentos.

A mis amigos de otros grupos por su apoyo y momentos que pasamos.

A todos aquellos que formaron parte de esta etapa de mi vida

---

ÍNDICE

---

INTRODUCCIÓN .....	1
<b>CAPÍTULO I .....</b>	<b>3</b>
ANTECEDENTES .....	3
1.1 <i>Argemone mexicana</i> (PAPAVERACEAE).....	3
1.2 DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES EN <i>A. mexicana</i> .....	4
1.3 SÍNTESIS DE ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS (ABI).....	5
1.3.1 DISTRIBUCIÓN TAXONÓMICA DE LOS ABI.....	6
1.3.2 RUTA DE BIOSÍNTESIS DE LOS ABI .....	6
1.3.2.1 FORMACIÓN DE S-NORCOCLAURINA.....	7
1.3.2.2 SÍNTESIS DE BENZOFENANTRIDINAS (SANGUINARINA) Y PROTOBERBERINAS (BERBERINA)	
.....	9
1.4 ESTUDIOS SOBRE LA SÍNTESIS DE ABI EN <i>A. mexicana</i> .....	11
1.4.1 PLANTAS MADURAS .....	12
1.4.2 PLÁNTULAS EN DESARROLLO .....	13
1.4.3 CULTIVOS <i>IN VITRO</i> .....	15
1.4.4 CULTIVOS DE CALLOS Y DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN .....	15
1.4.5 CULTIVOS DE BROTES Y DE RAÍCES.....	16
1.5 DISTRIBUCION TISULAR DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE BERBERINA Y SANGUINARINA EN <i>A. mexicana</i>	
.....	17
1.6 TRANSPORTADORES TIPO ABC (ATP-BINDING CASSETTE).....	18
1.6.1 DISTRIBUCIÓN TAXONOMICA DE LAS PROTEINAS TIPO ABC .....	22
1.7 MECANISMOS DE TRANSPORTE INTERTISULAR DE BERBERINA .....	23
1.7.1 ESTRUCTURA Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LOS TRANSPORTADORES DE BERBERINA	
.....	24
1.8 OTROS MECANISMOS DE TRANSPORTE DE BERBERINA .....	26
1.9 TRANSPORTE MEDIADO POR VESICULAS .....	26
1.10 MECANISMOS DE TRANSPORTE DE ALCALOIDES EN OTRAS ESPECIES .....	27
RECAPITULACIÓN.....	27
JUSTIFICACIÓN.....	29

---

HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS. ....	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	30
<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>31</b>
MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
2.1 SELECCIÓN DE CANDIDATOS A TRANSPORTADORES DE BERBERINA .....	31
2.2 ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	31
2.2.1 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE <i>A. mexicana</i> .....	31
2.2.2 SÍNTESIS DE ADNc.....	32
2.2.3 DISEÑO DE CEBADORES PARA LA AMPLIFICACIÓN DE AmABCB1, B2, B3, B4, NCS, SOMT, STYSYN DE <i>A. mexicana</i> .....	32
2.2.4 AMPLIFICACIÓN POR RT-PCR DE TRANSPORTADORES SELECCIONADOS.....	34
2.2.5 AISLAMIENTO Y CLONACION DE LOS TRANSPORTADORES SELECCIONADOS.....	35
2.2.6 CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR PDR/AMABCB1, ENSAYO DE TRANSPORTE EN LEVADURAS ( <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ) Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSPORTE DE ALCALOIDES POR UPLC-MS. ....	37
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>41</b>
RESULTADOS.....	41
3.1 SELECCIÓN DE SECUENCIAS CANDIDATAS A TRANSPORTADORES ABC TIPO B DE ALCALOIDES DE <i>A. mexicana</i> POR MEDIO DE ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	41
3.1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS CANDIDATOS SELECCIONADOS.....	46
3.1.2 ALINEAMIENTO, COMPARACIÓN Y ANALISIS FILOGENÉTICO (EN AMINOÁCIDOS) DE LAS SECUENCIAS CANDIDATAS SELECCIONADAS A TRANSPORTADORES ABCB DE <i>A. mexicana</i> .....	48
3.1.3 ANÁLISIS TOPOLÓGICO DE LOS AMABCB SELECCIONADOS CON RESPECTO A LOS ABCB DE REFERENCIA.....	51
3.2 CARACTERIZACION DE AMABCB1 COMO TRANSPORTADOR DE ALCALOIDES EN SEMILLAS DE <i>A. MEXICANA</i> .....	52
3.2.1 AMABCB1, AN ALKALOID TRANSPORTER FROM SEEDS OF <i>A. MEXICANA</i> .....	52



3.2.2 SUPPLEMENTARY INFORMATION. AMABCB1, AN ALKALOID TRANSPORTER FROM SEEDS OF <i>A. MEXICANA</i> .....	64
3.2.3 RECAPITULACIÓN .....	70
3.3 DISTRIBUCIÓN DE ALCALOIDES EN LAS SEMILLAS DE <i>A. mexicana</i> .....	71
3.3.1 ALKALOID DISTRIBUTION IN SEEDS OF <i>A. mexicana</i> .....	71
<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>81</b>
4.1 DISCUSION, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	81
4.2 BIBLIOGRAFÍA .....	85
<b>ANEXOS.....</b>	<b>95</b>
Anexo 1 SECUENCIAS EN NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LOS TRANSPORTADORES AMABCB1, B2, B3 Y B4 .....	95
Anexo 2 ANÁLISIS PREDICTIVO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE TRANSPORTADORES TIPO ABC DE ALCALOIDES BENCILISOQUINÓLINICOS ....	97
Anexo 3 CARACTERIZACIÓN DE AMABCB2, UN PRESUNTO TRANSPORTADOR DE AUXINAS DE <i>A. mexicana</i> .....	116
<b>LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS</b>	
<b>FIGURAS CAPITULO I</b>	
FIGURA 1.1 <i>A. mexicana</i> .....	5
FIGURA 1.2 ESTRUCTURA DE LOS PRINCIPALES ABI DE <i>A. mexicana</i> Y LOS GRUPOS A LOS QUE PERTENECEN.....	7
FIGURA 1.3 REACCIONES COMUNES EN LA SÍNTESIS DE ABI .....	9
FIGURA 1.4 REACCIONES ESPECÍFICAS PARA LA BIOSÍNTESIS DE SANGUINARINA Y BERBERINA .....	11
FIGURA 1.5 ASPECTO DE LAS PLANTAS MADURAS ,PLÁNTULAS COTILEDONARIAS Y JUVENILES DE <i>A. mexicana</i> .....	14
FIGURA 1.6 TRANSPORTE DE BERBERINA EN <i>C. japonica</i> .....	18
FIGURA 1.7 ESTRUCTURA DE UN TRANSPORTADOR ABC .....	19
FIGURA 1.8 ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA MDR (TRANSPORTADOR ABC) .....	21
FIGURA 1.9 MECANISMO DE ACCIÓN DE UN TRANSPORTADOR ABC .....	21
FIGURA 1.10 TOPOLOGIA DE SUBFAMILIAS ABC .....	23
FIGURA 1.11 RUTA DE SÍNTESIS DE ALCALOIDES EN <i>A. mexicana</i> .....	28

---

FIGURA 1.12 DIAGRAMA DE LA ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	30
<b>FIGURAS Y TABLAS DEL CAPITULO II</b>	
TABLA 2.1 SECUENCIA (5'-3') DE LOS CEBADORES EMPLEADOS PARA AMPLIFICAR LAS DIFERENTES SECUENCIAS. ....	33
<b>FIGURAS Y TABLAS DEL CAPITULO III</b>	
TABLA 3.1 NÚMEROS DE ACCESIÓN DE TRANSPORTADORES ABCB UTILIZADOS COMO REFERENCIA.....	41
FIGURA 3.1 FAMILIAS DE TRANSPORTADORES ABC DEL TRANSCRIPTOMA XT1..	43
FIGURA 3.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR POR EL MÉTODO DE “MAXIMUM LIKELIHOOD” .....	44
FIGURA 3.3 ACERCAMIENTO DEL ANÁLISIS FILOGENÉTICO MOLECULAR POR EL MÉTODO DE “MAXIMUM LIKELIHOOD” .....	45
TABLA 3.2 SIMILITUD DE LOS CANDIDATOS SELECCIONADOS COMO TRANSPORTADORES DE BERBERINA DE <i>A. mexicana</i> CON EL TRANSPORTADOR CJABCB1 DE <i>C. japonica</i> . ....	47
Figura 3.4 PORCENTAJE DE IDENTIDAD ENTRE LAS PROTEÍNAS TRANSPORTADORAS DE REFERENCIA Y AMABCB'S .....	47
Figura 3.5 DISTRIBUCIÓN TISULAR DE AMABCB1, B2, B3 Y B4 EN PLANTAS MADURAS DE <i>A. mexicana</i> .....	48
Figura 3.6 RELACIONES EVOLUTIVAS EN SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS DE ABCB DE REFERENCIA Y DE AMABCB SELECCIONADAS PARA EL TRANSPORTE DE ALCALOIDES .....	50
Figura 3.7 LOCALIZACION TOPOLÓGICA DE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS CON RESPECTO A LOS TRANSPORTADORES DE REFERENCIA .....	51
<b>FIGURAS SECCIÓN 3.2</b>	
Figure 3.2.1 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF AMABCB1 .....	60
Figure 3.2.2 EXPRESSION ANALYSIS OF AMABCB1 AND ALKALOID BIOSYNTHETIC GENES .....	62
Figure 3.2.3 BERBERINE AND SANGUINARINE IN VITRO ALKALOID TRANSPORT ASSAY OF AMABCB1 .....	63
TABLA 3.2.1.S1 PRIMER USED IN THE DIFFERENT PCR AMPLIFICATION .....	66

Figure 3.2.2.S1 SCHEMATIC VIEW OF BERBERINE AND SANGUINARINE BIOSYNTHETIC PATHWAYS.....	68
Figure 3.2.2.S2 AMINOACID SEQUENCE ALIGNMENT OF AMACB1 WITH BIA TRANSPORTERS .....	69
<b>FIGURAS SECCIÓN 3.3</b>	
Figure 3.3.1 ALKALOIDS CONTENTS IN <i>A. mexicana</i> SEEDS.....	75
Figure 3.3.2 SANGUINARINE DISTRIBUTION IN THE DIFFERENT SEED TISSUE COMPONENTS .....	76
Figure 3.3.3 SANGUINARINE RETRIEVED FROM SEED WASHOUTS WITH METHANOL .....	77
Figure 3.3.4 ALKALOID CONTENTS DURING <i>A. mexicana</i> GERMINATION.....	78
<b>FIGURAS CAPITULO IV</b>	
Figure 4.1 SERINAS CONSERVADAS DE TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES....	84
<b>FIGURAS ANEXOS</b>	
Figure A2.1 PLANT ABCB-TYPE TRANSPORTERS ANALYZED .....	110
Figure A2.2 PHYLOGENETIC ANALYSIS OF THE ABCB-TYPE TRANSPORTERS ANALYZED .....	111
Figure A2.3 IDENTITY BETWEEN THE ABCB-TYPE TRANSPORTERS ANALYZED ..	112
Figure A2.4 SEQUENCE ALIGNMENT OF THE PLANT ABCB-TYPE TRANSPORTERS ANALYZED.....	113
Figure A2.5 STRUCTURAL REPRESENTATION FOR TRANSMEMBRANE $\alpha$ -HELIXES IN TMDS .....	114
Figure A2.6 HYDROPHOBIC ANALYSIS & 3D STRUCTURE .....	115
Figura A3.1 RELACIONES EVOLUTIVAS EN SECUENCIAS DE AMINOACIDOS DE AMACB2 CON TRANSPORTADORES DE AUXINAS Y ALCALOIDES .....	117
Figura A3.2 ESTRUCTURA 3D DE AMACB2 DE <i>A. mexicana</i> .....	118
Figura A3.3 PREDICCIÓN ESTRUCTURAL Y DE LOCALIZACION CELULAR DE AMACB2 .....	119
Figura A3.4 RT-PCR DE LA SECUENCIA COMPLETA DE AMACB2 .....	120
Figura A3.5 MUTACION EN EL VECTOR PDR/AMACB2 .....	121

## ABREVIATURAS

### ABREVIATURAS

ABI	Alcaloides bencilisoquinolínicos
ABC	ATP binding cassette protein
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosin difosfato
AKR	Aldo-keto reductasa
AmABCB1	<i>Argemone mexicana</i> ATP Binding Cassette B1
AmABCB2	<i>Argemone mexicana</i> ATP Binding Cassette B2
AmABCB3	<i>Argemone mexicana</i> ATP Binding Cassette B3
AmABCB4	<i>Argemone mexicana</i> ATP Binding Cassette B4
ARN	Ácido ribonucleico
ARNi	Ácido ribonucleico de interferencia
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
BBE	Enzima puente de berberina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CanSyn	Canadina sintasa
CheSyn	Cheilantifolina sintasa
CjABCB1	<i>Coptis japonica</i> ATP Binding Cassette B1
CjABCB2	<i>Coptis japonica</i> ATP Binding Cassette B2
CYPs	Citocromos P
DAG	Diacilglicerol
DBOX	Dihidrobzofenantridina sintasa
DOPA	3, 4-dihidroxifenilalanina
EST	Expression sequence tags
MATE	Multidrug and Toxic Compound Extrusion

---

## ABREVIATURAS

---

MDR	Multidrug Resistance
MDRp	Multidrug Resistance Protein
MLV	Murine Leukemia Virus
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCS	Norcoclaurina sintasa
PS	Peso seco
RACE	Rapid Amplification of cDNA Ends
RE	Retículo endoplasmático
Rv	Cebador reverso
SanR	Sanguinarina reductasa
SDR	Dehidrogenasa/Reductasa
SOMT	S-escoulerina O metiltransferasa
STOX	Tetrahidroprotoberberina oxidasa
StySyn	Estilopina sintasa
T <sub>m</sub>	Temperatura de alineamiento
TMD	Dominio transmembranal
NBD	Dominio de unión a nucleótidos
TYDC	Tirosina descarboxilasa
UPLC-MS	Ultra performance liquid chromatography
XT1	Transcriptoma 1 de <i>Argemone mexicana</i>

---

### RESUMEN

En este trabajo se estudió la posible participación de un mecanismo de transporte de alcaloides mediado por proteínas ABC tipo B (ABCB) en *Argemone mexicana*. Los candidatos fueron identificados a partir de un transcriptoma de plántulas en desarrollo, utilizando el término **ABC proteins** para la búsqueda. Se encontraron 470 secuencias, de entre 150 y 4785 pb de longitud, etiquetadas con porcentajes de identidad de entre 28 y 86% entre ellas. Con estos contigs se construyó un árbol filogenético por el método de máxima similitud, incluyendo además los transportadores de berberina CjABCB1, B2 y B3; de *Coptis japonica*; TmABCB1 y B2 de *Thalictrum minus*, y EcABCB1 de *Eschscholzia californica*. Como controles externos se utilizaron los transportadores de auxinas AtABCB19 y DcABCB21 de *Arabidopsis thaliana* y *Daucus carota*, respectivamente. De los 470 candidatos se seleccionaron cuatro, denominados AmABCB1, B2, B3 y B4, de 4012, 3744, 522 y 195 pb, respectivamente. Tres de estos; B1, B3 y B4, se agruparon en el mismo clado que los transportadores de alcaloides de *C. japonica*, *T. minus* y *E. californica*, mientras que AmABCB2 se agrupó junto con el transportador de auxinas AtABCB19 en un clado diferente. AmABCB1, B3 y B4 se detectaron en tejidos de cápsulas, donde se observan niveles importantes de alcaloides, mientras que AmABCB2 fue observado principalmente en los pétalos. El análisis funcional de AmABCB1 (que desplegó los mismos motivos de los transportadores ABCB excepto en la región linker que esta embebida entre el NBD1 y el TMD2, y que está involucrada en la unión de sustrato) reveló una mayor actividad como importador de sanguinarina que como exportador de berberina. Los análisis de expresión y de distribución de sanguinarina y berberina en los diferentes tejidos de la semilla, mostraron que la disminución en los contenidos de berberina, así como el aumento en el contenido de sanguinarina coincidió el aumento en la expresión de AmABCB1, sugiriendo un papel para este transportador en el flujo de alcaloides entre los diferentes tejidos de la semilla. No se logró la expresión heteróloga de AmABCB2.

---

**ABSTRACT**

The participation of an alkaloid transport mechanism, mediated by ABC type B (ABCB) proteins, was analyzed in *Argemone mexicana*. Candidates were identified from a developing seedling transcriptome using as query the term **ABC proteins**. 470 sequences between 150 and 4785 bp were retrieved. Hits shared from 28 to 86% identity between them and were included in a phylogenetic tree, built by the maximum likelihood method. Previously reported berberine transporters from *Coptis japonica* (CjABCB1, B2 and B3); *Thalictrum minus* (TmABCB1 and B2) and *Eschscholzia californica* (EcABCB1) as references, as well as the auxin transporters AtABCB19 and DcABCB21 from *Arabidopsis thaliana* and *Daucus carota*, respectively were also included. Four candidates, named AmABCB1, B2, B3 and B4 (4012, 3744, 522 and 195 bp, respectively) were selected. Three of them; B1, B3 and B4 clustered in the same clade as the alkaloid transporters whereas AmABCB2 clustered with the auxin transporter AtABCB19, in a different clade. AmABCB1, B3 and B4 were detected in capsule tissues, where significant levels of alkaloids were observed, while AmABCB2 was observed mainly in the petals. AmABCB1 displayed the same motifs of the ABCB transporters except in the linker region, located between the NBD1 and TMD2 domains, and which is involved in substrate binding and displayed activity as a sanguinarine importer as well as a weak behavior as berberine exporter. The analysis of the expression and distribution of sanguinarine and berberine in the different tissues of the seeds revealed that the decrease in berberine contents, as well as the increase in the sanguinarine content, coincided with the increase in the expression of AmABCB1, suggesting a role for this transporter in the mobilization of alkaloids between the different tissues of the seeds. Heterologous expression of AmABCB2 was not achieved.

---

### INTRODUCCIÓN

*Argemone mexicana* L. es una planta de la familia Papaveraceae que produce alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI) y que se ha utilizado en la medicina tradicional para tratar diferentes afecciones como agente antitumoral, insecticida, fungicida, antiinflamatorio, antiviral y de igual forma ayuda en tratamientos en personas que padecen diabetes, procedimientos bucales y afecciones intestinales. (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013; Zou *et al.* 2017). Los principales alcaloides de *A. mexicana* son berberina y sanguinarina que se distribuyen diferencialmente en los tejidos de la planta. La berberina se distribuye en todos los tejidos, mientras que la sanguinarina sólo se encuentra en las raíces y semillas maduras (Xool-Tamayo *et al.* 2017a). Estudios de la distribución de ambos alcaloides han demostrado discrepancias con los sitios de acumulación de los transcritos presuntamente involucrados en diferentes etapas de su formación (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b).

Estas discrepancias pueden explicarse como diferencias en temporalidad de la acumulación de los transcritos con la de los productos finales, como la existencia de alternativas catalíticas aun no identificadas y por la operación de mecanismos de transporte intertisular. Esto último sugiere que los sitios de biosíntesis y acumulación final de los alcaloides no son los mismos. Se cuenta con evidencia que sustenta, en diferente medida cada una de estas tres posibilidades. Por ejemplo, durante las etapas tempranas del desarrollo de plántulas que han mostrado la acumulación de transcritos correspondientes a la biosíntesis de berberina en radículas, antecede a la detección de los alcaloides en este mismo tejido (Xool-Tamayo *et al.* 2017a). Por otra parte, en un transcriptoma de plántulas de *A. mexicana* se encontraron varias secuencias con altos porcentaje de identidad con las correspondientes a enzimas involucradas en la biosíntesis tanto berberina como sanguinarina (Xool-Tamayo *et al.* 2017a). En ese sentido, la existencia de enzimas con cierta flexibilidad catalítica para la biosíntesis de sanguinarina ha sido documentada en otras especies, como *E. californica* (Hagel *et al.* 2012). La participación de estos mecanismos está siendo analizada como parte de los estudios para caracterizar la biosíntesis de alcaloides en esta planta (Hagel *et al.* 2012). Finalmente, en otras especies productoras de berberina, como *C. japonica* y *T. minus* (Yazaki *et al.* 2001; Shitan 2015), así como de sanguinarina en *E. californica* (Nwanyichukwu 2014) se ha documentado la



## INTRODUCCIÓN

operación de esta clase de mecanismos y diferentes transportadores ABCB han sido caracterizados. De manera notable varios candidatos para este tipo de transportadores se han encontrado en el transcriptoma antes comentado (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b).

Con base en lo anterior, en este proyecto se propuso documentar la posible presencia de un mecanismo de transporte a larga distancia de alcaloides. Para ello, por métodos bioinformáticos se identificaron candidatos a transportadores ABCB en un transcriptoma de plántulas en desarrollo a partir del cual se han logrado identificar diferentes genes biosintéticos. Una vez identificados, se analizó su distribución tisular y se aislaron los ADNc completos para su expresión heteróloga y análisis funcional.

La organización de este trabajo de tesis es la siguiente. En el CAPÍTULO I se presentan los antecedentes que sustentan el proyecto de investigación, así como los objetivos planteados y la estrategia experimental a seguir. El CAPÍTULO II detalla los materiales y métodos empleados, siguiendo como guía los objetivos planteados para poder cumplirlos. En el CAPÍTULO III se presentan los resultados, divididos en diferentes secciones. La sección 3.1 describe los métodos bioinformáticos utilizados para la identificación de los candidatos. Las secuencias de los cuatro genes candidatos seleccionados como resultado de este proceso se presentan en el Anexo 1. En la sección 3.2 se presenta, en formato de un manuscrito, la caracterización de AmABCB1, seleccionado como posible transportador de alcaloides. Los resultados incluyen un análisis de la expresión tisular, así como la expresión heteróloga en levaduras y los ensayos funcionales como transportador de alcaloides. La caracterización de AmABCB2, otro de los candidatos aislado y secuenciado, se presenta en el Anexo 3. La sección 3.3 describe un análisis de la distribución de los alcaloides berberina y sanguinarina en los diferentes tejidos de las semillas, que correspondieron a los sitios en donde se observaron los máximos niveles de expresión de AmABCB1. Este análisis incluyó semillas en diferentes estados de madurez, y discute la posible la relación entre AmABCB1 y la movilización de alcaloides en estos tejidos. Esta sección también se presenta en forma de manuscrito sometido y aceptado en *Journal of the Mexican Chemical Society*. Finalmente, el CAPÍTULO IV se centra en la discusión, conclusión y perspectivas establecidas para el presente proyecto. Se presenta también un análisis comparativo de las estructuras tridimensionales, obtenidas por modelaje computacional, de los transportadores de *C. japonica*, *T. minus* y *E. californica* y AmABCB1 (Anexo 2).

## CAPÍTULO I

## ANTECEDENTES

**1.1 *Argemone mexicana* (Papaveraceae)**

Las plantas del género *Argemone* se conocen como chicalotes (Fig. 1.1). México es uno de los países de origen de diferentes chicalotes, la mayoría de ellos, considerados como malezas. *A. mexicana* L. es la más exitosa de ellos; hoy se encuentra en los trópicos de todos los continentes y puede llegar a ser bastante molesta (CONABIO 2017). Además de chicalote, se le conoce en español con otros nombres comunes como amapola montes, cardo, cardosanto, amapolilla y chicalote. En inglés se le conoce como prickly poppy o Mexican poppy (CONABIO 2017).

La clasificación taxonómica de *A. mexicana* corresponde a (CONABIO 2017; USDA 2017) a:

- a) Reino: Plantae
- b) Subreino Traqueobionta (plantas vasculares)
- c) Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas)
- d) División: (Magnoliophyta (plantas con flor)
- e) Clase: Magnoliopsida
- f) Orden: Papaverales.
- g) Familia: Papaveraceae
- h) Género: *Argemone*
- i) Especie: *A. mexicana*

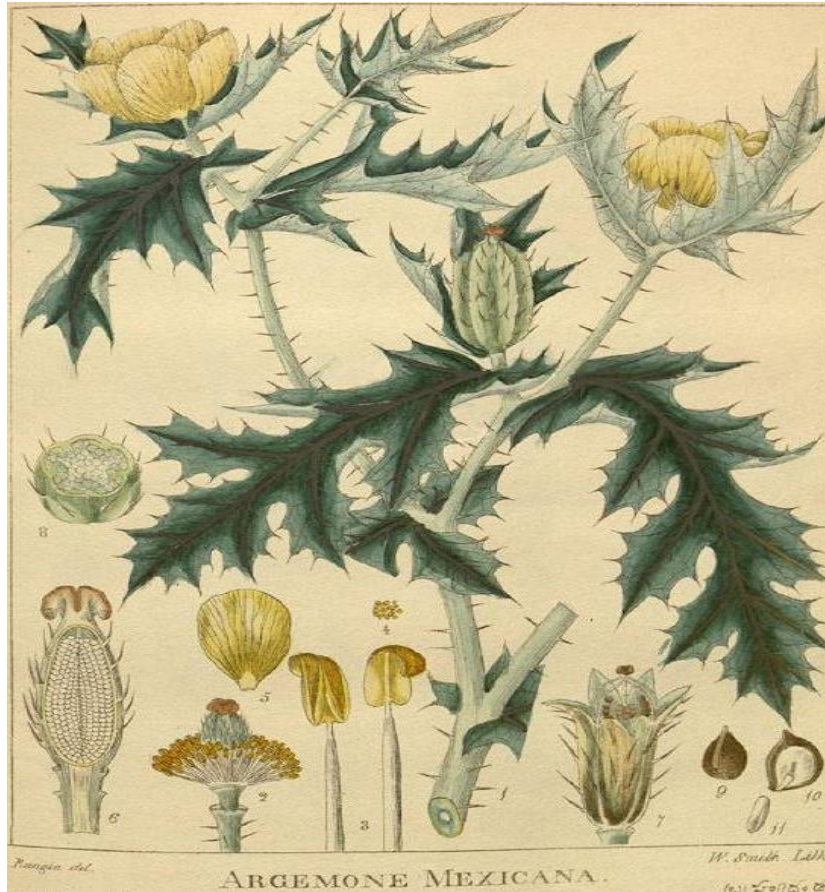
El género *Argemone* es uno de los 26 que se agrupan en la familia Papaveraceae, y dentro del género se han establecido 24 especies (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013). Es una planta anual de tallo erguido, que se ramifican desde la base, desarmados o poco espinosos, de entre 40 a 100 cm de alto, con hojas espinosas y flores terminales amarillas (FNA 2017). Se pueden encontrar en lugares de desecho, como maleza, en los bordes de las carreteras y en campos de barbecho (FNA 2017).

*A. mexicana* es probablemente nativa del sur de Estados Unidos y las Antillas y está muy extendida en las regiones templadas y tropicales de todo el mundo mediante la introducción del hombre (FNA 2017). Vestigios de semillas de *A. mexicana* de alrededor de 3000 años de antigüedad han sido encontrados en el centro de México y Chihuahua, cerca de la frontera con Estados Unidos, en conjunto con semillas de otras plantas medicinales y comestibles sugiriendo que comparten un uso común (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013).

*A. mexicana* produce una amplia variedad de ABI que son derivados de la tirosina. Algunos de estos alcaloides pueden ser altamente tóxicos, debido a sus efectos en el sistema nervioso central, los cuales provocan pérdida de la coordinación, somnolencia y convulsiones; sin embargo, los mismos alcaloides pueden tener propiedades medicinales valiosas (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013). Estos alcaloides se encuentran en plantas de los superórdenes Magnoliflorae y Ranunculiflorae, los cuales en conjunto incluyen 11 familias en total. La distribución de diferentes grupos de ABI sigue relaciones taxonómicas definidas, ya que algunos de ellos están restringidos a ciertas familias o géneros (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013).

### 1.2. Distribución de alcaloides en *A. mexicana*.

*A. mexicana* (Fig 1.1) es una planta que ha tenido una asociación al tratamiento de diferentes afecciones tales como eventos bucales, hepatitis y efectos antimicrobianos (Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013). Los elementos que permiten que la planta pueda tener estos usos son asociados a la producción de alcaloides. *A. mexicana* sintetiza principalmente dos alcaloides mayoritarios los cuales son la berberina, que pertenece a la subfamilia de las protoberberinas y está presente en todos los tejidos de plantas maduras a excepción de semillas maduras y, sanguinarina perteneciente a las benzofenantridinas que se encuentra en las raíces de las plantas y semillas maduras (Rubio-Piña & Vázquez-Flota 2013). Sin embargo, también se ha encontrado que esta especie contiene dehidrocoridalmina, jatrorrizina, columbamina, oxiberberina, entre otros alcaloides en extractos crudos de la planta completa (Singh y Singh 2010). De manera más específica también se ha reportado que en semillas se ha podido detectar la presencia de allocriptopina, berberina, queleritrina, copsisitina, dihidrosanguinarina, protopina y sanguinarina (Gobato *et al.* 2015). En partes apigeales se ha detallado la presencia de isocoridina, berberina, reituclina, protopina, alocriptopina, quelitenfolina, escoulerina, entre otros (Brahmachari *et al.* 2013). En partes aéreas se puede detectar reticulina, protomexicina, oxoprotopina, demetiloxisanguinarina, pancorina, entre otros (Brahmachari *et al.* 2013).



**Figura 1.1** *A. mexicana*. Se puede observar la estructura característica de la especie *A. mexicana* que se encuentra ampliamente distribuida en la República Mexicana, teniendo como elementos principales el color amarillo de la flor, las espinas en el tallo, y las cápsulas en forma ovoide. (Adaptado de Heber 1873).

### 1.3 Síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI).

Las plantas producen un amplio espectro de metabolitos especializados o secundarios, para adaptarse a los cambios ambientales. Los alcaloides son un grupo de moléculas que contienen nitrógeno, de comportamiento alcalino y que generalmente ejercen efectos fisiológicos en organismos diferentes a los que los producen (Roberts y Wink 1998). El origen biosintético de los alcaloides son algunos aminoácidos como la arginina, la lisina, el triptófano y la tirosina que definen los diferentes grupos (Roberts y Wink 1998).

Los ABI representan uno de los grupos más amplios con más de 2500 estructuras descritas que se forman a partir de la tirosina (Farrow *et al.* 2012; Hagel *et al.* 2015). Poseen importantes actividades farmacológicas, incluyendo los analgésicos morfina y codeína, los relajantes musculares papaverina y (+)-tubocurarina, el compuesto antimicrobial sanguinarina, la droga reductora de colesterol berberina y el analgésico/agente anticancerígeno noscapina (Farrow *et al.* 2012).

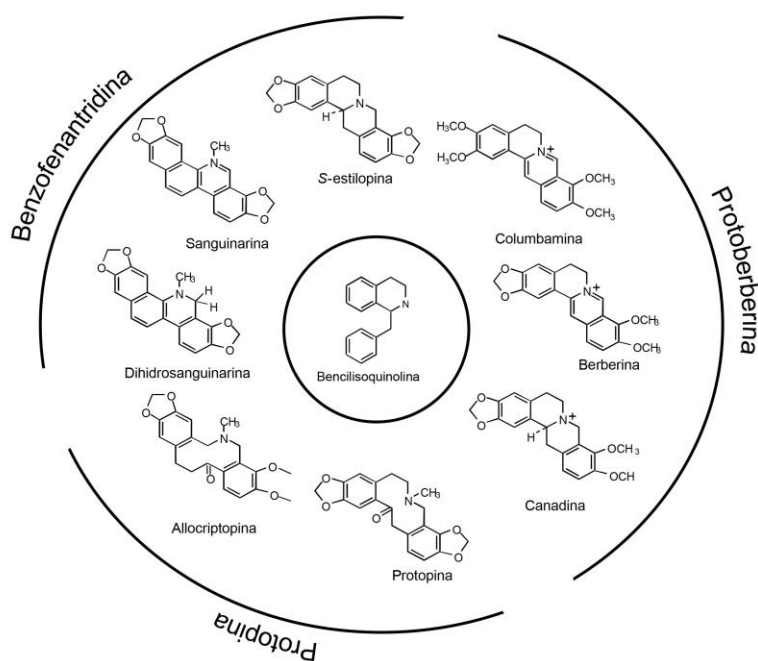
### 1.3.1 Distribución taxonómica de los ABI

Al igual que otros tipos de alcaloides, los ABI se distribuyen siguiendo patrones filogenéticos definidos. Se encuentran en plantas de los superórdenes Magnoliflorae y Ranunculiflorae (angiospermas), aunque también se han encontrado en algunas gimnospermas (Liscombe *et al.* 2005). En el superorden Magnoliflorae se encuentran las familias Annonaceae, Aristolochiaceae, Eupomatiaceae, Lauraceae, Monimiaceae y Nelumbonaceae, mientras que en el Ranunculiflorae se incluyen las familias Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae y Papaveraceae, familia a la que pertenece el género *Argemone*. Además de las Papaveráceas, estos alcaloides se pueden encontrar en las familias Cornaceae, Rutaceae y esporádicamente, en las familias que se encuentran incluidas en el orden de las Piperales tales como Aristolochiaceae y Piperaceae (Liscombe *et al.* 2008; Hagel *et al.* 2013). En las familias Annonaceae, Magnoliaceae y Menispermaceae se han identificado principalmente ABI tipo protoberberina, mientras que en la Berberidaceae y Ranunculaceae además de la presencia de protoberberina se pueden detectar protopinas (Fig. 1.2). En la familia Papaveraceae, se han identificado protopinas y benzofenantridinas (Liscombe *et al.* 2008). Más aún, algunos tipos de alcaloides se distribuyen de manera excluyente en las diferentes familias de plantas. Por ejemplo, las Papaveraceae acumulan alcaloides de los tipos benzofenantridina y morfina, pero no protoberberina que, por lo común, se acumulan en las familias Berberidaceae y Ranunculaceae las que, a su vez, no producen benzofenantridinas (Liscombe *et al.* 2008). De este modo, *A. mexicana* es una de las pocas especies en la que se acumulan dos tipos de alcaloides que pocas veces convergen; benzofenantridinas (sanguinarina) y protoberberinas (berberina).

### 1.3.2. Ruta de biosíntesis de los ABI

La formación de la unidad estructural básica de los ABI (Fig. 1.2) involucra la condensación de la dopamina y el 4-hidroxifenilacetaldehído, ambas derivadas de la tirosina, dando lugar a las porciones tetrahidroisoquinolina y bencil, respectivamente (Fig. 1.2); (Farrow *et al.* 2012). La ruta de síntesis de ABI es larga y compleja y en ella pueden participar hasta 43 enzimas, siendo los

tipos más comunes las monooxigenasas dependientes del citocromo P-450 (oxidoreductasas), dioxigenasas, las metiltransferasas y las liasas. La ruta de biosíntesis es común en todas las plantas que producen este tipo de alcaloides y se divide en tres etapas; la primera consiste en la formación de *S*-norcoclaurina a partir de dos unidades de tirosina mientras que la siguiente involucra la transformación de ésta en *S*-escoulerina. Las reacciones involucradas en estas dos etapas son compartidas para la formación tanto de los alcaloides benzofenantridina como los protoberberina (Fig. 1.3). La última etapa incluye las reacciones específicas para la síntesis de cada tipo de alcaloide (Facchini y De Luca 2008; Hagel *et al.* 2013).



**Figura 1.2** Estructura de los principales ABI de *A. mexicana* y los grupos a los que pertenecen. El círculo central encierra la estructura de benzilisoquinolina de estos alcaloides.

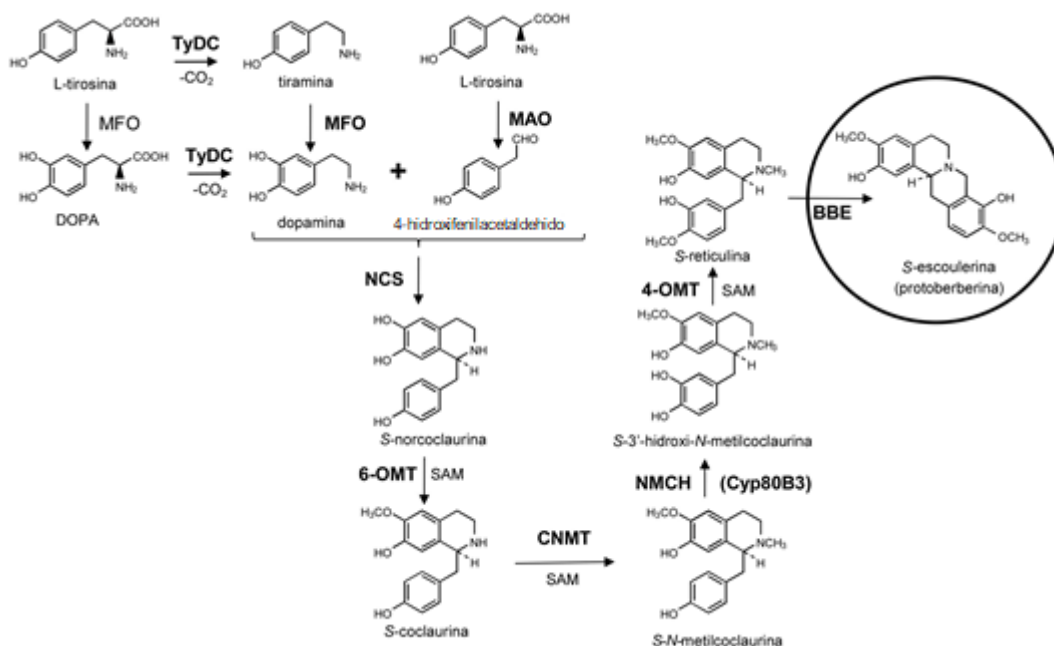
### 1.3.2.1. Formación de *S*-norcoclaurina

La biosíntesis de ABI inicia con dos unidades de tirosina. Una de ellas se convierte en 4-hidroxifenilacetaldehído (4-HFA) por la acción de una aminooxidasa (AO), mientras que la segunda se transforma en dopamina (3-hidroxitiramina o 3,4-dihidroxifenetilamina) en dos reacciones. Estas reacciones son la hidroxilación de la tirosina para formar 3-hidroxitirosina o 3,

4-dihidroxifenilalanina (DOPA), por acción de la monofenol oxidasa (MFO) y la descarboxilación de la tirosina o de la DOPA para formar tiramina o dopamina respectivamente. Esta reacción es catalizada por la tirosina/dopa descarboxilasa (TYDC). No hay un orden definido para estas reacciones ya que la hidroxilación puede preceder a la descarboxilación o viceversa y las enzimas involucradas pueden utilizar ambos tipos de sustratos (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013). En *Papaver somniferum*, la TYDC es codificada por una familia de aproximadamente 15 genes, mientras que en *Argemone* aparentemente sólo existe un gen para esta enzima (Trujillo-Villanueva 2010). La dopamina y el 4-HFA son condensados para obtener S-norcoclaurina, un intermediario central trihidroxilado. La reacción es catalizada por la norcoclaurina sintasa (NCS) (Fig. 1.3) cuyo gen se ha aislado en varias especies incluyendo de *C. japonica* (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013; Rubio-Piña & Vázquez-Flota 2013).

En *A. mexicana* existen al menos dos genes para esta enzima (Rubio-Piña 2009; Xool-Tamayo *et al.* 2017a). Las siguientes reacciones corresponden a la formación de S-escoulerina a partir de la norcoclaurina e involucran dos metilaciones; la primera en el grupo OH en posición 6 y la segunda en el nitrógeno heterocíclico; una hidroxilación en posición 3 y otra metilación en el OH de la posición 4, produciendo S-reticulina (Fig. 1.3). La conversión de S-escoulerina a partir de reticulina requiere la oxidación del grupo N-metilo, formando un puente N-dimetileno (CH<sub>2</sub>-N-CH<sub>2</sub>) en una reacción catalizada por la enzima del puente de la berberina (BBE). La Figura 1.3 muestra estas reacciones con las enzimas involucradas y que corresponden la norcoclaurina 6-O-metiltransferasa (6OMT), la S-coclaurina N-metiltransferasa (CNMT), la N-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa (NMCH o Cyp80B3) y la 3'-hidroxi-N-metil-S-coclaurina 4'-O-metiltransferasa (4'OMT) (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013; Rubio-Piña y Vázquez-Flota 2013).

Los ADNc correspondientes a la 6OMT se han caracterizado de *E. californica*, *P. somniferum* y *Thalictrum tuberosum*, mientras que los correspondientes a la CNMT se han obtenido de *P. somniferum* y *C. japonica*. Por su parte, tanto la NMCH y la 4'OMT están codificadas por familias de entre dos y tres genes en *E. californica*, *P. somniferum* y *C. japonica*. Finalmente, el ADNc de la BBE se ha aislado de diferentes plantas como *E. californica*, *Berberis stolonifera* y *P. somniferum* (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013). La S-escoulerina representa el punto de ramificación de la ruta biosintética conduciendo, por un lado, a la formación de benzofenantridinas y por el otro a la de protoberberinas (Fig. 1.4).



**Figura 1.3** Reacciones comunes en la biosíntesis de ABI. **4-HFA**, 4-hidroxiacetilaldehído; **4-OMT**, 3'-hidroxi-*N*-metil-*S*-coclaurina 4'-*O*-metiltransferasa; **6OMT** norcoclaurina 6-*O*-metiltransferasa; **BBE**, enzima del puente de la berberina; **CNMT**, *S*-coclaurina *N*-metiltransferasa; **DOPA**, 3, 4-dihidroxi-fenilalanina; **MAO**, monoamino oxidasa; **MFO**, monofenol oxidasa; **NCS**, norcoclaurina sintasa; **NMCH** (Cyp80B3), *N*-metilcoclaurina 3'-hidroxilasa; **TyDC** tirosina/dopa descarboxilasa.

### 1.3.2.2. Síntesis de benzofenantridinas (sanguinarina) y protoberberinas (berberina)

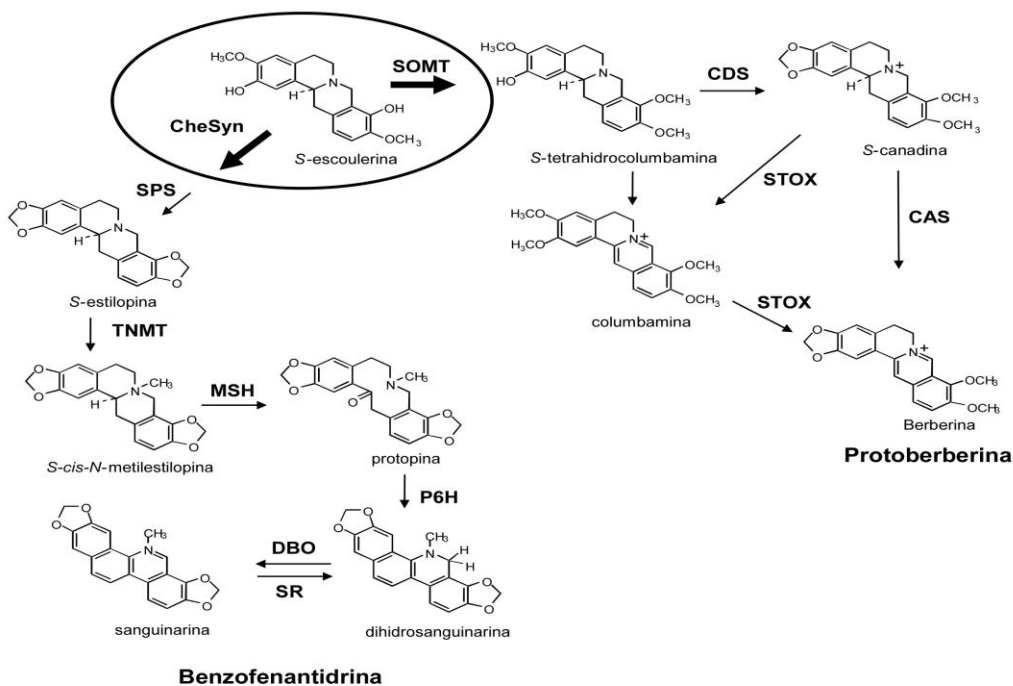
La biosíntesis de benzofenantridinas inicia con la conversión de la *S*-escoulerina a *S*-queilantifolina, seguida por la formación en *S*-estilopina. Estas reacciones son catalizadas por la *S*-queilantifolina sintasa (CheSyn) y *S*-estilopina sintasa (SPS), respectivamente (Fig. 1.4). La *S*-estilopina es metilada, formando *S*-cis-*N*-estilopina por acción de la *S*-tetrahidroprotoberberina cis-*N*-metiltransferasa (TNMT) (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013). Dos hidroxilaciones consecutivas resultan en la formación de protopina y dihidrosanguinarina, que finalmente se reduce en sanguinarina (Fig. 1.4). Estas hidroxilaciones son conducidas por la *N*-metilestilopina 14-hidroxilasa (MSH) y la protopina 6-hidroxilasa (P6H), respectivamente, mientras que la dihidrosanguinarina oxidasa (DBO) se encarga de la formación de dihidrosanguinarina. La sanguinarina reductasa (SR) es la enzima involucrada en el último paso (Fig. 1.4). La caracterización del gen de la TNMT se ha llevado a cabo en *E. californica*, *Corydalis vaginans* y



*S. canadensis*. Finalmente, se ha aislado una sanguinarina reductasa (SR) de *E. californica* que cataliza la conversión de la sanguinarina en dihidrosanguinarina (Fig. 1.4) (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013).

Por su parte, la síntesis de las protoberberinas inicia con la conversión de la S-escoulerina en S-tetrahydrocolumbamina, catalizada por la S-escoulerina 9-O-metiltransferasa (SOMT). El ADNc de esta enzima se aisló de *C. japonica*. La S-tetrahydrocolumbamina se convierte en S-canadina que se oxida a berberina (Fig. 1.4). Las enzimas participantes son la canadina sintasa y la S-tetrahydroberberina oxidasa (STOX). La canadina sintasa (CAS) ha sido detectada en los géneros *Thalictrum* y *Coptis*, mientras que las STOX ocurre en diversas especies (Ziegler y Facchini 2008; Hagel *et al.* 2013).

Recientemente, se han identificados dos genes maestros que coordinan la activación transcripcional de la ruta biosintética de la berberina en respuesta a la inducción por jasmonato en suspensiones celulares de *C. japonica* (Yamada *et al.* 2011; 2016). Uno de ellos pertenece a la familia de factores transcripcionales tipo WRKY (CjWRKY1), mientras que otro es una proteína básica tipo hélice-vuelta-hélice (helix-loop-helix; bHLH; CjbHLH1). Los genes correspondientes a ambos factores transcripcionales se activan dentro de la primera hora de exposición a jasmonato de metilo, antecediendo a la activación de la mayoría de los genes de la biosíntesis de berberina, en las suspensiones celulares (Yamada *et al.* 2011).



**Figura 1.4** Reacciones específicas para la biosíntesis de sanguinarina y berberina. **CAS**, canadina sintasa; **CheSyn**, S-queilantifolina sintasa; **DBO**, dihidrosanguinarina oxidasa **MSH**, N-metilestilopina 14-hidroxilasa; **P6H**, protopina 6-hidroxilasa; **SOMT**, S-escoulerina 9-O-metiltransferasa; **SPS**, S-estilopina sintasa; **STOX**, S-tetrahydroberberina oxidasa; **SR**, sanguinarina reductasa; **TNMT**, S-tetrahydroprotoberberina *cis*-N-metiltransferasa.

### 1.4 Estudios sobre la síntesis de ABI en *A. mexicana*

La presencia de alcaloides se debe en parte de igual forma a la capacidad de enzimas de producirlas dentro de las células del organismo en el que se presentan. La síntesis de alcaloides en *A. mexicana* se ha estudiado en plantas maduras, plántulas en desarrollo y cultivos *in vitro* encontrándose que cada sistema presenta particularidades propias.

### 1.4.1. Plantas maduras

Se consideran plantas maduras o adultas las que producen frutos y semillas fértiles. En *A. mexicana*, este estado se alcanza entre seis y ocho semanas después de la germinación y puede durar hasta cuatro meses en las condiciones de la península de Yucatán. En plantas en este estado (Fig. 1.5A), la distribución sigue un patrón diferencial, ya que las raíces acumulan berberina, queleritrina y sanguinarina, mientras que en las partes aéreas (tallos y hojas), solo se encuentra la berberina. Es interesante notar que en las semillas maduras también se encuentra la sanguinarina (Xool-Tamayo *et al.* 2017a, 2017b). Con el fin de establecer la capacidad biosintética de los diferentes tejidos de estas plantas, se analizó la distribución cuantitativa de estos alcaloides en raíces, tallos y hojas, junto con la de los transcritos correspondientes a genes seleccionados involucrados tanto en las reacciones biosintéticas iniciales, que son comunes para ambos alcaloides, como para las reacciones específicas que conducen a la formación de cada alcaloide. En el primer caso, se seleccionaron la TyDC, así como dos isoformas de la NCS (NCS1 y 2) y de la BBE (BBE1 y 2). De las reacciones involucradas en la biosíntesis específica de berberina, se monitorearon la SOMT y STOX; mientras que para la biosíntesis de sanguinarina se siguió la expresión de la CheSyn (CYP719A14), la ubicación de cada enzima en la ruta biosintética de muestra en las Figs. 1.3 y 1.4.

De manera general, las raíces tuvieron la mayor acumulación de alcaloides totales con valores alrededor de 3.5 mg/g PS para berberina, sanguinarina y queleritrina en comparación con valores menores a 2.0 mg /g PS de berberina en hojas y en tallos. Si bien se visualizaron cantidades traza de los otros alcaloides, éstas no se pudieron detectar por estar debajo del límite de detección. No obstante, la acumulación de los transcritos analizados fue marcadamente menor en las raíces que en los tejidos aéreos. De este modo, si bien todos los tejidos analizados mostraron la capacidad biosintética para berberina, dicha capacidad parece ser menor en las raíces, aunque éstas acumulen las mayores cantidades de alcaloides. Lo anterior sugiere la existencia de un posible mecanismo de transporte de alcaloides de los tejidos aéreos a las raíces. Alternativamente, podrían existir enzimas que, aun presentado las mismas propiedades catalíticas, correspondan a productos génicos diferentes, expresados preferencialmente en hojas y raíces. De este modo, es posible que, en los análisis transcripcionales de las raíces, no se hayan detectado las formas preferencialmente expresadas en este tejido (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b; Vázquez-Flota *et al.* 2018).

Por otro lado, la expresión de CheSyn, cuyo producto proteico participa únicamente en la biosíntesis de sanguinarina, sólo se detectó en las raíces, correspondiendo con el principal sitio de acumulación de este alcaloide. Esto indica que en plantas maduras las raíces se encargan tanto de la biosíntesis como de la acumulación de este alcaloide (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b; Vázquez-Flota *et al.* 2018).

Es interesante notar que, además de las raíces, la sanguinarina no se detectó en tejidos aéreos, incluyendo los componentes del fruto, sino solamente en las semillas maduras. Esto sugiere que el alcaloide encontrado en las semillas pudiera formarse en las mismas (Laines-Hidalgo 2019).

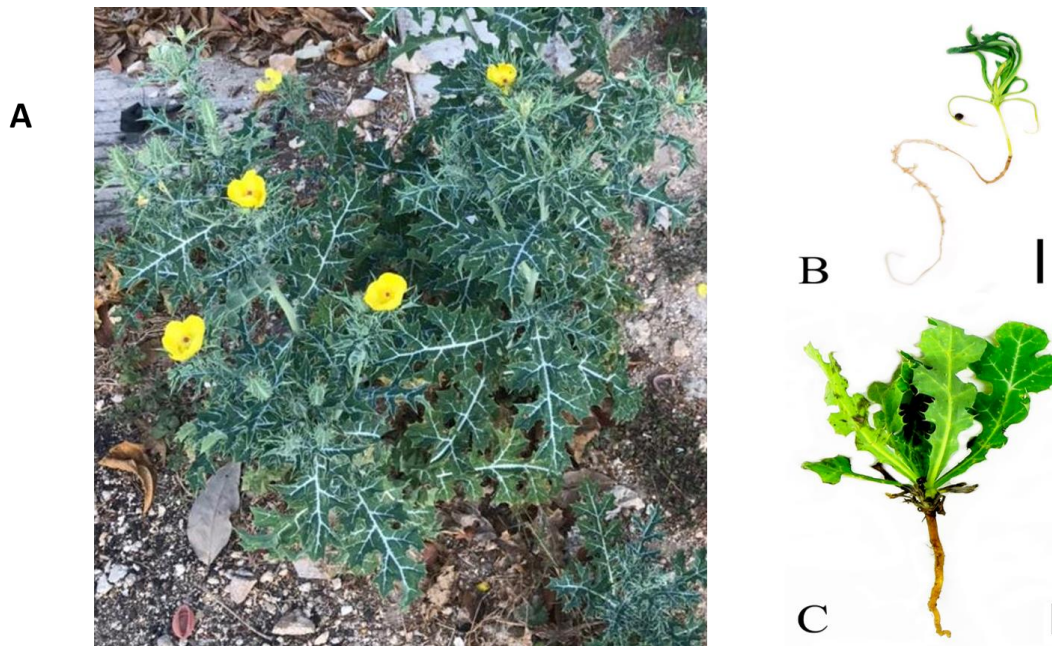
### 1.4.2. Plántulas en desarrollo

En plántulas en etapa cotiledonaria, durante los primeros 10 días de desarrollo y antes de la emergencia del primer par de hojas verdaderas (Fig. 1.5B), se logran detectar niveles importantes de sanguinarina en los cotiledones aun cerrados y que corresponden a los propios de las semillas. Al desplegarse los cotiledones, estos niveles aumentan en las radículas, pero no se detectan en los cotiledones abiertos (Fig. 1.5B). No obstante, los primeros pares de hojas verdaderas, que sustituyen a los cotiledones, contienen sanguinarina, aunque la berberina es el alcaloide más abundante. A diferencia de lo que sucede en las plantas maduras, las radículas muestran la mayor actividad transcripcional, sugiriendo un posible transporte de alcaloides hacia la parte aérea. Notablemente, se observó que la sanguinarina presente en las semillas se encontraba en la testa que recubre los cotiledones. Por otro lado, las radículas en activo crecimiento en estas etapas, excretaban sanguinarina, indicando un posible papel protector contra microorganismos, o bien en la inhibición de la germinación de otras especies, reduciendo la competencia por nutrientes (Xool-Tamayo *et al.* 2017a). Al avanzar el desarrollo, la capacidad biosintética para sanguinarina en las partes aéreas se mantiene, aunque en baja proporción, hasta la etapa juvenil (antes de la floración, aproximadamente cuatro semanas) (Fig. 1.5C) cuando desaparece.

Un aspecto interesante fue que la capacidad de acumular alcaloides disminuyó a casi la mitad desde las etapas tempranas hasta alcanzar el estado adulto. La actividad transcripcional disminuyó en valores similares, de acuerdo con estimaciones de los niveles de los transcritos biosintéticos por PCR tiempo real cuantitativo. Más aún, se observó una transición en los niveles de actividad transcripcional. Durante las etapas tempranas los tejidos subterráneos mostraron en mayor medida esta actividad transcripcional en comparación con los tejidos aéreos. No obstante,

esto se fue invirtiendo en las etapas posteriores hasta alcanzar el estado adulto, cuando en las raíces fue sustancialmente menor que en los tejidos aéreos, lo que no se relacionó con los contenidos finales de alcaloides. De hecho, las raíces mostraron mayores contenidos de alcaloides, lo que sugiere que los tejidos aéreos aportan al proceso de biosíntesis de los alcaloides acumulados en las raíces y, de esta manera, abre la posibilidad a la existencia de un mecanismo de transporte entre estos tejidos.

Se han descrito sistemas de transporte para diferentes alcaloides, incluyendo berberina. En plantas de *C. japonica*, la berberina es sintetizada exclusivamente en las raíces de donde se transporta a los rizomas en los que se acumula. Esta movilización ocurre con la participación de proteínas transportadoras tipo ABC (Shitan *et al.* 2003; 2014).



**Figura 1.5** Aspecto de las plantas maduras (A), plántulas cotiledonarias (B) y juveniles (C) de *A. mexicana*. Barra 0.5 cm en **B** y 1.0 cm en **C**.

### 1.4.3 Cultivos *in vitro*

Los cultivos *in vitro* son sistemas muy ventajosos para estudios sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios ya que permiten mantener condiciones ambientales controladas, así como la aplicación de estímulos externos con relativa facilidad. No obstante, los resultados obtenidos deben ser analizados considerando que éstos no necesariamente son extrapolables a plantas íntegras, ya que no presentan la organización de éstas. De este modo, solamente representan eventos que suceden a nivel celular o tisular (Vázquez-Flota y Loyola-Vargas 2003). Se han desarrollado tres sistemas de cultivos *in vitro* con los que se han abordado diferentes aspectos relacionados con la regulación de la síntesis de alcaloides en esta planta. Estos sistemas son cultivos de callos y de suspensiones celulares de brotes múltiples, que corresponden a las partes aéreas, pero que carecen de raíces; y de raíces aisladas que no presentan el componente aéreo.

### 1.4.4 Cultivos de callos y de células en suspensión

Una línea de callos de *A. mexicana* que se obtuvo en el laboratorio tiene como característica que acumula cantidades significativas de sanguinarina (cerca de 0.35 mg/g PS; Carrillo-Pech 2006) en condiciones normales de cultivo. En las suspensiones celulares estas cantidades se reducen ligeramente, pero manteniéndose en valores superiores a líneas de otras especies que producen este alcaloide, como *E. californica*. Esto es interesante ya que en otras especies la acumulación de sanguinarina solo se detecta después de la aplicación de condiciones que activan una reacción de defensa, como pueden ser la exposición a preparaciones de cultivos de hongos o bacterias patogénicas. En esta respuesta se incluye la acumulación del alcaloide, ya que este tiene propiedades antimicrobianas. La aplicación de mediadores químicos de esta respuesta, como el jasmonato de metilo, pueden causar el mismo efecto y en ocasiones se utilizan en lugar de la aplicación de los preparados de microorganismos (Trujillo-Villanueva *et al.* 2010). Molecularmente, las bases de esta respuesta incluyen: a) la percepción del estímulo externo (que pueden ser componentes de las paredes de los microorganismos); b) formación de mediadores químicos (como el jasmonato de metilo, ácido salicílico o etileno, entre otros) y c) activación transcripcional de genes de defensa, incluidos los involucrados en la biosíntesis de fitoquímicos (sanguinarina en este caso).

Aunque los cultivos *in vitro* de *A. mexicana* pueden producir sanguinarina cuando se mantienen en condiciones basales, aún sin ser estimulados, pueden mostrar una respuesta limitada cuando

se exponen a inductores del metabolismo secundario. Esto difiere de lo observado en las otras especies, como *E. californica*, en las cuales la amplitud de la respuesta es mucho mayor (Trujillo-Villanueva *et al.* 2010; 2012; Guizar-González *et al.* 2012). Parte de la reducida amplitud de esta respuesta se ha explicado sobre la base de las propiedades tóxicas de la sanguinarina que pueden imponer un límite máximo de acumulación. Dado que las cantidades basales son considerables de inicio (15 mg/-L), los máximos tolerables podrían ser fácilmente alcanzados con un aumento moderado (Trujillo-Villanueva *et al.* 2012). De hecho, un mecanismo que podría mitigar los daños por la acumulación de este alcaloide, que se puede intercalar en el ADN o interferir con el funcionamiento de proteínas y membranas, consiste en reducirlo a dihidrosanguinarina para su posterior expulsión al medio externo mediante un sistema de vesículas de transporte (Weiss *et al.* 2006; Trujillo-Villanueva *et al.* 2012).

Por otro lado, mediante el uso de inhibidores de la formación intracelular del jasmonato de metilo se ha logrado establecer que esta respuesta limitada se debe a que solamente la porción correspondiente a las reacciones iniciales, incluyendo TYDC y BBE de la ruta biosintética de la sanguinarina es sensible a este mediador y que otros componentes son responsables de la activación de los genes responsables de la etapa final de la biosíntesis (Guizar-González *et al.* 2012; 2016).

### 1.4.5 Cultivos de brotes y de raíces

El uso de cultivos de brotes ha permitido establecer la capacidad biosintética del componente aéreo, eliminando la participación de las raíces que, como se comentó, interviene en el tipo y cantidad de alcaloides que se acumulan en hojas y tallos. En una línea de brotes los patrones de acumulación de alcaloides presentaban cantidades importantes de sanguinarina que, normalmente no ocurre en los tejidos aéreos maduros. Junto con la sanguinarina también se acumularon cantidades significativas de berberina. Esto sugiere que, aunque los tejidos aéreos tienen la capacidad biosintética y de acumulación de sanguinarina, en presencia de la raíz dichas capacidades son restringidas en este tejido. De hecho, los transcritos correspondientes a la CheSyn, que participa en la biosíntesis de sanguinarina y que normalmente no se detecta en tejidos aéreos maduros, se acumulan en cantidades comparables a los encontrados en las radículas de plántulas en desarrollo (Xool-Tamayo *et al.* 2017b).

En este sentido, el sistema recíproco, correspondiente a las raíces aisladas cultivadas *in vitro* se comportaron de manera similar a las raíces de las plantas intactas ya que tanto la sanguinarina como la berberina se acumularon simultáneamente (Xool-Tamayo *et al.* 2017b).

### 1.5 Distribución tisular de la ruta de síntesis de berberina y sanguinarina en *A. mexicana*.

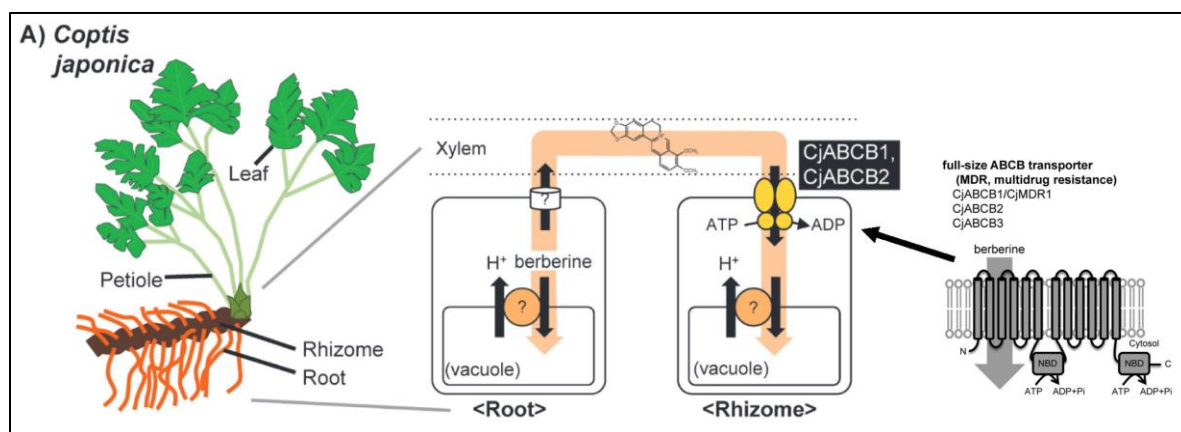
Con base en lo anterior, se observa que en ciertas condiciones pueden ocurrir discrepancias entre los tejidos en donde se expresan algunos de los genes involucrados en la ruta de síntesis de berberina y sanguinarina (visualizado por las enzimas TYDC y BBE de la ruta común y SOMT/StySyn para las rutas específicas de berberina y sanguinarina, respectivamente) y la acumulación de los alcaloides. Por un lado, podrían deberse a diferencias en la temporalidad de los distintos tramos de la ruta biosintética. Es decir, que no toda la ruta opere de manera continua, sino que sea necesaria la acumulación de ciertos intermediarios antes de que los siguientes tramos se activen transcripcionalmente. Esta clase de mecanismos se han observado, por ejemplo, en la biosíntesis de alcaloides monoterpénoides en plántulas de *C. roseus* en las que las últimas reacciones involucradas en la formación de vindolina se activan una vez que se han acumulado ciertas cantidades de tabersonina (St-Pierre y De Luca 1995; Besseau *et al.* 2013). De este modo, los transcritos involucrados en las reacciones tempranas e intermedias que no coinciden con la acumulación del alcaloide en *A. mexicana* (Xool *et al.* 2017a) podrían explicarse por diferentes eventos como sucede en *C. roseus*.

Por otro lado, es posible que existan alternativas catalíticas aún no detectadas y que puedan llevar a cabo algunas de las reacciones analizadas. Por ejemplo, en algunos análisis transcriptómicos de *E. californica* se han detectado variantes con actividades redundantes en las reacciones finales de la biosíntesis de sanguinarina (Hagel *et al.* 2012). En ese sentido, en distintos transcriptomas de *A. mexicana* se han encontrado diferentes secuencias relacionadas con algunos de los ADNc ya identificados en la ruta biosintética como CheSyn o STOX (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b).

Finalmente, es posible que existan mecanismos de transporte a larga distancia de tal modo que los alcaloides sean producidos en un tejido, pero almacenados en otros. De hecho, existen diferentes tipos de mecanismos de transporte para alcaloides, incluyendo para berberina en especies como *C. japonica* y *T. minus* (Shitan *et al.* 2013) y sanguinarina en *E. californica* (Nwanyichukwu 2014). En las tres especies los mecanismos de transporte de berberina y sanguinarina involucran la participación de una proteína transportadora de la familia ABCB. En *C. japonica* esta proteína denominada CjABCB1 participa en el transporte de berberina de los sitios de biosíntesis en la raíz hacia el rizoma en donde se acumula (Shitan *et al.* 2003). Los análisis de funcionalidad demostraron que CjABCB1 es una proteína transportadora de flujo de



berberina y que se encuentra localizada en la membrana plasmática (Fig. 1.6). También en *E. californica* se reportó que una proteína ABC denominada EcABCB1 estaba involucrada en el transporte de sanguinarina hacia el interior celular en suspensiones celulares de dicha especie; por lo que este mecanismo ha podido ser visualizado en diferentes especies (Nwanyichukwu 2014). Teniendo en cuenta estos ejemplos, las discrepancias encontradas entre los sitios de síntesis y los sitios de acumulación de alcaloides ABI en *A. mexicana* puedan deberse, en parte, a proteínas transportadoras de la familia ABC (Shitan *et al.* 2013).



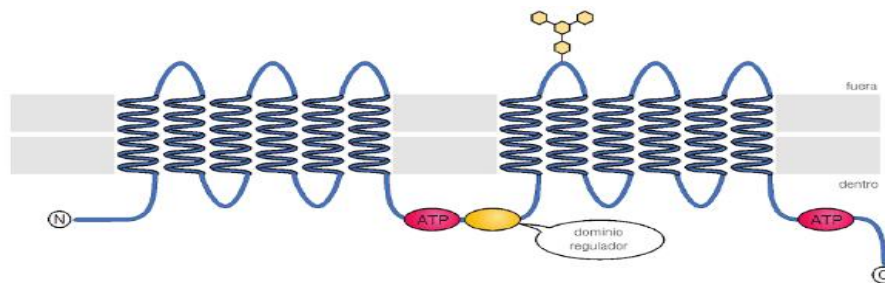
**Figura 1.6** Transporte de berberina en *C. japonica*. Se cree que la berberina se sintetiza en la raíz y luego se traslada al rizoma a través del xilema. Los transportadores ABCB localizados en la membrana plasmática, CjABCB1 y B2, funcionan en la captación de berberina del xilema en el rizoma. Una vez importada al citosol, la berberina se transporta rápidamente a la luz vacuolar a través de un antiportador H<sup>+</sup> / berberina. Estructura putativa y función de ABCB de tamaño completo. Adaptado de Shitan *et al.* 2014.

### 1.6 Transportadores tipo ABC (ATP-Binding Cassette)

Tanto los eucariotas como los procariotas poseen una serie de transportadores dependientes de ATP, que pertenecen a una superfamilia de proteínas denominadas proteínas transportadoras con casete fijador de ATP (ABC; de **A**T**P**-**B**inding **C**assette transport proteins; Do *et al.* 2018). La

secuencia del sitio de unión de ATP de todos estos transportadores, denominada NBD (**N**ucleotide **B**inding **D**omain), comparte una extensa homología, así como una organización con conservación del dominio. De ahí el nombre, casete de unión al ATP, que se encuentra en el segmento transmembranal de los transportadores y que se ha mantenido durante la evolución (Do *et al.* 2018). El dominio ABC constituye el módulo con la fuerza impulsora para el transporte de una serie de compuestos, entre las que se cuentan iones, metales pesados, azúcares, medicamentos, aminoácidos, péptidos y proteínas (Do *et al.* 2018).

El dominio transmembranal (TMD de **T**rans**M**embrane **D**omain) de las proteínas ABC presenta un total de doce hélices que atraviesan varias veces la membrana plasmática, organizadas en dos regiones definidas que construyen un canal con alta selectividad hacia el sustrato (Muller 2004). Por el lado citosólico de este arreglo transmembranal se localizan dos dominios reguladores, los cuales son los NBD mencionados anteriormente; uno de ellos es responsable de la unión e hidrólisis del ATP, mientras que el otro participa en la fosforilación reversible del transportador (Fig. 1.7) (Muller 2004).



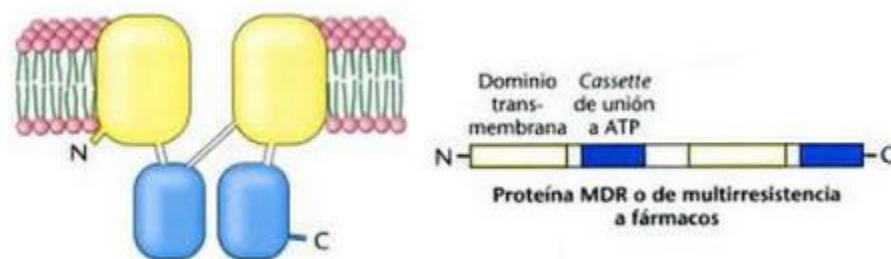
**Figura 1.7** Estructura de un transportador ABC. El transportador ABC típico consta de una cadena proteica que se ordena en dos grupos con seis hélices transmembrana cada uno. La glicosilación de los dominios extracelulares determina la vida media del transportador. Adaptado de Muller 2004.

Entre las funciones que los transportadores ABC desempeñan se encuentran la presentación del complejo antígeno-anticuerpos a los macrófagos y linfocitos. Las proteínas de multiresistencia a los fármacos (MDR1, del inglés Multi-Drug-Resistance), que hace resistente a las células tumorales contra numerosos medicamentos citotóxicos, son codificadas por genes para transportadores ABC (Muller 2004). En estas células tumorales, los genes para MDR-ATPasa's se encuentran en un mayor número de copias, y acoplan la hidrólisis de ATP con la excreción de

## CAPÍTULO I

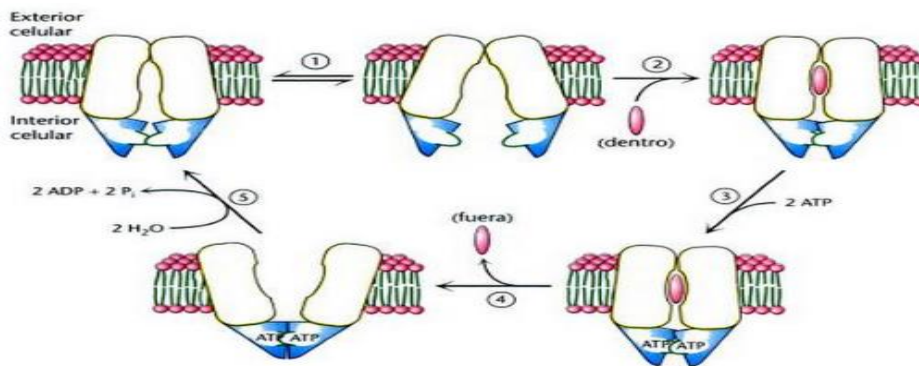
los fármacos, antes de haber logrado el efecto tóxico deseado. Esto se puede observar especialmente en las células de carcinoma de hígado, ya que los hepatocitos expresan grandes cantidades de MDR1-ATPasa para la “descontaminación” de materia endógena y exógena (Muller 2004). También, la resistencia múltiple de *Plasmodium falciparum*, causante de la malaria, se basa en un transportador ABC. Los plasmodios resistentes expresan esta proteína en grandes cantidades, lo que les permite excretar los medicamentos que han difundido hacia dentro. Estos ejemplos ilustran la capacidad de adaptación y la fuerza motriz mediante estrategias moleculares “inteligentes” en células de cáncer y parásitos, con las cuales se pueden realizar acciones terapéuticas eficaces (Muller 2004).

El análisis de las secuencias de aminoácidos de MDR y otras proteínas homólogas revelaron una arquitectura común (Fig. 1.8); (Berg 2007). Cada proteína está compuesta por cuatro dominios: dos dominios que atraviesan la membrana (TMD) y dos dominios de unión a ATP (NBD). Las proteínas ABC son miembros de la superfamilia de NTPasas de bucle P (Berg 2007). Un ejemplo de la estructura de un transportador ABC procariota es el de *Vibrio cholerae*. Esta proteína es un dímero formado por péptidos de 62 kDa; la mitad de cada proteína por extremo amino terminal presenta un dominio que atraviesa la membrana, mientras que el extremo carboxilo presenta el dominio de unión a ATP (Berg 2007). En contraste con la proteína MDR, otras proteínas ABC, particularmente las de procariotas, son proteínas con múltiples subunidades, pudiendo ser dímeros, como en el caso que se acaba de describir, o heterotetrámeros con dos subunidades que atraviesan la membrana y dos subunidades con los dominios NBD. Esto difiere de los transportadores eucariotas, en que las distintas actividades están en una cadena única (Berg 2007).



**Figura 1.8** Estructura de la proteína MDR (transportador ABC). La proteína de multiresistencia a fármacos (MDR) es una representante de una extensa familia de proteínas homologas compuestas de dos dominios transmembranales y dos dominios de unión a ATP, denominados cassettes de unión a ATP (ABCs) Adaptado de Berg 2007.

El mecanismo de acción de los transportadores ABC depende de la interacción con ATP y se ha desarrollado un modelo para el transporte activo mediado por estas proteínas (Berg 2007). El ciclo catalítico se inicia con el transportador libre tanto de ATP como de sustrato. El transportador puede interconvertirse así entre sus formas abierta y cerrada.



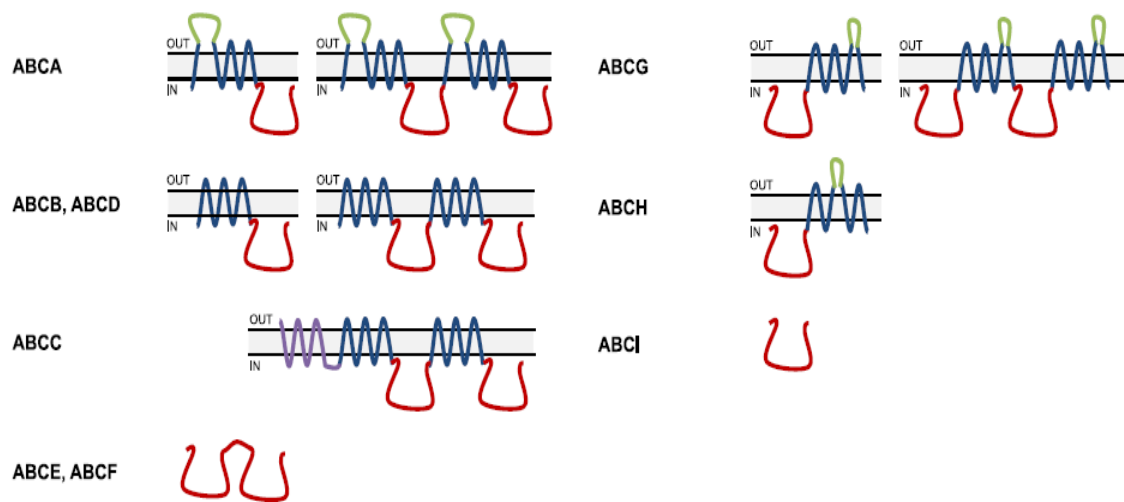
**Figura 1.9** Mecanismo de acción de un transportador ABC. El mecanismo incluye los siguientes pasos: (1) Apertura del conducto hacia el interior de la célula; (2) Unión del sustrato y cambio conformacional de los cassettes de unión a ATP; (3) Unión del ATP y cambios conformacionales consiguientes; (4) Separación de los dominios que atraviesan la membrana y liberación del sustrato al otro lado de la membrana y (5) hidrólisis del ATP y restauración del transportador a su estado inicial. Adaptado de Berg 2007.

En un transportador de salida, al entrar en contacto el sustrato con la cavidad central de la forma abierta del transportador, se induce el cambio conformacional en el dominio NBD, aumentando su afinidad por el mismo, y permitiendo que los dominios TMD y NBD interactúen fuertemente entre sí. Esto induce, a su vez, un cambio en la conformación tridimensional en la estructura existentes entre los dos dominios que atraviesan la membrana, lo que libera el sustrato al exterior de la célula. Finalmente, la hidrólisis de ATP y la liberación del fosfato inorgánico restauran la proteína para iniciar un nuevo ciclo (Fig. 1.9).

### 1.6.1 Distribución taxonómica de las proteínas tipo ABC

Las proteínas ABC están presentes en una variedad de procariotas y eucariotas, formando una superfamilia de proteínas. Los genomas de plantas contienen numerosos genes que codifican para proteínas ABC. Por ejemplo, el genoma de *Arabidopsis thaliana* contiene aproximadamente 120 genes que codifican para proteínas ABC. La mayoría de estas proteínas contienen dominios transmembranales (TMD) y dominios de unión a nucleótidos (NBD) que funcionan en la unión e hidrólisis del ATP.

Como transportadores primarios, las proteínas ABC acoplan la energía directamente obtenida de la hidrólisis del ATP con la translocación del sustrato. Las proteínas ABC de plantas están agrupadas en ocho subfamilias (Fig 1.10) (ABCA-G y ABCI; ABCH está ausente en genomas de plantas), de acuerdo a la similitud de secuencias y, por ende, en el acomodo de los TMD y los NBD (Shitan *et al.* 2014). El dominio NBD presente y característico de todas las proteínas ABC posee motivos altamente conservados, tales como las secuencias Walker A/Walker B, la firma ABC y los loops H y Q (Verrier *et al.* 2008). Las plantas son notables por su larga complementación particularmente de proteínas ABC, las cuales están asociadas con la versatilidad metabólica debido a que a diferencia de los animales éstas son sésiles y necesitan de diversos mecanismos para defenderse del medio ambiente y de los organismos. Esta misma naturaleza de las plantas y su capacidad de fotosíntesis también demanda un incremento en el requerimiento para la detoxificación y funciones asociadas al transporte (Verrier *et al.* 2008). En proteínas importadoras ABC de procariotas, los dominios TMD junto con componentes adicionales, tal como la proteína de unión periplásmica involucrada en la presentación de sustratos, son comúnmente codificados por genes separados los cuales están acomodados como operones. En proteínas ABC exportadoras común para procariotas y eucariotas, los dominios núcleo están fusionados en varias permutaciones: un arreglo común es dos unidades de tamaño medio codificados por genes separados el cual se piensa que forman un homo o heterodímero para formar al transportador funcional (Verrier *et al.* 2008). A pesar de que los NBD comparten un origen evolutivo y mecanismo común, los TMD pueden diferir considerablemente en secuencia y exhiben potencialmente diferencias mecánicas importantes (Higgins *et al.* 2004)



**Figura 1.10** Topología de subfamilias ABC. Basado en su tamaño, orientación y organización de los dominios, las proteínas ABC han sido clasificadas en 9 subfamilias, ABCA a ABCI. El transportador de tamaño medio para el caso de las subfamilias A, B, D, y G se encuentra a la izquierda de cada panel que representa a cada subfamilia mientras que el de tamaño completo se encuentra a la derecha. El N-Terminal se encuentra a la izquierda y C-Terminal a la derecha; los NBD en rojo, los TMD en azul y los dominios extracitosólicos en verde. (Adaptado de Lefevre *et al.* 2018).

### 1.7 Mecanismos de transporte intertisular de berberina

Utilizando suspensiones celulares de *C. japonica* se estableció que la toma de berberina añadida exógenamente al medio dependía de la adición de ATP y de la glicoproteína-P (o MultiDrugResistance protein 1) y se restringía en la presencia de vanadato, un inhibidor de transportadores dependientes de ATP. Esto sugiere la participación de un mecanismo activo de transporte, tipo ABCB (Sakai *et al.* 2002). Con esta información y mediante una estrategia por RACE (Rapid amplification of ADNc ends) 5'-3' se aislaron tres transportadores de este tipo en estas células, denominados CjABCB1/MDR1, CjABCB2 y CjABCB3 (Shitan *et al.* 2003). Aunque

los tres transportadores fueron capaces de movilizar berberina cuando se expresaron en levaduras o en oocitos de *Xenopus*, solamente la participación de CjABCB1/MRD1 y CjABCB2 se pudo establecer en el transporte de larga distancia (raíz-rizoma). Ambos transportadores, que comparten el 82% de identidad a nivel de aminoácidos, se localizan en la membrana plasmática y se expresan preferentemente en el xilema de rizomas (Sakai *et al.* 2002; Shitan *et al.* 2003). Se ha propuesto un modelo en el que estos transportadores descargarían la berberina sintetizada en los rizomas a los vasos del xilema, por donde se movilizaría a las raíces y una vez en las células de este tejido se acumularía en las vacuolas, mediante un sistema antiporte por medio de un gradiente protónico (H<sup>+</sup>/berberina, Otani *et al.* 2005). Es interesante hacer notar que transportadores tipo MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion, CjMATE1) se han identificado en suspensiones celulares de *Coptis*, pero aún no se ha establecido su participación específica en este proceso ya que, aunque movilizan berberina, también pueden hacerlo con otros compuestos (Otani *et al.* 2005; Shitan *et al.* 2013; Takanashi *et al.* 2017).

### **1.7.1 Estructura y caracterización molecular de los transportadores de berberina en *Coptis japonica* y *Thalictrum minus*.**

Como se ha mencionado se han identificado y aislado tres transportadores de berberina (Sección 1.7) en *C. japonica* (CjABCB1, B2 y B3), dos de ellos (CjABCB1 y B2) siendo caracterizados funcionalmente. Adicionalmente, dos de *T. minus* también han sido aislados (Shitan *et al.* 2013). El primer transportador aislado CjABCB1/MDR1 (Cjmdr1 o CjABCB1) se obtuvo mediante el diseño de cuatro cebadores degenerados para aislar un fragmento de ADNc con un tamaño de 320 pb, que correspondió al dominio NBD (dominios de unión a ATP) usando como referencia al transportador de humanos HsABCB1. El ADNc completo, aislado de suspensiones celulares por RACE 5' y 3', tuvo una longitud de 4192 nt, codificando a una proteína de 1289 aminoácidos, en la que se encontraron los dominios típicos de los transportadores ABC y que incluyen dos NBD, dos TMD (Fig. 1.8) así como tres motivos característicos en este tipo de proteínas, denominados Walker A, Walker B y la firma ABC (Yazaki *et al.* 2001).

El análisis bioinformático de CjABCB1 reveló que pertenece a la familia de genes parecidos a *mdr* (*mdr*-like genes; Yazaki *et al.* 2001). La expresión de este gen fue preferencialmente en los rizomas, que corresponde al tejido de mayor acumulación de berberina (Yazaki *et al.* 2001). Esto resultó interesante, ya que la caracterización funcional de CjABCB1 en oocitos de *Xenopus* demostró que éste opera como un transportador de toma (o de flujo de entrada) de drogas (Shitan

*et al.* 2003). Además, mediante el uso de anticuerpos específicos fue posible localizar las proteínas únicamente en la membrana plasmática, mientras que la localización de los transcritos reveló que predominaban en el tejido vascular asociado al xilema de los rizomas, el tejido en que se acumula la berberina (Shitan *et al.* 2003). Combinando estos resultados se pudo establecer la participación de CjABCB1 (Cjmdr1) en la descarga de berberina del xilema hacia las células que la acumulan en los rizomas (Shitan *et al.* 2003). Mediante una estrategia similar, se lograron aislar otros dos transportadores relacionados a CjABCB1 en suspensiones celulares de *C. japonica* (CjABCB2 y CjABCB3) (Shitan *et al.* 2013). Los ADNc aislados fueron de aproximadamente 4.2 kb, correspondientes a proteínas de 1292 y 1288 aminoácidos respectivamente, encontrándose los dos NBD y los dos dominios transmembranales, con las doce hélices que atraviesan las membranas (Fig. 1.6). Ambas secuencias, al igual que CjABCB1, se agrupan en el clado II en un árbol filogenético de transportadores ABC de plantas. Este clado es característico y agrupa solamente a algunos transportadores de auxinas, además de los CjABCB (Shitan *et al.* 2013). La similitud a nivel de aminoácidos entre CjABCB2 y CjABCB1 fue de 82%, mientras que sólo fue del 61% entre CjABCB3 y CjABCB1. Es interesante notar que esta similitud también fue baja entre CjABCB3 y los demás integrantes del clado II, a diferencia de CjABCB2 (Shitan *et al.* 2013). Más aún, CjABCB2 mostró una elevada expresión en rizomas mientras que CjABCB3, solo se observó en suspensiones celulares, sugiriendo su posible participación especializada en estos cultivos. La caracterización funcional de CjABCB2, así como la inmunolocalización de la proteína y la localización tisular de los transcritos correspondientes fueron similares a CjABCB1, sugiriendo su posible redundancia funcional (Shitan *et al.* 2013).

En suspensiones celulares de *T. minus* se han aislado dos transportadores de berberina que también pertenecen al grupo de transportadores ABC-B (Shitan *et al.* 2015). Los ADNc correspondientes a ambos transportadores (TmABCB1 y B2) tuvieron una longitud de ca. 4.2 kb, codificando para proteínas de 1285 y 1286 residuos, respectivamente (Shitan *et al.* 2015). En ambos casos se encontraron los NBD y los dominios transmembranales característicos. TmABCB1 y B2 compartieron un 77% de identidad a nivel de aminoácidos entre sí, mientras que TmABCB1 mostró 78 y 75 % de identidad hacia CjABCB1 y B2, respectivamente. Por su parte, TmABCB2 compartió el 80 y 82% con CjABCB1 y B2, respectivamente (Shitan *et al.* 2015). Ambos transportadores pertenecen al clado II de transportadores ABC de plantas, al igual que los de *Coptis* (Shitan *et al.* 2015). Los patrones de expresión, así como los estudios de inmunolocalización, demostraron que, al igual que los transportadores de *Coptis*, en *Thalictrum*



estos transportadores se encuentran en la membrana plasmática y participan en la excreción de berberina de las células al medio cuando los cultivos se someten a condiciones de inducción (Shitan *et al.* 2015).

De este modo, el tipo de transporte a larga distancia de la berberina, involucra la participación de proteínas ABC. Este tipo de proteínas se encuentra tanto en procariotas como eucariotas y generalmente participan en mecanismo de extrusión de tóxicos (Shitan *et al.* 2013).

### 1.8. Otros mecanismos de transporte de berberina

Recientemente, y a partir de una biblioteca de EST de suspensiones celulares de *C. japonica* se aisló un transportador tipo **Multi-Antimicrobial Extrusion Protein (MATE; CjMATE1)**, de 500 aminoácidos y que se localiza en el tonoplasto de células de todos los tejidos que acumulan berberina, aunque de manera preferente en los rizomas de esta planta (Takanashi *et al.* 2017). Este transportador se agrupó en el mismo clado que otros transportadores tipo MATE involucrados en la acumulación de metabolitos secundarios en vacuolas, como antocianinas en uvas y maíz, o nicotina en tabaco (Takanashi *et al.* 2017). No obstante, mostró una baja identidad a nivel de aminoácidos (49% con NtJAT2 de tabaco; Takanashi *et al.* 2017).

Es importante recalcar en este punto que los dominios responsables del reconocimiento de compuestos catiónicos o aniónicos no han sido determinados funcionalmente. Por otro lado, también es interesante hacer notar que la activación transcripcional de CjMATE1 resultó dependiente de CjBHLH1, uno de los genes maestros de la síntesis de berberina en *C. japonica*, ya que el silenciamiento de éste por ARNi abatió la expresión del transportador, tanto en suspensiones celulares como en plantas, sugiriendo que el proceso de biosíntesis del alcaloide se coordina con el mecanismo de transporte (Takanashi *et al.* 2017).

### 1.9. Transporte mediado por vesículas

El modelo de transporte mediado por vesícula es propuesto por observación microscópica de pequeñas vesículas que se presume llevan alcaloides a las vacuolas a las que se fusionan entre los compartimientos membranales. No se sabe si las pequeñas vesículas se originan a partir del retículo endoplasmático (RE) u otros organelos y como los alcaloides son incorporados a estas vesículas. Los alcaloides bencilisoquinolínicos, incluyen a la berberina en las especies del género *Berberis*, y sanguinarina en células en cultivo de *Papaver* y del cual se piensa llevan a cabo este proceso de ser transportados por vesículas (Shitan *et al.* 2014).

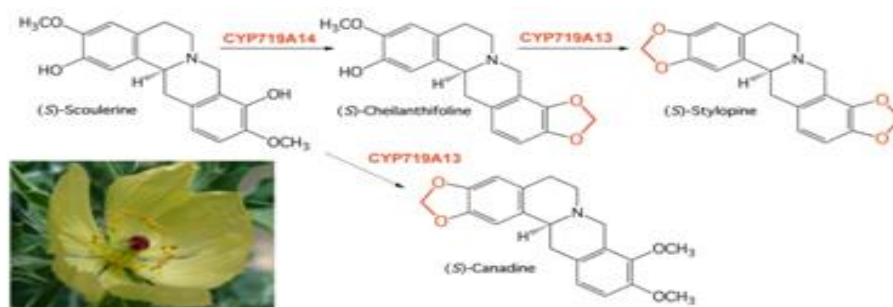
### 1.10. Mecanismos de transporte de alcaloides en otras especies.

Se ha descrito el transporte de alcaloides en otras especies; en *C. japonica* se ha detallado la participación de dos proteínas ABC denominadas CjABCB1 y CjABCB2 respectivamente y que la función de ambas ha sido relacionada con la movilización del alcaloide berberina que tiene su lugar de síntesis en la raíz pero que el sitio de acumulación final es el rizoma de la planta (Shitan *et al.* 2003; 2013). En *E. californica* también se ha detallado la participación de una proteína ABC denominada EcABCB1, la cual fue relacionada con la movilización del alcaloide sanguinarina (Nwanyichukwu 2014). En *C. roseus*, de igual manera, se visualizó que un transportador ABC denominado CrTPT2 estaba involucrado en la secreción del alcaloide monoterpeneo catarantina desde las células epidermales de las hojas hacia el exterior (Yu and De Luca 2013). De igual forma otros elementos que han sido reportados y que se ha demostrado que forman parte de la movilización de alcaloides pero que no forman parte de la familia de proteínas ABC son por ejemplo en *N. tabacum* dos transportadores MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion-type) y el transportador NUP1 (Nicotine Uptake Permease 1) que se ha descrito que de igual manera movilizan al alcaloide nicotina pero que no forman parte de la familia de proteínas transportadoras ABC (Shoji *et al.* 2009; Hildreth *et al.* 2011).

### RECAPITULACIÓN

De lo anterior se observa que en *A. mexicana* existen discrepancias entre los sitios de acumulación de los alcaloides berberina y sanguinarina y los de localización de algunos de los transcritos involucrados en su biosíntesis. Más aun, los patrones de distribución de alcaloides y de estos transcritos en los diferentes tejidos se modifican a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo (Xool-Tamayo *et al.* 2017a). Se debe enfatizar que en estos estudios se siguieron los niveles de acumulación de algunos transcritos involucrados en los tramos comunes del proceso de biosíntesis de tanto berberina como sanguinarina (TyDC, NCS y BBE; Figs. 1.2-1.4), así como de las ramas específicas para berberina (SOMT y STOX; Fig. 1.3) y de sanguinarina (CheSyn, DBOX; Fig. 1.3) (Vázquez-Flota *et al.* 2018). Estas discrepancias podrían explicarse de diferentes maneras. Por un lado, podrían existir diferencias temporales entre la acumulación de los alcaloides y la de los transcritos analizados. Además, dada la similitud estructural de los alcaloides y de los intermediarios biosintéticos (Fig. 1.3, 1.4). También podrían existir alternativas catalíticas a las ya establecidas. Así, una misma enzima podría aceptar diferentes

sustratos, generando productos diferentes que puedan servir como intermediarios para la biosíntesis de diferentes productos finales. Esta dualidad enzimática se centra en la capacidad que tiene una enzima para llevar a cabo una misma reacción sobre diferentes sustratos estructuralmente similares, generando así diferentes productos. Por ejemplo, una enzima con actividad de hidroxilasa puede llevar a cabo esta reacción sobre diferentes sustratos o en una diferente posición sobre un mismo sustrato. Esta es una propiedad que es frecuentemente observada en las enzimas del metabolismo secundario y explica en parte la gran diversidad de compuestos de este tipo (Díaz-Chávez *et al.* 2011; Gesell *et al.* 2011). En este sentido, el transcriptoma obtenido de plántulas de *A. mexicana* (Xool-Tamayo *et al.* 2017a) reveló la existencia de un número de secuencias diferentes, pero relacionadas a las asignadas como SOMT, STOX. De este modo, y dado que los análisis previos la detección de los transcritos se llevó a cabo por PCR, utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos, basados en las secuencias ya etiquetadas, es posible que no se hubieran detectado otras secuencias con actividades redundantes (Vázquez-Flota *et al.* 2018).



**Figura 1.11** Ruta de biosíntesis de alcaloides en *A. mexicana*. Ruta de biosíntesis de los alcaloides canadina y estilopina. Dentro de esta ruta están involucradas las enzimas CYP719A14 y CYP719A13. CYP719A14 que reconocen en primera instancia a la (S)-Escoulerina para dar lugar a la (S)-chelantifolina que a la vez esta molécula es reconocida por la CYP719A13 para dar lugar a la (S)-estilopina. Sin embargo, la CYP719A13 tiene la capacidad de reconocer a la (S)-escoulerina como sustrato para dar lugar a la (S)-canadina sin tener que pasar por un intermediario. A esta capacidad de reconocer a otro sustrato para convertirlo en un producto se le denomina *dualidad enzimática*. En rojo se resalta las modificaciones estructurales que sufren las moléculas tras ser reconocidas por las respectivas enzimas. Adaptado de Díaz *et al.* 2011.

Finalmente, también es posible la operación de un mecanismo de transporte entre los sitios de biosíntesis y de acumulación de los alcaloides. Mecanismos similares de transporte han sido descritos en otras plantas productoras de alcaloides, incluyendo para berberina. Más aún, dado que en una búsqueda reciente en el transcriptoma de plántulas en desarrollo de esta planta (Xool-Tamayo *et al.* 2017) se encontraron varios candidatos a transportadores del mismo tipo que CjABCB1 y B2, en este trabajo se propone aislar y caracterizar al menos a uno de esos candidatos.

### JUSTIFICACIÓN

La distribución tisular de los alcaloides mayoritarios berberina y sanguinarina de *Argemone mexicana* presenta discrepancias, respecto a la de los transcritos involucrados en su biosíntesis. Esto sugiere la participación de mecanismos de transporte para los alcaloides de los posibles sitios de biosíntesis, a los de acumulación. En otras especies productoras de este tipo de alcaloides, se ha establecido la participación de transportadores de larga distancia del tipo ABCB. Recientemente, el análisis de un transcriptoma de *A. mexicana* reveló la presencia de transportadores del mismo tipo. De este modo, se propone el aislamiento y caracterización de al menos de uno de estos transportadores.

### HIPÓTESIS

Las discrepancias entre los tejidos en donde se acumulan los alcaloides de *A. mexicana* y en los que se detectan algunos de los transcritos involucrados en su biosíntesis, sugiere que los sitios de biosíntesis y acumulación de éstos no coinciden. Por ello, es posible que existan mecanismos de transporte de larga distancia que conduzca los alcaloides de los sitios de biosíntesis a los de acumulación final.

### OBJETIVO GENERAL

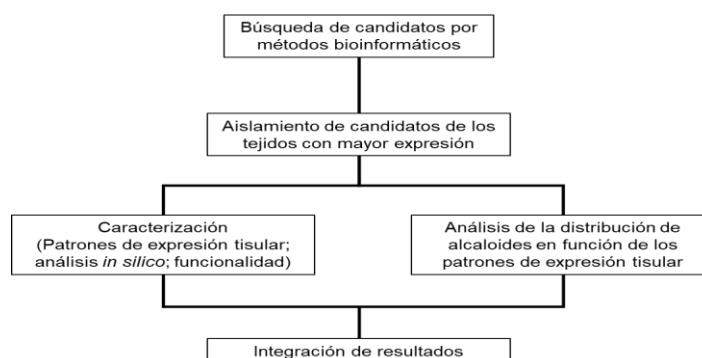
- Analizar la participación de mecanismos de transporte en la distribución tisular de los alcaloides ABI (berberina y sanguinarina) en *A. mexicana*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar por métodos bioinformáticos candidatos a transportadores de alcaloides tipo ABC en *A. mexicana*.
- Aislar y caracterizar funcionalmente los candidatos seleccionados como transportadores de alcaloides.
- Analizar los patrones de expresión de los transportadores aislados en función de la distribución de alcaloides en los tejidos con los mayores niveles de expresión.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental se plantea en la Fig. 1.12. Brevemente, para atender el primer objetivo específico, se realizó un análisis bioinformático para la selección de candidatos a partir de tres bases de datos; transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* (Xool-Tamayo, 2017a), GeneBank y Phytometasyn. La identificación se hizo por cercanía a transportadores del mismo tipo de alcaloides previamente caracterizados. A partir de las secuencias seleccionadas, y como parte del segundo objetivo, se diseñaron cebadores para su aislamiento por PCR. Se analizaron los patrones de expresión en diferentes tejidos, seleccionando los de mayor abundancia para el aislamiento. Como parte de la caracterización, los candidatos seleccionados se sometieron a un análisis *in silico* para identificar los motivos distintivos de los transportadores ABC. El análisis de funcionalidad se llevó a cabo en un sistema heterólogo.



**Figura 1.12.** Diagrama de la estrategia experimental. Se presenta la descripción de la estrategia que se siguió a lo largo del proyecto para alcanzar los objetivos planteados.

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Selección de candidatos a transportadores de alcaloides

Para la identificación de los candidatos, se siguió un acercamiento bioinformático. Los genes candidatos se seleccionaron a partir del transcriptoma de plántulas de *A. mexicana* en desarrollo (Xool-Tamayo *et al.* 2016), utilizando como término de búsqueda ABCB-type protein. Dicho transcriptoma se construyó *de novo* e incluye más de 70 000 entradas de entre 150 y 4785 pb etiquetadas. A partir de esta colección se han identificado diversos genes involucrados en la biosíntesis de berberina y sanguinarina (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b; Vázquez-Flota *et al.* 2018). Para el agrupamiento filogenético también se realizaron búsquedas en las bases de datos del GenBank NCBI-NIH y Phytometasyn (Xiao *et al.* 2013) utilizando como términos *A. mexicana* ABCB-type protein. Se incluyeron los transportadores de alcaloides de *C. japonica*, (CjABCB1, CjABCB2, CjABCB3) *T. minus* (TmABCB1, TmABCB2) y *E. californica* (EcABCB1) (Shitan *et al.* 2003; Nwanyichukwu 2014; Shitan *et al.* 2015), así como transportadores de auxinas de *A. thaliana* (AtABCB19) y *D. carota* (DcABCB21) (Noh *et al.* 2001; Iorizzo *et al.* 2016). Los programas que se emplearon para el alineamiento fueron BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y MEGA X (Kumar *et al.* 2018). Los detalles se describen en la sección 3.1 de Resultados.

#### 2.2 Análisis de ácidos nucleicos

##### 2.2.1. Extracción de ARN total de *Argemone mexicana*

La extracción del ARN de los diferentes tejidos de *A. mexicana* se realizó con el paquete Sistema de Purificación de ARN Total (Invitrogen). Todo el material empleado se esterilizó para eliminar contaminación por ARNasas. El tejido fresco se cortó en pequeños pedazos y se agregó nitrógeno líquido a un mortero para pulverizar usando un pistilo. El tejido ya pulverizado se transfirió a un tubo Eppendorf, previamente enfriado en nitrógeno líquido e inmediatamente se agregó 1.0 mL de la solución de lisis de ARN preparado con 2-Beta-mercaptoetanol. La mezcla se homogenizó por 45 seg usando el vórtex a máxima velocidad, se centrifugó a ~2600 x g por 5 min a temperatura ambiente. Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de ARNasa.

Se añadió etanol absoluto en un 50% del volumen de la reacción, se agitó y se eliminaron las partículas suspendidas antes de pasarlas por las columnas para ARN preinsertadas en un tubo de recolección. Se centrifugó a 12,000 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Se descarto el fluido y se reinserto el cartucho en el tubo hasta que la muestra entera se haya procesado. Se añadió 700  $\mu$ L del Buffer de lavado dentro de la columna para ARN, se centrifugo a 12, 000 x g por 15 seg a temperatura ambiente. Se descarto el fluido y el tubo de recolección y se colocó la columna para ARN en un tubo para lavado del ARN limpio, se agregó 500  $\mu$ L del Buffer de lavado II con etanol a la columna para ARN, se centrifugó a 12,000 x g por 15 seg a temperatura ambiente y se descartó el fluido y se reinsertó la columna en el tubo. Este paso se hizo una vez más antes de centrifugar la columna para ARN a 12,000 x g por 1 min a temperatura ambiente para secar la membrana a la cual está unido el ARN. Se descarto el tubo de recolección, y se insertó la columna para ARN en un tubo para recolar el ARN. Finalmente, para eluir el ARN, se añadió 30  $\mu$ L de agua libre de ARNasas en el centro de la columna para ARN, y se incubo a temperatura ambiente por 1 min. La columna para ARN se centrifugo por 2 min a 12,000 x g a temperatura ambiente y el ARN se diluyo en los 30  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de ARNasas.

### 2.2.2 Síntesis de ADNc

Para un volumen de 20  $\mu$ L se añadieron los siguientes componentes a un tubo de microcentrifugación; 2  $\mu$ g de ARN total, 0.5  $\mu$ g de oligo (dT), 0.2  $\mu$ M dNTPs Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), y se aforó a un volumen de 12  $\mu$ L con agua libre de ARNasas estéril. La mezcla se incubó a 65 °C por 5 min y la reacción se detuvo rápidamente en hielo. El contenido se colectó por centrifugación y se añadieron 4  $\mu$ L del amortiguador 5x First-Strand, 10 mM DTT, 40 U RNasa Out. El contenido se mezcló de manera suave y se incubó a 37 °C por 2 min. Se añadieron 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV, y la mezcla se homogenizó por pipeteo de manera suave, se incubó a 37 °C por 50 min y la reacción se inactivó por calor a 70 °C por 10 min.

### 2.2.3 Diseño de cebadores para la amplificación de AmABCB1, B2, B3, B4, NCS, SOMT, STYSYN de *Argemone mexicana*.

Para el diseño de cebadores se utilizó el software del programa DNAMAN. Después del análisis, los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1 Secuencia (5'-3') de los cebadores empleados para amplificar las diferentes secuencias.**  
Las temperaturas de alineamiento en las reacciones fue 2 °C inferior a la del Tm del cebador con el menor valor.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Tm (°C)	pb
<b>AmABCB1 Transportador de berberina y sanguinarina</b>			
AmABCB1-F1	TCA AGA GAA GAG CAA ACA GGG TGG	67.6	3802
AmABCB1-R1	AAA TTT GAG AGA GAG GGA GTG TG	63.2	
AmABCB1-F2	ATG ATA GGG ATG GGG GAT AAA AAC TTG GA	68.5	167
AmABCB1-R2	TTG GAA TCG GCA AAG GCG AAT	66.3	
AmABCB1-F3	GGG AGA GAA GGT AGG CAA GTT TAT ACA GCT A	69.6	318
AmABCB1-R3	TCC CTC CTG AAC ACC AGA TTT ATA CGC	68.8	
<b>AmABCB2 Presunto transportador de auxinas</b>			
AmABCB2-F1	TCA GCT CTA ATG GCG GAA AAA GCC AGA GC	73	4071
AmABCB2-R1	CCA CCC CAC TAA ACC AAA ACA CAC CCC ACA	74.6	
AmABCB2-F2	AAA GCC AGA GCA CTA AAC CAC GTG ACT CTT	72.2	4031
AmABCB2-R2	ACC CCA CAA TTT ACA TCA ACT GAC CAC CCA C	72.7	
AmABCB2-F3	AGC CAG AGC ACT AAA CCA CGT GAC T	70.7	115
AmABCB2-R3	CGT GTG CTT GAT AAT GTG AAG TTA ACG AAC	67.5	
AmABCB2-F4	CAG GAG ATG GTG AGA AAC CCA GAG CC	62	1149
AmABCB2-R4	AAG GAT AGA GAA GAC GGA GCT AA	59	
<b>AmABCB3 Presunto transportador de alcaloides/auxinas</b>			
AmABCB3-F1	GCG ACC GAG ATT ATC AAG GTA GTC CCG	70.6	~4000



AmABCB3-R1	GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G	68.1	
AmABCB3-F2	CCC GTT TCA CAA GCT CTT CTC GTT TAC C	70	~3900
AmABCB3-R2	CGC TAC GTA ACG GCA TGA CAG TG	68.3	
AmABCB3-F3	GGT AGC ACA GAG TTA TGT TTA GCC	64.1	395
AmABCB3-R3	CCT TAT CCG TGC AGC CTG	63.2	
<b>AmABCB4 Presunto transportador de alcaloides</b>			
AmABCB4-F1	TTA TTG CTC AGA GGT GGC TTG CTG G	62	190
AmABCB4-R1	TAC CTT CTC ACC CAT GGC TTC TTG A	59	
<b>AmNCS1; Am norcoclaurina sintasa 1 (Acc. EU881891.1)</b>			
AmNCS1-F1	CAT CGC TAA TTA CGT TCT CAA GAA TCA	64.4	241
AmNCS1-R1	ATA GTA GTA CAT GGA ATT ACC TGG ATG GGA	67.5	
<b>AmSOMT; Am S-Escoulerina O-Metiltransferasa (Acc. KT984756.1)</b>			
AmSOMT-F1	CAG GAT TTG GAC CAG AAG CAC	64.2	261
AmSOMT-F2	ACG ATA CTC CAT CCT CCT CGC	66.2	
<b>AmSTYSYN; Am Estilopina Sintasa (Acc. EF451151.1)</b>			
AmSTYSYN-F1	GTT CAA AAT CTA GTA CGT CCG CT	63.6	200
AmSTYSYN-F2	TTC TCT TGA ACA TTT GGT TCT CGT	63.5	

#### 2.2.4 Amplificación por RT-PCR de transportadores seleccionados.

Las amplificaciones se llevaron a cabo por PCR. La mezcla de reacción (30  $\mu$ L) se preparó con 150 ng de ADNc y añadiendo 3  $\mu$ L del amortiguador 10x PCR (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M NTP Mix, 0.2  $\mu$ M de cada cebador (Tabla 2.1), 3 U de Taq ADN Polimerasa, la mezcla se completó a un volumen de 30  $\mu$ L con agua destilada estéril, se homogenizó suavemente y la reacción se llevó a cabo en el termociclador (Applied Biosystems

Veriti Thermal Cycler. Foster City CA) con una temperatura 2 °C inferior a la del T<sub>m</sub> del cebador con el menor valor (Tabla 2.1). Las reacciones se iniciaron, en todos los casos, con un ciclo de 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos a 95 °C, variable (Tabla 2.1) y 72 °C por 20, 15 y 10 s, para la desnaturalización, alineamiento de cebadores y amplificación, respectivamente y una última extensión a 72 °C de 10 min. Para AmABCB1 el producto esperado en este caso fue de 318 pb usando los cebadores AmABCB1-F3 y R3. Para AmABCB2 el producto esperado en este caso fue de 115 pb usando los cebadores AmABCB2-F3 y R3. Para AmABCB3 el producto esperado en este caso fue de 395 pb usando los cebadores AmABCB3-F3 y R3. Para AmNCS1 el producto esperado en este caso fue de 241 pb usando los cebadores AmNCS1-F1 y R1. Para AmSOMT el producto esperado en este caso fue de 261 pb usando los cebadores AmSOMT-F1 y R1. Finalmente, para AmSTYSYN el producto esperado en este caso fue de 200 pb usando los cebadores AmSTYSYN-F1 y R1. Para las amplificaciones completas de los ORFs de AmABCB1, AmABCB2 y AmABCB3 se tomó 150 ng de los tubos de ADNc para la RT-PCR y se usó la Phusion Polimerasa. Para una reacción de 30 µL se mezclaron 6 µL del amortiguador 5x Phusion GC, 200 µM dNTPs, 0.2 µM de cada cebador (Tabla 2.1), 150 ng de ADNc, 1 µL de DMSO, 2.5 U de ADN polimerasa Phusion, y se aforó la reacción a un volumen final de 30 µL con H<sub>2</sub>O destilada estéril. Se mezcló y se agitó suavemente y las reacciones se llevaron a cabo bajo condiciones específicas para cada caso. Para AmABCB1 el producto esperado de la primera reacción en este caso fue de 3805 pb. El producto esperado de la segunda reacción en este caso fue de 167 pb. Para AmABCB2 el producto esperado en este caso fue de 4031 pb. Para AmABCB3 el producto esperado en este caso fue de ~3600 pb. Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa TAE (0.8 a 1.4% dependiendo del tamaño del producto visualizado) para su registro visual y para su posterior purificación.

### **2.2.5 Aislamiento y clonación de los transportadores candidatos.**

Una vez identificados y después de confirmar la presencia de los transcritos correspondientes en los tejidos de la planta, los presuntos transportadores ABCB (AmABCB1, AmABCB2, y AmABCB3), fueron aislados a partir de pétalos (AmABCB2) y semillas maduras (AmABCB1 y AmABCB3), después de verificar su abundancia, utilizando los cebadores señalados en la Tabla 2.1. Los productos amplificados se separaron en geles de agarosa TAE al 0.8% (p/v) y se purificaron utilizando del paquete de Zymoclean Gel ADN Recovery (Zymo Research). Los amplicones de 3866, 4031, 3600 pb, para AmABCB1, -B2 y -B3 se escindieron del gel con un bisturí y transfirieron a tubos de 1.5 mL y se añadieron tres volúmenes de ADB (Agarose

Dissolving Buffer) por cada volumen de agarosa (a 100 µg de gel se le añade 300 µL de ADB). Las mezclas se incubaron a 55 °C por 10 min hasta que el gel se disolvió por completo y la solución se filtró por las columnas de Zymo-Spin contenidas en el tubo de colecta, se centrifugaron por 30 – 60 s, descartando el sobrenadante. Las columnas se lavaron añadiendo 200 µL de la solución de lavado (ADN Wash Buffer), se centrifugaron por 30 s y se descartó el sobrenadante, repitiendo el lavado una vez más. Finalmente, se añadieron 10 – 15 µL del amortiguador de elución a la matriz de la columna y la elución se colectó en un tubo de 1.5 mL y se centrifugó por 30 – 60 s, para obtener el ADN puro.

Posterior a la purificación, se adicionaron los extremos de adenina en ambos extremos del ADN, debido a que la polimerasa Phusion utilizada para la amplificación carece de la propiedad para realizar esta acción. Para ello, los productos de PCR purificados se incubaron en una mezcla de 1x Taq buffer, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dATP y 1 U Taq ADN Polimerasa en un volumen final de 10 µL por 1 h a 72 °C. Al finalizar la incubación se empleó la muestra para realizar la clonación en el vector pGEM T Easy.

Después de haber agregado los extremos de adenina a los amplicones completos purificados, éstos se ligaron en el vector de clonación pGEM T Easy Vector (Promega). El protocolo empleado para la ligación en el vector pGEM T Easy Vector (Promega) consta de la siguiente información:

Después de haber elaborado las reacciones de ligación se dejó incubando las reacciones por 16 h a 4 °C. Posteriormente estas reacciones de ligación se emplearon para la transformación en células competentes JM109 (Promega) de *E. coli* para la obtención de mayores cantidades de las secuencias obtenidas.

La transformación se llevó a cabo por choque térmico tomando 2 µL de las diferentes reacciones de ligación (previamente centrifugadas para coleccionar el volumen en el fondo) y se mezclaron con 50 µL de una suspensión de células competentes como estaba establecido en las especificaciones del proveedor (Promega). La mezcla se agitó de manera lenta y se incubó sucesivamente en hielo por 20 min, a 42 °C por 45 s en un baño María y de nuevo en hielo 2 min. Posteriormente se añadieron 900 µL de medio LB líquido y se dejó incubar por 1.5 h a 37 °C con agitación a 150 rpm. Finalmente, se emplearon 200 µL de cada reacción para plaquear en cajas Petri con medio LB Agar (Invitrogen) / ampicilina (100 µM) / IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido; 135 µM) / X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido 80 µM).



**Para la región 3 '(3694 pb) de AmABCB1**

Infusion\_AmABCB11\_F2\_FW AGATGTCATGCTGATGATTATTGG

Infusion\_AmABCB1\_F2\_RV CGGGCCCCCCTCGACTAAGTTGAACTCATGTGAAG  
AGCTACTA

Las secuencias subrayadas indican secuencias adicionales para la clonación In-Fusion.

El producto de PCR se subclonó entre los sitios EcoRI y XhoI del vector de expresión de levadura pDR196 (Rentsch *et al.* 1995), usando el kit de clonación In-Fusion HD (Clontech, EE. UU.). El plásmido resultante se aisló y multiplico mediante su introducción a células de *E. coli* DH5a competentes por choque térmico. La identidad del producto clonado se confirmó comparando la secuencia con la de AmABCB1 del transcriptoma de plántulas (99,9%). El plásmido aislado, pDR-AmABCB1, se utilizó para transformar la cepa de levadura AD12345678 (MAT $\alpha$ , PDR1-3, ura3, his1,  $\Delta$ yor1 :: hisG,  $\Delta$ snq2 :: hisG,  $\Delta$ pdr5 :: hisG,  $\Delta$ pdr10 :: hisG,  $\Delta$ pdr11 :: hisG,  $\Delta$ yfc1 :: hisG,  $\Delta$ pdr3 :: hisG; y  $\Delta$ pdr15 :: hisG) (Decottignies *et al.* 1998) por el método del acetato de litio, con transformantes seleccionados usando medio SD (-uracilo). Los transformantes de levadura se trataron como se describió para el aislamiento de CjABCB2 (Shitan *et al.* 2013). En resumen, los transformantes se cultivaron previamente en 100 ml de medio SD (-uracilo), se recolectaron a una OD<sub>600</sub> = 0,6 y se suspendieron en 25 ml de medio SD de concentración media (-uracilo) que contenía berberina (concentración final 5  $\mu$ M) o sanguinarina (concentración final 5  $\mu$ M) a una OD<sub>600</sub> = 0,6. Las células se incubaron a 30 ° C con agitación leve a 200 rpm, se recolectaron en el tiempo indicado por centrifugación, se lavaron dos veces con agua fría desionizada y se rompieron con perlas de vidrio y tampón de extracción (metanol al 50% que contenía HCl 0.01 N). Las muestras se centrifugaron a 1500 x g y los sobrenadantes se sometieron a análisis UPLC-MS.

Los contenidos de berberina y sanguinarina en células de levadura se determinaron mediante un sistema ACQUITY UPLC con un detector de masas QDa (Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.) Después de filtrar con un filtro de cosmospina de 0.45  $\mu$ m (Nacalai Tesque, Kyoto, Japón). El análisis de UPLC se realizó utilizando una columna CORTECS UPLC c18 (2.1 x 100 mm, 1.6  $\mu$ m; Waters Corp., Milford, MA, EE. UU.), y se operó a 40 °C. La fase móvil estaba constituida por A): agua que contenía ácido acético al 0.01% y B): acetonitrilo que contenía ácido acético al 0.01% con un gradiente de elución: 0-9 min, 5-40% B; 9-12 min, 40-50% B; 12-15 min, 50-5% B. La velocidad de flujo y el volumen de inyección se establecieron en 0.3 mL / min y 2  $\mu$ L,

## CAPÍTULO II

respectivamente. Las condiciones de QDa se establecieron de la siguiente manera: una tensión de cono de 15 V, una tensión capilar de 0.8 kV y una temperatura de la fuente de 600 °C. Se detectaron berberina ( $m/z = 336$ ) y sanguinarina ( $m/z = 332$ ) utilizando el modo de registro de iones únicos y se identificaron mediante comparación directa con picos de productos químicos estándar. Se adquirieron estándares auténticos de berberina y sanguinarina de Nacalai Tesque, Inc. y Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis, MO, EE. UU.), respectivamente. La cantidad de berberina y sanguinarina se cuantificó utilizando una curva estándar.



## CAPÍTULO III

## RESULTADOS

Como se indicó, en este Capítulo se presentan los resultados, divididos en diferentes secciones. La sección 3.1 describe los métodos bioinformáticos utilizados para la identificación de los candidatos. Las secuencias de los cuatro genes candidatos seleccionados se presentan en el Anexo 1. En la sección 3.2 se presenta, la caracterización de AmABCB1, seleccionado como posible transportador de alcaloides. La caracterización de AmABCB2, otro de los candidatos aislado y secuenciado, se presenta en el Anexo 3. La sección 3.3 describe un análisis de la distribución de los alcaloides berberina y sanguinarina en los diferentes tejidos de las semillas, en donde se observaron los máximos niveles de expresión de AmABCB1, en los diferentes estados de madurez, y discute la posible relación entre AmABCB1 y la movilización de alcaloides en estos tejidos. Esta sección también se presenta en forma de manuscrito sometido y aceptado en *Journal of the Mexican Chemical Society*.

### 3.1 Selección de secuencias candidatas a transportadores ABC tipo B de alcaloides de *A. mexicana* por medio de análisis filogenético

Los candidatos para aislar los transportadores fueron seleccionados siguiendo una estrategia bioinformática (atendiendo el primer objetivo específico). Como primer paso, se realizó una búsqueda en diferentes fuentes para la identificación de candidatos que después fueron comparados en un árbol filogenético con transportadores de alcaloides del mismo tipo previamente ya caracterizados (Tabla 3.1). Se incluyeron transportadores de auxinas (Tabla 3.1) debido a la relación que guardan con los transportadores de ABI (Noh *et al.* 2001; Iorizzo *et al.* 2016).

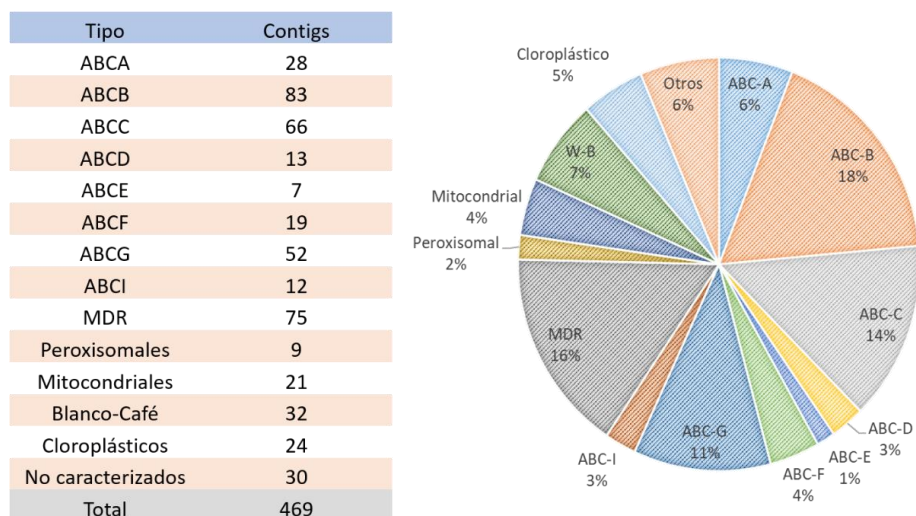
**Tabla 3.1** Números de accesoión de los transportadores ABCB utilizados como referencia.

Transportadores ABC de referencia	Número de accesoión
CjABCB1	AB043999



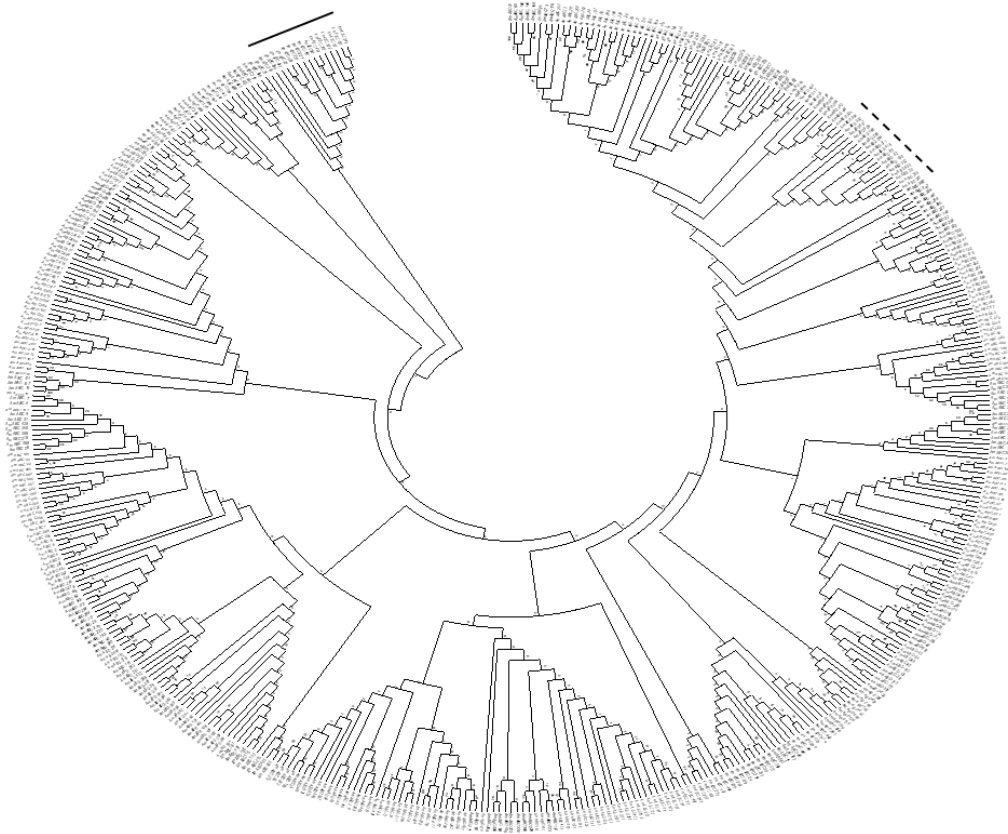
CjABCB2	AB674325.1
CjABCB3	AB674326.1
TmABCB1	LC029926.1
TmABCB2	LC029927.1
EcABCB1.1	ECARTPF1_rep_c332
EcABCB1.2	ECARTPF1_rep_c656
AtABCB19	NM_113807.3
DcABCB21	XM_017374076.1

Para la búsqueda de genes candidatos se utilizó el transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* que contiene un poco más de 75, 000 contigs ensamblados, incluyendo 15 correspondientes a enzimas de la biosíntesis de ABI's, que cubren tanto los tramos comunes; TyDC, NCS, CNMT y BBE; así como los específicos para berberina; SOMT, CDS, STOX y sanguinarina; CheSyn, TNMT, DBOX (Xool-Tamayo *et al.* 2016). Además, se realizaron búsquedas en el GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) y en PhytoMetaSyn (<https://bioinformatics.tugraz.at/phytometasyn/>) (Xiao *et al.* 2013). Para la búsqueda en las bases de datos se utilizó la secuencia nucleotídica del transportador CjABCB1 dirigida a entradas reportadas para *A. mexicana* y el término "ABC transporter" en el transcriptoma. No se encontraron entradas en el GeneBank que cumplieran con al menos un 70% de similitud con la referencia mientras que en PhytoMetaSyn se encontró una entrada de 3858 pb de suspensiones celulares de *A. mexicana* que mostraba un 80 % de identidad con la referencia (Tabla 3.2). Por su parte, se encontraron 469 contigs de entre 150 y 4785 pb en el rastreo por anotación funcional en transcriptoma de *A. mexicana* con una identidad de entre 28 y 86% con la referencia (Figura 3.1). De estas, 158 se identificaron como del subtipo B, que engloba tanto a los transportadores de auxinas como de ABI (Figura 3.1). El total de las secuencias fueron utilizadas para la construcción de un árbol filogenético por el principio de máxima similitud, utilizando el paquete Mega X (Fig. 3.2).

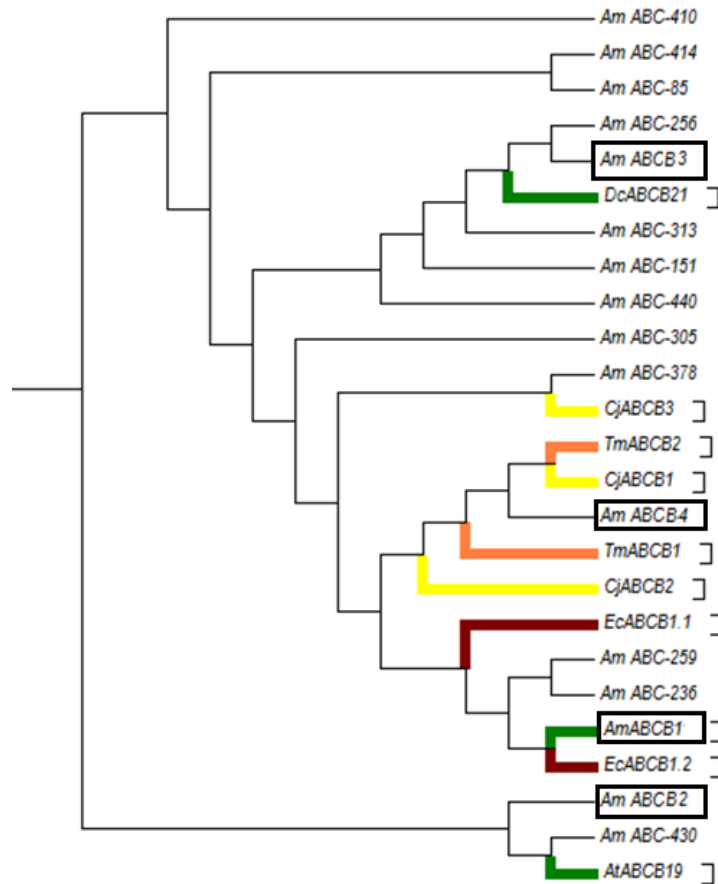


**Figura 3.1** Familias de transportadores ABC del transcriptoma XT1. Un total de 469 secuencias junto con los ABC de referencia se utilizaron para crear el árbol filogenético. Un total de 158 secuencias formaron para de la subfamilia B el cual incluye a los transportadores de alcaloides y auxinas que se emplearon en este estudio.

Como guías para la identificación de candidatos se incluyeron los transportadores ya caracterizados de berberina CjABCB1 y B2 de *C. japonica* y TmABCB1 y B2, de *T. minus*. También se incluyó el transportador CjABCB3 de *C. japonica* aún sin caracterizar y un transportador para sanguinarina; EcABCB1 (que contaba con dos accesiones que se emplearon) (Tabla 3.1), reportado en suspensiones celulares *E. californica* (Nwanyichukwu 2014); (Tabla 3.1). Como guías externos se incluyeron los transportadores de auxinas AtABCB19 (Noh *et al.* 2001) y DcABCB21 (Iorizzo *et al.* 2016) de *A. thaliana* y *D. carota*, respectivamente (Tabla 3.1). De este modo, se emplearon un total de 479 entradas para la construcción del árbol siendo nueve de especies diferentes de *A. mexicana* (Fig. 3.2).



**Figura 3.2** Análisis filogenético molecular por el método de “Maximum Likelihood”. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Probabilidad Máxima basado en el modelo Tamura-Nei. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-380681.43). El porcentaje de árboles en los que los taxones asociados agrupados se muestran junto a las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente aplicando los algoritmos de Neighbor-Join y BioNJ, a una matriz de distancias por pares estimado usando el modelo Tamura-Nei, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad logarítmico superior. El árbol está dibujado a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. Este análisis involucró 479 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 6983 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X. La línea continua representa el clado I mientras que la línea punteada representa las secuencias que se muestran en la Fig. 3.3 que se encuentra dentro del clado II.



**Figura 3.3** Acercamiento del análisis filogenético molecular por el método de “Maximum Likelihood”. Se muestra un acercamiento de lo visualizado en la Fig. 3.2 mostrando las cuatro secuencias seleccionadas. El análisis se llevó a cabo como se describe en la Fig. 3.2 Las líneas de color amarillo representan los transportadores ABC de *C. japonica*, de color naranja los de *T. minus*, de color rojo oscuro las secuencias de *E. californica* y de color verde las de *A. thaliana* y *D. carota* junto con el transportador de *A. mexicana* que se pudo caracterizar funcionalmente (Sección 3.2). Las secuencias que se seleccionaron en el presente trabajo están encerradas en un cuadro con borde negro que fueron denominados AmABC1, B2, B3 y B4.

Si bien muchas de las 479 secuencias eran incompletas (Figura 3.2), éstas se agruparon en dos clados principales con el clado I incluyendo 16 secuencias de entre 153 y 1653 pb y los 454 restantes, con un rango de entre 150 y 4785 pb, en conjunto con las nueve secuencias guías haciendo un total de 463 secuencias en el clado II (Fig. 3.2). Varios grupos parafiléticos fueron

identificados en este clado, con uno de ellos de 25 miembros; grupo IIA (Figura 3.3), incluyendo dieciséis entradas junto con las nueve guías (Fig. 3.3). El grupo IIA, a su vez se dividió en dos grupos menores; IIA-1, integrado por el transportador de auxinas AtABCB19 y dos entradas de *A. mexicana* de 255 y 3744 pb, y el grupo IIA-2 con catorce entradas de entre 165 y 4012 pb además de las siete referencias para transportadores de alcaloides y el transportador de auxinas de DcABCB21 para un total de 22 secuencias (Fig. 3.3).

### 3.1.1 Características generales de los candidatos seleccionados

Se seleccionaron cuatro secuencias de 3,744, 4012, 522 y 195 pb, denominados AmABCB1, B2, B3 y B4, respectivamente (Tabla 3.2) (Anexo 1). AmABCB4 se seleccionó por su similitud con los transportadores de berberina; 73 y 90 % de similitud respectivamente con el segmento Phe<sub>119</sub>-Val<sub>192</sub> de CjABCB1 y Gln<sub>131</sub>-Val<sub>190</sub> de TmABCB2. Este segmento incluye la región TMD1. AmABCB1 fue seleccionada por representar un marco de lectura completo con un 86% de identidad con EcABCB1, mientras que AmABCB2 y B3, si bien mostraron bajas similitudes con CjABCB1 y EcABCB1 (45/45 % y 67/69 %, respectivamente), mostraron alta similitud con los transportadores de auxinas, teniendo AmABCB2 un 86% de identidad con AtABCB19 de *A. thaliana* y AmABCB3 un 90% de identidad en la región comprendida Met<sub>1</sub>-Val<sub>174</sub> en DcABCB21 de *D. carota*. De este modo, se seleccionaron dos candidatos a transportadores de alcaloides; uno similar a un transportador para sanguinarina (AmABCB1); y uno para berberina (AmABCB4) y dos para auxinas; (AmABCB2 y B3), siendo similares a AtABCB19 y DcABCB21 respectivamente. Con base en sus posiciones en el árbol filogenético, se sugiere que AmABCB2 y B3 participan en el transporte de auxinas. AmABCB2, representa un contig de 3744 pb (Anexo 1), que incluye un marco de lectura completo de 1248 residuos con un 86 % de identidad con el transportador de auxinas de *A. thaliana* AtABCB19 (Fig. 3.4) (Noh *et al.* 2001). En él se pudieron identificar todas las características de los transportadores de ABCB (Do *et al.* 2018). Un alineamiento con otros transportadores identificados se muestra que comparte una identidad de entre 42 y 86% entre ellos (Fig. 3.4). AmABCB1 se seleccionó para su posterior expresión heteróloga y su caracterización funcional se detalla en formato de artículo en la Sección 3.2. Por su parte, AmABCB3 representa un contig de 522 pb correspondiente a 174 aminoácidos que se encuentran localizados al tramo equivalente Met<sub>1</sub> - Val<sub>174</sub> de DcABCB21 (Iorizzo *et al.* 2016).

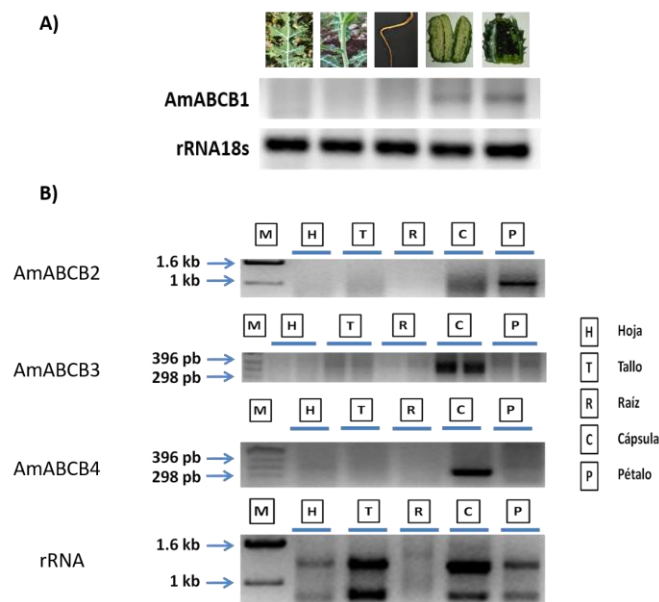
Tabla 3.2 Similitud de los genes candidatos seleccionados como transportadores de *Argemone mexicana* con el transportador CjABCB1 de *C. japonica* (Shitan *et al.* 2003).

Candidato	Tamaño del ORF	Similitud con <i>C. japonica</i>	Presencia de TMD respecto a <i>C. japonica</i> (AA)	Presencia de NBD respecto a <i>C. japonica</i> (AA)
AmABCB1	3858 pb	80%	64-362; 717-1009	363-716; 1010-1289
AmABCB2	3744 pb	45%	64-362; 717-1009	363-716; 1010-1289
AmABCB3	522 pb	67%	1-174	N/A
AmABCB4	195 pb	73%	119-192	N/A

	CjABCB1	CjABCB2	CjABCB3	TmABCB1	TmABCB2	EcABCB1	AtABCB19	DcABCB21
<b>AmABCB1</b>	80%	78%	66%	76%	80%	85%	45%	75%
<b>AmABCB2</b>	45%	44%	42%	45%	46%	45%	86%	45%
<b>AmABCB3</b>	67%	72%	58%	65%	69%	69%	43%	90%
<b>AmABCB4</b>	73%	83%	77%	82%	90%	78%	45%	82%

**Figura 3.4** Porcentaje de identidad entre las proteínas transportadoras de referencia y AmABCB's. Se muestran las relaciones entre los AmABCBs seleccionados (AmABCB1, B2, B3 y B4) con respecto a los ABCBs movilizados de referencia (CjABCB1, CjABCB2, TmABCB1, TmABCB2, EcABCB1, AtABCB19 y DcABCB21 (Noh *et al.* 2001; Shitan *et al.* 2003; Nwanyichukwu 2014; Shitan *et al.* 2015; Iorizzo *et al.* 2016). Se incluye AmABCB3 por su presunta actividad como transportador de berberina.

Se realizó un análisis de expresión de los genes seleccionados (AmABCB1, B2, B3 y B4) en tejidos de hoja, tallo, raíz, cápsula y pétalo (Fig. 3.5), encontrando que AmABCB3 tenía una mayor presencia en cápsulas de plantas maduras mientras que AmABCB2 se localizó preferentemente en los pétalos marcando una diferencia en cuanto al sitio preferencial de localización posiblemente ligado a funciones diferentes dentro del transporte de auxinas.



**Figura 3.5** Distribución tisular de AmABCB1, B2, B3 y B4 en plantas maduras de *A. mexicana*. **A)** Se muestra la expresión de AmABCB1 en hoja, tallo, raíz, capsula madura e inmadura. **B)** M: Marcador de peso molecular; H: Hoja; T: Tallo; R: Raíz; C: Cápsula y P: Pétalo (150 ng de ADNc). AmARNr: *A. mexicana* ARN ribosomal (750 ng). Los transcritos se detectaron por RT-PCR.

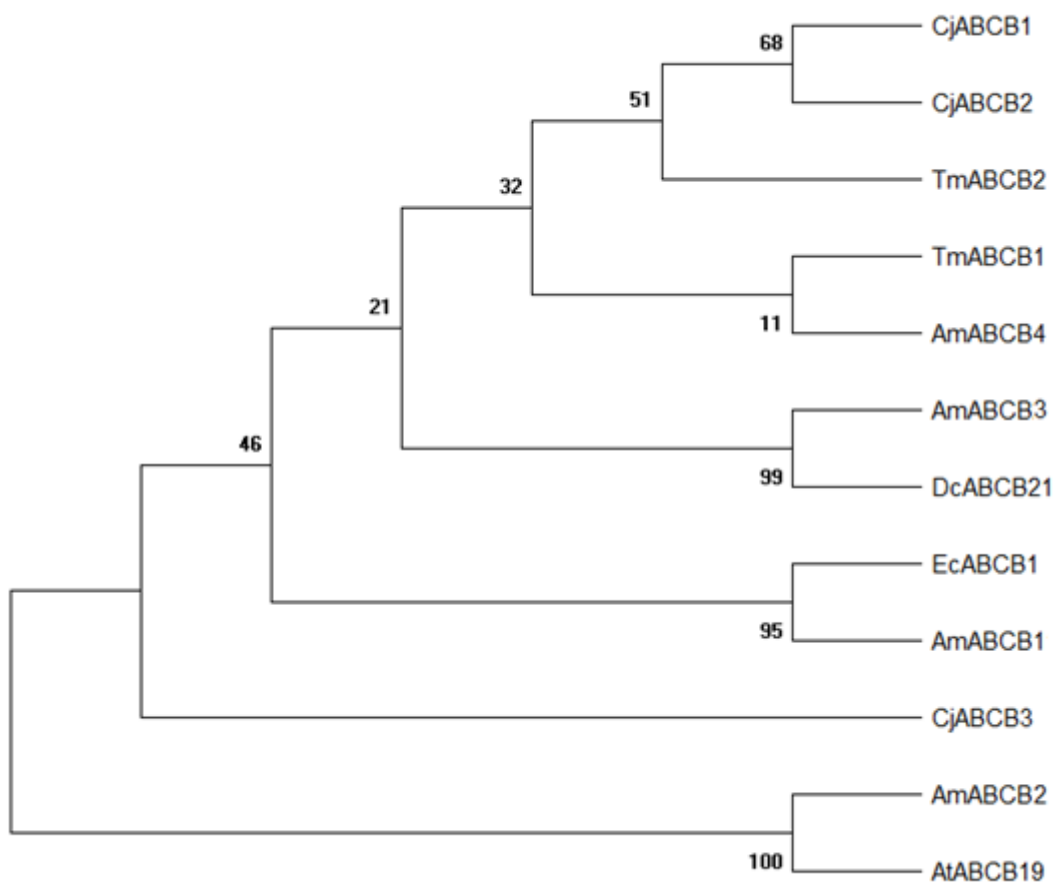
Por su parte, las posiciones de AmABCB1 y B4 sugieren su participación en el transporte de alcaloides. AmABCB1, representa un contig de 4012 pb, contenía un marco de lectura completo de 1286 aminoácidos (Tabla 3.2, Anexo 1) y su caracterización completa se presenta en una sección aparte (3.2). Un análisis de expresión (Fig. 3.5) reveló que AmABCB1 se expresaba preferencialmente en cápsulas maduras de *A. mexicana* indicando una posible vinculación entre la presencia de este transportador y de sanguinarina. Por su parte, AmABCB4 presentó una secuencia de 195 pb, correspondiente a 65 aminoácidos equivalente al tramo Phe<sub>119</sub>-Val<sub>192</sub> de CjABCB1 e incluye la región TMD1 de las proteínas ABCB (Tabla 3.2, Anexo 1).

### 3.1.2 Alineamiento, comparación y análisis filogenético (en aminoácidos) de las secuencias de genes candidatos seleccionados a transportadores ABCB de *A. mexicana*.

Después de la selección de las cuatro secuencias candidatas (AmABCB1, AmABCB2, AmABCB3, AmABCB4) se realizó un análisis filogenético comparando sus secuencias de

aminoácidos (Fig. 3.6 y 3.7). En AmABCB1, de 1286 aa se identificaron los dominios transmembranales (TMD1 y 2) en las posiciones Ser<sub>55</sub>-Ala<sub>351</sub> y Lys<sub>715</sub>-Ser<sub>1006</sub> los dominios de unión a ATP (NBD1 y 2) en las posiciones Ala<sub>352</sub>-Asn<sub>714</sub> y Ser<sub>1007</sub>-Thr<sub>1286</sub> (Tabla. 3.2, Anexo 1). En AmABCB2, de 1248 aa (Anexo 1) se identificaron los dominios transmembranales (TMD1 y 2) en las posiciones Asp<sub>33</sub>-Lys<sub>331</sub> y Ala<sub>677</sub>-Ile<sub>969</sub> junto con los dominios de unión a ATP (NBD1 y 2) en las posiciones Ala<sub>332</sub>-Asn<sub>676</sub> y Ile<sub>970</sub>-Ile<sub>1248</sub> (Tabla 3.2). En AmABCB3, de 174 aa (Anexo 1) se encontró parte del dominio TMD1 en las posiciones Met<sub>1</sub>-Val<sub>174</sub>; en AmABCB4, de 65 aa (Anexo 1) se halló de igual forma lo que correspondería al dominio TMD1 en las posiciones Phe<sub>1</sub>-Val<sub>65</sub>. El alineamiento de las proteínas resultantes sitúa a AmABCB1 y AmABCB4 con las mayores probabilidades de poder movilizar alcaloides ya que se encuentran evolutivamente más cercanos hacia los ABCB de referencia CjABCB1, CjABCB2, CjABCB3, TmABCB1 TmABCB2, EcABCB1 (Shitan *et al.* 2003; Nwanyichukwu 2014; Shitan *et al.* 2015) (Fig. 3.6). En cambio, AmABCB2 y AmABCB3 se encuentran más distantes en el mismo clado de los ABCB de referencia y se encuentran más cercanos a los transportadores de auxinas de *A. thaliana* AtABCB19 y *D. carota* DcABCB21 respectivamente.

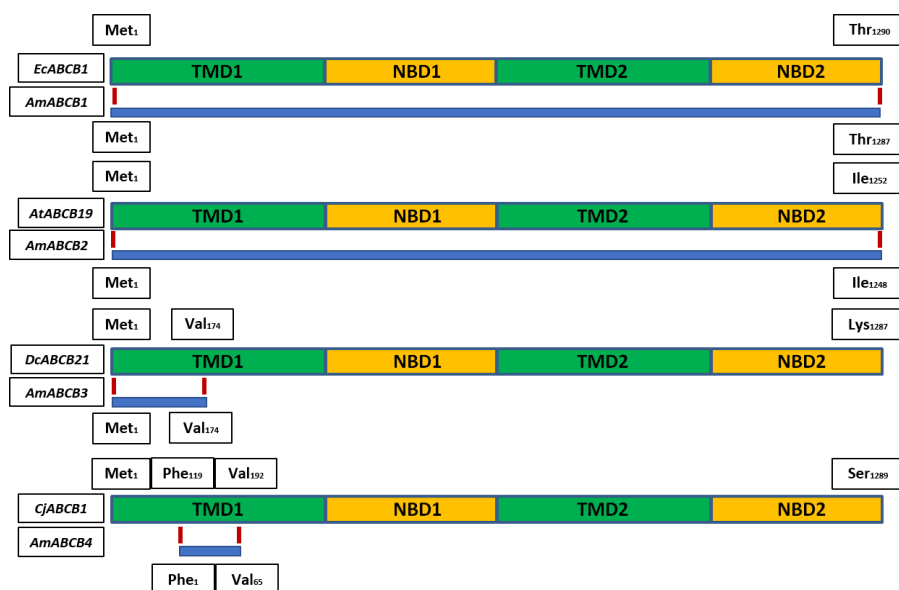




**Figura 3.6** Relaciones evolutivas en secuencia de aminoácidos de ABCB de referencia y de AmABCB seleccionadas para el transporte de alcaloides. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de máxima similitud y el modelo de matriz JTT. Se muestra el árbol con la probabilidad de registro más alta (-15179.43). El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados se muestra junto a las ramas. El árbol inicial para la búsqueda heurística se obtuvo automáticamente mediante la aplicación de los algoritmos de Vecindad y BioNJ a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando un modelo JTT, y luego seleccionando la topología con un valor de probabilidad de registro superior. El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en el número de sustituciones por sitio. El análisis involucró 12 secuencias de aminoácidos. Hubo un total de 1321 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGAX.

### 3.1.3 Análisis topológico de los AmABCB seleccionados con respecto a los ABCB de referencia.

A partir de las secuencias de aminoácidos de los AmABCB seleccionados se realizó una esquematización de sus posiciones topológicas (Fig. 3.7) con respecto a los ABCB de referencia CjABCB1, CjABCB2, CjABCB3, TmABCB1, TmABCB2 y EcABCB1 (Shitan *et al.* 2003; Nwanyichukwu 2014; Shitan *et al.* 2015). Si bien AmABCB1 y B2 presentan en sus secuencias una estructura completa que incluyen los dominios TMD1-NBD1-TMD2-NBD2; este no fue el caso para AmABCB3 y AmABCB4, ya que sus secuencias de 174 y 65 aminoácidos se encuentran localizados en lo que correspondería ser el dominio TMD1 de DcABCB21 y CjABCB1 (Iorizzo *et al.* 2016; Shitan *et al.* 2003) en las posiciones Met<sub>1</sub>-Val<sub>174</sub> y Phe<sub>119</sub>-Val<sub>192</sub> respectivamente (Tabla 3.2, Fig. 3.7).



**Figura 3.7** Localización topológica de las secuencias de genes seleccionados con respecto a los transportadores de referencia. Las cajas verdes representan los TMD, y las cajas amarillas representan los NBD. Los renglones azules son las representaciones esquemáticas de los candidatos seleccionados con respecto a su referencia). Como referencia se utilizaron los transportadores AtABCB19, DcABCB21, CjABCB1, EcABCB1. TMD: Transmembrane Domain; NBD: Nucleotide Binding Domain.

Con la información obtenida de los análisis bioinformáticos se pudo separar y escoger 4 secuencias denominadas AmABCB1, AmABCB2, AmABCB3 y AmABCB4 con un tamaño de 4012, 3744, 522 y 195 pb respectivamente. AmABCB1 y AmABCB4 se seleccionaron como candidatos para movilizar alcaloides mientras que AmABCB2 y AmABCB3 se seleccionaron para movilizar auxinas. De igual manera hasta este punto se cumplió en cierto modo el primer objetivo específico que consistía en el aislar a partir del transcriptoma de *A. mexicana* genes candidatos para ser proteínas transportados ABCB. Definido las secuencias se procedió a cumplir el objetivo específico dos que se describe a partir de la sección 3.2. Hasta este punto se prosiguió a trabajar únicamente con AmABCB1 (descripción de resultados Sección 3.2) y AmABCB2 (Descrito en Anexo 3) ya que fueron las únicas dos secuencias que presentaron un marco de lectura abierto completo.

### **3.2 Caracterización de AmABCB1 como transportador de alcaloides en semillas de *A. mexicana*.**

Esta sección describe la distribución tisular y caracterización funcional de AmABCB1 como transportador de alcaloides y atiende el segundo objetivo específico. Se presenta en formato de artículo sometido a la revista "Planta". Cabe destacar que la metodología por la cual AmABCB1 fue aislado se describe en la sección 2.1 correspondiente a materiales y métodos. Sin embargo, el texto del artículo detalla de igual manera el procedimiento por el cual se logró obtener. A manera de resumen AmABCB1 en ensayos *in vitro* demostró tener principalmente una actividad importadora de sanguinarina, con una menor como exportador de berberina. Estos datos junto con el análisis de expresión de genes reporteros (NCS, StySyn, SOMT) en diferentes tejidos, incluyendo las semillas en diferentes estados de desarrollo, reafirman la postura de que AmABCB1 pudiera estar involucrado en el transporte de alcaloides entre los diferentes tejidos que conforman a las semillas de *A. mexicana*. De igual manera la similitud de AmABCB1 con el transportador de sanguinarina encontrado en cultivos celulares de *E. californica* (Nwanyichukwu 2014) reafirma esta relación entre ambas especies para la movilización de este alcaloide.

#### **3.2.1. AmABCB1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana* (Papaveraceae)**

L Loza-Muller<sup>1</sup>, N Shitan<sup>2</sup>, Y Yamada<sup>2</sup>, F Vázquez-Flota<sup>1</sup>, \*

1) Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Chuburná 97205, Mérida Yucatán México and 2) Laboratory of Medicinal Cell Biology, Kobe Pharmaceutical University, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan.

### **Main conclusion**

An ABCB-type transporter for sanguinarine, a benzophenanthridine alkaloid, was isolated from *Argemone mexicana* seeds.

### **Abstract**

An ABCB-type transporter, AmABCB1, was identified in a transcriptome from unfolding seedlings of *A. mexicana* by its closeness to previously characterized alkaloid transporters from *Coptis japonica* and *Thalictrum minus*. Expression analysis revealed mature seeds as its main location, meanwhile in vitro assays in yeast cells showed that AmABCB1 had an uptake activity for sanguinarine with a lower berberine efflux one.

### **Key words**

ABCB-type transporter, BIA, benzophenanthridine, protoberberine.

### **Introduction**

In alkaloid-producing plants, a common strategy to protect cell sensitive processes from their toxic effects is splitting their biosynthesis and final accumulation into different tissues or compartments, which requires the operation of transportation systems. Different types of alkaloid transporting proteins have been described in plants (Gani *et al.* 2020), including ATP binding cassette proteins (ABC proteins), which comprise a large superfamily, widely distributed in nature. ABC proteins share a basic architectural design, with transmembrane domains (TMD) that anchor the transporter as an integral membrane protein, and nucleotide binding domains (NBD) directly coupling ATP hydrolysis to substrate translocation against a concentration gradient. ABC proteins are involved in different cell events, such as xenobiotic detoxification, nutrient and intermediaries' mobilization and lipid secretion, among others (Do *et al.* 2018). In plants, eight ABC subfamilies have been described (Verrier *et al.* 2008), with some members already identified as alkaloid transporters. In *Coptis japonica* the ABCB-type transporters CjABCB1 and CjABCB2 have been

related to berberine mobilization from roots to rhizome (Shitan *et al.* 2003, 2013a). Berberine is a protoberberine type of benzyloisoquinoline alkaloid (BIA), commonly found in plants from the Ranunculales order (Liscombe *et al.* 2005), which includes seven plant families, among them the Papaveraceae. *Argemone* genus (prickly poppies) belongs to the Papaveraceae family and comprises around 25 species, including *A. mexicana* (Schwarzbach and Kadereit 1999). This plant accumulates berberine in its aerial and underground tissues, although it can also be detected in immature seeds. Interestingly, sanguinarine, a benzophenanthridine, is only detected in roots and mature seeds (Vázquez-Flota *et al.* 2018). As other BIA's, both berberine and sanguinarine synthesis starts with the modification of two tyrosine units that later condenses into S-norcochlorine, a thrice hydroxylated compound, which then follows the biosynthetic routes depicted in Fig. 3.2.2.S1.

It is noteworthy that transcriptional activity related to both berberine and sanguinarine biosynthesis does not always match alkaloid tissue distribution in neither developing plantlets, nor in mature *A. mexicana* plants. Tissues displaying high transcriptional activity do not accumulate the highest alkaloids amounts (Xool-Tamayo *et al.* 2017; Vázquez-Flota *et al.* 2018). These observations suggest the existence of an operative alkaloid transport system in this plant. Based on its similarity to previously identified BIA transporters, an ABCB-type transporter, AmABCB1, was isolated from *A. mexicana*. AmABCB1 displayed a preference for sanguinarine over berberine, and its main expression was detected in seeds, where it could operate in alkaloid accumulation.

### Materials and methods

#### Phylogenetic analysis and bioinformatics

Two contigs with complete 3861 and 3744 bp ORFs, respectively, were retrieved from a seedling transcriptome (Xool-Tamayo *et al.* 2017) and analyzed as possible candidates for alkaloid ABC transporters. Both contigs; AmABCB1 and AmABCB2 were included in a phylogenetic tree along with berberine transporters from *C. japonica* (CjABCB1 and CjABCB2; Acc. AB043999 and AB674325.1; Shitan *et al.* 2003, 2013a) and *Thalictrum minus* (TmABCB1 and TmABCB2; Acc: LC029926.1 and LC029927.1; Shitan *et al.* 2015), as well as the auxin transporters from *Arabidopsis thaliana* (AtABCB19; Acc: NM\_113807.3; Noh *et al.* 2001), *Solanum lycopersicum* (SIABCB4; Acc: NP\_001234209.1; Ofori *et al.* 2018) and the predicted auxin transporter from

*Daucus carota* (DcABCB21; Acc: XM\_017374076.1; Iorizzo *et al.* 2016). The tree was constructed using the corresponding translated amino acid sequences by the maximum likelihood algorithm with 500 bootstrap replications with MEGA X (<https://www.megasoftware.net>; Kumar *et al.* 2018). Amino acid sequences were aligned with Clustal W in MEGA X and BioEdit v7.1.11. (Hall 1999). Selected *A. mexicana* candidates were submitted to *in silico* 3D structural analysis using PHYRE 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>; Kelley *et al.* 2015) and the 3D viewer FirstGlance (<http://firstglance.jmol.org>). Subcellular localization and transmembrane domains were predicted with BUSCA (<http://busca.biocomp.unibo.it>; Castrense *et al.* 2018).

### Extraction and analysis of nucleic acids

Total RNA was extracted employing PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen Life Technologies; Waltham MA). Synthesis of single stranded ADCc and PCR amplifications were performed following standard procedures (See Supplementary information and Table 3.2.1.S1 for details and oligonucleotide primers). Tissue expression analysis of the isolated ABC transporters (AmABCB1 and B2) was performed by RT-PCR using oligonucleotide primers ABCB1 and ABCB2, respectively. Norcoclaurine synthase (NCS), s-scoulerine O-methyltransferase (SOMT) and stylopine synthase (StySyn) were utilized as indicators of tissues' biosynthetic capacity and performed by RT-PCR.

### Isolation of AmABCB1 and functional analysis in yeast cells

AmABCB1 complete sequence was retrieved from seeds RNA by crossover PCR according to manufacturers' instructions (In-Fusion HD cloning kit; Clontech, USA; Supplementary information) and cloned in yeast expression vector pDR196 (Rentsch *et al.* 1995). The isolated plasmid, pDR-AmABCB1, was used to transform *S. cerevisiae* strain AD12345678 (see Supplementary information for yeast genotype and culture conditions). For functional alkaloid transport analysis, selected transformant colonies were precultured in 100 mL SD medium to OD<sub>600</sub> 0.6 and then 25 mL were diluted in half-strength SD medium, containing 5 µM of either berberine or sanguinarine. Cultures were incubated at 30°C and 200 rpm during 3 or 5 h and then collected and extracted as described before (Shitan *et al.* 2013b; Supplementary information). Berberine or sanguinarine contents were analysed in an ACQUITY UPLC system coupled to a QDa mass detector (Waters Corp., Milford, MA, USA) as reported before (Shitan *et al.* 2013b; Supplementary information).

## Results

### Phylogenetic identification of AmABCB1 as an alkaloid transporter and its isolation

Two full length sequences, AmABCB1 and AmABCB2, were selected from a seedling *A. mexicana* transcriptome and compared to ABCB-type transporters involved in BIA and auxin transport (Fig. 3.2.1A). AmABCB1 displayed 45% and 80 % identity with AtABCB19 and CjABCB1, respectively and clustered within the alkaloid transporter group with a significant bootstrap (Fig. 3.2.1A). In contrast, AmABCB2 shared 86 and 45 % identity with the same transporters and neighbored to *A. thaliana* and *S. lycopersicum* auxin transporters in a separated branch (Fig 3.2.1A). These results suggested AmABCB1 as a candidate to mobilize alkaloids and it was chosen for further characterization. In silico 3D modeling, after hydrophobicity analysis, revealed the presence of several  $\alpha$ -helix stretches crossing the membrane in both TMD's of AmABCB1 (Fig. 3.2.1B and C), consistent with the typical structure of ABCB-type transporters. Moreover, NBD's occurred alternated between the TMD's forming  $\beta$ -sheet structures on the cytoplasmic side. Both NBD's included several required motifs for ATP binding and hydrolysis, such as Walker A, Q-Loop, ABC-signature, Walker B, D-Loop and H-Loop, as has been described for the typical structure of ABC transporters (Thomas and Tampe 2020; Fig. 3.2.1B and C). Almost all reported plant ABCB-type transporters are located in the plasma membrane (Kang *et al.* 2011), and the prediction programs suggested this same location for AmABCB1 (Fig. 3.2.1C, bottom).

### Expression analysis of AmABCB1

Mature plants of *A. mexicana* accumulate sanguinarine in their roots and mature seeds with levels around 1.5 and 1.0 mg g DW<sup>-1</sup>, respectively. Berberine is found in all tissues, reaching values between 1.3 and 3 mg g DW<sup>-1</sup> (Vázquez-Flota *et al.* 2018). An initial analysis showed the presence of AmABCB1 transcripts mainly in the entire mature capsules, followed by that in immature capsules and only a faint band was found in roots (Fig. 3.2.2A). Capsules were dissected into pericarps and seeds and analyzed at early-, mid- and full-term ripening (Fig. 3.2.2B). Seeds at early stages showed a milky endosperm with a thin and transparent seed coat, which turned brown by mid-term and finally, black and thick when totally mature (Fig.3.2.2B). Low amounts of berberine (ca. 0.1 mg g DW<sup>-1</sup>), but no sanguinarine, were detected in seeds at early stages. Upon maturation and desiccation, berberine disappeared, whereas sanguinarine gradually increased up to its maximal values, only when totally mature (Xool-Tamayo *et al.* 2017).

AmABCB1 transcripts were detected mainly in mature seeds, with faint bands observed at early and mid-term stages. Interestingly, AmABCB1 expression was also observed in mature pericarps, similarly to AmABCB2, even when sanguinarine is not present in this tissue (Fig. 3.2.2B). When expression of biosynthetic genes was analyzed, it was noticed that NCS was mainly detected in pericarps at all stages, with an increasing pattern in seeds during the early- and mid-term ones (Fig. 3.2.2B). On the other hand, SOMT was only detected in pericarps at mid- and mature terms with no expression in seeds. Contrastingly, StySyn could be observed both in pericarps and seeds at all stages (Fig. 3.2.2B).

### In vitro assay for alkaloid transport in yeast cells

Seeds were selected for isolation of AmABCB1 complete sequence and used to construct pDR-AmABCB1 vector for heterologous expression in yeast cells. Yeast readily taken up both alkaloids as noticed in the those transformed with the empty vectors (Fig. 3.2.3). Interestingly, berberine efflux was noticed in AmABCB1 transformed cells, particularly after a 5 h incubation when a 19 % lower accumulation was detected, in comparison to the empty vector (Fig. 3.2.3A). Contrastingly, AmABCB1 transformed cells accumulated higher sanguinarine amounts (ca. 60%) from early incubation which were maintained up to end of the experiment (Fig. 3.2.3B). These results suggest that AmABCB1 could be involved in the alkaloid mobilization in *A. mexicana* seeds.

### Discussion

AmABCB1 is the first alkaloid transporter reported in *A. mexicana* seeds and it was identified by its neighboring with berberine transporters from *C. japonica* and *T. minus*. It displayed the expected features of an ABCB-type protein, including its predicted localization in the plasma membrane (Fig. 3.2.1C). It showed both berberine efflux and sanguinarine uptake activity (Fig. 3.2.3A and 3.2.3B). Although, it was not noticed in berberine accumulating tissues, it was abundantly expressed in seeds, with a low expression in pericarps and roots (Fig. 3.2.3A and 3.2.3B). Seeds represent along with roots, the sole sites of sanguinarine accumulation in mature plants and these results suggest that most of roots' sanguinarine content is in situ produced or imported by a different transporter. In contrast, that found in seeds could be imported from different tissues. Interestingly, transcripts involved in sanguinarine biosynthesis are detected at high levels in leaves, stems (Vázquez-Flota *et al.* 2018) and pericarps (Fig. 3.2.2B), even when



this alkaloid does not accumulate in mature aerial parts, suggesting that they might be acting as source tissues. However, since StySyn expression (used as marker of sanguinarine biosynthesis) was also observed in seeds (Fig. 3.2.2B), some of it also could be produced in there. Sanguinarine in seeds is exclusively accumulated in the coats (Xool-Tamayo *et al.* 2017), which are formed from the ovular interteguments. Since seed coats consist of multiple cell layers and the most external of them results from the formation of secondary cell walls with sclereids during desiccation (Jardinaud and Petitprez 2003), AmABCB1 could also operate in sanguinarine transport among these layers.

Although no other sanguinarine transporters has been reported, a search in information banks retrieved a characterized sanguinarine transporter from *Eschscholzia californica* cell cultures (Nwanyichukwu 2014), which shared 86% identity with AmABCB1, supporting its role as a sanguinarine transporter in *A. mexicana*. Interestingly, berberine could be detected in the seed's endosperm at early stages and some expression of AmABCB1 was also noticed (Fig. 3.2.2A and 3.2.2BB). However, during seed maturation, berberine is displaced by sanguinarine (Loza-Muller *et al.* 2021), suggesting a role for AmABCB1 in this process (Fig. 3.2.3A).

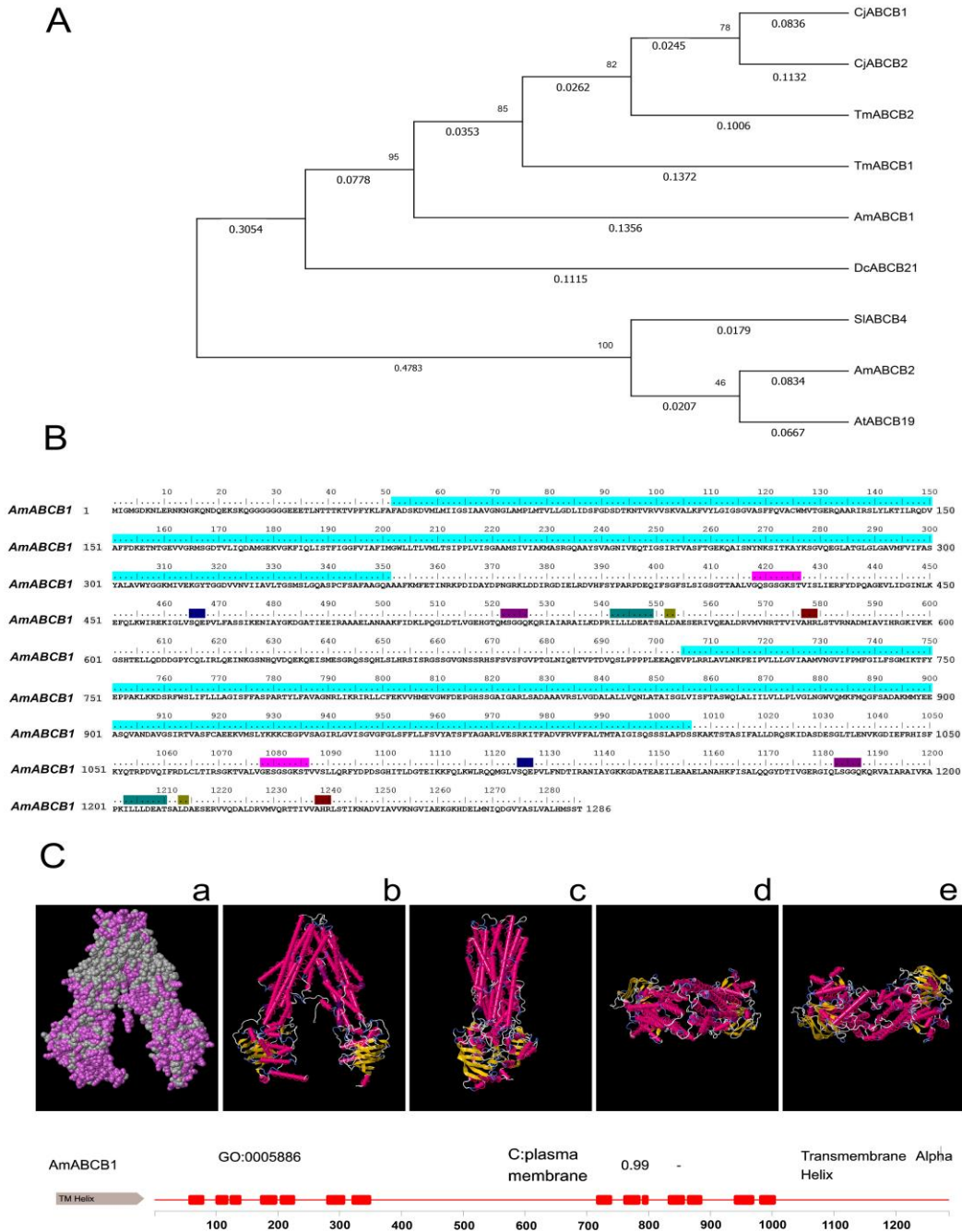
### Declarations

**Acknowledgments:** The authors wish to thank Drs. W. Frommer (Carnegie Institution at Stanford University) and A. Goffeau (Université Catholique de Louvain, Belgium) for their kind donations of the pDR196 vector and the AD12345678 yeast strain, respectively. We also thank MSc. Miriam Monforte-González for image editing.

**Material availability:** AmABCB1 and AmABCB2 ADNc sequences are available at GenBank under the accession numbers MW936653 and MW962272, respectively.

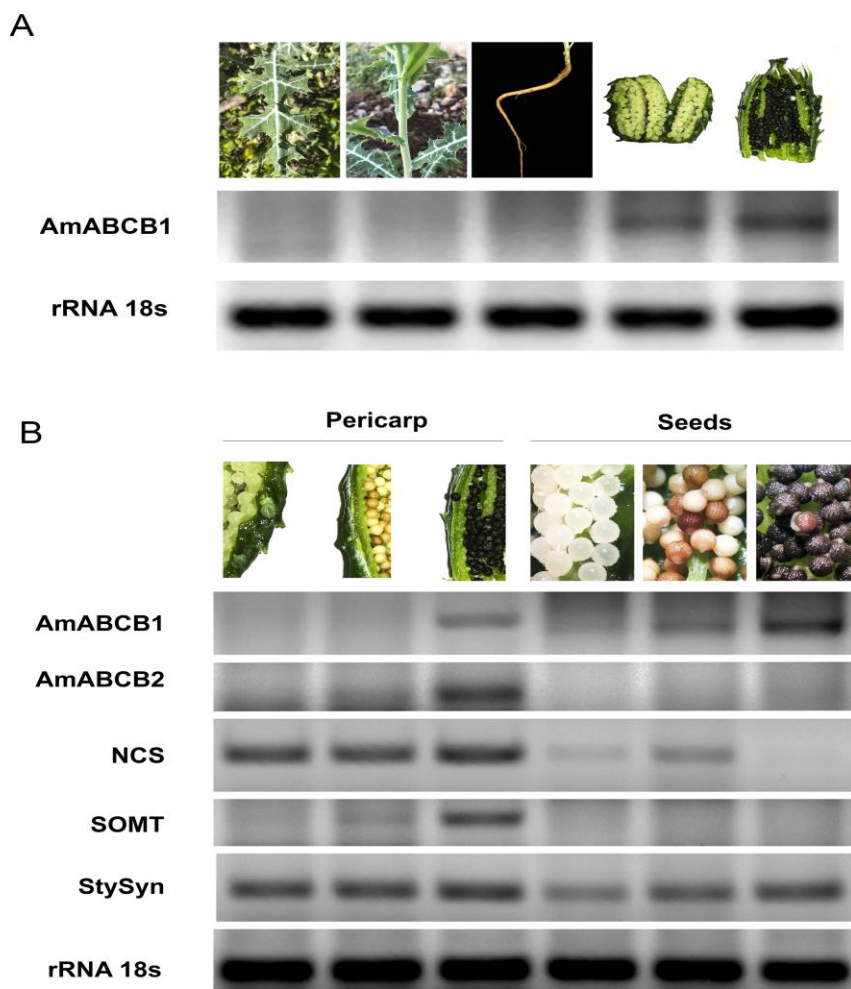
**Authors' contributions:** LL-M: designed part of the research and conducted the bioinformatics and isolation of the ADN sequences and wrote the first draft; NS and YY: constructed the expression vectors and performed the *in vitro* assays; FV-F: grant responsible, designed the research, analyzed the data, and produced the final MS version. All the authors read and approve the MS.



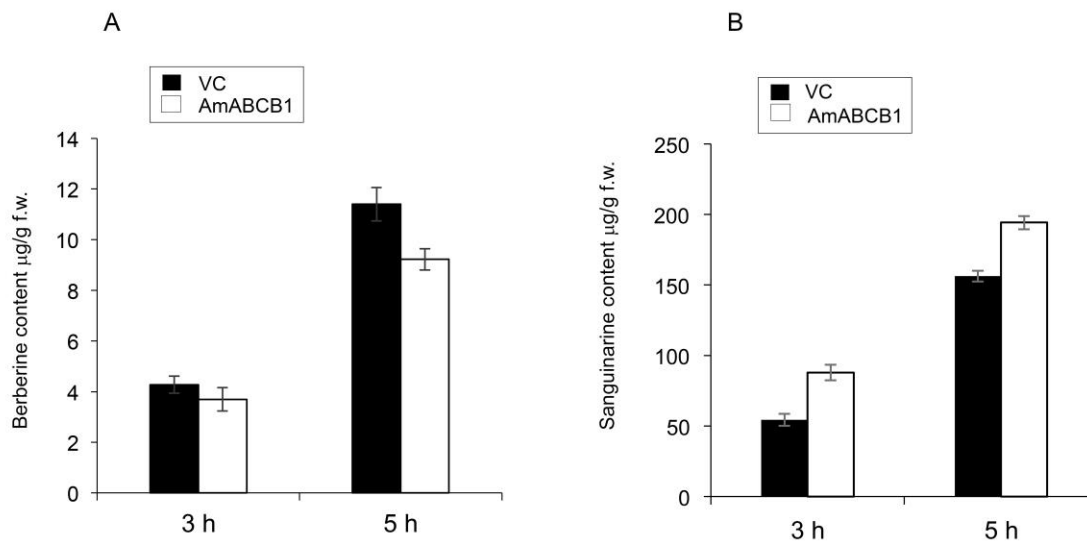


**Fig. 3.2.1 (A)** Phylogenetic analysis of AmABCB1. The complete phylogenetic tree comprises CjABCB1, and CjABCB2 (Acc. AB043999 and AB674325.1), which

correspond to berberine transporters from *C. japonica* (Shitan *et al.* 2003, 2013a); TmABCB1 and TmABCB2 (Acc. LC029926.1 and LC029927.1), to the berberine transporters from *T. minus* (Shitan *et al.* 2015); AtABCB19 and SIABCB4 (Acc. NM\_113807.3, NP\_001234209.1; Noh *et al.* 2001; Ofori *et al.* 2018), to the auxin transporters from *A. thaliana* and *S. lycopersicum* respectively; and lastly DcABCB21 to the predicted auxin transporter from *D. carota* (Acc. XM\_017374076.1; Iorizzo *et al.* 2016). The phylogenetic tree was constructed with the maximum likelihood method with 500 bootstrap replications using MEGA X. **(B)** Amino acid sequence for AmABCB1. TMD1 (turquoise) from F52 to A351 and TMD2 (turquoise) from V705 to S1006. NBD1 includes Walker A (fuchsia), Q-Loop (deep blue), ABC signature (violet), Walker B (bluish green), D-loop (olive green) and H-loop (deep red) in the stretch from G418 to R579, while NBD2 includes the same motifs from G1078 to R1240. **(C)**. Hydrophobic analysis and 3D structure of AmABCB1 protein. **a)** Hydrophobic/hydrophilic regions in the protein structure of AmABCB1. Hydrophobic/hydrophilic regions are colored in gray/pink, respectively; **b-e)** Frontal, side, top and bottom views, respectively, of the 3D structure of AmABCB1;  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets are colored in pink and yellow, respectively. Analysis was performed with Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre2; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) and 3D viewer FirstGlance (<http://firstglance.jmol.org>). Bottom) Transmembrane prediction (BUSCA software) for AmABCB1 indicated the presence of several  $\alpha$ -helices distributed in its two TMDs, while its subcellular localization pointed to the plasma membrane with 99% of confidence.



**Fig. 3.2.2** Expression analysis of AmABCB1 and alkaloid biosynthetic genes. A) AmABCB1 expression in leaves, stems, roots, and immature and mature fruits. B) AmABCB1 expression during fruit and seed development. RT-PCR was carried out from 150 ng total RNA with specific oligonucleotide primers (Table 3.2.1.S1). NCS, norcoclaurine synthase; SOMT, S-scoulerine O-methyltransferase and StySyn, stylophine synthase. Amplicon products were 318, 241, 261, 200 bp for AmABCB1, NCS, SOMT and STYSYN, respectively.



**Fig. 3.2.3** Berberine (A) and sanguinarine (B) in vitro alkaloid transport assay of AmABC B1. Yeast containing pDR/AmABC B1 vector were incubated with 5 µM of either alkaloid for 3 or 5 h, and contents inside the cells were analyzed by UPLC-MS. Incubations were made in triplicate (p 0.05; t test).

### 3.2.2. Supplementary information. AmABCB1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana* (Papaveraceae)

L Loza-Muller<sup>1</sup>, N Shitan<sup>2</sup>, Y Yamada<sup>2</sup>, F Vázquez-Flota<sup>1,\*</sup>

1) Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Chuburna 97205, Mérida Yucatán México and 2) Laboratory of Medicinal Cell Biology, Kobe Pharmaceutical University, Motoyamakita-machi, Higashinada-ku, Kobe 658-8558, Japan.

#### Contact information:

Dr. Felipe Vázquez-Flota (\*Corresponding author), Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán AC, Calle 43 No. 130 Chuburna 97205, Mérida Yucatán México; (999)942-83330 (151); felipe@cicy.mx; ORCID ID: 0000-0002-3171-137X

#### Supplementary Information

#### Materials and methods

#### Extraction and analysis of nucleic acids.

Total RNA from mature plants was extracted from different tissues using the PureLink Total RNA Purification System (Invitrogen Life Technologies; Waltham MA). Single stranded ADNc was prepared with 2 µg of total RNA primed with 0.5 µg oligo(d)T and mixed with 0.2 µM dNTP's and 200 U of the MLV-RT (Invitrogen) in a total volume of 20 µl. The mix was incubated at 37°C during 50 min and the reaction was stopped at 70°C for 15 min. All RT-PCR amplifications were carried with 150 ng of the single stranded ADNc. RT-PCR were performed with an initial 5 min 95°C

denaturation step and 35 further cycles of 20, 20 and 15 seg at 95°C, variable (Table 3.2.1.S1) and 72 °C, for template denaturation, primer alignment and amplification, respectively, and final 10 min 72°C amplification round. In all cases, reaction mixtures were prepared with 0.2 µM of each primer, 200 µM dNTP's, 1.7 mM MgCl<sub>2</sub> and 3 U of Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific), in a total volume of 30 µl. After amplification (Applied Biosystems Veriti Thermal Cycler, Foster City CA), PCR products were resolved in 1.4% agarose gels in TAE. Tissue expression analysis of NCS, SOMT and StySyn was performed by RT-PCR as described above (Xool-Tamayo *et al.* 2017), using the primer combination NCS-F/R, SOMT-F/R, and StySyn-F/R, respectively (Table 3.2.1.S1).

#### **Isolation of AmABCB1 and functional analysis in yeast cells.**

The full-length ADNc of AmABCB1 for construction of the yeast expression vector was retrieved from seed ADNc by crossover PCR using the primer combinations AmABCB1-CrossOver-F1/R1 and AmABCB1-CrossOver-F2/R2. Fragments of 167 and 3,866 bp, carrying the 5' and 3' ends respectively were recovered by crossover PCR using the primer combination showed in Table 1S according to the In-Fusion HD cloning kit manufactures' instructions (Clontech, USA) and cloned between the EcoRI and XhoI sites of the yeast expression vector pDR196 (Rentsch *et al.* 1995). The resulting plasmid was transformed into competent DH5a *E. coli* cells by heat shock. Identity of the cloned product was confirmed comparing sequences with AmABCB1 from the seedling transcriptome (99.9%). The isolated plasmid, pDR-AmABCB1, was used to transform the *S. cerevisiae* strain AD12345678 (MAT $\alpha$ , PDR1-3, ura3, his1,  $\Delta$ yor1::hisG,  $\Delta$ snq2::hisG,  $\Delta$ pdr5::hisG,  $\Delta$ pdr10::hisG,  $\Delta$ pdr11::hisG,  $\Delta$ ycf1::hisG,  $\Delta$ pdr3::hisG; and  $\Delta$ pdr15::hisG; Decottignies *et al.* 1998) by lithium acetate and positive transformants were selected using SD medium less uracil (SD medium contain 20 mg/L of each adenine, arginine, histidine, methionine and tryptophan and tyrosine; 40 mg/L threonine; 50 mg/L phenylalanine and 120 mg/L leucine).



### CAPÍTULO III

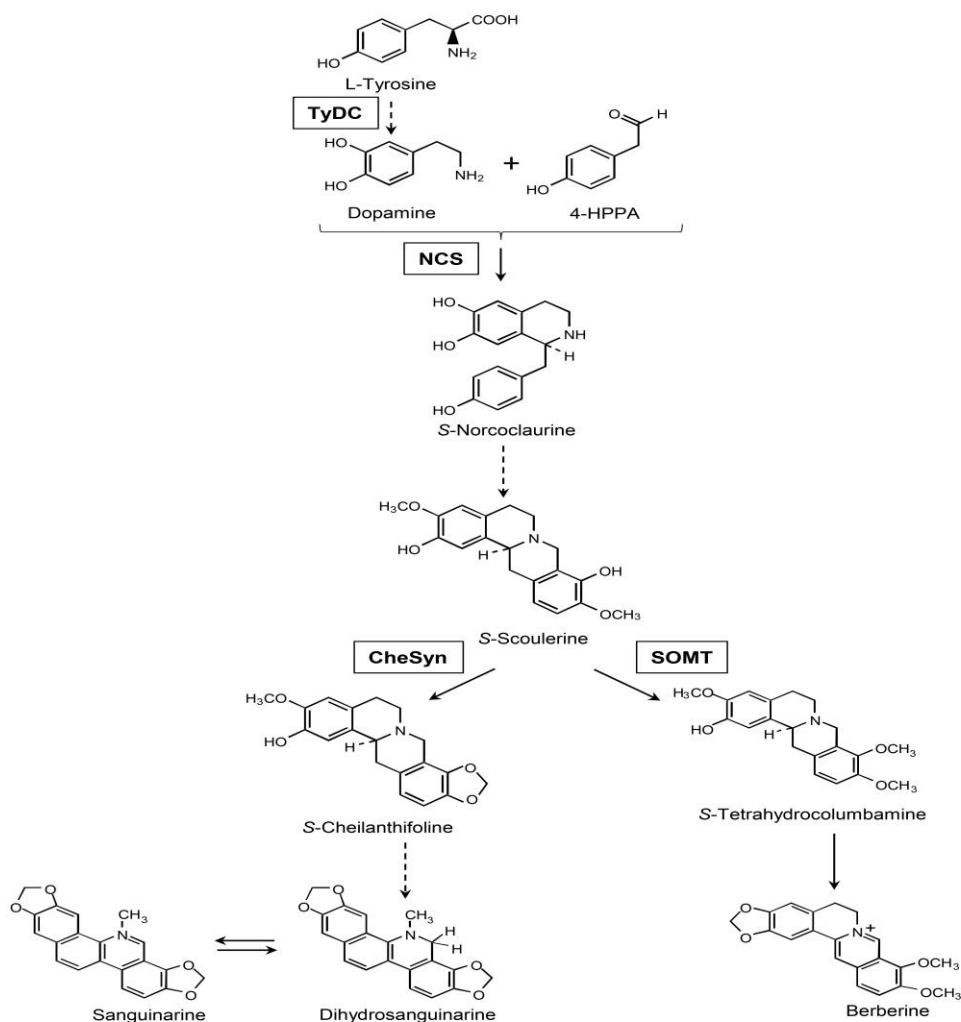
For functional alkaloid transport analysis, selected transformant colonies were precultured in 100 mL of SD medium until OD600 0.6 and then diluted to 25 mL in half-strength SD medium containing 5  $\mu$ M of either berberine or sanguinarine. Culture was incubated at 30°C and 200 rpm during 3 and 5 h. Cells were collected by centrifugation and pellets were washed twice with deionized cold water before disruption with glass beads in the extraction buffer (0.01 N HCl in 50% methanol). Cell debris was discarded by centrifuged and supernatants (crude yeast extracts) were analyzed for alkaloid contents (Shitan *et al.* 2013a). The contents of berberine and sanguinarine in yeast extracts were determined in an ACQUITY UPLC system coupled to a QDa mass detector (Waters Corp., Milford, MA, USA). Extracts were passed through a 0.45  $\mu$ m Cosmospin filter (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) and chromatographed on a Cortecs UPLC C18 column (2.1  $\times$  100 mm, 1.6  $\mu$ m; Waters Corp., Milford, MA, USA) at 40 °C using as mobile phase an incremental gradient of acetonitrile (A) in 0.01% acetic acid in water (B). A multistep gradient was applied initiating with 5 % A in B and increasing it to 40 % within the first nine minutes, then to 50% for three minutes, and returning to the initial conditions (5 % A in B) for three additional minutes (total running time 15 min). Flow speed and injection volume were set at 0.3 mL/min and 2  $\mu$ L, respectively (Shitan *et al.* 2013a). Mass detector was set at 15 and 800 V cone and capillary voltages respectively, at 600°C. Berberine (m/z=336) and sanguinarine (m/z=332) were detected using single ion recording mode and identified by direct comparison to commercial standards (Nacalai Tesque, Inc. and Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis, MO, USA), respectively.

**Table 3.2.1.S1.** Primer used in the different PCR amplification. Primer alignment temperature in PCR's was set 0.2 °C below from the minimum T<sub>m</sub> of each combination.

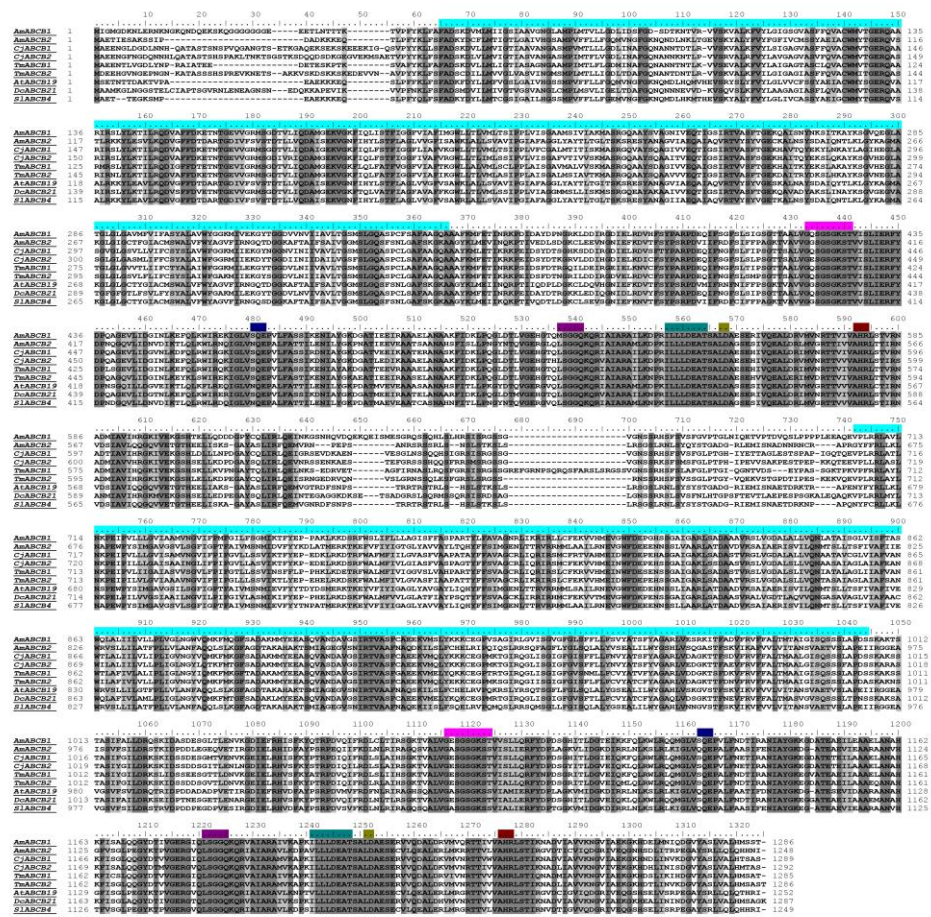
Primer tag	Sequence (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size (bp)
AmABCB1-F	GGGAGAGAAGGTAGGCAAGTTTATACAGCTA	69	318

### CAPÍTULO III

AmABCB1-R	TCCCTCCTGAACACCAGATTTATACGC	68	
AmABCB2-F	AGCCAGAGCACTAAACCACGTGACT	70	115
AmABCB2-R	CGTGTGCTTGATAATGTGAAGTTAACGAAC	67	
NCS-F	CATCGCTAATTACGTTCTCAAGAATCA	64	241
NCS-R	ATAGTAGTACATGGAATTACCTGGATGGGA	67	
SOMT-F	CAGGATTTGGACCAGAAGCAC	64	261
SOMT-R	ACGATACTCCATCCTCCTCGC	66	
StySyn-F	GTTCAAAATCTAGTACGTCCGCT	63	200
StySyn-R	TTCTCTTGAACATTTGGTTCTCGT	63	
AmABCB1-CrossOver-F1	ATGATAGGGATGGGGGATAAAAACTTGGA	68	167
AmABCB1-CrossOver-R1	TTGGAATCGGCAAAGGCGAAT	66	
AmABCB1-CrossOver-F2	TCAAGAGAAGAGCAAACAGGGTGG	67	3866
AmABCB1-CrossOver-R2	AAATTTGAGAGAGAGGGAGTGTG	63	



**Fig. 3.2.2.S1** Schematic view of berberine and sanguinarine biosynthetic pathways. TyDC, tyrosine decarboxylase; NCS, norcoclaurine synthase; BBE, berberine bridge enzyme; SOMT, S-scoulerine O-methyltransferase; STOX, tetrahydroprotoberberine oxidase; CheSyn (CYP719A14), cheilanthifoline synthase; DBOX, dihydrobenzophenanthridine synthase; SnR, sanguinarine reductase. Boxed enzymes correspond to those analyzed in this study; dashed arrows show multiple reactions.



**Fig. 3.2.2.S2** Amino acid sequence alignment of AmABC1 with BIA transporters. The alkaloid transporters from *C. japonica* (CjABC1 and CjABC2) and *T. minus* (TmABC1 and TmABC2) were employed as query. The auxin transporters from *A. thaliana* (AtABC19) and *S. lycopersicum* (SiABC4); and the predicted auxin transporter from *D. carota* (DcABC21) were employed as external references. The Clustal W algorithm in MEGA X (<https://www.megasoftware.net>) and BioEdit (BioEdit v7.1.11.) were employed for this alignment. AmABC1 showed a common identity in the TMD's and NBD's with other ABCB-type transporters. TMD's regions (turquoise), Walker A (fuchsia), Q-Loop (deep blue), ABC signature (violet), Walker B (bluish green), D-loop (olive green) and H-loop (deep red).

### 3.2.3 Recapitulación.

Con la información que se logró obtener en la caracterización de AmABCB1 se sugiere que esta proteína transportadora ABC estaría participando en el transporte del alcaloide sanguinarina en semillas maduras de *A. mexicana*. Por lo tanto, la participación de AmABCB1 estaría también ligado a un mecanismo fisiológico porque como bien se sabe la sanguinarina se ha reportado como un agente alelopático que tiene actividad antimicrobiana y contra otros animales (Roberts *et al.* 1998; Ly *et al.* 2018); y al estar AmABCB1 involucrado en la acumulación de sanguinarina en la semilla forma parte de la ruta por la cual la planta emplea un mecanismo de defensa para su sobrevivencia y adaptación al medio ambiente. AmABCB1 es el primer transportador de alcaloides que se caracteriza en semillas maduras de cualquier especie y se espera que este descubrimiento abra el camino para entender como las diferentes especies vegetales pueden emplear diversos mecanismos para su adaptación en la vida terrestre. En la sección posterior (3.3) se vincula la posibilidad de que AmABCB1 tenga una relación entre la distribución de los alcaloides descritos en semillas maduras de *A. mexicana*.

### 3.3 Distribución de alcaloides en las semillas de *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae)

En la presente sección se describe la distribución de alcaloides en semillas maduras de *A. mexicana* en formato de artículo para publicación. Estos resultados se asocian al tercer objetivo y, junto con los resultados presentados en la sección anterior, permite una mejor integración del trabajo. A manera de resumen en semillas inmaduras no se pudo localizar a la sanguinarina; mientras que berberina se encontraba en una concentración de alrededor de 0.1 mg gDW<sup>-1</sup>; mientras que en semillas maduras sucedía lo contrario, berberina no pudo ser detectado, pero sanguinarina se encontraba en concentraciones de alrededor de 0.8 mg gDW<sup>-1</sup>. Esta transición se asoció con un aumento en la expresión de AmABCB1 que si bien moviliza sanguinarina de manera *in vitro* (sección 3.2); no se descarta que en semillas pudiera estar llevando a cabo esta función.

#### 3.3.1 Alkaloid distribution in seeds of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae)

Lloyd JA Loza-Muller<sup>1</sup>, José Ignacio Laines-Hidalgo<sup>1</sup>, Miriam Monforte-González & Felipe Vázquez-Flota\*

Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43, No. 130 Chuburná 97205 Mérida Yucatán México.

\*Corresponding author: (52) 999-942-8330 (151); felipe@cicy.mx

#### Abstract

Seeds of *Argemone mexicana* L accumulate significant amounts of sanguinarine. The analysis of the distribution of this alkaloid through the tissues of mature seeds revealed that up to 60% of its contents was found tightly fixed to the different components of the seed external covers where it persisted during seedling germination. Contrastingly, sanguinarine contents in cotyledon accounted for the remaining 40% and it could have been, at least partially, mobilized to the newly formed hypocotyls during emergence from seeds. Berberine was only detected in immature seeds and in seedlings once cotyledons were totally displayed. These results are discussed as a possible sanguinarine role in the chemical protection during seedlings germination.

**Key words:** *Argemone mexicana*; berberine, sanguinarine, seeds.

### Resumen

Semillas de *Argemone mexicana* L acumulan cantidades elevadas de sanguinarina. Un análisis de la distribución de alcaloides en los diferentes tejidos que componen la semilla reveló que hasta un 60% del contenido se encontraba fuertemente unido en las capas que forman la cubierta exterior, donde se retuvieron durante la emergencia del hipocótilo. En contraste, los cotiledones presentaron el 40% restante y parte de ello pudo haber sido movilizado al hipocótilo al emerger. Berberina sólo se observó en semillas inmaduras y en plántulas en desarrollo con los cotiledones desplegados. Estos resultados se discuten en función del posible papel defensivo de la sanguinarina durante la germinación.

Palabras clave: *Argemone mexicana*; berberina, sanguinarina, semillas.

### Introduction

Alkaloids are toxic nitrogenous compounds providing chemical defense to the organism that produce them (Zenk & Juenger 2016). In plants, alkaloids are often accumulated in tissues susceptible to be assaulted by predators, such as sprouts, or reproductive structures, i.e., flowers and seeds, because their high protein and sugar contents. Although protective during early stages of germination, the presence of toxic chemicals in seed and seed holding organs plays an important role in spreading of the population, since it could restrict it to the participation of specialist herbivores or to environmental conditions (Hartmann 2004). Presence of alkaloids in fertilized tissues, such as fruits and seeds, occurs through different plant families. Since seeds function as sink organs importing sugars and other metabolites through direct vascular connections, the origin of the alkaloids found in them could be traced to other parts of the fruit or distant tissues (Ziegler & Facchini 2008). In *Datura stramonium* (Solanaceae), the tropane alkaloids atropine and scopolamine accumulate in both pericarps and seeds, whereas scopolamine is only found in seeds, where no biosynthetic activity has been observed (Miraldi *et al.* 2001). In *Coffea* (Rubiaceae), purine alkaloids are produced in mesocarps, but accumulated

in seeds (Koshiro *et al.* 2006). In *Papaver somniferum* (Papaveraceae), the benzyloisoquinoline alkaloid morphine is found in the capsular fruits but not in seeds, which seems related to the absence of laticifer cells where the alkaloid is accumulated (Weid *et al.* 2004). *Argemone mexicana* L, the Mexican prickly poppy, is another member of the Papaveraceae family which accumulates berberine throughout the complete plant, except in mature seeds, and sanguinarine exclusively in roots and seeds even when biosynthetic activity could be detected in stems and leaves (Xool-Tamayo *et al.* 2017; Vázquez-Flota *et al.* 2018). *Argemone* seeds are contained in septicial capsules with four to six locules. Inside the capsules, seeds remain attached to the intralocular septum by the placenta (Cresson & Schneider 1988). During development and desiccation, the seed testa engrosses and turns from transparent to yellow-brownish and black with the appearance of concave depressions on the surface which confer it a reticulate aspect. At mature stage, *Argemone* seeds are small (*ca.* 1 mm diameter) and spherical shaped (Fig. 3.3.1). An external cuticle covers the episperma consisting of a thick testa, formed by three cell layers and the internal tegmen, which involves the endosperm (Cresson & Schneider 1988).

Interestingly, the newly displayed cotyledons of unfolding seedlings lack of sanguinarine whereas high contents could be still found in the detached seed coats (Vázquez-Flota *et al.* 2018). Recently, evidence of a possible alkaloid protein transporter operating in seeds has been reported (Loza-Muller *et al.* 2019). Therefore, the precise location of sanguinarine in seeds would help to integrate a better model about the role of this alkaloid during seed germination and seedling establishment.

### Experimental

Plant materials. Immature and mature seeds were collected from 10- and 18-day post anthesis (DPA) indehiscent and dehiscent capsules, respectively. Indehiscent fruits were cut opened with



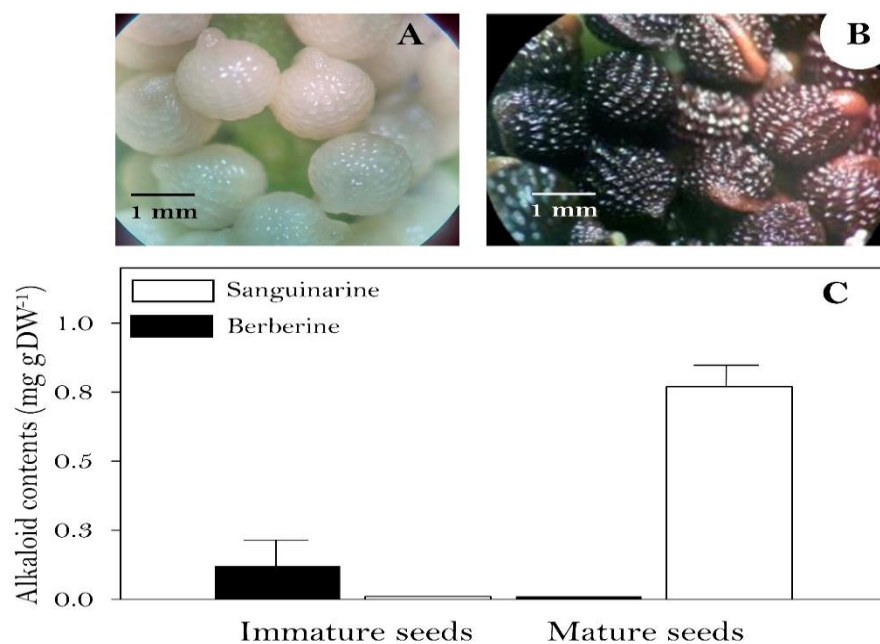
a scalpel to harvest the seeds. For alkaloid distribution in seed tissues, 80 seeds (95 mg, *i.e.*, 1.19 mg per individual seed) were mechanically separated in external cuticle, testa, internal tegmen and endosperm with tweezers and flat rounded end spatulas (see Fig. 3.3.2A). Each tissue component was individually collected in microcentrifuge tubes and weighted to estimate their contribution to seed biomass. Alkaloid contents were estimated both on dry matter as per single seed (Fig. 3.3.2). For germination, seeds were manually scarified with sandpaper and then placed on top of wet filter contained in Petri dishes. Alkaloids were washed out from 100 seeds incubating them in water, 100 mM phosphate buffer at pH 5, 7, 8 and 10, methanol or 10% NH<sub>4</sub>OH during 1, 3, 12 and 24 h, with gentle agitation. Alkaloid from the aqueous solvents were recovered as described lines below increasing pH > 10 with NH<sub>4</sub>OH.

Alkaloid analysis. Alkaloids were extracted from ground tissues in 1.0 mL of methanol, as described in (Monforte-González *et al.* 2012). Extracts were separated by TLC, using a mixture of n-butanol: water: NH<sub>4</sub>OH (8:1:1) and benzene: ethanol (9:1) for berberine (R<sub>f</sub> 0.29) and sanguinarine (R<sub>f</sub> 0.53), respectively. After chromatographic separation, alkaloids were quantified by *in situ* fluorescence, using a Camag TLC Scanner 4 (Muttentz Switzerland) controlled by the WinCATS 1.4.10 planar chromatography manager (Monforte-González *et al.* 2012). When required, alkaloids were retrieved from aqueous solutions increasing pH > 10 with NH<sub>4</sub>OH and extracting with equals volumes of EtOAc (Guízar-González *et al.* 2012). Identity of the chromatographic bands has been previously established by LC-MS (Vázquez-Flota *et al.* 2018, Guízar-González *et al.* 2012).

### Results and Discussion

Immature seeds from capsules 10 DPA were near final dimensions, friable and with a thin, transparent episperma. Humidity content was near 85 % (Fig. 3.3.1A). Upon desiccation, water

content decreased to less than 10% and the episperma (testa and tegmen) turned black, showing the typical reticulate aspect (Fig. 3.3.1B). Low amounts of berberine, but not sanguinarine were detected in the immature seeds, whereas in mature seeds, high amounts of sanguinarine (ca. 0.8 mg gDW<sup>-1</sup>) were observed (Fig. 3.3.1C). These values are among the usually reported 0.6 and 1.0 mg gDW<sup>-1</sup>) for *Argemone* seeds (Xool-Tamayo *et al.* 2017). Since no berberine was observed, it was not further monitored in the mature seeds.

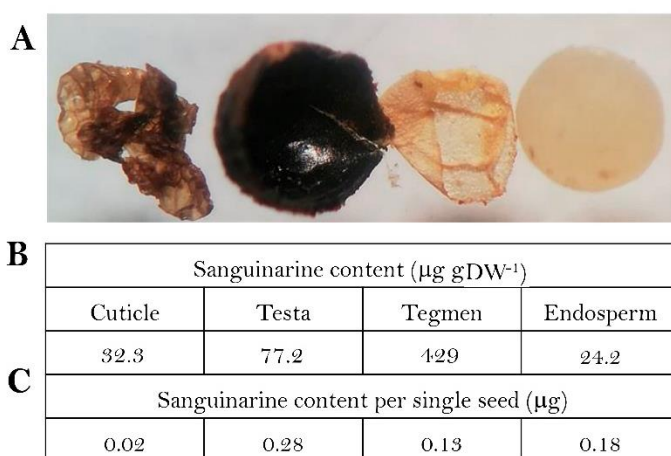


**Figure 3.3.1.** Alkaloids contents in *A. mexicana* seeds at different developmental stages. Aspect of the immature (A) and mature (B) seeds. Sanguinarine (empty bars) and berberine (full bars) contents (C). Average of three repetition with standard deviation.

Mature seeds were dissected in cuticle, testa, tegmen and endosperm (Fig. 3.3.2A) and sanguinarine content was analysed (Fig. 3.3.2B). On dry weight basis, tegmen showed the highest contents (429  $\mu\text{g gDW}^{-1}$ ) followed by the testa (77.2  $\mu\text{g gDW}^{-1}$ ), and with the external

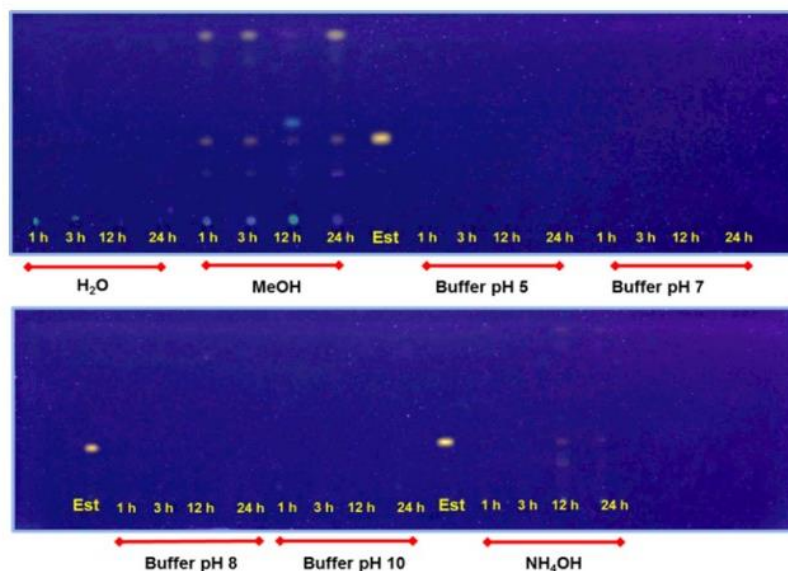
cuticle and endosperm presenting the lowest contents (32.3 and 24.2  $\mu\text{g gDW}^{-1}$ ; Fig. 3.3.2B).

Considering the registered weights, in this experiment sanguinarine content was estimated as 0.67  $\mu\text{g}$  per seed (563  $\mu\text{g}$  sanguinarine per g of seeds; 1.19 mg each seed). Since cuticle, tegmen and testa represent 5, 2.5 and 30% (0.06, 0.03 and 0.35 mg) of the individual seed weight, respectively, seed external layers (cuticle and episperma) contributed with over 65 % of the total sanguinarine contents (0.43  $\mu\text{g}$  per seed; adding values from each tissue, Fig. 3.3.2C) even when together represented less than 40% of the total mass.



**Figure 3.3.2.** Sanguinarine distribution in the different seed tissue components. **(A)** aspect of the external cuticle, testa, tegmen and endosperm (left to right) of mature seeds. Sanguinarine contents on dry weight basis **(B)** and per single seed **(C)**. Alkaloid per seed was estimated from the total contents of an 80 seed batch. Individual weight of seed tissues was estimated dissecting 80 units and dividing the total for that number. Values in **(B)** are average of triplicates (standard deviation was less than 15% in all cases).

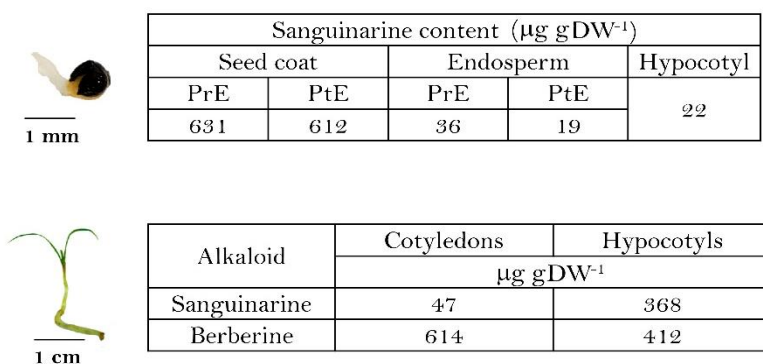
Sanguinarine displays antimicrobial properties (Rubio-Piña & Vázquez-Flota 2013) and its location in the external seed layers suggest a role in seedling protection during germination and establishment (Rubio-Piña & Vázquez-Flota 2013). Hence, seeds were incubated in different solvents to observe if they were either retained in the seed coat or released to the surroundings. Due to the differential solubility of alkaloids in acidic and alkaline media, buffer solutions were assayed as well as plain water, NH<sub>4</sub>OH and methanol (Fig. 3.3.3). Under the conditions, none of the aqueous solvents succeed in washing the alkaloid out suggesting a firm attachment to the matrix, or its reduced permeability to the coats.



**Figure 3.3.3.** Sanguinarine retrieved from seed wash outs with methanol (MeOH), and 100 mM phosphate buffer at pH 5 and 7 (upper panel), 8, 10, and NH<sub>4</sub>OH 10% (lower panel). 100 seeds were incubated with agitation in 50 mL of the solutions for the times indicated. **Est**, sanguinarine standard at *R<sub>f</sub>* 0.53 (benzene: ethanol 9:1). Limit of detection at 5 ng (Monforte-González *et al.* 2012).

Although these observations point to a possible sanguinarine role in the chemical defense of the actual seed structures, rather than to the soil adverse microflora during seedling unfolding,

liberation of sanguinarine has been observed from *Argemone* radicles tips during this process (Xool-Tamayo *et al.* 2017). Hence, alkaloid contents were analysed at the early stages of hypocotyl emergence (Fig. 3.3.4). Sanguinarine, was noticed in the hypocotyl, coinciding with a slight decrease in cotyledon contents whereas those of the complete coat remained in similar levels, indicating the possible mobilization from cotyledons to this newly formed organ (Fig. 3.3.4A). In totally unfolded seedlings (Fig. 3.3.4B), low sanguinarine levels was observed in the displayed cotyledons whereas radicles presented similar contents to those previously reported (ca. 0.8 mg gDW<sup>-1</sup>) (Xool-Tamayo *et al.* 2017). Interestingly, berberine was now detected in these organs (Xool-Tamayo *et al.* 2017). However, some released sanguinarine could be detected in radicle surrounding areas (Xool-Tamayo *et al.* 2017).



**Figure 3.3.4** Alkaloid contents during *A. mexicana* seed germination at the hypocotyl (A) and seedling (B) stages. **PrE** and **PtE**, prior- and post-hypocotyl emergence, respectively. Hypocotyls and seedlings were collected 12 and 18 days after planting. Average of triplicates, standard deviation was less than 15% in all cases.

## Discussion

During seed germination and hypocotyl emergence, cell division rely on the stored reserves rather

than on new biosynthetic processes (Harada 2001). Although in *A. mexicana*, an early alkaloid biosynthetic activity has been noticed (Xool-Tamayo *et al.* 2017), it occurred after cotyledon display (Xool-Tamayo *et al.* 2017), similarly, to has been observed in *Catharanthus roseus* for monoterpene indole alkaloids (Vazquez-Flota *et al.* 2000). Hence, stored alkaloids might play a role in protecting the newly formed organs until they acquire the biosynthetic capacity required. Therefore, sanguinarine mobilization to emergent hypocotyl from the endosperm, as suggested in results in Figs. 3.3.4A, could provide chemical defense to this organ whereas that remained in the seed coat would do it for cotyledons (Xool-Tamayo *et al.* 2017). Interestingly, once seed coats were detached and cotyledons displayed, newly formed berberine seems to take that role in them whereas radicles keep important amounts of both alkaloids. Sanguinarine has been suggested to have certain functions, allelopathic among them (Rubio-Piña & Vázquez-Flota 2013). In fact, it was detected around seedling radicles, supporting this interpretation (Fig 3.3.4B). However, since sanguinarine from the external seed covers was not released at the conditions assayed (Fig. 3.3.3), results in here reported about sanguinarine distribution in *A. mexicana* seeds, seem consisting with a protective role of the developing structure, rather than eliminating harmful soil microflora.

### **Acknowledgments**

This work was supported by the National Council of Science and Technology (CONACYT, México); grant CB-2016-0285887. LL-M and JILH are recipient of CONACYT scholarships for doctoral studies.

### **Conflict of interest**

All authors declare no conflict of interest.



## CAPITULO IV

## 4.1 DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En plantas de *A. mexicana* se han descrito que los sitios de acumulación de transcritos involucrados en la síntesis de alcaloides discrepan de los sitios de acumulación final de los alcaloides (Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b). Entre los posibles mecanismos que pudieran explicar está la existencia de un mecanismo de transporte a larga distancia. En otras especies productoras de alcaloides bencilisoquinolínicos, como *C. japonica*, *T. minus* y *E. californica* se describió la participación de transportadores tipo ABCB (Shitan *et al.* 2003; Nwanyichukwu 2014; Shitan *et al.* 2015). En *C. japonica* se han descrito tres transportadores; CjABCB1, CjABCB2 y CjABCB3 siendo los dos primeros encontrados en el rizoma de esta especie mientras que la última fue encontrada en suspensiones celulares. Los tres fueron relacionadas con la movilización de berberina (Shitan *et al.* 2003; 2013). En *T. minus* ocurren dos transportadores; TmABCB1 y TmABCB2 que, de igual manera, se relacionan con la movilización de berberina (Shitan *et al.* 2015). Finalmente, en *E. californica* el transportador EcABCB1 fue descrito en suspensiones celulares y está involucrado en la movilización de sanguinarina (Nwanyichukwu 2014). Por ello, se analizó en el transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* candidatos que compartieran similitudes con estos transportadores (Sección 3.1). Es importante mencionar que en este transcriptoma se han logrado identificar los transcritos correspondientes a diferentes enzimas de la ruta biosintética de los alcaloides berberina y sanguinarina (tales como TYDC, NCS, BBE, SOMT y CHESYN (descritos en la sección 1.3.2 y 1.3.2.1; Xool-Tamayo *et al.* 2017a; 2017b). Se encontraron 469 secuencias de entre 150 y 4785 pb, y con porcentajes de identidad entre ellas de 28 y 86%. De igual manera una búsqueda en diferentes bases de datos públicas permitió recuperar únicamente una secuencia adicional de 4012 pb de Phytometasyn que corresponde a suspensiones celulares de *A. mexicana*. El ordenamiento de estas 470 secuencias, junto con los transportadores de alcaloides ya caracterizados de *C. japonica*, *T. minus* y *E. californica*, así como los transportadores de auxinas de *A. thaliana* AtABCB19 y de *D. carota* DcABCB21, permitió la identificación de cuatro genes candidatos, denominados AmABCB1, AmABCB2, AmABCB3 y AmABCB4, en virtud de su agrupamiento en diferentes



clados. AmABCB1 y AmABCB4 mostraron la mayor cercanía a los transportadores CjABCB1/CjABCB2 y TmABCB1/TmABCB2 mientras que AmABCB2 y AmABCB3 mostraron una mayor cercanía con los transportadores de auxinas AtABCB19 y DcABCB21 (Sección 3.1). Dado que las secuencias de AmABCB1 y AmABCB2, incluían los marcos de lectura abierta completos y en ellos se encontraron los dominios característicos de los transportadores ABC (TMD y NBD; sección 3.1), se decidió continuar el trabajo de caracterización con ellos; incluyendo un modelaje *in silico*, análisis de expresión en diferentes tejidos y funcionales como transportadores (Secciones 3.1, 3.1.1, 3.2 y Anexo 3). AmABCB1 y AmABCB2 demostraron tener la conformación tridimensional típica de los transportadores ABCB, así como una predicción de su localización en la membrana plasmática (Secciones 3.2, Anexo 3). Una vez que se dispuso de la secuencia completa de AmABCB1 se logró determinar su actividad como un transportador de sanguinarina *in vitro* (Sección 3.2). Para ello, se aisló la secuencia completa a partir de semillas, en donde se observó la mayor expresión (Sección 3.1.1, Fig. 3.5) y se llevaron a cabo estudios de expresión heteróloga en levaduras encontrándose una actividad como importador de sanguinarina, así como de importador de berberina (Sección 3.2). No obstante, aún hay preguntas por resolver como los tejidos de la semilla en el que se expresa AmABCB1 y si únicamente moviliza al alcaloide sanguinarina, o si también es capaz de movilizar a otros existentes en este tejido. De hecho, es posible que exista la movilización de sanguinarina contenida en los cotiledones durante la germinación y emergencia del hipocótilo (Sección 3.3).

Por otra parte, aunque se logró obtener la secuencia completa de AmABCB2 y la construcción de un vector de expresión (Descrito en el Anexo 3), una mutación, introducida durante la construcción del vector, introdujo un codón de paro en Ser<sub>889</sub> lo que no permitió realizar la caracterización funcional. La reparación de este error por medio de mutagénesis puntual para restituir el residuo original permitirá detallar su actividad como transportador de auxinas y/o descartar su participación en la movilización de alcaloides (Descrito en el Anexo 3).

La expresión de las secuencias seleccionadas (AmABCB1, AmABCB2, AmABCB3 y AmABCB4) se analizó en plantas maduras. Tanto AmABCB1, AmABCB3 y AmABCB4 se detectaron preferentemente en cápsulas (Sección 3.1.1, Fig. 3.5) siendo este tejido donde se pudo obtener la secuencia completa para AmABCB1 y poder realizar su caracterización funcional, y en menor proporción en raíz (Sección 3.2). AmABCB2 fue observado principalmente en los pétalos y este tejido fue el órgano por el cual se pudo extraer la secuencia completa a partir de la elaboración

de ADNc (Descrito en el Anexo 3).

Es de suma importancia mencionar que se pudo observar una transición en la expresión de AmABCB1 siendo esta menor en las semillas inmaduras (que únicamente presentan berberina) y que va incrementando hacia las semillas maduras (que presentan sanguinarina y van desplazando a la berberina) (Sección 3.2 y 3.3).

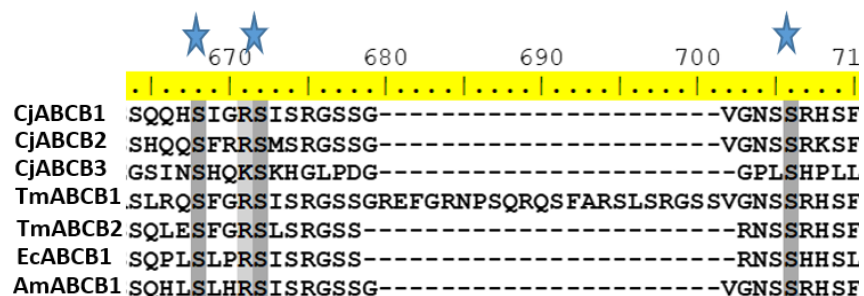
El presente trabajo pudo culminar con la obtención de AmABCB1 y determinar su actividad como importador de sanguinarina y exportador de berberina (Sección 3.2) sin embargo falta mucho por conocer y ahora que sabemos esta información se espera en un futuro próximo determinar en el contexto propio de la planta si esta actividad importadora y exportadora de sanguinarina/berberina respectivamente se mantiene, cambia o se reduce por lo que se propone realizar a través de ARNi (ARN de interferencia) o por VIGS (Virus Induced Gene Silencing). Cabe mencionar que aun atenuando o reduciendo la expresión de AmABCB1 hay que entender el contexto en el cual otro transportador similar pudiera suplir la función observada y por ende no demostrar ningún cambio en el fenotipo de la planta sin embargo esto no se sabrá hasta que se realice.

También sería interesante analizar el papel de algunos aminoácidos embebidos en la región linker de la secuencia de AmABCB1 (entre Gly<sub>626</sub> y Gln<sub>703</sub>) en el reconocimiento de los sustratos como fue reportado para el transportador AtABCB1 de *Arabidopsis thaliana* el cual bastó una simple sustitución en la Ser<sub>634</sub> para generar un cambio en la especificidad del reconocimiento para las auxinas (Henrichs *et al.* 2012). Es de interés mencionar que de las siete secuencias de los transportadores descritos a la fecha (CjABCB1, B2, B3; TmABCB1, B2; EcABCB1 y AmABCB1) en la región linker de todas estas proteínas se conservan tres serinas de manera contundente (Fig. 4.1) por lo que se espera analizar en un futuro próximo el papel que pudieran tener estas serinas en el reconocimiento de alcaloides.

Finalmente, sería interesante completar el aislamiento de otras secuencias con posible actividad de transporte de alcaloides y su papel en otros contextos. En ese sentido, recientemente se observó un aumento muy notorio en la acumulación de sanguinarina en hojas de plantas maduras de *Argemone* con síntomas de infección fúngica (comunicación de Hernández-Hernández y Hernández-Eleria). Puesto que, aunque no se ha confirmado una actividad biosintética para sanguinarina en condiciones normales en estos tejidos, es posible que un transporte de la

sanguinarina de las raíces pueda estar ocurriendo. Si bien AmABCB1 no se pudo detectar en hojas sanas de *A. mexicana*; sería importante analizar si el aumento en la síntesis y acumulación de sanguinarina en las hojas que presentaron síntomas debido a la infección por hongos desencadena una señal para la expresión de este transportador para poder determinar si AmABCB1 pudiera expresarse debido a una respuesta fisiológica de la planta.

Con toda la información obtenida en este proyecto de doctorado se espera que los datos que se generaron permitan comprender un poco más sobre la participación y el papel fundamental que pueden llevar a cabo las proteínas ABC en el transporte de metabolitos secundarios y en cierta medida que puedan ser empleados en la ingeniería metabólica para la producción de compuestos de interés farmacológico.



**Figura 4.1** Serinas conservadas de transportadores de alcaloides. Se muestra la localización de las serinas conservadas en las siete proteínas transportadoras de alcaloides siendo ellas CjABCB1, B2, B3; TmABCB1, B2; EcABCB1 y AmABCB1 las cuales podrían jugar un papel esencial en el reconocimiento de sus sustratos.

## 4.2 BIBLIOGRAFIA

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis, J, Raff M, Roberts K. & Walter, P (2005) Introducción a la biología celular. Editorial Médica Panamericana. Pp. 393

Azzaria M, Schurr E, Gros P (1989) Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Molecular and Cellular Biology* 8: 5289-5297.

Berg J (2007) Bioquímica. Editorial Reverte. Pp. 358-359.

Besseau S, Kellner F, Lanoue A, Thamm A, Salim V, Schneider B, Geu-Flores F, Hofer R, Guirimand G, Guihur A (2013) A pair of tabersonine 16-hydroxylases initiates the synthesis of vindoline in an organ-dependent manner in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* 163: 1792-1803.

Brahmachari G, Gorai D, Roy R (2013) *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 23: 559-575.

Carrillo-Pech M. (2006). Regulación de la síntesis de los alcaloides en cultivos *in vitro* de *Argemone mexicana*. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.

Cresson R, Schneider E (1988) Ovule and seed structure in *Argemone aurantica* (Papaveraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 115: 108-112.

CONABIO: Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. Gobierno Federal de la Republica de México (En línea) Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone-mexicana/fichas/ficha.htm#1> . (Acceso 27 marzo 2017).

Decottignies A, Grant A, Nichols W, de Wet H, McIntosh D, Goffeau A (1998) ATPase and multidrug transport activities of the overexpressed yeast ABC protein Yor1p. *Journal of biological chemistry* 273: 12612-12622.

Devlin T (2004) Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas. Editorial Reverte. Pp. 525-526.

Dhaliwal A, Mohan A, Gill K (2014) Comparative analysis of ABCB1 reveals novel structural and

functional conservation between monocots and dicots. *Frontiers in plant science* 5: 657.

Diaz-Chavez L, Rolf M, Gesell A, Kutchan T (2011) Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Archives of biochemistry and biophysics* 507: 186-193.

Do THT, Martinoia E, Lee Y (2018) Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* 41: 32-38.

Facchini P, De Luca V (2008) Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants. *The plant journal* 54: 763-784.

Farrow S, Hagel J, Facchini P (2012) Transcript and metabolite profiling in cell cultures of 18 plant species that produce benzylisoquinoline alkaloids. *Phytochemistry* 77: 79-88.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

FNA: Flora of North America. United States of America (En línea) Disponible en: [http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora\\_id=1&taxon\\_id=200009118](http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=200009118). (Acceso 27 marzo 2017).

Gardy J, Spencer C, Wang K, Ester M, Tusnády, G, Simon I, Brinkman F (2003) PSORT-B: Improving protein subcellular localization prediction for Gram-negative bacteria. *Nucleic acids research* 31: 3613-3617.

Gesell A, Díaz-Chavez M, Kramell R, Piotrowski M, Macheroux P & Kutchan T. (2011) Heterologous expression of two FAD-dependent oxidases with (S)-tetrahydroprotoberberine oxidase activity from *Argemone mexicana* and *Berberis wilsoniae* in insect cells. *Planta* 233: 1185-1197.

Gobato R, Gobato A, Fedrigo D (2015) Allocryptopine, berberine, chelerythrine, copsitine, dihydrosanguinarine, protopine and sanguinarine. Molecular geometry of the main alkaloids found in the seeds of *Argemone mexicana*. *Parana journal of science and education* 1: 7-16.

Goodman S (2008) *Medical Cell Biology*. Elsevier. University of Texas. Pp. 32.

Guízar-González C, Monforte-González M, Vazquez-Flota F (2016) Yeast extract induction of sanguinarine biosynthesis is partially dependent on the octadecanoic acid pathway in cell cultures of *Argemone mexicana* L., the Mexican poppy. *Biotechnology Letters* 38: 1237-1242.

Guízar-González C, Trujillo-Villanueva K, Monforte-Gonzalez M, Vazquez-Flota F (2012) Sanguinarine and Dihydrosanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* (L) Cell suspension cultures exposed to yeast extract. *Journal of the Mexican Chemical Society* 56: 19-22.

Hagel J, Beaudoin G, Fossati E, Martin V, Facchini P (2012) Characterization of a flavoprotein oxidase from opium poppy catalyzing the final steps in sanguinarine and papaverine biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* 51: 42972-42983.

Hagel J, Facchini P (2013) Benzyloquinoline alkaloid metabolism: A century of Discovery and a brave new world. *Plant & Cell Physiology* 54: 647-672.

Hagel J, Morris J, Lee E, Desgagné I, Bross C, Chang L, Chen X, Farrow S, Zhang Y, Soh J, Sensen C, Facchini P (2015) Transcriptome analysis of 20 taxonomically related benzyloquinoline alkaloid-producing plants. *BMC Plant Biology* 15: 227.

Harada J (2001) Role of Arabidopsis Leafy Cotyledon genes in seed development. *Journal of Plant Physiology* 158: 405-409.

Hartmann T (2004) Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. *Planta* 219: 1-4.

Heber D (1873) *The useful plants of India: with notices of their chief value in commerce, medicine, and the arts.* London: Allen 16: 512.

Henrichs S, Wang B, Fukao Y, Zhu J, Charrier L, Bailly A, Oehring S, Linnert M, Weiwad M, Endler A, Nanni P, Pollmann S, Mancuso S, Schulz A, Geisler M (2012) Regulation of ABCB1/PGP-1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *The EMBO journal* 31: 13.

Higgins C, Linton K (2004) The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 11: 918-926.

Hildreth S, Gehman E, Yang H, Lu R, Ritesh K, Harich K, Yu S, Lin J, Sandoe J, Okumoto S,

Murphy A, Jelesko J (2011) Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 18179-18184.

Iorizzo M, Ellison S, Senalik D *et al.* (2016) A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature genetics* 48: 657-666.

Koshiro Y, Zheng X, Wang M *et al.* (2006) Changes in content and biosynthetic activity of caffeine and trigonelline during growth and ripening of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *Plant Science* 171: 242-250.

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer E (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology* 305: 567-580.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGAX: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.

Laines I. (2019) Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L. Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY). México, Pp. 65.

Latorre R, López J, Bezanilla F, Llinas R (1996) *Biofísica y fisiología celular*. Editorial Grafivalme. Pp. 10-25.

Lefevre F, Boutry M (2018) Towards Identification of the substrates of ATP-Binding Cassette Transporters. *Plant Physiology* 178: 18-39.

Liscombe D, Macleod B, Loukanina N, Nandi O, Facchini P (2005) Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry* 66: 1374-1393.

Liscombe D, Facchini P (2008) Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* 19: 173-180.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M, Scott M, Zipursky L, Darnell J (2005) *Editorial Médica Panamericana*. Pp. 158.

## CAPÍTULO IV

Loza-Muller L, Trujillo-Villanueva K, Vázquez-Flota F (2019) Book of abstracts XVIII National Plant Biochemistry and Molecular Biology Congress 163: 226.

Lv P, Chen Y, Shi T, Wu X, Li Q, Hua R (2018) Synthesis and Fungicidal Activities of Sanguinarine Derivatives. *Pesticide Biochemistry Physiology* 147: 3-10.

Miraldi E, Masti A, Ferri S, Comparini B (2001) Distribution of hyoscyamine and scopolamine in *Datura stramonium*. *Fitoterapia* 72: 644-648.

Monforte-González M, Guízar-González C, Rubio-Piña J, Carrillo-Pech M, Vázquez-Flota F (2012) Berberine and Sanguinarine Quantitation in *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae) Tissues by TLC-In Situ Fluorography. *Journal of Planar Chromatography* 25: 358-360.

Muller W (2004) *Bioquímica: Fundamentos para medicina y ciencias de la vida*. Editorial Reverte, Pp. 368-370.

Noh B, Murphy A, Spalding E (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell* 1311: 2441-2454.

Nwanyichukwu P (2014) Identification and characterization of an adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporter EcABCB1 involved in the transport of alkaloids in *Eschscholzia californica*. Dissertation, University of Calgary.

Ofori PA, Geisler M, di Donato M, Pengchao H, Otagaki S, Matsumoto S, Shiratake K (2018) Tomato ATP-binding cassette transporter SIABCB4 is involved in auxin transport in the developing fruit. *Plants* 7: 65.

Otani M, Shitan N, Sakai K, Martinoia E, Sato F, Yazaki K (2005) Characterization of vacuolar transport of the endogenous alkaloid berberine in *Coptis japonica*. *Plant Physiology* 138: 1939-1946.

Rentsch D, Laloï M, Rouhara I, Schmelzer E, Delrot S, Frommer W (1995) NTRI encodes a high affinity oligopeptide transporter in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 370: 264-268.

Roberts M, Wink M (1998) *Introduction Alkaloids: Biochemistry, Ecology and Medicinal Applications*. Plennun Press, New York, Pp. 1-7.



Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-Tasser: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols* 5: 725-738.

Rubio J (2009) Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis de doctorado. Doctorado en ciencias y biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida Yucatán, México. Pp. 51.

Rubio-Piña J, Vázquez-Flota F (2013) Pharmaceutical applications of the Benzylisoquinoline alkaloids from *Argemone mexicana*. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 17: 2200-2207.

Sakai K, Shitan N, Sato F, Ueda K, Yazaki K (2002) Characterization of berberine transport into *Coptis japonica* cells and the involvement of ABC protein. *Journal of Experimental Botany* 53: 1879-1886.

Sadava D, Purves W (2009) *Vida: La ciencia de la biología*. 8va edición. Editorial Médica Panamericana. Pp. 84.

Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Shoji T, Inai K, Yazaki Y, Sato Y, Takase H, Shitan N, Yazaki K, Goto Y, Toyooka K, Matsuoka K & Hashimoto T (2009) Multidrug and Toxic compound Extrusion-Type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology* 149: 708-718.

Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 751-756.

Shitan N, Dalmas F, Dan K, Kato N, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2013) Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry* 91: 109-116.

Shitan N, Kato K, Shoji T (2014) Alkaloid transporters in plants. *Plant Biotechnology* 31: 453-463.

Shitan N, Terasaka K, Yamamoto H, Sato F, Yazaki K (2015) Two B-type ATP-binding cassette

(ABC) transporters localize to the plasma membrane in *Thalictrum minus*. Plant Biotechnology Journal 32: 243-247.

Silverthorn D, Johnson B (2008) Fisiología humana: un enfoque integrado. Editorial Médica Panamericana. Pp. 136-139.

Singh S, Singh T (2010) Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*. Pharmaceutical Biology. 48: 158-160.

St-Pierre B, De Luca V (1995) A cytochrome P-450 monooxygenase catalyzes the first step in the conversion of tabersonine to vindoline in *Catharanthus roseus*. Plant Physiology 109: 131-139.

Takanashi K, Yamada Y, Sasaki T, Yamamoto Y, Sato F, Yazaki K (2017) A multidrug and toxic compound extrusion transporter mediates berberine accumulation into vacuoles in *Coptis japonica*. Phytochemistry 138: 76-82.

Titapiwatanakun B, Murphy A (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. Journal of Experimental Botany 60: 1093-107.

Trujillo-Villanueva K, Rubio-Piña J, Monforte-González M, Vazquez-Flota F (2010) *Fusarium oxysporum* homogenates and jasmonate induce limited sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. Biotechnology Letters 32: 1005-1009.

Trujillo-Villanueva K, Rubio-Piña J, Monforte Gonzalez M, Ramirez-Benítez E, Vazquez-Flota F (2012) The sequential exposure to jasmonate, salicylic acid and yeast extract promotes sanguinarine accumulation in *Argemone mexicana* cell cultures. Biotechnology Letters 34: 379-385.

USDA: United States Department of Agriculture (Natural Resources Conservation Service. United States of America (En línea) Disponible en: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=ARME4> . (Acceso 27 marzo 2017).

Uzuegbu P (2014) Identification and characterization of an adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporter *EcABCB1* involved in the transport of alkaloids in *Eschscholzia*

*californica*. Master Thesis. University of Calgary.

Vázquez-Flota F, St-Pierre B, De Luca V (2000) Light activation of vindoline biosynthesis does not require cytomorphogenesis in *Catharanthus roseus* seedlings. *Phytochemistry* 55: 531-536

Vazquez-Flota F, Loyola-Vargas V (2003) *In vitro* plant cell culture as the basis for the development of a research institute in Mexico: Centro de Investigación Científica de Yucatán. *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 39: 250-258.

Vazquez-Flota F, Rubio-Piña J, Xool-Tamayo J, Vergara-Olivares M, Tamayo-Ordoñez Y, Monforte-Gonzalez M, Guizar-Gonzalez C, Mirón-López G (2018) Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista fitotecnia* 41: 13-21.

Verrier PJ, Bird D, Burla B *et al.* (2008) Plant ABC proteins-a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science* 13: 151-159.

Voet D, Voet J, Pratt C (2007) *Fundamentos de Bioquímica*. 2da edición. Editorial Médica Panamericana. Pp. 259.

Weid M, Ziegler J, Kutchan T (2004) The roles of latex and the vascular bundle in morphine biosynthesis in the opium poppy, *Papaver somniferum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 13957-13962.

Weiss D, Baumert A, Vogel M, Roos W (2006) Sanguinarine reductase, a key enzyme of benzophenanthridine detoxification. *Plant, Cell & Environment* 29: 291-302.

Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E, Barber C, Chakrabarty R, MacNevin G (2013) Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *Journal of biotechnology* 3: 122-134.

Xool J (2016) Estudio de la relación entre la acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes tejidos de *Argemone mexicana* y sus patrones transcripcionales. Universidad Autónoma de Yucatán (UADY) & Centro de Investigación de Yucatán (CICY). Tesis Doctoral. Pp. 87.

Xool J, Monforte M, Rubio J, Mirón G, Vázquez-Flota F (2016) Early development onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana*) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters* 20: 300-305.

Xool J, Serrano G, Monforte M, Mirón G, Vázquez-Flota F (2016) Development of newly sanguinarine biosynthetic capacity in *in vitro* shoots of *Argemone mexicana* L. Mexican prickly poppy. *Biotechnology Letters* 39: 323-330.

Xool-Tamayo J, Graniel-Sabidoa M, Mirón-López G, Mena-Rejóna G, Monforte-González M, Vázquez-Flota F (2017a) HPLC-DAD determination of berberine, chelerythrine and sanguinarine in the mexican prickly poppy (*Argemone mexicana* L. Papaveraceae), a medicinal plant. *Quimica Nova* 00: 1-6.

Xool-Tamayo J, Monforte-González M, Rubio-Piña J, Mirón-López G, Vázquez-Flota F (2017b) Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters* 20: 300-305.

Yamada Y, Koyama T, Sato F (2011) Basic helix-loop-helix transcription factors and regulation of alkaloid biosynthesis. *Plant signaling & behavior* 11: 1627-1630.

Yamada Y, Yoshimoto T, Yoshida S, Sato F (2016) Characterization of the Promoter Region of Biosynthetic Enzyme Genes Involved in Berberine Biosynthesis in *Coptis japonica*. *Frontiers in plant science* 7: 1352.

Yang Y, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y (2015) The I-Tasser Suite: Protein structure and function prediction. *Nature Methods* 12: 7-8.

Yazaki K, Shitan N, Takamatsu H, Ueda K, Sato F (2001) A novel *Coptis japonica* multidrug-resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *Journal of Experimental Botany* 357: 877-879.

Yu F, De Luca V (2013) ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 15830-15835.

Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BioMed Central* 9: 40.

## CAPÍTULO IV

Zuckerlandl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. Academic Press, New York. 97-166.

Ziegler J, Facchini P (2008) Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and trafficking. Annual Review of Plant Biology 59: 735-769.

Zou K, Li Z, Zhang Y, Zhang H, Li B, Zhu W, Shi J, Jia Q, Li Y (2017) Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. Acta Pharmacologica Sinica 38: 157–167.

## ANEXOS

## ANEXO 1 SECUENCIAS EN NUCLEÓTIDOS Y AMINOÁCIDOS DE LOS TRANSPORTADORES AMABCB1, B2, B3 Y B4

Secuencias de los transportadores AmABCB1, B2, B3 y B4 en nucleótidos/aminoácidos. Las secuencias de AmABCB1 y AmABCB2 demostraron tener la inclusión completa de la estructura típica de transportadores ABCB tales como los dominios TMD y NBD (Do *et al.* 2018) mientras que AmABCB3 y AmABCB4 correspondían a secuencias incompletas que incluían parte del dominio TMD1. Regiones TMD (turquesa), Walker A (fucsia), Q-Loop (azul marino), firma ABC (violeta), Walker B (verde azulado), D-loop (Oлива) and H-loop (rojo oscuro).

### >AmABCB1\_nucleotide (Accesión: MW936653) Longitud 3861 pb y aislado de semillas maduras

```

ATGATAGGGATGGGGATAAAAACTTGGAAAGGAATAAAAAATGGTAAGCAAAATGATCAAGAGAAGAGCAAAACAGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGAAGAAGAAACCCCTT
AACACTACTACTAAGACTGTTCCATTTTACAAGCTATTCGCCTTGGCCGATTCCAAAGATGTCATGCTGATGATTATGGCTCGATTGCTGCTGTTGGCAATGGTTGGCCATG
CCCCTAATGACTGTTCTCCTCGGAGATTAATTGATTCTTTGGTGATTACAGACACCAAAAATACGGTTCGTGTAGTTTCCAAGGTAGCATTGAAATTTGTGACTTGGGTATC
GGGTCGGGCGTGGCATCGTCTTCCAGGTCGCTTGTGGATGGTTACGGGGGAGAGACAGGCTGCAAGAATCAGGAGTTTACTTGAAAATATACTGAGGCAAGATGTT
GCTTCTTTGATAAGGAAACAAAATACGGGGCGAAGTGTGGAAAGGATGTCGGGTGATAGTCTTAATCAAGATGCTATGGGAGAGAAGGTAGGCAAGTTTATACAGCTAAT
TTCAACATTCATAGGAGGCTTGTGATTGCATTCATCATGGGATGGCTTCTGACCCTTGTGATGTTAACCTCCATCCACCTCTGTGATTTCCGGTGGCCGCTATGCTATTGT
TATAGCCAAGATGGCATCTCGTGACAAGCTGCTTACTCAGTAGCAGGGAATATCGTAGAACAGACGATCGGATCAATCAGAACAGTTGCATCATTACAGGGGAGAAAACAA
GCAATATCTAATTATAACAAATCTATTACAAAAGCGTATAAATCTGGTGTTCAGGAGGGATTGGCCACCGGGTTAGGCCTTGGCCGAGTTATGTTTGCATATTCGCTAGTTAT
GCTTTGGCTGTATGGTATGGTGGGAAAATGATAGTCGAGAAAAGGCTATACAGGCGGAGATGATGTTAACGTAATCATTGCTGTTTTGACTGGTTCCATGCTCTAGGTCAG
CATCTCCATGCTTTAGTGCAATTTGCTGCTGGACAAGCTGCGGCATTCAAGATGTTGAGACAATAAATAGGAAGCCAGATATAGATGCTTATGACCCAAATGGACGTAAGCTG
GATGATATTCGTGGAGATATCGAGTTGAGGGATGTTCAATTTAGTTACCTCGTAGACCAGACGACAAATATTTAGTGGGTTTTCTCTCCATAGGGAGTGGCACTACTGC
AGCTTTAGTTGGACAGAGTGGAAAGTGGCAAGTCAACAAGTGATCAGTCTCATAGAGAGGTTCTATGACCCACAAGCCGGTGAAGTTCTCATAGATGGCATAAATCTGAAGGAG
TTTCAGCTGAAATGGATCAGAGAGAAAATTTGGTCTTGTCCAGGATTCATAGATAAATCCCAAGGTTAGATACCTTGGTTGGTGAACATGGAACACAGATGTGTCAGGGGACA
AGAAATCAGAGCTGGCATCTGCAAAATGCTGCAAAATCATAGATAAATCCCAAGGTTAGATACCTTGGTTGGTGAACATGGAACACAGATGTGTCAGGGGACA
AAGCAGAGAATTGCCATTAGCTAGAGCTATTTTAAAAGACCCACGAATTCCTGCTCTAGATGAAGCTACTAGTGCATTGATGCTGAGTCTGAGCGGATTTGCAAGAAGCT
CTGGATAGAGTCATGGTTAACCGAACTACAGTCATTGTTCCCATCGCTTAAAGCACAGTCAGAAAACCGCGATATGATAGCCGTCATTATAGAGGAAAATTTGTAAGAAAG
GTTACACACAGGAGCTCTCGCAGGATGATGATGGACCATTGCCAGCTTATACGCCCTACAAGAAATAAACAAAGGGTCAAAATCACCAAGTTGATCAAGAAAACAAGAAAT
TCAATGGAGCTGGCAGGCAATCAAGCCAACACTGTCCCTTCATCGGTCAATAAGTCGTGATCTTCTGGGGTTGAAAACAGCAGTCGTCACCTATTCTCCGTCTCATTGG
GTGATCCTACAGGACTCAACATACAAGAACTGTCCCAACAGATGTTCAATCTCTCCACCTCCACCTTTGGAGGAAGCACAAAGAAATTTCCACTACGTCGCCTTGCAATTTCT
AACAAACCCGAGATCCCTGTTCTACTACTTGGTGTATAGTGCATGTTGTTCAATGGTCAATGGAGTGCATATTTCCCAATGTTGGTATACTATTTCTGGTATGATCAAAACATTCTATGAG
CCACCTGCGAAGCTTAAGAAGGATCTCGGTTTTGGTCTTGATATTTCTCTCTTCCCGGATATCATTTTTGATCCTCCAGCAAGAACATAATTTATTTGCTGTTGCCGGG
AATAGGTTAATCAAAGAATCCGATTATTGTGCTTTGAGAAGGTGGTTCACATGGAAGTAGGTTGGTTTTGATGAGCCTGGGCACTCGAGCGGTCAATAGGTGCAAGGCTCT
CAGCGGATGAGCAGCTGTTTGAAGCCTGGTCCGGGATGCACITGCGCTGCTTGTTCAGAAATTTGGCAACAGCAATATCTGGTCTAGTTATTTCAATTTACAGCAAGCTGGCA
ATTGGCTCTCATAATCTTGTGTTGCTACCTCTAGTAGGACTTAATGGATGGGTACAATGAAGTTCATGCAAGGTTTCAGTGCAGATGCAAGATGATGATGAGGAAGCAA
GTCAAGTTGCTAACGACGCTGTCCGAAGTATAAGGACAGTTGCTTCTTTTGTGCTGAAGAGAAGGTAATGAGTTTGTACAAAAGAAATGTGAAGTCCAGTTTCAGCAGG
GATAAGGCTCGGAGTGATTAGTGGGTTGGTTTTGGGCTTCCCTCTCTTTGTTTTCGGTGTACGCAACCAGTTTCTATGCTGGAGCTCGACTTGTGGAGTCCAGAAAAG
ATAACATTCGCTGATGTTTTCTGTTTCTTGTCTCTACAATGACTGCAATTTGGGATTTCTCAGTCAAGCTCCCTTGCAACCAGATCAAGTAAAGCAAAGACTTCAACTGCT
TCAATTTTGCACCTTCTGACCGACAATCAAAGATAGATGCAAGCGATGAGTCAGGATTGACATTAGAAAATGTGAAAGGAGACATTGAGTTTCGACACATCAGTTTTAAGTAC
CAAAACAGACCTGACGTTGAGATTTTCCGAGACCTTTGTTTGAATTCGTTCTGCAAGACTGTAGCTCTGGTAAGGAAAAGTGGGAGTGGGAAATCGACTGTGGTATCGT
TGTGCAAAAGATTCTATGACCCTGATTCTGGTACATAACGTTAGATGGAACGAAATTAAGAAGTCCCAATGAAAGTGGCTGAGACAACAAATGGGTTCTAGTTGGCAAGA
CCAGTGTGTTAATGACACAATCCGAGCCAACTCGCTTACGGAAGAAAGGAGATGCAACTGAGGAGAGATTTTGAAGCAGCAGAGTTGGCAATGCGCACAAATTCAT
TTAGTGCCTGCAACAGGATATGACACAATAGTAGGAGAAAGAGGAATACAAATATCAGGTTGGGCAAGCAAGGAGGTTGATGCAAGAGCAATAGTAAAAGCTCCAAA
GATTTTATTGTTAGATGAGGCGACAAGCGCGTTAGAGGCTGAATCTGAAAGAGTAGTTCAAGACGCATTGGACAGGGTTCATGGTTCAAAGAACCCAGTTGATGATGACACA
AGGTTATCAACAATCAAGAATGCAGATGTAATAGCCGATGTTAAAACCGTGAATCGCAGAGAAAAGGAAAACATGATGAATTAATGAACATTCAGGATGGAGTTTATGCTTC

```

TCTAGTAGCTCTTCACATGAGTTCAACTTAG

### >AmABC B1\_protein (Accesión: MW936653) Longitud 1286 AA

MIGMGDKNLERKNKGNQDQEKSKQGGGGGEEELNNTTKTVPFYKLFADSKDVMLMIGSIAVGNGLAMPLMTVLLGLDIDSGDSTKNTVRVVSKVLFVYLGIGSG  
VASFQVACWMMVTERQAARIRSLYLKTLRQDVAFDKEKNTGEVVRMSGDTVLIQDAMGEKVGKFIQLISTFIGGFVIAFIMGWLLTLVMLTSIPPLVISGAAMSIVIAKMASRGQA  
AYSVAGNIVEQTIGSIRTVASFTGEKQAINYNKSIKAYKSGVQEGELTGLGLGAVMFVIFASYALAVWYGGKMIKVEKGYTGDDVVNVIIAVLGSMSLQSQSPCSAFAAAGQA  
AFKMFETINRKPDIADYDPNGRKLDDIRGDIELRDVHFSYPARPDEQIFSGFSLSIGSGTTAALVCSGSGSKSTVISLIERFYDPAQAGEVLIDGINKLKEFLKWIREKIGLVKQVPLFASSIKE  
NIAYGKDGATIEEIRAANAELANAAKFIDKLPQGLDTLVEHGTQMSGGCKQRIARAIARKDPRILLDEATSALEAESERIVQEALDRVMVNRTTIVVLRHSTVRNADMIIVHRGKIVE  
KGSHTLELQDDDGYPQQLIRLQEKINSGNHQVDQEKEIMESGRQSSQLSLHRSISRSGSSVGNSSRHSFSVSVFGVPTGLNIQETVPTDQVSLPPPLEEAQEVLPLRRLAVLNK  
PEIPVLLLGVIAAMVNGVIFPMFGLIFSGMIKTFYEPKAKLKDSEWLSLIFLLAGISFFASPARYLFAVAGNRIKIRLLCFEKVVHMEVGFDEPHSSGAIGARLSADAARVSL  
VGDALALLVQNLATAISGLVISFTASWQALILVLLPLVGLNGWVQMKFMQGFSAADAKMMYEEASQVANDAVGSIRTVASFCAEEKVMSLYKKKCEGPVVSAGIRLGVISGVGFLSF  
FLFSVYATSFYAGARLVERSKITFADVFRVFFALTMTAIGISQSSSLAPDSKAKTSTASIFALLDRQSKIDASDESGLTENVKGDIEFRHISFKYQTRPDVQIFRDLCLTIRSGKTVAL  
VGEISGSGKSTVSSLQRFYDPDSSHITLDGTEIKKFLKWLRRQMGVLKQKQVPLFNDTIRANIAYGKKGDATEAEILEAELANAHKFIASLQGGYDTIVGERGIIKQQRVAIA  
RAIVKAPKILLDEATSALEAESERIVQDALDRVMVQRTTIVVLRHSTIKNADVIAVVKNGVIAEKGHDELMIQDGVYASLVALHMSST

### >AmABC B2\_nucleotide (Accesión:MW962272) Longitud 4458 pb y aislado de pétalos

CTTGTTTGACCAGAACTCCATTACTTCTCTCTCTAAAAACACAGTGAAGCTCAAGAGTTGAAGACGAAGTAAAACTCGTCTTGATTGATAACCGAACCGACATTGTTG  
TCAGTTTCTCTGAG

ATGAAGGATAAAATAATTAAGATAAAGCTTTGAGATCAGCTCTAATGGCGGAAAAAGCCAGAGCACTAAACCAGTGACTCTATTATGCGGAAGAGAAGAGATCTTTTCATT  
TCTTACCTTTAAATCTCTTATGAGGCAGTTGTTAACTTACACATTATCAAGCACAGCAATTACATACATTCTTCCGATCTGTTTCACCTTCTCTCTCTAGAAAGTTGAAACTTCTG  
ATTTCTAGCTTTTAAAGAGTGAAAGGAACAGTTGAAGTAGTAAAGAACTTGGTTATCGGAATCAATGGCGGAAACAATAGAATCCGCCAAAAGTTCTATACCTGATGCAGATAA  
GAAAAAGGAACAACACTTCTCTTTTATAAACTTTTCTCTTTTGCAGACAAGTATGATGTTTTTGTGATGACCATGGAACCTTAGGAGCTATTGTTTATGTTTCAGCTATGCCT  
GTTTTCTCTCTTTTGTGGACAAATGGTAAATGGATTTGGAAAAACCAGAACGATTTGAATAAGTAACTGGAGAAGTTTCAAAGTACGCTTTGATTTCTCTACTTCCGAT  
TCATTGTTGTATGCTCTCTACGCTGAGATTGCTTTGGATGTACACTGGAGAGACAAAGTACATTGAGAAAGAAGTATTTGGAATCAGTTTGAACAAAGATGTTG  
GGTTCTTTGATACAGACGCTAGAAGTGGAGATATAGTTTTCAAGTGTCTACTGACACTCTTCTTGTCCAAAGATGCCATCAGCGAGAAGGTGGGGAACCTTCACTACTCTTT  
CAACTTTTGTGGCGGTTTGTGTGGGTTTCACTTTCGCGTGGAACTTGCAGTCTGATGTTGCTGTGATCCGGGGATGCTTTTGTGGTGGTTTATATGCCTACACT  
CTCACAGGCTCACCTCAAGAGTCGAGAATCCTATGCAAAATGCTGGTAAATTCGAGAGCAGGCCATTGCACAAGTCAGGACAGTATACTCGTATGTGGGAGAGTGCAAG  
GCCCTAAATCATACTCCGATCGATACAAAACAGCTTGAAGCTTGATACAAGGCAGCAATGGCAAAGGCCCTTGGAAATGGATGTACATTTGGTATCGCATGCATGTCTT  
GGCCCTAGTTTTCTGGTATGCTGGAGTTTTTATCAGAAAATGGTGCAGACAGACGGGGCAAGGCCCTTCACAGCAATTTTTTCAGCCATTGTTGGTGGCATGAGCTTGGGGCA  
GTCATTTTAAATCTGGGGCATTAGCAAAGTAAAGCGGCAGGATACAAGCTAATGGAGGTTATCAACCAAAAACCCACTATAGTGGAGACCTCAGATGGAAAAGTGTT  
TGGAAAGGTTAATGAAATATTGATTTTAAAGACGTGACCTTCAAGCTACCCCTCAAGGCCAGCAGCATCATCTTCCGAGATTTCCTCAATTTCTCCAGCAAGAAAACA  
GTTGCTGTGGTTGGAGGTAGTGCTCCGAAAAGAGCACTGTTGTCTCTAATAGAAGGTTCTACGATCCTAATCAAGGGCAAGTCTTGATGGACCAATGGGATATAAAAA  
CCCTTCAATTGAAATGGCTAAGGAATCAGATTGGTTTTGGTGAACAGGAACCGACTCTCTTGAACCCACTACTAGAAAACATGCTCTATGGGAAACCTAATGCTACAATT  
GAAGAAGTAGAAGCTGCCACATCTGCTGCCAATGCACATAGCTTCATTTCTGCTTCCCAATGGATATAATACACAAGTGGGAGAACAGGCTCCAACCTTCTGGTGGTC  
AGAAACAGAGAATTGCCATTGCTAGAGCCATGTTGAAGGACCAAGAAATTTCTCTCTGATAGGGCTACTAGTCTCTAGATGCTGGCTCCGAGAGCATTGTTCAAGAGGC  
TCTAGACCGTCTTATGGTTGGAAGAACCAACTTGTGTTGCACATCGTCTCAACCTATAAGAAATGTTGACAGTATCGCAGTTCTCCAGCAAGGCCAAGTGTGAGACTG  
GTACGCATGAAGAATTTTCAAAGTCCGGAGCCTATGCATCCCTCATCCGCTTTTCAGGAGATGGTGGAGAAACCCAGAGCCTTCCGGCAACCGTTACCGCTCTCACGCT  
TAGCAATTTCTGTCTACCAAGCTTTAAGCCTCCGGTCCGGTACGTTAAGGAACCTGAGCTATCAGTACAGCACTGGAGCTGATGGACGGTTAGAGATGATCTCTAATGCT  
GACAATAATCGTAACTGTGAGCACCAAGGGGTTACTTCTCCGGCTTCTTAAGCTGAATGCACCTGAGTGGCCATATTAATCATGGGAGCAGTTGGATCTGCTGCTGCAG  
GTTTTCATAGGTTCAACCTTTGCCATTGTGATGAGTAAATATGATCGATGATTTCTATTAACAAGATCTTGTCTACTATGGAGAGGAAGACAAGGAGTTTGTGTTTATATATG  
GAACCGGCTTTATGCTGTGGTGGCTTATCTTACACAACATTTCTTCTCAGTATCATGGGAGAGAATCTCACAACTAGAGTGAAGGAGGATGATGCTTGCAGCTATATTGAGG  
AATGAAGTTGGGTGGTTCGACGAAGAGGAAAATAATTCAAGTCTCGTTGCAGCTCGTCTTGCACAGATGCTGTTGATGTGAATCTGCCATTGCTGAAAGGATCTCAGTGA  
TTCTACAAAATAGACGCTACTTCTTACATCATTTATAGTAGCTTTCATAATCGAATGGAGGGTCTCACTACTATTCTAGCTACTTTCCCTCTTCTTGTCTTGCATTTTCT  
CAGCAACTATCTCTAAAAGGGTTTGTGGAGACCCGGAAGGCACATGCAAGACGAGCATGATTGCAAGGGGAAGTTGTGAGCAACATCCGAACCGTAGCTGCCTCAAT  
GCACAAGACAAGATCCTCTACTCTTTGTACAGAACTTGCATTCACAAAATCAAGCCTACGTCGAAGCCAATTTGCAGGATCCCTCTATGGCTTTTCCCAACTTGCACCT  
TACGTATCAGAAGCCGCTAAATTTATGGTATGGTTCCACCTAGTGAGTCAAGGTGCATCAACTTTCTCAGGGTCATCAAAGCATTCGTTGTCTTGAATTAAGTCAAGTCA  
GTTGCAGAGACTGTGAGCCTGCTCTGAGATTATCGTGGTGGAGAAGCTATTAGCTCCGCTCTCTCTATCCCTGACCGATCAACCAAAATCGAATGGATGCTTATGAGG  
GTGAACAAGTAGAAACCTCGTGGTGTATTGAGCTTGCACACATTGACTTGGCTACCCATCAAGACCTGAACAAATAATCTTAAAGGATCTTAACTTAGAATCGTGTCTG  
GCCAGAGTGTAGCTCTTGGTGTGAAGTGGGCTGTGTAAGTCCGTTGATGCTTGGCTGCAAAAGTTCTGATGGGAAAAGA  
TATTCCAGCTTAAACCTTAAATGCTCTGACTTAAGATCGGATGTTGACAACAAGAACGACATTTTGACGCTAGCATTTTCCAAAATATGCATATGCAAAAGACGGTGC  
AACAGAAGCAGAAAGTCATCGAGGCAGCTCGTGACGTAATGTTTATGGATTTGTGAGTGGATTACCAGAAGGATATAAGACTCCTGTAGGGGAGAGGAGTACAACATC  
AGGTGGACAAAACAAGAAATTCGATAGCGAGGGCAGTTCTAAAGGACCCAGCAGTGTACTTCTTATGATGAAGTACAAGTCAAGTGCACCTGATGCAGAAATGATGACTT  
CAAGAAGCATTAGAGCCGATTAAGAGCGCAACACAGTCTTGTGCTCATGCTATTTCGACCTAAGAGGATTTGATACAACCTGTGTAATCAAGATGGAGCAATCG  
TAGAACAAGGTAACCATTCGATTTGATCACCAGCTGAGGGTGCCTATTCTAGGCTCTTACAGCTGCAGCATATAATTTGAAAAGAAAAATTTAGAGTGGGTGCTGAT

TGATGATAAATTGGGGGTGTGTTTTGGTTTGTAGTGGGGTGGAGTGATGATGTTTTATGGGAAAGGCTGATTATTTAACATTTTTGCTTTTTATGTTTTGCTTCTGATGGTTGT  
 AGATAAAGGGAAGATAAAAAGTTATTTGTGGTTGAAGTCTTTTTAATCTAATTTTTCCCTATTTGAGAGAAGCAATTAACACATTATATGAGATAACTAGGGACATGAATGATT  
 AAGTTTTATGGTTAGGAGAAGTTTTGCTGGGTTG

### >AmABCB2\_protein (Accesión: MW962272) Longitud 1248 AA

MAETIESAKSSIPDADKKKEQTLPFYKLFSEADKYDCFLMTIGTLGAIVHGSAMPVFFLLFGQMVNGFGKNQNDLNKLTGEVSKYALYFVYFVGFIVCMSSYAEIACWMTGERQVSTL  
 RKKYLESVLKQDVGFDDTARTGDIVFSVSTDLLVQDAISEKVGNFHILSTFLAGLVVGFISAWKLLSVAVIPGIAFAGGLYAYTLTGLTSKRESYANAGVIAEQIAQVVRTVYSY  
 VGECKALNSYSDAIQNTLKLGYKAGMAKGLGIGCTFGIACMSWALVFWYAGVFIRNGQTDGGKAFTAFSAIVGGMSLGGQSFNLGAFSKGKAAGYKLMVINQKPTIVEDLSGKC  
 LEEVNGNIEFKDVTFSYPSRPDVIFRDFSIFFPAGKTVAVVGGSGSGKSTVVSlierFYDPNQGVLDNVDIKTLQKWLNRNIGLVGCPALFATTILENLYGKPNATIEVEAATSA  
 ANAHSFISLLPNGYNTQVGERGLQLSGGCKQRIAIARAMLKDPKLLLEDEATSAIDAGESIQEALDRLMVGRTTIVVDFEITIRNVDSIAVLQQGVVETGTHEELISKSGAYASLI  
 RFQEMVRNPEPSANRSRSLNSLSTKSLRSGSLRNLQSYQSTGADGRLEMISNADNNRNCRAPRGYFFRLLKLNAPWVPSYIMGAVGVSLSGFIGPTFAIVMSNMIDVFYK  
 DLATMERKTEKFVFIYIGTGLYAVVAYLTHYFFSIMGENLTVRRRMLLAAILRNEVGFDEEENSSSLVAARLATDAVDVKSIAERISVILQNMSTLTSFVAFIIEWRVSLILATF  
 PLLVLANFAQQLSLKGFAGDTAKAHAKTSMIAGEGVSNIPTVAFAAQDKILSLFCHLRIPQIQLRRSQFAGFLYGLSQLALYVSEALILWYGSHLVSGGASTFSKVIKAFVVLVITAN  
 SVAETVSLAPEIRGGEAISVFSILDRSTKIDPDDLEGEQVETIRGDIELRHIDFAYPSRPEQIFKDLNLRIRAGQSVLVGASGSGKSSVISLIERFYDPLAGKVLIDGKDIRRLNLKSLR  
 LKIGLVGCPALFAASIFENIAYKDGATEAEVIEAARAANVHGFVSGLEPYKTPVGERGVQLSGGCKQRIAIARAVLKDPAVLLEDEATSAIDAESECVLQEAALERLMKRRTTVLV  
 HRLSTIRGVDTCVIQDGRIVEQGNHSDLITRPEGAYSRLQLQHNN

### >AmABCB3\_nucleotide Longitud 522 pb, transcriptoma XT1

ATGCCCGCGATGAAAAGCCTAAATGGTGGTAGCACAGAGTTATGTTAGCCCTACATCAGGAACCTCGAATCCTGAAAAATGAGGCAGGAAGAAGTAAATGAAGATCAAAAGA  
 AGCGGACCGAGATTATCAAGGTAGTCCCGTTTACCAAGCTCTTCTCGTTTACCGATTCTAAGGATGTTATCTTGATGATCATTGGTACCGTAGCATCGGTTGGTAATGGATTA  
 TGATGCCCTCATGAGCGTTCTTATTGGTGAATTAACGTGATGCTTTTGGACAAAATCAAAACAATGACGAGCGGTAGATAAAGTTTCCAAGGTGTCATTAAAAATTTGCTAT  
 CTGGCGATGGGGGCTGGGATAGCGTCATTCTGCAGGTGGCTTCTGGATGGTTACAGGGGAGAGACAGGCTGCACGGATAAGGAGTTTATATCTTAAAACTATATTAAGA  
 CAAGATGTCAGCTCTTTGATGTGGAAACAATACAGGAGAAGTTGTGGGGAGGATGTCTGGTGACACTGTC

### >AmABCB3\_protein Longitud 174 AA

MAAMKSLNNGSTELCLAPTSRTRILENEAGRSNEDQKATEIKVVPFHKLFSFTDSKDVILMIIGTVASVGNGLCMPLMSVLIGELTDAFGQNQNDEAVDKVSKVSLKFLVYLAMGA  
 GIASFLQVACWMTGERQAARIRSLYLKILRQDVSVFFDVTETNGEVVGRMSGDTV

### >AmABCB4\_nucleotide Longitud 195 pb, transcriptoma XT1

TTTGTATTGCTCAGAGGTGGCTTGTGGATCATCACAGGGGAAAGACAAGCTTCAAGAATACGAACTTTTACTTGAAAACCATATTGAGACAAGACATCGCTTCTTCGAT  
 AAAGAAAACAACACGGGAGAAGTTATTGGAAGAATGTCAGGTGACACTGTTCTCATTCAAGAAGCCATGGGTGAGAAGGTA

### >AmABCB4\_protein Longitud 65 AA

FVYCSEVACWIITGERQASRIRNFYKILRQDIAFFDKETNTGEVIGRMSGDTVLIQEAMGEKV

## ANEXO 2 ANÁLISIS PREDICTIVO DE LA ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE TRANSPORTADORES TIPO ABC DE ALCALOIDES BENCILISOQUINÓLICOS

En el siguiente Anexo 2 se presenta en formato de artículo en preparación la comparación *in silico* entre AmABCB1 y los transportadores de alcaloides que se emplearon en este trabajo; CjABCB1/CjABCB2/CjABCB3 de *C. japonica* (Shitan *et al.* 2003; 2013); TmABCB1/TmABCB2



de *T. minus* (Shitan *et al.* 2015) y EcABCB1 de *E. californica* (Nwanyichukwu 2014). Cabe destacar que las secuencias empleadas están detalladas en la sección 3.1 y Anexo 1, y con ellas se elaboró el árbol filogenético de la Fig. 3.2 y representan las que se emplearon como secuencias ancla para la identificación por cercanía de los posibles transportadores de alcaloides en *A. mexicana*. A continuación, se presenta el texto del artículo denominado “*Comparative analysis between ABCB-type alkaloid transporters of plants*”. A manera de resumen las siete secuencias empleadas en el presente texto mantuvieron una similitud en sus estructuras con un mínimo de 62% entre TmABCB1 y CjABCB3 y un máximo de 86% entre AmABCB1 y EcABCB1 demostrando de esta manera el grado de conservación que existe entre este tipo de proteínas movilizadoras de alcaloides.

### **Comparative analysis between ABCB-type alkaloid transporters of plants.**

**Loza-Muller, L.<sup>1</sup> & Vázquez-Flota, F.<sup>1§\*</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Calle 43 No. 130 Chuburna 97205, Mérida Yucatán México.

\*Supported by CONACYT (México)

§Corresponding author; felipe@cicy.mx

### **Introduction**

ABC transporters are a large group of integral membrane proteins present in the three domains of life and with an important role in the transport of molecules in and out of the cells. Almost all ABC transporters have at least one Transmembrane Domain (TMD) and one Nucleotide Binding Domain (NBD), for a half structure, or two TMD's and two NBD's for a full structure (Verrier *et al.*

2008; Kavishe *et al.* 2009; Doh *et al.* 2018). Since TMD's include the regions where substrates bind for translocation, they display the most divergent regions (besides the linker region), consisting of several  $\alpha$ -helix crossing the membrane multiple times (Gutmann *et al.* 2010; Couch-Uicab *et al.* 2010; Lefevre & Boutry 2018). Contrastingly, NBD's are the most conserved region since they represent the site for ATP binding and hydrolysis, being situated on the cytoplasmic side. NBD's include several consensus motifs presented in all ABC transporters: Walker A, Walker B, Q-Loop, D-Loop, H-Loop and the ABC signature (LSGGQ) (Couch-Uicab *et al.* 2010; Lefevre & Boutry 2018). Traditionally ABC transporters have been grouped into a unified system that consist into nine subfamilies; from A to I, based on TMD's and NBD's similarity, with plants, lacking the ABCH subfamily (Verrier *et al.* 2008).

Some members of the ABCB-type subfamily have been characterized as alkaloids transporters. Most alkaloid transporters characterized to date are related to the benzyloisoquinoline type (BIA) in plants such as *Coptis japonica*, *Thalictrum minus*, *Eschscholzia californica* and *Argemone mexicana* (Shitan *et al.* 2003; 2013; 2015; Nwanyichukwu P. 2014; Loza-Muller *et al.* unpublished). BIA's are derived from tyrosine and they form a diverse group of alkaloids surpassing more than 2500 identified structures, distributed in plants from the Ranunculales order (Rubio-Piña *et al.* 2013; Xool-Tamayo *et al.* 2016). Here we present a bioinformatic analysis to visualize a structural comparison between seven ABCB-type transporters from *C. japonica* (CjABCB1, CjABCB2, CjABCB3), *T. minus* (TmABCB1, TmABCB2), *E. californica* (EcABCB1) and *A. mexicana* (AmABCB1). As expected, the seven transporters shared a common structure at both TMD's and NBD's, but remarkable differences were detected in the stretch spanning the initial ~60 residues at the N-terminus and at the linker disordered regions situated between the NBD1 and the TMD2 of each transporter analyzed. Between such divergence in the linker regions four residues were completely conserved (Three Serines and One Proline) between the

sequences analyzed and we suggest that these residues may play a specific role in the recognition of different molecules as reported in other studies (Hrycyna *et al.* 1998; Sato *et al.* 2009; Henrichs *et al.* 2012; Esser *et al.* 2017; Ford *et al.* 2020).

### **Material and Methods**

#### ***Sequences Selection***

Seven sequences (Fig. A2.1) were selected from the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and from the Phytomesatyn DataBase (<https://bioinformatics.tugraz.at/phytometasyn/>): 1) CjABCB1 (Accession: BAB62040.1); 2) CjABCB2 (Accession: BAM11098.1); CjABCB3 (Accession: BAM11099.1); 4) TmABCB1 (Accession: BAS29581.1); 5) TmABCB2 (Accession: BAS29582.1); EcABCB1 (Accession: rep\_c332) and AmABCB1 (Accession: MW936653) (Shitan *et al.* 2003; 2013; 2015; Nwanyichukwu 2014; Loza-Muller *et al.* unpublished).

#### ***Sequence's alignment and phylogenetic tree construction.***

For the alignment of the sequences, we employed the MEGA X Software (<https://www.megasoftware.net/>; Kumar *et al.* 2018) and BioEdit Software (BioEdit v7.1.11.; Hall 1999). Sequences were aligned by Clustal W method. Phylogenetic tree was constructed by the Maximum likelihood method with 500 Bootstrap Replications.

#### ***Blastp comparison of sequences.***

The Basic Local Alignment Search Tool option for proteins (BLASTp; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to obtain the identity between the protein sequences.

**3D model analysis and transmembrane prediction.**

3D structures were elaborated with the Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre2; <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>; Kelley *et al.* 2015) and after obtaining they were analyzed with FirstGlance in Jmol (<http://firstglance.jmol.org>). Transmembrane prediction was elaborated with the Bologna Unified Subcellular Component Annotator (BUSCA; <http://busca.biocomp.unibo.it>; Castrense *et al.* 2018).

**Results and discussion*****Phylogenetic distribution of ABCB alkaloid transporters.***

The phylogenetic tree showed two major clades: Clade I was constituted by CjABCB1, CjABCB2, TmABCB1, TmABCB2 in subgroup A and EcABCB1 with AmABCB1 were clustered together into subgroup B while Clade II was constituted only by CjABCB3 (Fig. A2.2). These findings correspond in the fact that CjABCB3 has a low identity with all the other ABCB transporters (64%, 64%, 62%, 65%, 64%, 66% against CjABCB1, CjABCB2, TmABCB1, TmABCB2, EcABCB1 and AmABCB1 respectively (Fig. A2.3). This could be related with a previous work (Shitan *et al.* 2013) in which CjABCB3 expression was only observed in *C. japonica* cultured cells and not in the whole intact plants making it different from the other two ABCB-type transporters reported from *C. japonica* (CjABCB1/CjABCB2) in the same plant where their expression was visualized to the rhizome (Shitan *et al.* 2003; 2013).

Clade I had a minimum identity of 74% between its members, corresponding to the pair TmABCB1/EcABCB1 (Fig. A2.3). Clade 1 clustered CjABCB1, CjABCB2, TmABCB1 and TmABCB2 into subgroup A while EcABCB1 and AmABCB1 into subgroup B, these clustering makes sense if function its analyzed. ABCB-type transporters clustered into subgroup A share

the common function that they primarily mobilize berberine (Shitan *et al.* 2003; 2013; 2015) while those transporters in subgroup B mobilize sanguinarine (Nwanyichukwu P. 2014; Loza-Muller *et al.* unpublished). The analysis of the seven ABCB-type transporters showed that EcABCB1/AmABCB1 had the maximum identity between the transporters analyzed with 86% and after them CjABCB1/CjABCB2 with 82% while TmABCB1/CjABCB3 had the minimum identity in the same way with 63% (Fig. A2.3). The maximum length was for CjABCB2 with a length of 1292 AA while EcABCB1 had the smallest size with 1281 AA making the differences in sizes between all the transporters of only 11 residues (Fig. A2.1).

The high identity of CjABCB1/CjABCB2 could be related to previous works in which was reported that these ABCB-type transporters could mobilize in a cooperative way berberine for accumulation into the rhizome which was the tissue of preferential expression for both proteins (Shitan *et al.* 2003; 2013). Since in *C. japonica* this tissue was demonstrated to accumulate berberine in high levels it could be possible that redundant transporter genes with high similarity exist in the same organ nevertheless *i.e.*, CjABCB1 was also observed in petiole, peduncle and flower (Yazaki *et al.* 2001) while CjABCB2 was exclusively expressed in the rhizome suggesting a specific role for CjABCB2 in the whole plant (Shitan *et al.* 2013). Another example it's seen with the pair TmABCB1/TmABCB2 with an identity of 78% and in which in other work it was reported that both are preferentially expressed in roots and that they might contribute to the retention of berberine by functioning as berberine importers in the root making again this an example of redundant proteins (Shitan *et al.* 2015). EcABCB1 high identity rate of 86% to AmABCB1 could be related to the report that they both act as sanguinarine importers as described in precious works (Nwanyichukwu P. 2014; Loza-Muller *et al.* Unpublished). EcABCB1 shared the maximum identity with AmABCB1; actually, EcABCB1 was employed as query and was useful for the functional characterization of AmABCB1 (Loza-Muller *et al.* Unpublished). Both transporters had been

reported to mobilize preferentially sanguinarine but AmABCB1 had the particularity that it's the first transporter in a plant organism that is overexpressed in mature seeds and related to alkaloid mobilization, thus the high identity between EcABCB1 and AmABCB1 could be related for the function instead of the tissue in which they are preferentially expressed (Nwanyichukwu P. 2014; Loza-Muller *et al.* Unpublished). All seven ABCB-type transporters analyzed were reported to be localized to the plasma membrane.

### ***Sequence analysis and disordered linker regions.***

Common structure for ABCB-type transporters consisted of two TMD's and two NBD's making a typical TMD1-NBD1-TMD2-NBD1 or NBD1-TMD1-NBD-TMD2 orientation (Hrycyna *et al.* 1998; Sato *et al.* 2009; Esser *et al.* 2017; Ford *et al.* 2020).

The alignment of the seven ABCB-type transporters analyzed showed a common structure for the TMD's and NBD's (which included the Walker A, Walker B, D-Loop, Q-Loop, H-Loop and the ABC Signature; Fig. A2.4). Although there was a common structure in the protein sequences; two regions displayed a disordered alignment being them: a) the first ~55 residues from the sequences that correspond to the signal sequences and b) the residues comprised in the linker regions (Fig. A2.4). Signal sequences are small sequences ranging between 3-70 residues in the N-terminal that direct the linked protein to subcellular localization (Mainprize *et al.* 2007; Pelley 2012; Nakai & Imai 2019). The signal sequences from the ABCB-type transporters that were analyzed showed a disordered alignment maintaining no relationship between them (Fig A2.4). The length of the signal sequences was as follow: 53, 56, 55, 31, 51, 46 and 43 residues for CjABCB1, CjABCB2, CjABCB3, TmABCB1, TmABCB2, EcABCB1 and AmABCB1, respectively, thus having TmABCB1 and CjABCB2 the shortest and longest, respectively.

Linker regions are peptide sequences that join the C-terminal end of the first NBD to the N-

terminal start of the second TMD (Ford *et al.* 2020). This part of the protein is completely disordered and usually does not have an  $\alpha$ -helix or an  $\beta$ -sheet secondary structure.

Linker regions from the ABCB-type transporters analyzed span 68 residues, between Asp<sub>639</sub>-Tyr<sub>706</sub> and Asn<sub>635</sub>-Gln<sub>702</sub> for CjABCB3 and TmABCB2, respectively; 70 residues, between Ser<sub>637</sub>-Gln<sub>706</sub> and Ser<sub>640</sub>-Glu<sub>709</sub> for CjABCB1 and CjABCB2, respectively; 76 residues between Val<sub>626</sub>-Gln<sub>701</sub> for EcABCB1, 78 residues between Gly<sub>626</sub>-Gln<sub>703</sub> and 88 residues between Ser<sub>615</sub>-Pro<sub>702</sub> for TmABCB1. Linker aminoacid sequences are shown below:

CjABCB1 70 SEVDKAENVESGLNSSQQHSIGRSISRGSSEGVGNSSRHSFSVSFGLPTGHIYETTAGL  
ESTSPAIGQTQ

CjABCB2: 70 SSENKAESTEFGRSSSHQQSFRRSMSRGSSGVGNSSRKSFSMSFGLPTPHIPEVVSA  
KPESTPEPKKQTE

CjABCB3: 68 DSEKETTNDQDDPEGSINSHQKSKHGLPDGGPLSHPLLTGVSVHLPVQENYKTESIEL  
TTTEASQQPY

TmABCB1: 88 SEDRVETAGFIRNASLRQSFGRSISRGSSEGVGNSSRHSFSVSFGLPTGHIYETTAGL  
RHSFSLAFGLPTGIQGNTVDSEYPASSGKTP

TmABCB2: 68 NGEDRVQNVSLGRNSSQLESFGRSLSRGSSRNSSRHSFSVSFGLPTGYVQEKVSTG  
PDTIPESKEKVQ

EcABCB1: 77 VPEHQVINDKKGKSNMVEFARQSSQPLSLPRISRGSSEGVGNSSRHSFSVSFGLPTGLNI  
QENVQIEDPASLPPPEQAQ

AmABCB1: 78 GSNHQVDQEKQEISMESGRQSSQHLHLRSISRGSVGNSRRHSFSVSFGVPTGLN  
IQETVPTDVQSLPPPPLEEAQ

Maximum identity between linker regions of the ABCB-type transporters analyzed was the pairs EcABCB1/AmABCB1 with 64% and then CjABCB1/CjABCB2 with 58% although the whole sequences have an identity of 82% and 86% making this linker region not as identical as the rest of the sequence. This disordered linker regions might play a specific role in the binding of the substrates reported in Fig. A2.1 (Hrycyna *et al.* 1998; Sato *et al.* 2009; Henrichs *et al.* 2012; Ford *et al.* 2020). A key example of this is the finding that the phosphorylation of the linker region of ABCB1/PGP-1 catalyzed the regulation of auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. In brief, a phosphorylation in the Ser<sub>634</sub> of the ABCB1 transporter from *A. thaliana* resulted in the discovery of the fundamental role that this residue could have to determine functions as the binding of drugs and the activity of the transporter (Henrichs *et al.* 2012). Further studies are required to determine if these segments of the full sequences of the ABCB-type transporters analyzed might play a key role in the specificity of recognition/mobilization of different molecules as alkaloids or others.

### ***Transmembrane helixes prediction.***

TMD's are constituted mostly of nonpolar residues that can cross the membrane systems from one to several times. The secondary structure of the TMD's is usually given by several  $\alpha$ -helixes. Within the plasmatic membrane, where the water is completely excluded, a chain usually between 18-21 residues adopts the  $\alpha$ -helical conformation that maximizes its hydrogen bonds (Wayne *et al.* 2012; Farooqui *et al.* 2016). We used the BUSCA prediction software and determined that the seven ABCB-type transporters had several  $\alpha$ -helixes distributed in their TMD's regions (Fig. A2.5).



Regions comprising  $\alpha$ -helices were:

CjABCB1: 64-91; 110-131; 133-152; 181-210; 214-239; 289-321; 330-362; 717-744; 762-790; 792-803; 834-862; 865-890; 942-973; 982-1009.

CjABCB2: 67-94; 113-142; 144-155; 185-213; 217-242; 291-324; 333-365; 720-746; 765-793; 795-806; 838-865; 868-893; 945-976; 985-1013.

CjABCB3: 66-92; 113-134; 136-155; 185-213; 217-243; 292-325; 333-364; 718-744; 762-791; 793-804; 834-862; 865-889; 942-974; 982-1009.

TmABCB1: 42-69; 88-117; 119-130; 160-188; 192-217; 267-298; 308-340; 714-739; 758-786; 788-799; 830-858; 861-886; 940-970; 978-1005.

TmABCB2: 62-89; 107-137; 139-150; 180-208; 212-237; 287-319; 328-361; 714-740; 758-786; 788-799; 830-858; 861-885; 937-970; 978-1005.

EcABCB1: 57-84; 103-131; 133-144; 174-202; 206-231; 279-312; 321-352; 713-739; 756-784; 786-797; 828-856; 860-884; 932-966; 975-1004.

AmABCB1: 55-81; 99-120; 122-141; 171-199; 203-228; 278-309; 319-351; 715-741; 759-787; 789-800; 831-859; 862-887; 938-971; 979-1006.

### ***3D modeling with hydrophobicity and linker structure analysis.***

Protein structure prediction is essential in the inference to obtain the 3D structure of a polypeptide through the employment of computational algorithms. This structure can be predicted by two principles: a) the laws of physics and b) evolution. According to the first one, the protein folds into a stable and well-formed conformation while according to the second principle, a polypeptide is a

consequence of gradual changes in its residues and conformation over a period (Jabeen *et al.* 2019; Simoncini *et al.* 2019). We used the Phyre2 Software to obtain the 3D structure for the seven ABCB-type transporters analyzed. Also, we obtained the hydrophobic and hydrophilic regions that correspond to the TMD's and NBD's (Fig. A2.6). As it was expected the TMD's showed a hydrophobic pattern that are represented in gray in contrast to the NBD's where the pattern was more related to hydrophilic zones and are represented in purple; this information can be visualized in column A. Some few residues were conserved in the linker regions between the ABCB-type transporters analyzed. Three Serines (Ser) and one Proline (Pro) were completely conserved and distributed in sequences as follow, considering their respective linker regions:

CjABCB1: Ser<sub>656</sub>, Ser<sub>660</sub>, Ser<sub>672</sub>, Pro<sub>683</sub>.

CjABCB2: Ser<sub>659</sub>, Ser<sub>663</sub>, Ser<sub>675</sub>, Pro<sub>686</sub>.

CjABCB3: Ser<sub>657</sub>, Ser<sub>661</sub>, Ser<sub>672</sub>, Pro<sub>683</sub>.

TmABCB1: Ser<sub>633</sub>, Ser<sub>637</sub>, Ser<sub>671</sub>, Pro<sub>682</sub>.

TmABCB2: Ser<sub>654</sub>, Ser<sub>658</sub>, Ser<sub>668</sub>, Pro<sub>679</sub>.

EcABCB1: Ser<sub>657</sub>, Ser<sub>661</sub>, Ser<sub>671</sub>, Pro<sub>682</sub>.

AmABCB1: Ser<sub>651</sub>, Ser<sub>655</sub>, Ser<sub>667</sub>, Pro<sub>678</sub>.

As described before (Henrichs *et al.* 2012) it was reported that phosphorylation of Ser<sub>634</sub> that it's localized in the linker region of ABCB1/PGP suggested it's role as a fundamental residue involved in regulation of auxin transport. The fact that it was found that three Serines are well conserved between the ABCB-type transporters analyzed here suggest their possible high value as key residues involved possibly in alkaloid recognition. Another observed feature was that, with the

sole exception of CjABCB3, all analyzed transporters shared a common short peptide (-SRGSS-) between the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> conserved residues of the linker regions.

Linker regions join the NBD1 with TMD2, so the whole protein is codified in one single gene. The 3D structure of the seven ABCB-type transporters analyzed corresponded to a typical structure of subfamily B displaying the TMD1-NBD1-TMD2-NBD2 organization (N- and C- termini as blue and red and between following the rainbow color spectra in figures). The four views; frontal, side, top and bottom (columns B, C, D, E of Fig. A2.6) display the structural properties of the seven ABCB-type transporters. Although all had a similar structure in their TMD's and NBD's, this was not the case at the linker regions, where the most divergent changes in the 3D structure were noticed (column F of Fig. A2.6). These results reinforce the theory that the divergence seen in the disordered linker regions might play a specific role in either the correct folding of the 3D structure of the protein for conformational changes, or in substrate selectivity leading to the recognition of different possible molecules. Of course, both effects are also possible (Ford *et al.* 2020).

### **Conclusions and Perspectives.**

Seven ABCB-type transporters were analyzed in the present work to know the similarities and differences in their structure and function. All the ABCB-type transporters (with exception of CjABCB3 that is uncharacterized) have described that they mobilize alkaloids although there was difference in other substrates; CjABCB1/CjABCB2 mobilize 4-nitroquinoline N-oxide while EcABCB1 was reported to mobilize sanguinarine and morphine and AmABCB1 did the same for sanguinarine and berberine (Shitan *et al.* 2003; 2013; Nwanyichukwu P. 2014; Loza-Muller *et al.* unpublished). The phylogenetic tree grouped in two clades the ABCB-type transporters analyzed being CjABCB1/CjABCB2/TmABCB1/TmABCB2 and EcABCB1/AmABCB1 in two different subgroups in Clade I and CjABCB3 in Clade II. The maximum identity between the ABCB-type

transporters was for EcABCB1/AmABCB1 with 86% while the minimum identity was for TmABCB1/CjABCB3 with 62%. The alignment of ABCB-type transporters showed a conserved aminoacid sequence in the TMD's and NBD's while there was divergence in the signal sequence and in the linker region. All ABCB-type transporters had the typical conserved motifs (Walker A, Walker B, Q-loop, D-Loop, H-Loop and ABC signature). Each transporter had several  $\alpha$ -helixes distributed half in the TMD1 and the other half in the TMD2. In the 3D analysis structure, the TMD's showed a hydrophobic preference while the NBD's showed a composition of hydrophilic residues. The general structure of the seven ABCB-type transporters showed a typical folding with an orientation TMD-NBD-TMD-NBD while the linker region had a disordered sequence and represented the most divergent 3D structure in the analysis; probably representing a specific role in each ABCB-type transporter. Further studies are required to know the specific role that this region could have inside the cells. It is not clear if these regions are only implied in one function or several in the whole plant.

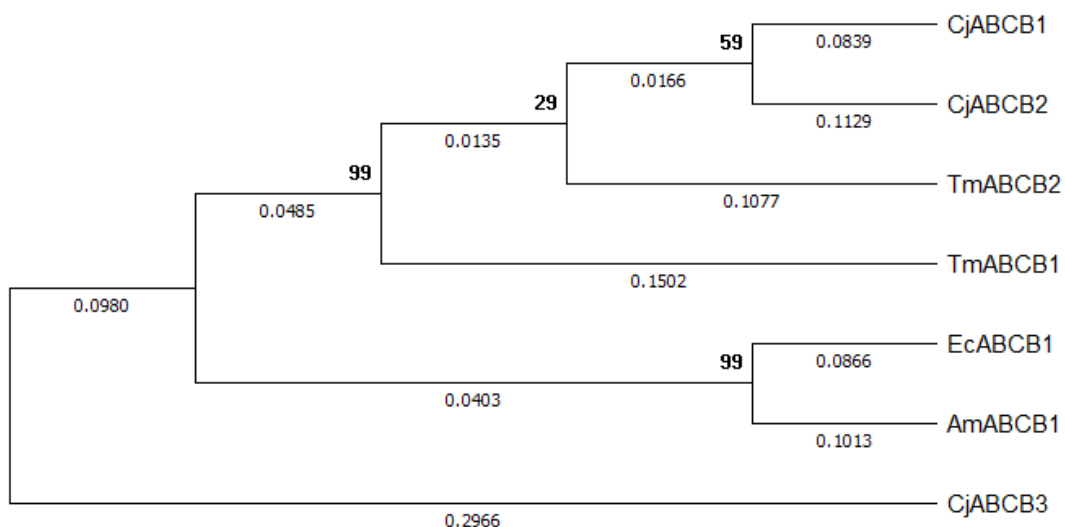
**Acknowledgments.**

This work was supported by CONACYT (National Council for Science and Technology, Mexico), Grant CB-2016-0285887. LLM was recipient of CONACYT scholarship for Ph.D. Authors declare that there is no conflict of interest.

## Figures and legends

ABC Transporter	Organism	Lenght (AA)	Accesion number	Characterized transported metabolites	Reference
<i>CjABCB1</i>	<i>C. japonica</i>	1289	BAB62040.1	Berberine, reticuline, 4-nitroquinoline N-oxide	Shitan et al, 2003
<i>CjABCB2</i>	<i>C. japonica</i>	1292	BAM11098.1	Berberine, 4-nitroquinoline N-oxide	Shitan et al. 2013
<i>CjABCB3</i>	<i>C. japonica</i>	1288	BAM11099.1	Uncharacterized	Shitan et al. 2013
<i>TmABCB1</i>	<i>T. minus</i>	1285	BAS29581.1	Berberine	Shitan et al. 2015
<i>TmABCB2</i>	<i>T. minus</i>	1286	BAS29582.1	Berberine	Shitan et al. 2015
<i>EcABCB1</i>	<i>E. californica</i>	1281	rep_c332	Sanguinarine, berberine, morphine	Nwanyichukwu 2014
<i>AmABCB1</i>	<i>A. mexicana</i>	1286	MW936653	Sanguinarine, berberine	Loza-Muller et al. Unpublished

**Figure A2.1 Plant ABCB-type transporters analyzed.** A total of seven ABCB-type transporters were analyzed by bioinformatic methods for structural comparison; they were *CjABCB1/CjABCB2/CjABCB3* from *C. japonica*; *TmABCB1/TmABCB2* from *T. minus*; *EcABCB1* from *E. californica* and *AmABCB1* from *A. mexicana*.



**Figure A2.2 Phylogenetic analysis of the ABCB-type transporters analyzed.** The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model (Jones *et al* 1992). The tree with the highest log likelihood (-10488.52) is shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. This analysis involved 7 amino acid sequences. There were a total of 1327 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA X (Kumar *et al* 2018).

	<i>Cj</i> ABC <i>B1</i>	<i>Cj</i> ABC <i>B2</i>	<i>Cj</i> ABC <i>B3</i>	<i>Tm</i> ABC <i>B1</i>	<i>Tm</i> ABC <i>B2</i>	<i>Ec</i> ABC <i>B1</i>	<i>Am</i> ABC <i>B1</i>
<i>Cj</i> ABC <i>B1</i>		82%	64%	77%	82%	78%	79%
<i>Cj</i> ABC <i>B2</i>	82%		64%	75%	80%	76%	78%
<i>Cj</i> ABC <i>B3</i>	64%	64%		62%	65%	64%	66%
<i>Tm</i> ABC <i>B1</i>	77%	75%	62%		78%	74%	76%
<i>Tm</i> ABC <i>B2</i>	82%	80%	65%	78%		78%	80%
<i>Ec</i> ABC <i>B1</i>	78%	76%	64%	74%	78%		86%
<i>Am</i> ABC <i>B1</i>	79%	78%	66%	76%	80%	86%	

**Figure A2.3 Identity between the ABCB-type transporters analyzed.** The lowest identity between the ABCB-type transporters analyzed was the pair *Cj*ABC*B3*/*Tm*ABC*B1* with 62% while the maximum was for *Am*ABC*B1*/*Ec*ABC*B1* with 86%.

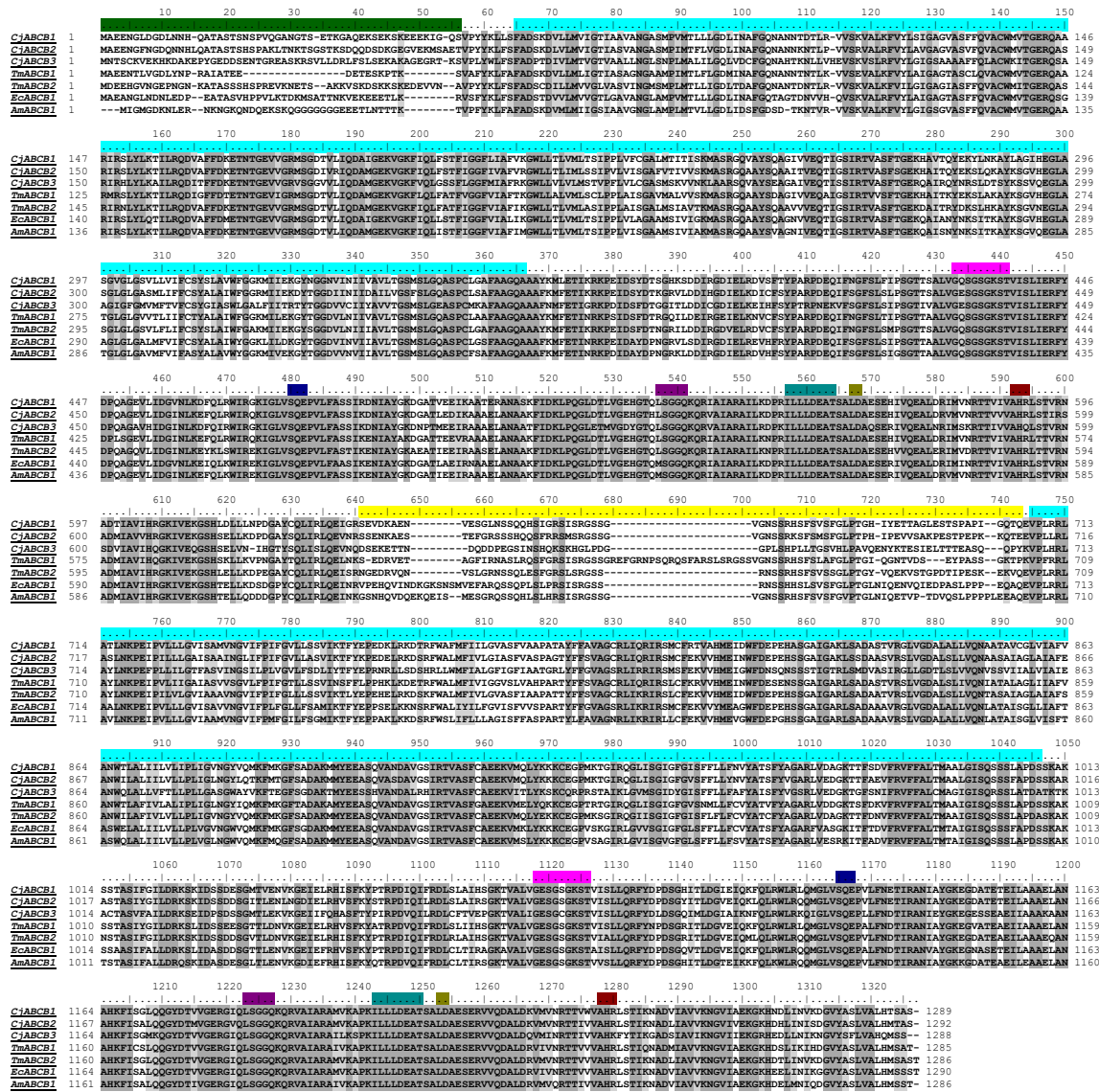
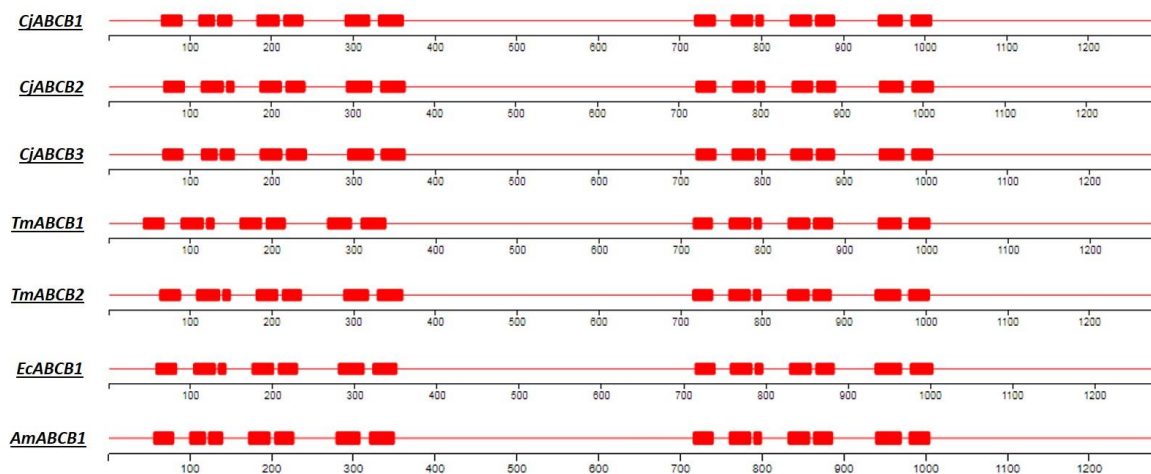
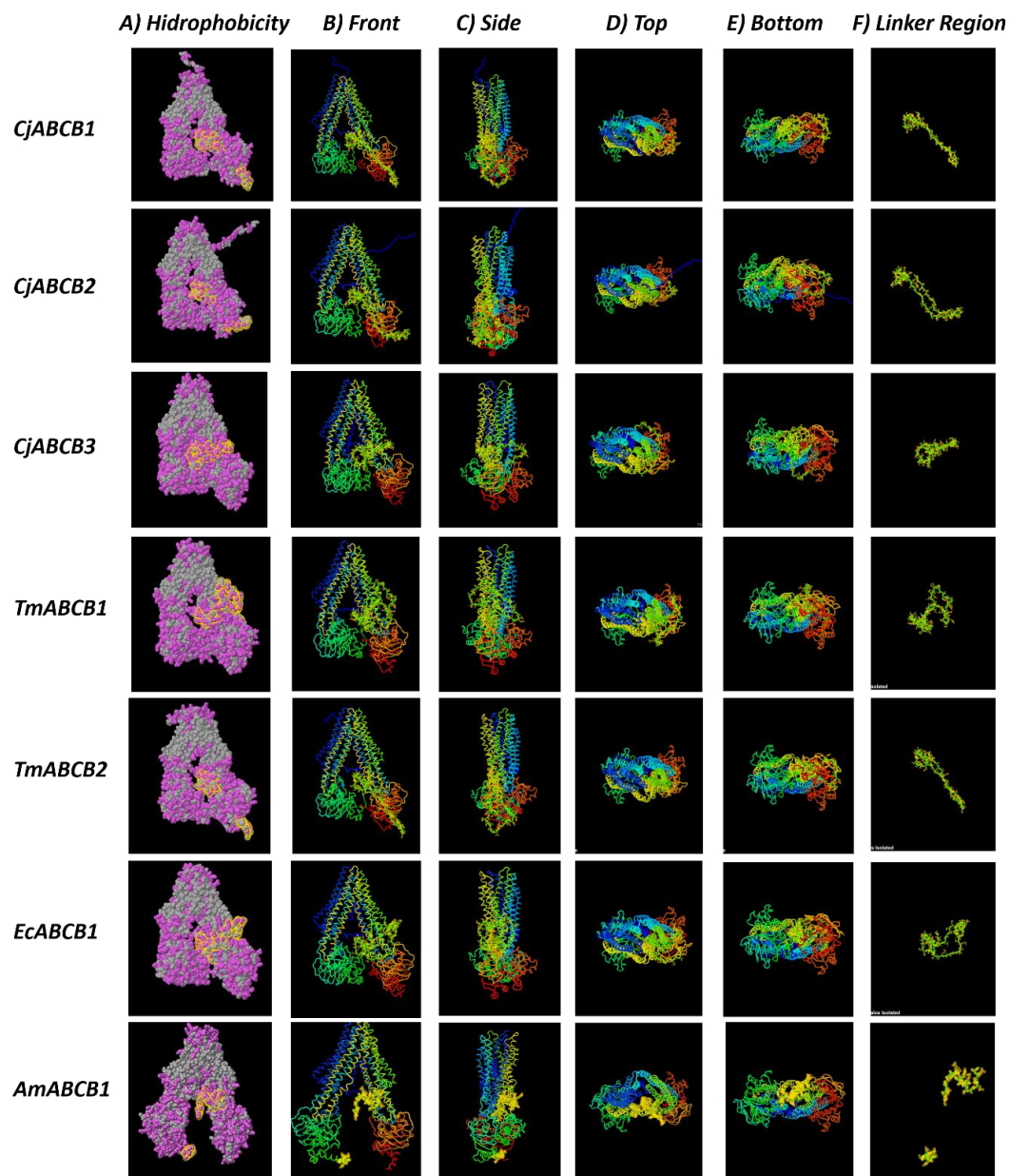


Figure A2.4 Sequence alignment of the plant ABCB-type transporters analyzed. ■ Signal sequence; ■ Transmembrane Domains; ■ Walker A; ■ Q-Loop; ■ ABC Signature; ■ Walker B; ■ D-Loop; ■ H-Loop; ■ Linker Region





**Figure A2.5 Structural representation for transmembrane  $\alpha$ -helices in TMD's.** The seven ABCB-type transporters showed in the transmembrane analysis that contained several  $\alpha$ -helices distributed in their TMD's.



**Figure A2.6 Hydrophobic analysis & 3D structure of the ABCB-type transporters analyzed.** [a] Hydrophobic/hydrophilic regions in the protein structure of ABCB-type transporters; [b-e] Frontal, side, top and bottom view of the 3D structure of ABCB-type transporters; [f] Isolation of the 3D structure of linker regions of ABCB-type transporters analyzed.

### ANEXO 3 CARACTERIZACIÓN DE AmABCB2, UN PRESUNTO TRANSPORTADOR DE AUXINAS DE *A. mexicana*.

Además de los resultados obtenidos para AmABCB1 y que se encuentran descritos en la sección 3.2, se seleccionó un segundo candidato derivado de los resultados de la búsqueda de presuntos transportadores en el transcriptoma y bases públicas de datos (Sección 3.1). La secuencia identificada era de 4458 pb e incluía un marco de lectura abierto de 3744 pb, por su cercanía a los transportadores de auxinas en el análisis filogenético (Fig. 3.2, 3.3), se denominó a AmABCB2, como un posible transportador de auxinas. Los patrones de expresión de AmABCB2 se muestran en comparación en la Figura 3.5.

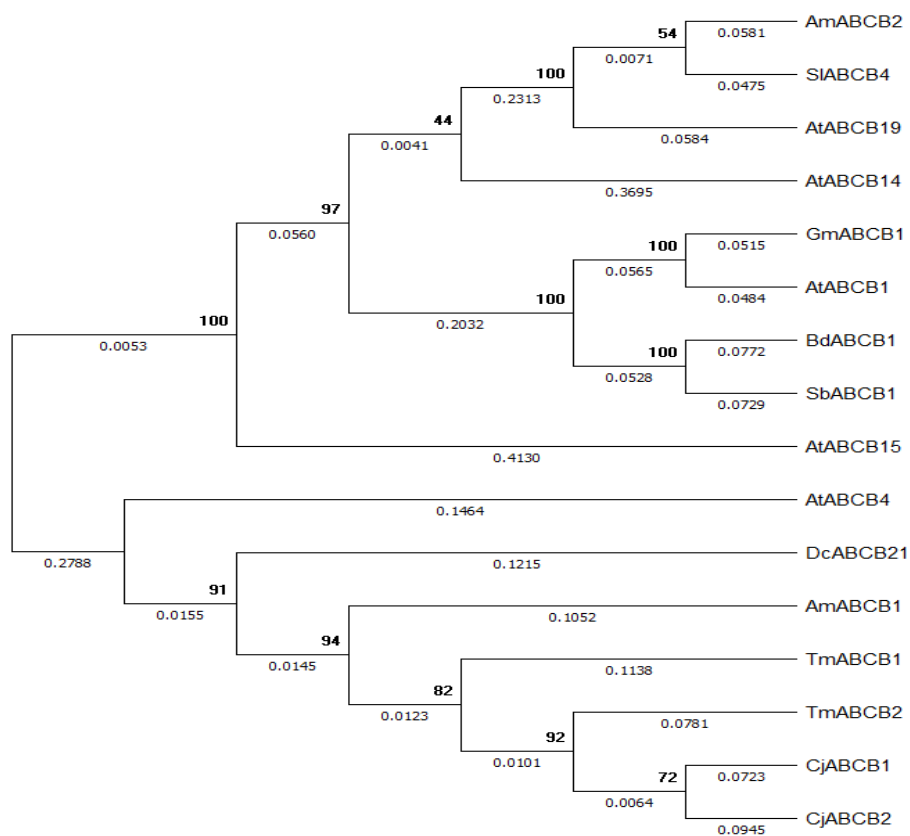
Este presunto transportador también se caracterizó *in silico* con el fin de comparar su estructura con los transportadores de alcaloides usados en la sección 3.1 y fue aislado con el fin de obtener una caracterización funcional. En este apartado se describen los resultados obtenidos.

#### Análisis filogenético de AmABCB2.

Para confirmar la relación de AmABCB2 con los transportadores de auxinas, se elaboró un nuevo árbol filogenético (Fig. A3.1) que incluía 16 entradas de transportadores ABCB con función establecida o predicha para auxinas de diferentes especies, incluyendo *S. lycopersicum* (SIABCB4, Acc. NP\_001234209.1; Ofori *et al.* 2018), *S. bicolor* (SbABCB1, Acc. AAR10387.1; Dhaliwal *et al.* 2014), *B. distachyon* (BdABCB1, Acc. XM\_003571225.1; Dhaliwal *et al.* 2014), *G. max* (GmABCB1, Acc. XP\_003554389.1; Dhaliwal *et al.* 2014) y *A. thaliana* (AtABCB1, AtABCB4, AtABCB14, AtABCB15 y AtABCB19, Acc. NP\_181228.1, O80725.1, AEE30902.1, Q9LHD1.1 y NM\_113807.3; Dhaliwal *et al.* 2014). Además, se incluyó el transportador DcABCB21 de *D. carota* (Sección 3.1; Iorizzo *et al.* 2016) y los transportadores de alcaloides CjABCB1/CjABCB2 de *C. japonica* (Shitan *et al.* 2003; 2013) y TmABCB1/TmABCB2 de *T. minus* (Shitan *et al.* 2015), junto con AmABCB1 de *A. mexicana* como movilizador de sanguinarina.

El análisis se llevó a cabo por el método de Neighbor-Joining, con un valor de 500 bootstraps, formándose dos clados (Fig. A3.1). En el primero de ellos se resolvió AmABCB2 junto con ocho entradas con función predicha o reportada como movilizadores de auxinas en *S. lycopersicum*, *S. bicolor*, *B. distachyon*, *G. max* y *A. thaliana* (cuatro entradas). Como se esperaba, en el segundo clado se agruparon las seis entradas correspondientes a los transportadores de

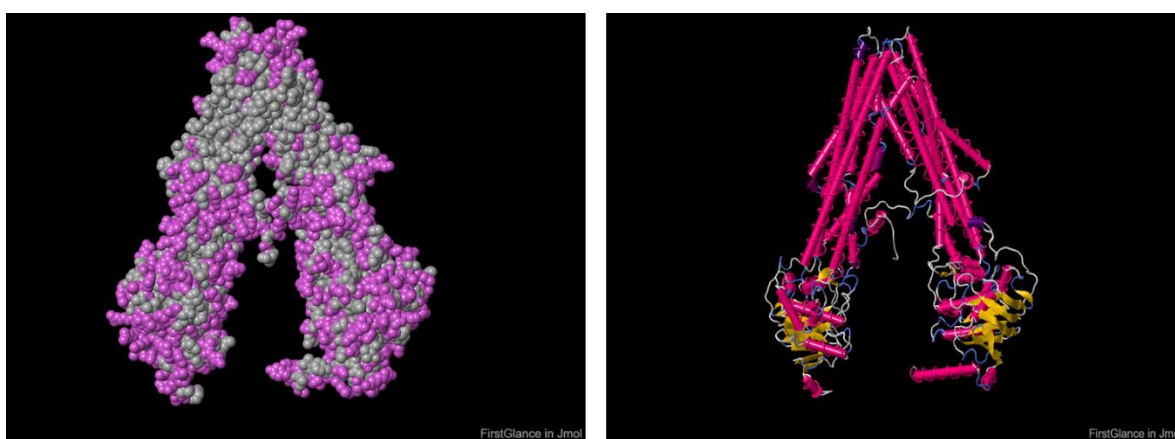
alcaloides descritos en la sección 3.2. Esta separación permite asignar con mayor sustento el posible papel de AmABCB2 como transportador de auxinas.



**Figura A3.1** Relaciones evolutivas en secuencia de aminoácidos de AmABCB2 con transportadores de auxinas y alcaloides. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Neighbor-Joining. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 2.88227774. El porcentaje de árboles en los que se agrupan los taxones asociados (500 réplicas) se muestra junto a las ramas. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de corrección de Poisson y están en las unidades del número de sustituciones de aminoácidos por sitio. Este análisis involucró 16 secuencias de aminoácidos. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes (opción de eliminación completa). Hubo un total de 1198 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X.

### Modelamiento 3D de la secuencia de aminoácidos de AmABCB2 de *Argemone mexicana*.

La secuencia completa (marco de lectura, 3744 pb) de AmABCB2 se muestra en el Anexo 1. AmABCB2, codifica para un polipéptido de 1248 residuos (Anexo 1), comparte una identidad de entre 45 y 89 % con los transportadores de auxinas analizados y muestra la estructura típica de los transportadores ABCB, mencionados anteriormente (Sección 1.6.1, Fig.1.10). En comparación, su identidad con los transportadores de alcaloides sólo fue entre 42 y 46 % (Fig. 3.4). La secuencia se encuentra depositada en el GenBank con el número de accesión MW962272.



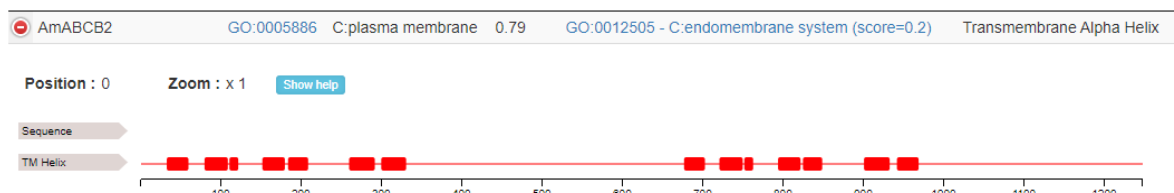
**Figura A3.2 Estructura 3D de AmABCB2 de *A. mexicana*.** Estructura 3D de AmABCB2 que se tomó del transcriptoma de *A. mexicana* para su postulamiento como transportador de auxinas que se ha confirmado existe en otras especies como *A. thaliana* y *D. carota*; las dos especies no son pertenecientes al orden de las Ranunculales. El modelamiento se realizó por medio de la plataforma Phyre2.

El modelamiento tridimensional se realizó en las plataformas del Protein Homology/Analogy Recognition Engine V 2.0 (Phyre2, <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) y el 3D viewer FirstGlance (<http://firstglance.jmol.org>) (ver sección 3.1 para los detalles). AmABCB2 comparte la misma conformación estructural que AmABCB1 y otros transportadores tipo B (Do *et al.* 2018) (Sección 1.6.1, Fig.1.10), conteniendo sus dominios TMD1 entre las posiciones Asp<sub>33</sub>-Lys<sub>331</sub> y TMD2 en Ala<sub>677</sub>-Ile<sub>969</sub>. Los resultados obtenidos (Fig. A3.2) muestran una hidrofobicidad y una estructura terciaria característica de un transportador que ha sido reportado con anterioridad en otras especies tales como SIABCB4 de *S. lycopersicum* y AtABCB19 de *A. thaliana* (Noh *et al.* 2001; Ofori *et al.* 2018) y que incluyen los dominios TMD en las posiciones Asp<sub>33</sub>-Lys<sub>331</sub> y Ala<sub>677</sub>-

Ile<sub>969</sub> junto con los dominios NBD1 en las posiciones Ala<sub>332</sub>-Asn<sub>676</sub> y Ile<sub>970</sub>-Ile<sub>1248</sub> (Tabla 3.2).

### Predicción estructural y de localización celular de AmABCB2.

Al igual que AmABCB1, la localización predicha de AmABCB2 (BUSCA; <http://busca.biocomp.unibo.it>) corresponde a la membrana plasmática (Fig. A3.3). Los resultados muestran 14 regiones de  $\alpha$ -hélices distribuidas entre las posiciones Asp<sub>33</sub>-Lys<sub>331</sub> y Ala<sub>677</sub>-Ile<sub>969</sub> de los dos TMD y sugiere una localización en la membrana plasmática con un 79% y una localización alterna en el sistema endomembranoso con un 20% de probabilidad; coincidiendo estos resultados con lo reportado para la localización de los transportadores de auxinas caracterizados a la fecha (Noh *et al.* 2001; Ofori *et al.* 2018).



**Figura A3.3 Predicción estructural y de localización celular de AmABCB2.**

Predicción de presencia de  $\alpha$ -hélices que conforman los dominios transmembranales de AmABCB2 junto con su sitio de localización subcelular de mayor probabilidad. La predicción estructural de las  $\alpha$ -hélices se obtuvo mediante la plataforma BUSCA.

### Aislamiento del ADNc completo y clonación de AmABCB2.

Para el aislamiento de AmABCB2, se analizaron por RT-PCR los niveles de expresión en diferentes tejidos de plantas maduras, incluyendo hojas, tallos, raíz, capsulas y pétalos (Fig. 3.5). Se emplearon los iniciadores AmABCB-F4 y AmABCB-R4 (Tabla 2.1) y las condiciones descritas en materiales y métodos (Sección 2.2.4).

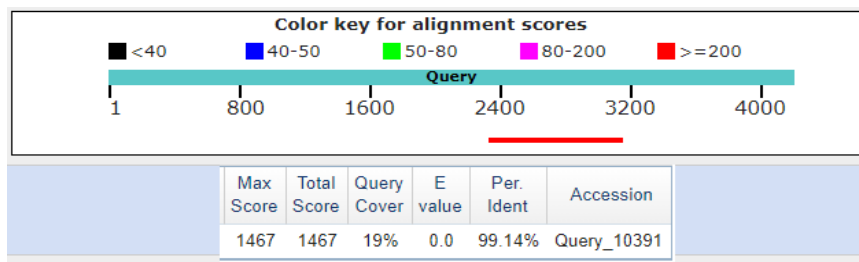
Se pudo detectar preferencialmente la expresión de AmABCB2 en pétalos (Fig. 3.5). Es interesante notar que los transportadores de auxinas tales como AtABCB19, AtABCB14 y AtABCB15 de *A. thaliana* que han sido descritos para el transporte de auxinas se expresan en tejidos vasculares del hipocótilo y en la estela de la raíz en el caso del primero; mientras que los otros dos localizan principalmente en los tejidos vasculares de las inflorescencias que es el órgano precursor en el caso de *A. mexicana* que da lugar a las flores y en donde se logró observar

una expresión preferencial para AmABCB2 y donde se obtuvo su secuencia completa por lo que su presencia en este tejido podría estar vinculada también a la movilización de auxinas en las inflorescencias en *A. mexicana* esto asociado por su similitud estructural con los transportadores mencionados de *A. thaliana* (Fig. A3.1) (Titapiwatanakun y Murphy 2009).

Con base en estos resultados, se seleccionaron los pétalos como material de partida para el aislamiento del ADNc de AmABCB2. Esto se logró mediante RT-PCR, como se describe en la sección 2.2.5. En una primera instancia, partiendo de ADNc de pétalo, y utilizando los cebadores AmABCB2-F1, AmABCB2-R1, AmABCB2-F2 y AmABCB2-R2 (Tabla 2.1), se logró obtener el producto completo de 4031 pb (Fig. A3.4) y que correspondía al tamaño promedio de los transportadores de auxinas usados como referencia (Noh *et al.* 2001; Iorizzo *et al.* 2016). El producto amplificado fue verificado y confirmado por medio de secuenciación (Fig. A3.5) que coincidió con la secuencia encontrada en el transcriptoma.



**Figura A3.4 RT-PCR de la secuencia completa de AmABCB2.** Se muestra la obtención de un amplicón de un tamaño de 4031 pb. Este amplicón fue obtenido a partir de RT-PCR utilizando los cebadores enlistados en la Tabla 2.1.



AmABCB19\_1982\_nucleotide  
 Sequence ID: Query\_10391 Length: 820 Number of Matches: 1

Range 1: 6 to 820 [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1467 bits(794)	0.0	810/817(99%)	3/817(0%)	Plus/Plus
Query 2319		GCTCTTAAGCTGAATGCACCTGAGTGGCCATATTCAATCATGGGAGCAGTTGGATCTGT		2378
Sbjct 6		GCTGCTT-AGCTG-ATGCACCTGAGTGGCCATATTCAATCATGGGAGCAGTTGGATCTGT		63
Query 2379		GCTGT CAGGTTTCATAGGTC AACCTTTGCCATTGTGATGAGTAATATGATCGATGTATT		2438
Sbjct 64		GCTGT CAGGTTTCATAGGTC AACCTTTGCCATTGTGATGAGTAATATGATCGATGTATT		123
Query 2439		CTATTACAAAGATCTTGCTACTATGGAGAGGAAGACA AAGGAGTTTGTGTT CATGTATAT		2498
Sbjct 124		CTATTACAAAGATCTTGCTACTATGGAGAGGAAGACA AAGGAGTTTGTGTT CATGTATAT		183
Query 2499		TGGAACCGGTCTTTATGCTGTGGTGGCTTATCTTACACAACATATTTCTTCAGTATCAT		2558
Sbjct 184		TGGAACCGGTCTTTATGCTGTGGTGGCTTATCTTACACAACATATTTCTTCAGTATCAT		243
Query 2559		GGGAGAGAATCTCACAACTAGAGTGAGGAGGATGATGCTTGCAGCTATATTGAGGAATGA		2618
Sbjct 244		GGGAGAGAATCTCACAACTAGAGTGAGGAGGATGATGCTTGCAGCTATATTGAGGAATGA		303
Query 2619		AGTTGGGTGGTTCGACGAAGAGGAAAAAATTC AAGTCTCGTTGCAGCTCGCTTGGCCAC		2678
Sbjct 304		AGTTGGGTGGTTCGACGAAGAGGAAAAAATTC AAGTCTCGTTGCAGCTCGCTTGGCCAC		363
Query 2679		AGATGCTGTTGATGTGACATCTGCCATTGCTGAAAGGATCTCAGTGATTCTACAAAAAT		2738
Sbjct 364		AGATGCTGTTGATGTGAAATCTGCCATTGCTGAAAGGATCTCAGTGATTCTACAAAAAT		423
Query 2739		GACGTCACCTCTTACATCATTTATAGTAGCTTTCATAATCGAATGGAGGGTCTCACTACT		2798
Sbjct 424		GACGTCACCTCTTACATCATTTATAGTAGCTTTCATAATCGAATGGAGGGTCTCACTACT		483
Query 2799		CATTCTAGTACTTTCCCTCTTCTTGTGCTTGTCTAATTTTGTCTCAGCAACTATCTCTAAA		2858
Sbjct 484		CATTCTAGTACTTTCCCTCTTCTTGTGCTTGTCTAATTTTGTCTCAGCAACTATCTCTAAA		543
Query 2859		AGGGTTTGTCTGGAGACACCGCAAGGCACATGCA AAGACGAGCATGATTGCAGGGGAAGG		2918
Sbjct 544		AGGGTTTGTCTGGAGACACCGCAAGGCACATGCA AAGACGAGCATGATTGCAGGGGAAGG		603
Query 2919		TGTGAGCAACATCCGAAACGGTAGCTGCCTTCAATGCACAAGACAAGATCCTCTCACTCTT		2978
Sbjct 604		TGTGAGCAACATCCGAAACGGTAGCTGCCTTCAATGCACAAGACAAGATCCTCTCACTCTT		663
Query 2979		TTGTCAAGAACTTCGATTCACAAATTC AAGCCTACGTGGAAGCCAATTTGCAGGATT		3038
Sbjct 664		TTGTCAAGAACTTCGATTCACAAATTC AAGCCTACGTGGAAGCCAATTTGCAGGATT		723
Query 3039		CCTCTATGGTCTTTCCCAACTTGCACCTTACGTATCAGAAGCCCTAATTTTATGGTATGG		3098
Sbjct 724		CCTCTATGGTCTTTCCCAACTTGCACCTTACGTATCAGAAGCCCTAATTTTATGGTATGG		783
Query 3099		-TTCCCACCTAGTGAGTCAAGGTGCATCAACTTTCTC 3134		
Sbjct 784		TTCCCACCTAGTGAGTCAAGGTGCATCAACTTTCTC 820		

**Figura A3.5 Mutación en el vector PDR/AmABCB2.** Se muestra la localización de la sustitución de una citosina en la base 2668 por una adenina generando de esta manera una modificación para la generación de un codón de parada e interrumpiendo de esta manera la correcta traducción de la proteína AmABCB2.



### **Subclonación de AmABCB2 en vector PDR para expresión heteróloga.**

Después de la obtención completa de la secuencia de AmABCB2, se procedió a subclonar en el vector PDR para su expresión heteróloga en levaduras con el fin de confirmar su presunta actividad como un transportador de auxinas. El procedimiento se describe en la sección 2.2.6 y se obtuvo el plásmido pDR/AmABCB2. Sin embargo, el producto generado para la construcción de PDR/AmABCB2 presentó una mutación de C a A que cambió la Ser<sub>889</sub> por un codón de paro y por lo cual no se pudo proseguir con la expresión de la proteína AmABCB2 (Fig. A3.5).

### **Análisis de los resultados.**

Si bien no fue posible la expresión heteróloga de AmABCB2 para confirmar su actividad como transportador de auxinas, se pudo obtener suficiente evidencia para asignar esa posible función y así, descartarlo como un transportador de alcaloides. En primer lugar, AmABCB2 comparte mayores niveles de identidad con otros transportadores de auxinas que con los de alcaloides; 45 vs 86% y se agrupa en un mismo clado con los transportadores de auxinas, diferente al de alcaloides (Fig. 3.2, 3.3 y Fig. A3.1). Además, AmABCB2, mostró todos los elementos típicos de los transportadores ABCB y que incluyen los dominios transmembranales y de unión a nucleótidos (Fig. A3.2 y A3.3).

Es interesante notar que AmABCB2 se expresa preferentemente en pétalos, en el cual no se ha detectado la presencia de sanguinarina (el sustrato de AmABCB1), pero sí de berberina (Vázquez-Flota *et al.* 2018). No obstante, el papel de las auxinas en flores es fundamental en los procesos de desarrollo del botón floral debido a que por ejemplo se ha descrito que AtABCB14 y AtABCB15 de *A. thaliana* participan en la movilización polar de las auxinas en este tejido (Titapiwatanakun & Murphy 2009).

La corrección del error introducido durante la construcción del vector de expresión, será fundamental para poder establecer el papel de este transportador en estos tejidos.

## Referencias

Castrense S, Martell P, Fariselli P, Profiti G, Casadio R (2018) BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Research* 46: 459–466.

Couoh-Uicab Y, Canto-Canché B, Islas-Flores I (2010) Revisión de las características de los transportadores ABC involucrados en patogénesis fúngica. *Tecnociencia Chihuahua* 4:2.

Dhaliwal A, Mohan A, Gill K (2014) Comparative analysis of ABCB1 reveals novel structural and functional conservation between monocots and dicots. *Frontiers in plant science* 5: 657.

Do THT, Martinoia E, Lee Y (2018) Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Current Opinion in Plant Biology* 41: 32-38.

Esser L, Zhou F, Pluchino K, Shiloach J, Ma J, Tang K, Gutierrez C, Zhang A, Shukla S, Madigan J, Zhou T, Kwong P, Ambudkar S, Gottesman M, Xia D (2017) Structures of the Multidrug Transporter P-glycoprotein Reveal Asymmetric ATP Binding and the Mechanism of Polyspecificity. *J Biol Chem* 2: 446-461.

Farooqui T, Farooqui A (2016) Perspective and Directions for Future Research on Trace Amines and Neurological Disorders, in *Trace Amines and Neurological Disorders*.

Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.

Ford R, Marshall-Sabey D, Schuetz J (2020) Linker domains: why ABC transporters ‘live in fragments no longer’. *Trends Biochem Sci* 45:2.

Gutmann D, Ward A, Urbatsch I, Chang G, Van Veen H (2010). Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends in Biochemical Sciences* 16: 36-42.

Hall T (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95.

Henrichs S, Wang B, Fukao Y, Zhu J, Charrier L, Bailly A, Oehring S, Linnert M, Weiwad M, Endler A, Nanni P, Pollmann S, Mancuso S, Schulz A, Geisler M (2012) Regulation of

ABCB1/PGP-1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *The EMBO journal* 31: 13.

Hrycyna C, Airan L, Germann U, Ambudkar S, Pastan I, Gottesman M (1998) Structural flexibility of the linker region of human P-glycoprotein permits ATP hydrolysis and drug transport. *Biochemistry* 37: 39.

Iorizzo M, Ellison S, Senalik D *et al.* (2016) A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature genetics* 48: 657-666.

Jabeen A, Mohamedali A, Ranganathan S (2019) Protocol for Protein Structure Modelling in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*.

Jones D, Taylor W, Thornton J (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Computer Applications in the Biosciences* 8: 275-282.

Kavishe R, Van den Heuvel J, Van de Vegte M, Luty A, Russel F, Koenderink J (2009) Localization of the ATP-binding cassette (ABC) transport proteins PfMRP1, PfMRP2, and PfMDR5 at the *Plasmodium falciparum* plasma membrane. *Malaria Journal* 8: 205.

Kelley L, Mezulis S, Yates C, Wass M, Sternberg M (2015) The Phyre2 web portal for Protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10: 845-858.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGAX: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547-1549.

Loza-Muller L, Shitan N, Yamada Y, Vázquez-Flota F (2021). AmABCB1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana*. *Planta* Submitted.

Mainprize I, Vulcu F, Andrews D (2007) The signal recognition particle and its receptor in ER targeting. *The Enzymes: Molecular machines involved in protein transport across cellular membranes*. 25: 178-182

Nakai K, Imai K (2019) Prediction of Protein Localization in *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology* 2: 53-57.

Noh B, Murphy A, Spalding E (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for

auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell* 1311: 2441-2454.

Nwanyichukwu, P. (2014). Identification and characterization of an adenosine triphosphate binding cassette (ABC) transporter EcABCB1 involved in the transport of alkaloids in *Eschscholzia californica*. Master Thesis. University of Calgary.

Ofori PA, Geisler M, di Donato M, Pengchao H, Otagaki S, Matsumoto S, Shiratake K (2018) Tomato ATP-binding cassette transporter SIABCB4 is involved in auxin transport in the developing fruit. *Plants* 7: 65.

Pelley J (2012) Protein Synthesis and Degradation. Elsevier's Integrated Review Biochemistry (Second Edition). 158-159.

Rubio-Piña J, Vázquez-Flota F (2013) Pharmaceutical applications of the benzyloquinoline alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 13: 2200-2207.

Sato T, Kodan A, Kimura Y, Ueda K, Nakatsu T, Kato H (2009) Functional role of the linker region in purified human P-glycoprotein. *FEBS Journal* 13: 3504-16.

Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 751-756.

Shitan N, Dalmás F, Dan K, Kato N, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2013) Characterization of *Coptis japonica* CjABCB2, an ATP-binding cassette protein involved in alkaloid transport. *Phytochemistry* 91: 109-116.

Shitan N, Terasaka K, Yamamoto H, Sato F, Yazaki K (2015) Two B-type ATP-binding cassette (ABC) transporters localize to the plasma membrane in *Thalictrum minus*. *Plant Biotechnology Journal* 32: 243-247.

Simoncini D, Zhang K (2019) Population-Based Sampling and Fragment-Based De Novo Protein Structure Prediction. *Encyclopedia of Bioinformatics & Computational Biology*.

Titapiwatanakun B, Murphy A (2009) Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins:

cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal of Experimental Botany* 60: 1093-107.

Vazquez-Flota F, Rubio-Piña J, Xool-Tamayo J, Vergara-Olivares M, Tamayo-Ordoñez Y, Monforte-Gonzalez M, Guizar-Gonzalez C, Mirón-López G (2018) Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzylisoquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Revista fitotecnia* 41: 13-21.

Wayne R, Wayne A, Siegel G (2012) Cell Membrane Structures and Functions, in *Basic Neurochemistry*. 8<sup>th</sup> Edition.

Xiao M, Zhang Y, Chen X, Lee E, Barber C, Chakrabarty R, Desgagné-Penix I, Haslam T, Kim Y, Liu E, MacNevin G, Masada-Atsumi S, Reed D, Stout J, Zerbe P, Zhang Y, Bohlmann J, Covello P, De Luca V, Page J, Ro D, Martin V, Facchini P, Sensen C (2013) Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *J. Biotechnol* 166: 122-134.

Xool J, Monforte M, Rubio J, Mirón G, Vázquez F (2016) Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochemistry Letters* 20: 300-305.

Yazaki K, Shitan N, Takamatsu H, Ueda K, Sato F (2001) A novel *Coptis japonica* multidrug-resistant protein preferentially expressed in the alkaloid-accumulating rhizome. *J Exp Bot.* 52: 77-879.