



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES
EN “*ARGEMONE MEXICANA* L”

Tesis que presenta

RAMIRO PÉREZ GONZÁLEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2024

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 Ramiro Pérez González titulado **Caracterización de transportadores de alcaloides en *Argemone mexicana* L.**, fue realizado en la unidad de biología integrativa, en la línea de investigación de Metabolismo integrativo, en el laboratorio 25 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de septiembre de 2024

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.

Firma: _____



Ramiro Pérez González

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “**Los alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción planta ambiente. *Argemone mexicana* como modelo de estudio**”, financiado por el CONAHCYT (**CBF2023-2024-1879**), bajo la dirección del Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y su programa de posgrado en Ciencias Biológicas.

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada (824779) para la realización de mis estudios de maestría y por el financiamiento al proyecto: “Los alcaloides bencilisoquinolínicos en la interacción planta ambiente. *Argemone mexicana* como modelo de estudio” (CBF2023-2024-1879).

Al director de tesis y mentor, el Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota, por enseñarme que siempre hay una mejor manera de hacer las cosas, inspirarme y motivarme con su estoicismo y ayudarme a crecer como persona y profesional.

Al Dr. Armando Muñoz Sánchez por la guía en los asuntos del laboratorio y que nunca me hizo falta material para trabajar.

Al comité tutorial y revisor, integrado por la Dra. Renata Rivera Madrid, el Dr. Jorge Rubio Piña, El Dr. Gregorio Godoy Hernández y a la Dra. Yajaira Tamayo Ordoñez, les agradezco y valoro mucho su tiempo, disposición y consejos para la culminación de este trabajo.

A mi compañero y amigo el Dr. Lloyd Loza Muller, que me ayudó a aprender incontables técnicas, su guía y enseñanza siempre me fueron de utilidad y me mostraron el camino a seguir para alcanzar mis metas.

A la Dra. Laura Rodríguez Piña, por el apoyo con las técnicas en las que no estaba familiarizado, gracias por la paciencia y tu tiempo.

A cada uno de mis compañeros y amigos del laboratorio 25 por el apoyo y la camaradería que nos caracterizan, gracias por las risas, consejos, enseñanzas y, sobre todo, su amistad.

A mi esposa, Edda Gutiérrez Moguel, por su apoyo incondicional, por todo el cariño y motivación que me da, gracias por ayudarme a cumplir mis metas y a ser una mejor persona.

DEDICATORIAS

A mis padres, Delia González Terrones y Ramiro Pérez
Cervantes

son mi inspiración, personas trabajadoras y tenaces que me enseñaron a
aprender.

A mi esposa Edda Abril Gutiérrez Moguel

que siempre me apoya, procura, motiva y gracias a ella soy mejor persona.

A Dios

Por darme la oportunidad de cumplir este logro, darme salud, amor y respaldo.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
LISTADO DE FIGURAS	iii
LISTADO DE TABLAS	v
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES	7
1.1. LAS PLANTAS Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS	7
1.2. ALCALOIDES	8
1.3. ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS	9
1.4. PLANTAS PRODUCTORAS DE ABIS	11
1.5. “ <i>ARGEMONE MEXICANA</i> ”	12
1.6. DISTRIBUCIÓN DE ABIS EN “ <i>A. MEXICANA</i> ”	14
1.7. TRANSPORTE DE SOLUTOS	16
1.7.1. Transporte intracelular	17
1.7.2. Transporte intercelular	18
1.8. TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES	18
1.8.1. Transportadores ABC	19
1.8.2. Transportadores MATE	23
1.8.3. Transportadores PUP	29
1.9. RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES	30
2. JUSTIFICACIÓN	33
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. OBJETIVO GENERAL	33
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	34
6. MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1. MATERIAL BIOLÓGICO	37
6.2. MÉTODOS	37

7.	RESULTADOS IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS	41
7.1.	IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES EN EL TRANSCRIPTOMA DE “ <i>ARGEMONE MEXICANA</i> ”	41
7.2.	SELECCIÓN DE CANDIDATOS A TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES POR ANOTACIÓN FUNCIONAL.....	41
8.	RESULTADOS AISLAMIENTO DE CANDIDATOS AmMATE2-AmMATE5.....	49
8.1.	AISLAMIENTO DE LOS POSIBLES TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES TIPO MATE DE “ <i>A. MEXICANA</i> ”	49
8.2.	AISLAMIENTO DE CDNA DE AmMATES	53
8.2.1.	Transformación de <i>E. coli</i> con AmMATE4 y AmMATE5 y selección de colonias..	57
8.2.2.	Secuenciación de los cDNA correspondientes a las presuntas proteínas MATE de <i>A. mexicana</i>	61
8.2.3.	Síntesis de vectores de entrada con AmMATES.....	67
9.	RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES	69
9.1.	CARACTERIZACIÓN DE LAS PRESUNTAS PROTEÍNAS MATE DE “ <i>A. MEXICANA</i> ” 69	
9.2.	ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TISULAR	70
10.	DISCUSIÓN GENERAL	79
11.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	81
	BIBLIOGRAFÍA.....	83

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Reacciones biosintéticas para la formación de S-escoulerina.....	6
Figura 1.2. <i>Argemone mexicana</i> L.....	8
Figura 1.3. Síntesis a partir de S-escoulerina de sanguinarina y berberina, principales alcaloides de <i>A. mexicana</i>	9
Figura 1.4. Abundancia relativa y distribución de los transcritos para la biosíntesis de alcaloides en tejidos de <i>Argemone mexicana</i>	10
Figura 1.5. Transporte de agua y soluto en raíz.....	12
Figura 1.6. Conglomerados de sitios de fosforilación encontrados en ABCG36 de <i>A. thaliana</i> ...	17
Figura 1.7. Árbol filogenético de familias de proteínas MATE de plantas y procariotas.....	19
Figura 1.8. Representación de listón de CasMATE.....	20
Figura 1.9. Esquema de acceso alternativo en los transportadores MATE.....	20
Figura 5.1. Diagrama de la estrategia experimental seguida en este trabajo.....	26
Figura 7.1. Proporción de proteínas transportadoras encontradas en el transcriptoma XT1.....	33
Figura 7.2. Árbol filogenético para clasificar las proteínas ABC con proteínas de referencia.....	34
Figura 7.3. Arquitecturas predichas en HMMER v3.3.2 de los transportadores candidatos.....	37
Figura 7.4. Árbol filogenético de presuntos AmMATEs contra transportadores MATE que movilizan alcaloides de diferentes especies.....	38
Figura 7.5. Árbol filogenético presuntos AmABCGs contra transportadores ABCG que movilizan alcaloides de diferentes especies.....	39
Figura 8.1. Alineamiento de los AmMATE contra CjMATE, NtJAT1 y NtJAT2.....	42
Figura 8.2. Esquema de AmMATEs frente a sus referencias más cercanas.....	44
Figura 8.3. Gel de agarosa de la primera PCR para el aislamiento de AmMATE4.....	47
Figura 8.4. Gel de agarosa de la primera PCR para el aislamiento de AmMATE5.....	47
Figura 8.5. Distribución tisular y aislamiento de los transcritos correspondientes a las presuntas proteínas AmMATE2 y AmMATE3.....	48
Figura 8.6. Aislamiento de los transcritos correspondientes a las presuntas proteínas AmMATE4 y AmMATE5.....	48
Figura 8.7. Análisis de la presencia de AmMATE5 en las colonias de bacterias transformadas con PCR8/GW/TOPO-AmMATE5.....	49
Figura 8.8. Perfil de digestión de PCR8/GW/TOPO-AmMATE5 con EcoRV.....	50
Figura 8.9. Análisis de la orientación de los insertos en los plásmidos de las colonias.....	51

Figura 8.10. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra la secuencia real obtenida. AmMATE2.....	53
Figura 8.11. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra la secuencia real obtenida. AmMATE3.....	54
Figura 8.12. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra la secuencia real obtenida. AmMATE4.....	55
Figura 8.13. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra la secuencia real obtenida. AmMATE5, región 5'.....	56
Figura 8.14. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra la secuencia real obtenida. AmMATE5, región 3'.....	57
Figura 8.15. Mapa de los plásmidos pUC19-AmMATEs.....	59
Figura 9.1. Patrón de expresión de AmMATEs por RT-PCR a partir de RNA de tejidos de plantas maduras plántulas en desarrollo y suspensiones celulares de <i>A. mexicana</i>	63
Figura 9.2. Modelo tridimensional de la proteína AmMATE5 interactuando con berberina.....	66
Figura 9.3. Análisis de la presencia de posibles serinas fosforilables en las secuencias proteicas de AmMATE4 y AmMATE5.....	68
Figura 9.4. Análisis de hidrofobicidad de las proteínas AmMATE4 y AmMATE5.....	69
Figura 9.5. Esquematización de la localización de los sitios R/KXS y R/KXXS de AmMATE4 y AmMATE5.....	70

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1. ABIs y su distribución tisular en <i>Argemone mexicana</i>	11
Tabla 7.1. Dominios de referencia para la búsqueda de proteínas transportadoras.....	32
Tabla 7.2. Secuencias de transportadores putativos encontradas en el transcriptoma XT1 de las familias ABC, MATE y PUP.....	33
Tabla 7.3. Proteínas ABC clasificadas con su código de color en el árbol filogenético ABC.....	34
Tabla 7.4. Proteínas ABC de referencia con número de accesoión.....	35
Tabla 7.5. Proteínas candidatas a estudio.....	37
Tabla 8.1. Cebadores específicos empleados para la detección de los transcritos de las diferentes presuntas proteínas MATE en tejidos de <i>A. mexicana</i>	43
Tabla 8.2. Condiciones de la PCR para la detección de la presencia tisular de los transcritos de para las presuntas proteínas AmMATE en tejidos de <i>A. mexicana</i>	44
Tabla 8.3. Cebadores utilizados para el aislamiento de los cDNA de las presuntas proteínas AmMATE por PCR.....	45
Tabla 8.4. Condiciones de la PCR para el aislamiento del cDNA de AmMATEs.....	46
Tabla 8.5. Fragmentos para secuenciación AmMATEs.....	52
Tabla 9.1. RNA de tejidos de <i>A. mexicana</i>	62
Tabla 9.2. Distribución tisular de los transportadores MATE de <i>A. mexicana</i>	63
Tabla 9.3. Presuntos aminoácidos que interaccionan con berberina y sanguinarina en las cavidades estudiadas de AmMATE4.....	65
Tabla 9.4. Presuntos aminoácidos que interaccionan con berberina y sanguinarina en las cavidades estudiadas de AmMATE5.....	67

RESUMEN

Argemone mexicana produce alcaloides de tipo bencilisoquinolínicos y se ha observado que la acumulación de éstos difiere con sus sitios de síntesis (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013; Rubio-Piña, 2009), esto sugiere un fenómeno de transporte. Un transportador ABCB capaz de movilizar berberina y sanguinarina fue encontrado, aislado y caracterizado partiendo del transcriptoma de *A. mexicana* (Loza-Muller, *et al.*, 2021), lo que llevó a pensar que existen sistemas de movilización de alcaloides en esta planta y por lo tanto existen más transportadores afines a éstos. En este trabajo se identificaron y caracterizaron posibles transportadores de alcaloides en *A mexicana*. Para ello, se realizó un análisis bioinformático del transcriptoma de plántulas en desarrollo (XT1), que fue comparado contra la base de datos “RefSeq non-redundant proteins” de NCBI. Se identificaron los posibles transportadores mediante la búsqueda de términos dirigida por motivos ocultos de Markov (hmm), identificando los dominios proteicos característicos de tres tipos de proteínas transportadoras; ABC, MATE y PUP encontrándose 870, 102 y 40 candidatos, respectivamente (1012 en total). Acotando la selección de candidatos por subfamilia, completitud y homología, se obtuvieron cuatro candidatos, todos de la familia MATE, denominados AmMATE2 a AmMATE5. Se diseñaron cebadores específicos para cada uno de ellos para su aislamiento a partir de RNA de diferentes tejidos. A partir de plántulas y suspensiones celulares, se obtuvieron fragmentos de 505 y 816 bp para AmMATE2 y AmMATE3 respectivamente y el marco de lectura completo (1443 y 1446 pb) para AmMATE4 y AmMATE5 a partir de raíces para ambos. Adicionalmente, AmMATE5 se pudo aislar del endospermo. Se confirmó la identidad de los candidatos aislados por secuenciación. La distribución tisular de los presuntos transportadores se analizó por PCR punto final y mostró que tanto AmMATE2 como AmMATE3 eran abundantes en plántula y suspensiones celulares, siendo AmMATE3 también abundante en hoja, raíz y cápsula madura. La expresión de AmMATE4 fue escasa en todos los tejidos evaluados y para AmMATE5 se observó principalmente en radículas, suspensiones celulares y cápsula madura. Se generaron modelos 3D para AmMATE4 y AmMATE5 y se examinaron contra berberina y sanguinarina con el paquete CB-Dock2 para identificar los posibles residuos que interactúan con estas moléculas encontrándose 15 posibles cavidades. También se encontraron los dominios aminoacídicos R/KXS o R/KXXS, con alta probabilidad de ser fosforilables. Uno de éstos se encontró embebido en el sitio conservado RVSNELGA para ambas proteínas. Un análisis de hidrofobicidad confirmó que dichos sitios pudieran ser alcanzables por cinasas y se generó un modelo de estas proteínas y sus posibles sitios de regulación del transporte. Por los resultados obtenidos, AmMATE2 podría ser utilizado por la

planta únicamente en ciertas etapas del desarrollo y no de manera continua; para AmMATE3 los resultados nos sugieren que es un transportador ampliamente utilizado en esta planta en todas las etapas de desarrollo; AmMATE4 tiene una expresión prácticamente nula, lo que puede sugerir que este transportador es inducible bajo ciertas condiciones; AmMATE5 parece estar involucrado principalmente en la movilización de sustrato en las raíces, tanto en plántulas como en plantas maduras, en cápsula madura y en suspensiones celulares.

ABSTRACT

Argemone mexicana produces benzylisoquinoline alkaloids and it has been observed that the accumulation of these differs with their synthesis sites (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013; Rubio-Piña, 2009), this suggests a transport phenomenon. An ABCB transporter capable of mobilizing berberine and sanguinarine was found, isolated and characterized based on the transcriptome of *A. mexicana* (Loza-Muller, *et al.*, 2021), which led us to think that there are alkaloid mobilization systems in this plant and therefore there are more transporters affined to them. In this work, potential alkaloid transporters in *A. mexicana* were identified and characterized. To achieve this, a bioinformatic analysis of a transcriptome from developing seedlings (XT1) was performed and compared against the NCBI "RefSeq non-redundant proteins" database. Potential transporters were identified through a hidden Markov model (HMM)-driven search for terms, identifying the characteristic protein domains of three types of transporter proteins: ABC, MATE, and PUP, with 870, 102, and 40 candidates found, respectively (1012 in total). Narrowing the selection of candidates by subfamily, completeness, and homology, four candidates were obtained, all from the MATE family, named AmMATE2 to AmMATE5. Specific primers were designed for each of them to isolate them from RNA of different tissues. From seedlings and cell suspensions, fragments of 505 and 816 bp were obtained for AmMATE2 and AmMATE3, respectively, and the full reading frame (1443 and 1446 bp) for AmMATE4 and AmMATE5 from roots for both. Additionally, AmMATE5 was isolated from the endosperm. The identity of the isolated candidates was confirmed by sequencing. The tissue distribution of the presumptive transporters was analyzed by endpoint PCR and showed that both AmMATE2 and AmMATE3 were abundant in seedlings and cell suspensions, with AmMATE3 also being abundant in leaves, roots and mature capsules. The expression of AmMATE4 was low in all tissues evaluated, and AmMATE5 was observed mainly in radicles, cell suspensions, and mature capsules. 3D models were generated for AmMATE4 and AmMATE5 and examined against berberine and sanguinarine using the CB-Dock2 package to identify possible residues interacting with these molecules, finding 15 potential cavities. Amino acid domains R/KXS or R/KXXS were also found, with a high probability to be phosphorylated. One of them, was embedded in the conserved RVSNELGA site for both proteins. A hydrophobicity analysis confirmed that these sites could be accessible by protein kinases, and a model was generated of these proteins and their possible sites of transport regulation. Based on the results obtained, AmMATE2 could be used by the plant only in certain stages of development and not continuously; For AmMATE3, the results suggest that it is a transporter widely used in this plant at all stages of development; AmMATE4 has practically no expression,

which may suggest that this transporter is inducible under certain conditions; AmMATE5 appears to be mainly involved in substrate mobilization in roots, both in seedlings and mature plants, in mature capsule and in cell suspensions.

INTRODUCCIÓN

Los alcaloides son metabolitos importantes de las plantas ya que les sirven para interactuar con su entorno, pudiendo ser la manera que tienen estas de defenderse contra un herbívoro, una infección bacteriana u otras interacciones con diferentes organismos (Funayama & Cordell, 2014). *Argemone mexicana* es una planta utilizada en la medicina tradicional mexicana que posee la capacidad de producir alcaloides de tipo bencilisoquinolínicos y tiene la particularidad de tener 2 alcaloides mayoritarios que pocas veces convergen en la misma planta, que son berberina, de la subfamilia de las protoberberinas y sanguinarina de la subfamilia de las benzofenantridinas (Piña-Rubio & Vázquez-Flota, 2013).

En estudios previos se ha observado la acumulación de estos alcaloides en diferentes tejidos, siendo las semillas maduras y las raíces más abundantes en sanguinarina, la berberina por su parte, está presente en toda la planta excepto en semillas maduras (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013; Rubio-Piña, 2009). Así mismo se analizó la abundancia y distribución de los transcritos para la biosíntesis de estos alcaloides y se descubrió que hay discrepancias entre la distribución de estos y de los alcaloides biosintetizados (Vázquez-Flota, *et al.*, 2018). Esta estrategia es usada comúnmente entre las plantas que producen alcaloides para evitar la toxicidad de estas moléculas y la evidencia sugiere que *A. mexicana* no es la excepción, esto a su vez requiere de un fenómeno de transporte que movilice estas moléculas a través de diferentes tipos celulares o incluso entre los tejidos (Shitan and Yazaki 2007; Verma et al. 2012).

Recientemente se logró identificar y caracterizar una proteína capaz de movilizar alcaloides bencilisoquinolínicos partiendo del análisis del transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* (Loza-Muller, 2021) y se encontraron otros posibles candidatos a transportadores de alcaloides por lo que este trabajo se enfoca en identificar y caracterizar estos candidatos.

MARCO TEÓRICO Y ANTECEDENTES

1.1. LAS PLANTAS Y SUS METABOLITOS SECUNDARIOS

Las plantas terrestres están sujetas al suelo, sin posibilidad de moverse para defenderse. Por ello han desarrollado mecanismos de respuesta a las condiciones adversas que enfrentan y que les ayudan a adaptarse a las mismas. Algunas de éstas se basan en rutas metabólicas especializadas completas que forman el metabolismo secundario y que son capaces de producir sustancias que les sirven para interactuar con el medio, defenderse de infecciones, deshacerse de la competencia o persuadir herbívoros (Funayama & Cordell, 2014).

Cuando se producen heridas por la depredación por insectos o por el daño mecánico inducido por factores físicos, se genera una respuesta de defensa de la planta. Esta involucra la activación transcripcional para la formación de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de una invasión de microorganismos patógenos (Jiménez, Ducoing & Sosa, 2003). Estos genes codifican para proteínas involucradas en:

- La fortificación de la pared celular, como son la formación de calosa, lignina y las proteínas ricas en hidroxiprolina.
- La producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas.
- La biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana y/o antioxidante (Peña-Cortés & Willmitzer, 1995).

Los metabolitos secundarios se clasifican en las siguientes familias de moléculas: terpenos, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados (alcaloides) y glucósidos.

- Terpenos: Se derivan de la unión de unidades de isopreno y suelen ser insolubles en agua, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios contando con más de 40,000 moléculas diferentes (Jiménez, Ducoing & Sosa, 2003). En conjunción con otros compuestos como las oxilipinas y los indoles forman mezclas que se volatilizan y funcionan como señales químicas para atraer enemigos naturales de los insectos herbívoros cuya saliva es el inductor para la producción de estos compuestos (Paiva, 2000; Pare y Tumlinson, 1998; Shen et al., 2000).
- Compuestos fenólicos: Derivan y cuentan con un grupo fenol en su estructura, son un grupo muy diverso y existen dos rutas básicas implicada en la biosíntesis de estos

compuestos, la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. Esta última es responsable de la mayoría de la biosíntesis de compuestos fenólicos en plantas, a partir de eritrosa 4P y de fosfoenolpiruvato se inicia una secuencia de reacciones que conducen a la biosíntesis de ácido shikímico y derivados de este, aminoácidos aromáticos. Pelargonidina, cianidina y delphinidina son antocianinas que están presentes flores de geranio, rosa y delphinium respectivamente y aportan sus colores tan llamativos; su color depende del número de grupos hidroxilo y metoxilo en el anillo B y del pH de las vacuolas en las que se almacenan (Ávalos, 2009).

- Glucósidos: Deben su nombre al enlace glucosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de particular interés y son las saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Las saponinas son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura lo que le da propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón. En los glicósidos cardiacos uno de los más conocidos es la digitoxina, su estructura contiene una lactona, estas moléculas cuentan con actividad biológica en los tejidos cardiacos incrementando la fuerza y la velocidad de las contracciones cardiacas (Cucurella, 2002). Los cianogénicos son compuestos nitrogenados que no son tóxicos, pero cuando la planta sufre algún estrés mecánico, se degradan y se liberan sustancias volátiles tóxicas como el cianuro de hidrógeno, un ejemplo de estos compuestos es la amigdalina. Los tubérculos de madioca o yuca son conocidos por ser ricos en glicósidos cianogénicos.
- Alcaloides: Son una familia de más de 20,000 compuestos heterocíclicos que son generalmente sintetizados a partir de aminoácidos como triptofano, tirosina, fenilalanina, lisina, arginina y ornitina. Suelen tener una alta actividad biológica y esto se debe a su parecido químico con moléculas que participan en la señalización del sistema nervioso, transducciones de señales neuronales y canales iónicos de vertebrados e insectos (Jiménez, Ducoing & Sosa, 2003); también pueden inhibir el crecimiento bacteriano ya que cuentan con la capacidad de intercalarse con el DNA, detener la biosíntesis proteica, inducir apoptosis e inhibir enzimas del metabolismo de carbohidratos (Wink & Shimmer, 1999).

1.2. ALCALOIDES

Los alcaloides son compuestos nitrogenados, solubles en agua y con actividad biológica. En su mayoría son heterocíclicos, aunque también los hay alifáticos. Se encuentran en el 14% de la

flora del mundo (Aniszewski-Tadeusz, 2015). A pH citosólico y vacuolar (7.2 y 5-6 respectivamente) su nitrógeno está protonado lo que les confiere un carácter alcalino, de lo que deriva su nombre (Ávalos, 2009).

Los alcaloides pueden ser clasificados en términos de su:

- Actividad biológica y ecológica
 - Moléculas neutras o débilmente básicas
 - Alcaloides derivados de animales
 - Alcaloides marinos
 - Alcaloides de musgos
 - Alcaloides de hongos y bacterias
 - Alcaloides no naturales
- Relación a innovación química y tecnológica
 - Alcaloides naturales
 - Alcaloides biomiméticos y biónicos
 - Alcaloides sintéticos
- Estructura química: se dividen en diferentes tipos de acuerdo con su estructura química pura apuntando primero a la base del alcaloide.
- Ruta biosintética
 - Alcaloides verdaderos: Son derivados de aminoácidos y comparten un anillo heterocíclico con N.
 - Protoalcaloides: compuestos en los cuales el átomo de N derivado de un aminoácido no es parte del enlace del heterociclo.
 - Pseudoalcaloides: compuestos básicos con esqueletos de carbono que no son derivados de aminoácidos. Están conectados con rutas de aminoácidos.

1.3. ALCALOIDES BENCILISOQUINOLÍNICOS

Son alcaloides derivados de la tirosina, de dos de ellas para ser exactos (**Fig. 1.1**), que se condensan formando un intermediario central común para todos los ABIs (S-norcoclaurina) y posteriormente que da lugar a los diferentes subgrupos que incluyen a las benzofenantridinas como la sanguinarina y la macarpina (Mueller, *et al.*, 1993), los alcaloides protoberberina como la berberina y la palmitina (Hashimoto & Yamada, 1994) y los alcaloides morfinaños como la morfina y la codeína (Rueffer & Zenk, 1987). Son un grupo de más de 2500 estructuras ya

elucidadas, se caracterizan por tener un esqueleto carbonado básico que proviene de un enlace entre un anillo isoquinolínico y otro bencílico (Facchini *et al.*, 2000), este anillo isoquinolínico está formado a su vez de la fusión de un anillo de benceno y un anillo de piridina que comparten 2 átomos de carbono, unido a este anillo hay otro grupo bencil. Los ABIs como la sanguinarina y la berberina tienen múltiples propiedades farmacológicas potentes como antibiótico contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, así como también bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013).

A partir de la S-reticulina se puede realizar la biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos simples (papaverina), b) tipo protoberberina (berberina), c) tipo benzofenantidrina (sanguinerina), d) morfina (morfina), e) aporfina (magnoflorina) y f) tipo isoquinolina de ftalida (noscapina) (De la Cruz-Chacón, González-Esquinca & Riley-Saldaña, 2012).

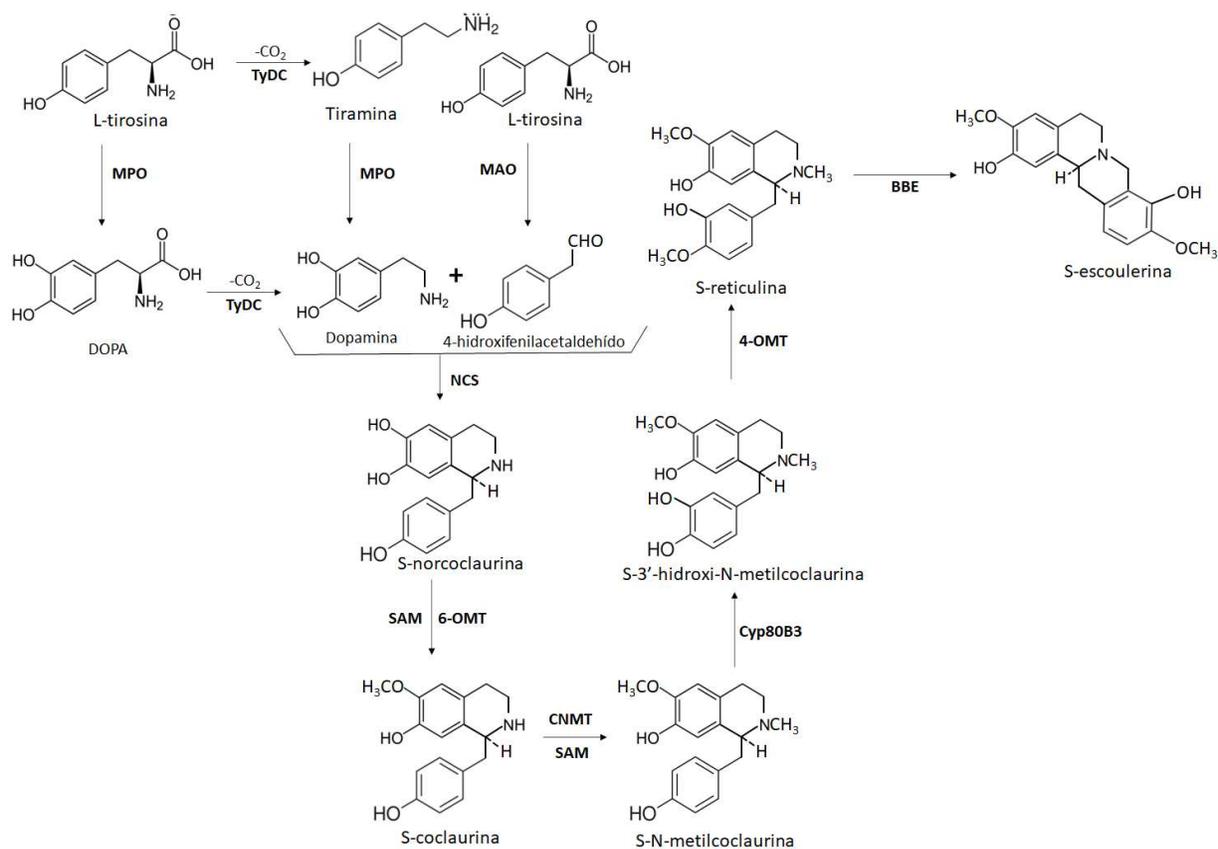


Figura 1.1. Reacciones biosintéticas para la formación de S-escoulerina. Estas reacciones son comunes para la síntesis de diferentes tipos de alcaloides bencilisoquinolínicos. Modificada de Rubio-piña, Vázquez-Flota, 2013. **BBE**, berberine bridge enzyme; **CNMT**, coclaurine N-metiltransferase; **Cyp80B3**, N-metilcoclaurine 3-hydroxylase; **DOPA**, L-3,4-dihydroxyphenylalanine; **MAO**, monoamine oxidase; **MPO**,

monophenol oxidase **NCS**, norcoclaurine synthase; **4-OMT**, 3'-hydroxy-N-metilcoclaurine 4'-metiltransferase; **6-OMT**, norcoclaurine 6-O-metiltransferase; **SAM**, S-adenosylmethionine; **TyDC**, tyrosine decarboxylase; **TyHO**, tyrosine hidroxilase.

1.4. PLANTAS PRODUCTORAS DE ABIS

Según Hegnauer se define a las plantas alcaloideas como aquellas especies que contienen más de 0.01% de alcaloides (Waterman, 1999). Los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) se han encontrado en variedad de especies de los superórdenes Magnoliflorae y Ranunculiflorae (angiospermas), también hay evidencia de la presencia de algunos ABIs como benzofenantridina y 1-bencilisoquinolina en gimnospermas (Hagel, *et al.*, 2013; Minami, *et al.*, 2008; Ziegler, *et al.*, 2008; Xu & Lin, 1999). En la subclase Magnoliidae se encuentran las familias Annonaceae, Berberidaceae, Hernandiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Nelumbonaceae, Ranunculaceae y Papaveraceae. También se encuentran en las familias Cornaceae, Rutaceae y en mucha menor medida en las del orden de las Piperales como Aristolochiaceae y Piperaceae (Liscombe *et al.* 2008; Hagel *et al.* 2013). En las familias Annonaceae, Magnoliaceae y Menispermaceae se han identificado principalmente ABIs tipo protoberberina, mientras que en la Berberidaceae y Ranunculaceae además de la presencia de protoberberina se pueden detectar protopinas. En la familia de las Papaveraceae se han identificado protoberberinas, protopinas y benzofenantidrininas (Liscombe *et al.* 2008).

No porque una familia acumule un tipo de ABI tiene que acumular necesariamente otros. Su distribución es difícil de predecir. Por ejemplo, las Papaveraceae acumulan predominantemente alcaloides de los tipos benzofenantridina y morfina, pero no los del tipo protoberberina que, comúnmente, se encuentra en las familias Berberidaceae y Ranunculaceae las que, a su vez, producen benzofenantridinas. De este modo, aunque las benzofenantridinas y protoberberinas pueden coincidir en una misma especie, en pocas ocasiones se ambos son acumulados en cantidades importantes ya que generalmente solo una de ellos predomina ocasionalmente (Liscombe *et al.* 2008).

Algunas plantas productoras de alcaloides se han estudiado para construir un plano bioquímico de la biosíntesis de ABIs (De la Cruz-Chacón, González-Esquinca & Riley-Saldaña, 2012), estas plantas son *Argemone mexicana*, *Berberis stolonifera*, *B. beaniana*, *B. canadiensis*, *Coptis japonica*, *Corydalis vaginans*, *Eschscholzia californica*, *Papaver somniferum*, *P. bracteatum*, *Thalictrum flavum*, *T. tuberosum*, *T. bulgaricum*, *Tinospora caffra*, *T. cordifolia* y *Sanguinaria canadense*. *Argemone mexicana* es un caso particular y digno de estudio ya que es capaz de

acumular dos tipos de alcaloides que raramente convergen en cantidades significativas; benzofenantridinas, como la sanguinarina, y protoberberinas como la berberina.

1.5. “ARGEMONE MEXICANA”

Esta planta originaria de del suroeste de Estados Unidos y el norte de México, pero, su distribución alcanza Sudamérica y las islas del caribe. Ha sido introducida en múltiples partes del mundo como Australia, España, India y otras partes del sudeste asiático como también en África donde representa un serio problema como maleza (Schwarzbach & Kadereit, 1999; Parsons & Cuthbertson, 1992).

Argemone mexicana es una planta anual, herbácea de entre 40 y 100 cm de altura. De color glauco o verdoso, con nervios blanquecinos, tallos más o menos aculeados, produce látex amarillo, sus hojas son caulinares sésiles, oblongas u obovadas con bordes irregularmente dentados espinescentes y con 3-6 pares de lóbulos. Las flores terminales, por lo general tienen corola de color amarillo, raro blanco, el fruto es oblongo, elíptico, ovoideo, fusiforme o aculeado. Las semillas son globosas de aproximadamente 2 mm de diámetro (Rzedowski, 1991).



Figura 1.2. *Argemone mexicana* L.

Es usada en la medicina tradicional mexicana para diferentes afecciones (Piña-Rubio & Vázquez-Flota, 2013) como las cataratas oculares, para aliviar la fiebre, su usaba como purgante, contra la sarna y otras afecciones cutáneas (Laines-Hidalgo, 2019). Tiene propiedades antimicrobianas, antiparasitarias, antimalárica, pesticidas, neurológicas y citotoxicidad esto es debido a los más

de 25 alcaloides bencilisoquinolínicos (ABIs) que posee los cuales asumen un papel defensivo para la planta (Piña-Rubio & Vázquez-Flota, 2013).

Berberina y sanguinarina (**Figura 1.3**) son dos ABIs presentes en *Argemone*, mientras que sanguinarina solo se encuentra en la raíz y semillas de las plantas maduras, berberina se encuentra tanto en las partes aéreas como en las raíces (Brahmachari, 2013). Los ABIs en concentraciones elevadas son tóxicos para las células por lo que las plantas productoras de alcaloides han adoptado una estrategia común para evitar este proceso: separando la biosíntesis y la acumulación final de estos compuestos en diferentes tejidos o compartimentos (Loza-Muller, *et al.*, 2021) lo que necesariamente involucra un proceso de transporte.

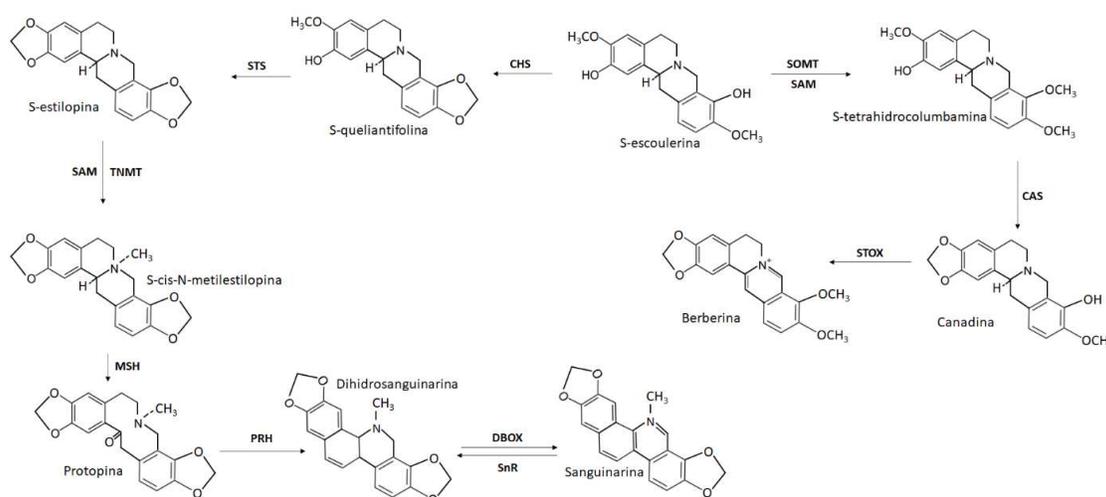


Figura 1.3. Biosíntesis a partir de S-escoulerina de sanguinarina y Berberina, principales alcaloides de *A. mexicana*. Tomado de Rubio-piña, Vázquez-Flota, 2013. **CAS**, canadine synthase; **CHS**, chelanthifoline synthase; **DBO**, dihydrobenzophenanthridine oxidase; **MSH**, N-methylstylopine 14-hydroxylase; **PRH**, protopine 6-hydroxylase; **SAM**, S-adenosylmethionine; **SnR**, sanguinarine reductase; **SOMT**, S-scoulerine N-methyl-9-O-transferase; **STOX**, S-tetrahydroprotoberberine oxidase; **STS**, stylopine synthase; **TNMT**, tetrahydroprotoberberine cis-N-methyltransferase.

1.6. DISTRIBUCIÓN DE ABIS EN “*A. MEXICANA*”

La reticulina, protopina, alocriptopina, criptopina, berberina y queleritrina se localizan en hoja, tallo, cápsula, látex y raíz en plántulas de dos meses de edad; sanguinarina fue encontrada únicamente en la raíz (Chávez, *et al.*, 2011; Xool-Tamayo, 2016). Cuando las radículas emergen durante la germinación de plántulas de *A. mexicana* se puede detectar la acumulación de sanguinarina y cuando se despliegan los cotiledones, a los 18 días se puede detectar la presencia de berberina (Xool-Tamayo, 2016). Conforme se desarrollan las plántulas, estos alcaloides se acumulan en mayor cantidad (Rubio-Piña, 2009), por lo que se sugirió que se necesita la parte aérea para la acumulación de berberina, pero no necesariamente para la sanguinarina (Xool-Tamayo, 2016). En plantas adultas se estudió la acumulación de estos alcaloides y se muestra que la berberina se acumula en la mayoría de los tejidos mientras que la sanguinarina se acumula únicamente en raíz y en semillas maduras (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013; Rubio-Piña, 2009).

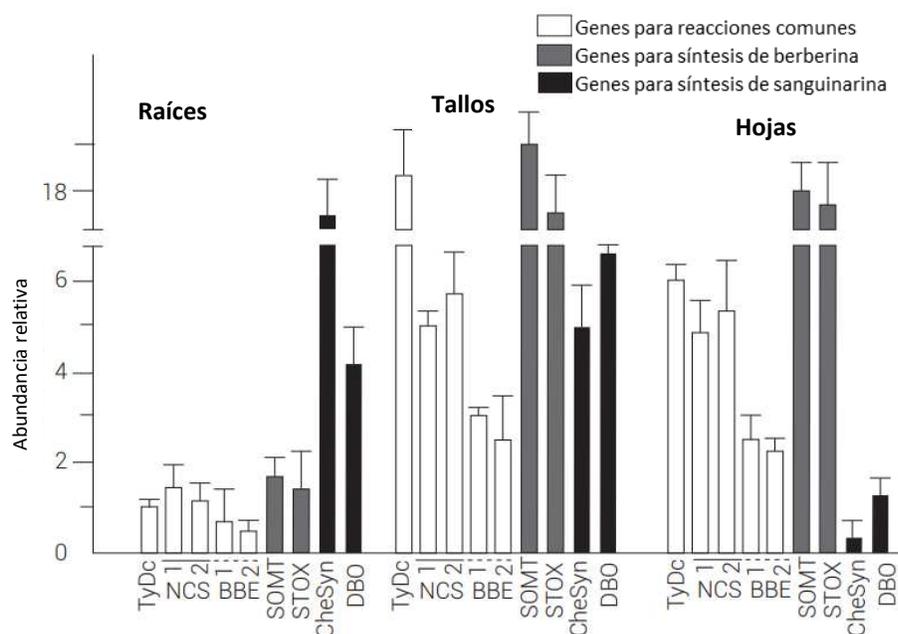


Figura 1.4. Abundancia relativa y distribución de los transcritos para la biosíntesis de alcaloides en tejidos de *Argemone mexicana* tomado de Vázquez-Flota y colaboradores, 2018.

Tabla 1.1. ABIs y su distribución tisular en *Argemone mexicana* tomado de Xool-Tamayo, 2016.

ABIs	Tejidos en los que se encuentran
Berberina	Parte epigeal y semilla
Dihidroquelantifolina	Planta entera
Dihidrocoridalmina	Planta entera
Culombamina	Planta entera
(+)-Reticulina	Parte apigeal y parte aérea
Protopina	Parte apigeal, semillas y raíces
Alocriptopina	Parte apigeal y raíz
Criptopina	Planta entera
13-oxoprotopina	Parte aérea
(-)-quelantifolina	Parte apigeal
Estilopina	Planta entera
Nor-sanguinarina	Planta entera
Queleritrina	Planta entera
Sanguinarina	Raíz y semillas
Oxiberberina	Planta entera
N-demetiloxisanguinarina	Parte aérea
Nor-queleritrina	Planta entera
(±)-6-acetonil dihidroqueleritrina	Planta entera
Dihidosanguinarina	Semillas
Dihidroqueleritrina	Tejidos
8-acetonil dihidrosanguinarina	Planta entera
8-metoxi dihidrosanguinarina	Parte aérea
Hidróxido de dihidropalmitina	Semillas

Como se muestra en la Tabla 1.1 y en la figura 1.4 los niveles de acumulación de berberina y sanguinarina en un tejido dado, no coinciden con los niveles de expresión de los transcritos involucrados en su biosíntesis en esos tejidos. Lo anterior sugiere que algún fenómeno de

transporte ocurre entre los tejidos que le dan origen biosintético a los alcaloides y los tejidos que están destinados a almacenarlos.

1.7. TRANSPORTE DE SOLUTOS

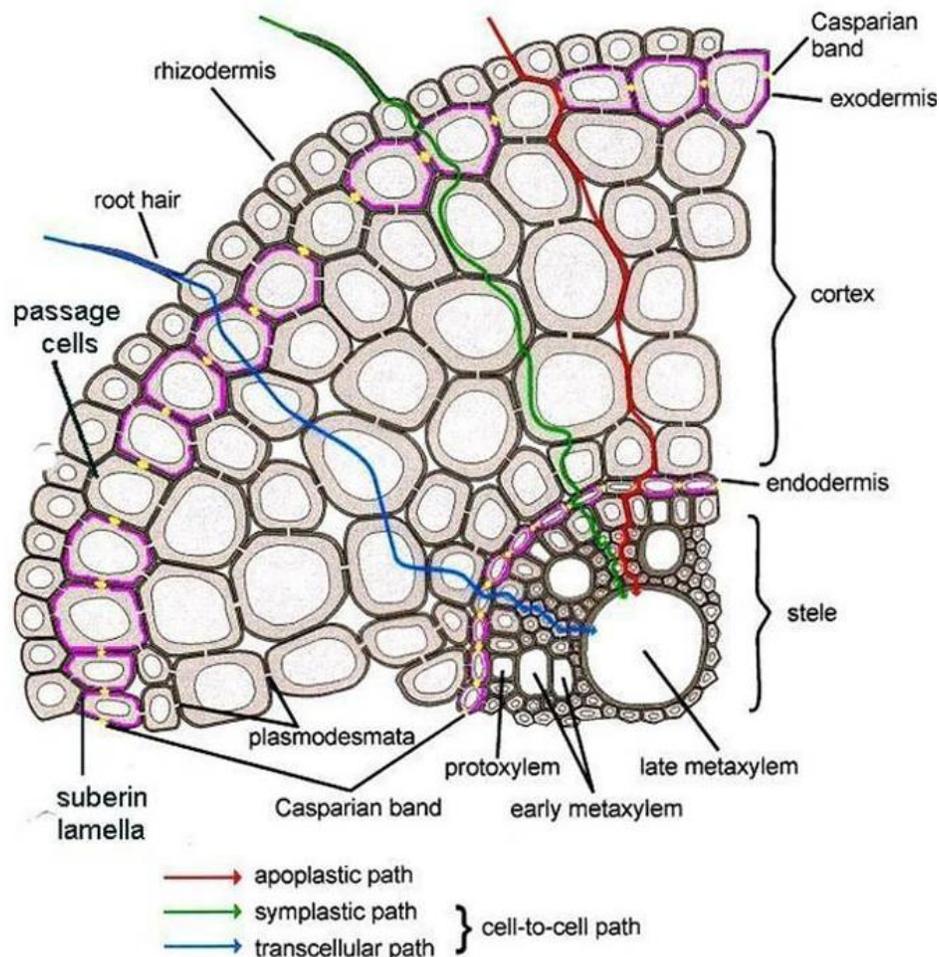


Figura 1.5. Transporte de agua y soluto en Raíz tomado de Kim y colaboradores, 2018.

El transporte de agua y solutos en las raíces está mediado por un gradiente en la presión hidrostática generada por la evaporación de agua en las hojas y cuando no está presente esta transpiración, el bombeo activo de nutrientes e iones en el xilema provoca un flujo osmótico de agua y una acumulación de presión en la raíz en la cual esta última actúa como osmómetro en vez de sólo resistir hidráulico (Steudle, 2000; Kim *et al.*, 2018).

Existen tres rutas principales que el agua y solutos puede tomar para ser transportados en la planta, estas rutas pueden involucrar transporte intracelular o no, y se pueden combinar dependiendo del soluto en cuestión.

La ruta apoplástica (línea roja en la Figura 1.5) es la que toma un soluto que se desplaza en medio de las paredes celulares, no atraviesa ninguna membrana plasmática para continuar por lo que es la menos selectiva de todas, está impedida por gran parte de la circunferencia de las raíces por las bandas de Casparian y las laminillas de suberina en la exodermis y endodermis. La ruta simplástica (línea verde en la Figura 1.5) es cuando el soluto atraviesa la pared celular y se desplaza a través del simplasto utilizando los plasmodesmata. La última ruta es llamada transcelular y es en la que el soluto entra a la pared de las células más externas y se introduce al citoplasma de la célula donde puede ser metabolizado o censado por las proteínas específicas e inducir una respuesta (Kim *et al.*, 2018).

1.7.1. Transporte intracelular

Los metabolitos dentro de la célula se pueden transportar de distintas maneras, una de ellas es por difusión, en la que estos se mueven aleatoriamente por el citosol sin rumbo fijo hasta que se encuentran otra molécula con la cual interaccionar. La frecuencia de estas interacciones depende de la concentración de las moléculas involucradas, en este caso depende de la polaridad del metabolito en cuestión para que atraviese la membrana de organelos como vacuola, peroxisoma, u otras vesículas intracelulares en las que pueden ser transformados, degradados o aprovechados (Shitan & Yazaki 2007, 2003).

Algunos metabolitos son citotóxicos o producen compuestos que lo son al reaccionar con otras moléculas en el citosol, por lo que su síntesis o procesamiento se confinan en compartimentos específicos de la célula, como vacuola o retículo endoplásmico; debido a esto, es necesario que se transporten dentro de vesículas para ir de un organelo a otro o al exterior del citosol (Shitan & Yazaki 2007, 2003; Walker, *et al.*, 2003). En las plantas, al contrario de las células animales se utilizan principalmente filamentos de actina para el transporte membranal de estas vesículas, lo que se refleja en la considerable expansión de los motores de tipo V de miosina (13 genes) en el genoma de *Arabidopsis* en comparación con otros organismos (Reddy & Day, 2001; Vale, 2003).

También existen proteínas de membrana en organelos que facilitan el movimiento de metabolitos específicos dentro y fuera de estos espacios confinados por membranas, las cuales pueden cumplir una función de almacenamiento en caso de necesitar grandes cantidades de esta molécula en una situación de estrés específica para una respuesta rápida (Perry *et al.*, 2006). Ejemplos para este tipo de transporte son las proteínas MATE (Multi-drug And Toxic compound

Extrusion) NtMATE1 y NtMATE2 encargados de movilizar nicotina al interior de la vacuola de raíces de *Nicotiana tabacum* (Shoji *et al.*, 2009), MtMATE2 que media el secuestro vacuolar de glucósidos flavonoides y malonatos en hojas y flores de *Medicago truncatula* (Zhao *et al.*, 2011).

1.7.2. Transporte intercelular

En respuesta a un estímulo, las células vegetales pueden sintetizar o liberar ciertos compuestos que le ayudan a defenderse ante una amenaza, a veces las células encargadas de biosintetizar estos compuestos no son las mismas en donde se almacenan, o se necesitan en un momento dado por lo que existe un flujo de estas sustancias de unas células a otras o de un tejido a otro.

Se sabe poco sobre los mecanismos moleculares exactos para el tráfico de fitoquímicos (Walker *et al.*, 2003), sin embargo, se ha visto un transporte de citrato malato y ácidos orgánicos relacionados en exudados de raíz en respuesta a altas concentraciones de Al^{3+} en maíz y trigo (Ma, Ryan & Delhaize, 2001).

Se han observado vesículas que contienen compuestos autofluorescentes verdes en células de maíz que expresan ectópicamente el regulador P de la biosíntesis de 3-desoxi flavonoides (Grotewold *et al.*, 1998). Basado en observaciones de fluorescencia verde dentro de las regiones específicas del RE después del tratamiento con brefeldina A, es probable que estas vesículas tengan su origen ahí; las vesículas se fusionan y forman grandes cuerpos fluorescentes verdes que migran a la superficie de la célula y se fusionan con la membrana celular para liberar el compuesto verde fluorescente a la pared celular (Grotewold *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 2003).

El flujo de metabolitos hacia dentro o fuera de la célula también suele estar mediado por proteínas de membrana que sirven como puertas selectivas para compuestos específicos (Stillwell, 2016). Un ejemplo de este tipo de transporte es el caso de la berberina en *Coptis japonica* que es movilizada fuera de la célula por un transportador tipo ABC (ATP-Binding Cassette) que funciona como una bomba energizada por ATP que excreta este alcaloide fuera de las células (Otani *et al.*, 2005; Shitan, 2007, 2013).

1.8. TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES

Los alcaloides tienen que ser almacenados para que estén disponibles cuando se les necesite y para evitar sus efectos tóxicos. Comúnmente diferentes tejidos se encargan de su biosíntesis y de su acumulación, lo que sugiere la operación de sistemas en la célula que se encargan de transportar estas moléculas entre organelos o tejidos para poder desempeñar su función (Shitan

and Yazaki 2007; Verma et al. 2012). Se sabe por ejemplo que *Argemone* importa sanguinarina hacia sus semillas desde un tejido diferente como las hojas, el tallo o el pericarpio ya que estos tejidos expresan la maquinaria biosintética de sanguinarina, pero no hay acumulación de esta en ellos (Vázquez-Flota *et al.*, 2018).

Se han propuesto tres distintos mecanismos para el transporte de alcaloides: difusión simple seguido de atrapamiento de membrana, transporte membranal mediado por transportador y transporte mediado por vesícula (Shitan & Yazaki 2007, 2003).

Se piensa que los alcaloides son capaces de penetrar la membrana del tonoplasto por difusión simple de manera limitada, una vez incorporados a la vacuola son protonados fácilmente en el lumen ácido, volviéndose hidrofílicos e impermeables a la membrana (Matile, 1976). Se han descubierto proteínas de membrana, tanto en vacuola como en membrana plasmática que median activamente el transporte de alcaloides (Morita, *et al.*, 2009; Shoji *et al.*, 2009; Shitan *et al.*, 2014). También se han observado por microscopía pequeñas vesículas que contienen alcaloides que se cree que entregan alcaloides a la vacuola por fusión de los compartimentos membranosos, aunque no se tiene claro el origen de las vesículas ni como se incorporan los alcaloides a estas (Shitan, 2014).

De acuerdo con su estructura primaria y método de energización, los transportadores en plantas son clasificados en cinco familias: los casets de unión al ATP (ABC), facilitadores mayores (MFS), extrusión de multidroga y compuestos tóxicos (MATE), pequeña resistencia a multidroga (SMR) y división celular de nodulación de resistencia (RND) (Shoji, *et al.*, 2014).

Se han identificado por aproximaciones moleculares y celulares que en plantas productoras de alcaloides las familias de proteínas que los movilizan son las ABC (ATP-binding cassette), MATE (Multidrug and toxic compound extrusión) y PUP (Purine Permease. Se han encontrado firmas de estos transportadores en el transcriptoma XT1 de *A. mexicana* y se han aislado de sus semillas transportadores ABC de la subfamilia B que se probó transportaban sanguinarina (Loza-Muller, *et al.*, 2021).

1.8.1. Transportadores ABC

Los transportadores ATP-Binding Cassette (ABC) son una superfamilia de proteínas de membrana con miembros de tamaño completo (4 dominios), medio tamaño (2 dominios) y algunas proteínas solubles, todas ellas importan y exportan diversas moléculas a través de la

membrana usando energía en forma de ATP, además tienen firmas “Walker A” y “Walker B” y los motivos “H loop” y “Q loop” que son altamente conservadas. Tienen subfamilias de la ABCA a la ABCI, la subfamilia ABCH está ausente en plantas (Sharom, *et al.*, 2011). Para que una proteína ABC sea funcional tiene que tener un tamaño completo el cual consta de dos dominios transmembranales embebidos en una membrana biológica (TMD) y dos dominios de unión al ATP (NBD) arreglados en orden: TMD-NBD-TMD-NBD en la mayoría de los casos o en el orden reverso (NBD-TMD-NBD-TMD) como en la subfamilia ABCG, por lo que es necesario que las de mitad de tamaño formen homo- o heterodímeros para realizar la función de transporte (Shoji, *et al.*, 2014).

Los transportadores ABC de plantas se dividen en subfamilias de la A a la I, la subfamilia H no ha sido identificada en organismos vegetales y la subfamilia I es exclusivo de estos, esta clasificación es consistente con la Organización del Genoma Humano (HUGO, por sus siglas en inglés) (Lane, *et al.* 2016). El sistema de clasificación más ampliamente usado para subfamilias de transportadores ABC en plantas se basa en la solubilidad de la proteína, presencia de TMDs, función, y secuencia de aminoácidos (Verrier, *et al.* 2008).

Los miembros de las subfamilias ABCF y ABCE son proteínas solubles carentes de TMDs y a pesar de ser llamadas “transportadoras” carecen de cualquier fenómeno de transporte (Verrier, *et al.* 2008).

Existen diferencias significativas entre el número de miembros únicos de genes transportadores ABC entre algas, briófitas, licófitas, helechos, coníferas y angiospermas (Lane, *et al.*, 2016). El número de estas proteínas muestra poca diferencia significativa entre las plantas cuando hablamos de las subfamilias ABCD, ABCE y ABCI, en cambio, la diversidad de las proteínas ABCB y ABCF, conocidas por su capacidad de desintoxicación y resistencia al estrés, respectivamente, son genes atractivos para analizar con el fin de mejorar los cultivos mediante la biotecnología (Lane, *et al.*, 2016). Lane y colaboradores encontraron en un análisis de transcriptomas que las plantas terrestres tenían más miembros únicos del gen transportador ABCB, ABCC y ABCG en promedio ($p < 0,005$), y las algas verdes, las algas rojas y las briofitas tenían significativamente más miembros del gen transportador ABCF ($p < 0,005$). Los helechos tenían significativamente menos miembros del gen transportador ABCA que todos los demás grupos de plantas ($p < 0,005$).

Los transportadores ABC están involucradas en distintos procesos de transporte abarcando transporte de alcaloides, flavonoides, diterpenos, estrigolactonas, de metales pesados como Cd, Pb y Al, controlan la homeostasis del Fe, participan en la formación de la cutícula y confieren resistencia tanto a metales pesados como los ya mencionados, como a antibióticos y herbicidas (Shoji, 2014). Se conoce que las subfamilias ABCB y ABCG son transportadoras de alcaloides (Shitan, *et al.*, 2014). Y se ha descrito esta función en plantas como *Argemone mexicana*, *Catharanthus roseus*, *Coptis japonica* y *Thalictrum minus* (Loza-Muller, 2021; Shitan, 2015; Shitan, 2013; Yu & De Luca, 2013).

Varios modelos de mecanismos de transporte ABC han sido propuestos con base en datos estructurales y bioquímicos, en particular los modelos de "sitio alterno" (Senior, Al-Shawi & Urbatsch, 1995), "interruptor" (Higgins & Linton, 2004) y "contacto constante" (Sauna, *et al.*, 2007; Siarheyeva, Liu & Sharom 2010). Todos estos modelos comparten pasos elementales, como la dimerización NBD dependiente de ATP y el cambio de conformaciones del TMD entre orientadas hacia afuera y hacia adentro, los modelos divergen con respecto a algunos de los detalles del mecanismo. Sin embargo, cabe señalar que hay poca evidencia que sugiera que todos los transportadores ABC funcionen mediante el mismo mecanismo (Wilkins, 2015).

En el estudio de Terasaka y colaboradores en 2003 con *Thalictrum minus*, se observó que el eflujo de berberina endógena era muy sensible a inhibidores de ATPasa de membrana lo que sugiere que el transporte de berberina en cultivos celulares de esta planta puede estar mediado por transportadores de tipo ABC localizado en la membrana plasmática.

Es común que los transportadores ABC, estén sujetos a regulaciones postraduccionales como la fosforilación (Stolarczyk, Reiling & Paumi, 2011). Se identificaron en ABCG36, una proteína de membrana plasmática en *Arabidopsis thaliana* que actúa como exportador de compuestos indólicos y camalexina (Aryal, *et al.*, 2022) dos conglomerados de sitios de fosforilación ubicados antes de los NBD1 y NBD2 en los que se pueden observar sitios R/KXS y R/KXXS que son funcionalmente relevantes para la actividad de transporte (Aryal, *et al.*, 2022; Underwood and Somerville, 2017).

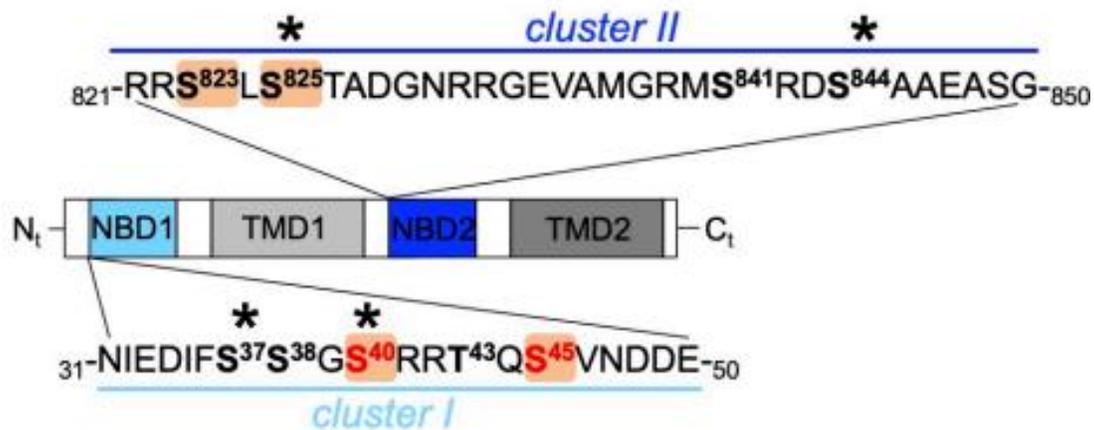


Figura 1.6. Conglomerados de sitios de fosforilación encontrados en ABCG36 de *A. thaliana* tomado de Aryal y colaboradores, 2022.

Además de lo dicho de los transportadores ABC, se ha visto que controlan muchos rasgos deseables en la agricultura y pueden ser un objetivo para mejorar el rendimiento y calidad de los cultivos (Banasiak & Jasiński, 2022). Un ejemplo destacado es *Lr34res* (roya de la hoja 34 por sus siglas en inglés) que confiere a las plantas resistencia de campo, duradera y no específica de la raza contra numerosas enfermedades fúngicas (Banasiak & Jasiński, 2022). Este gen codifica para una proteína ABCG de tamaño completo y es uno de los genes de resistencia más frecuentemente utilizados en el mejoramiento de trigo en todo el mundo (Krattinger et al., 2009; Risk et al., 2012). *Lr34res*, como transgén, se ha incorporado con éxito en todos los cereales principales, como el arroz (Krattinger et al., 2016), el maíz (Sucher et al., 2017), la cebada (Risk et al., 2013) y el sorgo (*Sorghum bicolor*) (Schnippenkoetter et al., 2017).

En *A. mexicana* ya se han identificado y caracterizado algunos transportadores ABC, como el AmABCB1 que se localiza en membrana plasmática y pueden mediar el flujo de sanguinarina y berberina, fue aislado de semillas maduras. Se logró identificar en el transcriptoma de plántulas de *A. mexicana* XT1 con herramientas bioinformáticas teniendo como referencia los transportadores de alcaloides de *C. japonica* (CjABCB1 y CjABCB2) y de *Thalictrum minus* (TmABCB1 y AmABCB2), se precisó su localización principal en semillas maduras mediante el análisis de sus niveles de expresión, de igual manera, en ensayos *in vitro* en levadura se observó que tenía actividad transportadora para berberina y sanguinarina (Loza-Muller, et al., 2021).

1.8.2. Transportadores MATE

Los transportadores de extrusión de compuestos tóxicos y de múltiples fármacos deben sus siglas al inglés “Multidrug And Toxic compound Extrusion” Esta familia de proteínas se divide en tres subfamilias según sus estructuras primarias: subfamilia NorM, subfamilia DinF y subfamilia de los eMATE (MATE eucarióticos) (Miyachi, *et al.*, 2017).

Comúnmente contienen 12 α -hélices transmembranales (TM) y comparten similitud de secuencias en esa región, aunque casi no hay secuencias o motivos conservados en todos los miembros (shoji, 2014). TM 1-6 y 7-12 forman los lóbulos N y C, respectivamente, que están relacionados por una simetría pseudo-doble intramolecular (Miyachi, *et al.*, 2017), estas TM tienen topologías diferentes a las de los transportadores de la superfamilia de falicitadores principales (MFS) (Brown, Paulsen & Skurray, 1999; Yan, 2015).

Los transportadores MATE de mamíferos tienen una hélice adicional, TM13, en el lado C-terminal. Se considera que TM13 estabiliza los MATE en la bicapa de membrana o en sus interacciones con otras proteínas asociadas, pero su papel preciso aún sigue siendo difícil de determinar (Miyachi, *et al.*, 2017).

Son transportadores secundarios (antiporte) que acoplan la translocación del sustrato catiónico (que pueden ser metabolitos, toxinas o xenobióticos) con un gradiente electroquímico de iones de H^+ o Na^+ establecido entre dos membranas. Se pueden encontrar en la planta en tonoplasto, membrana plasmática, y otros organelos membranosos (Dobritzsch, *et al.*, 2016).

Median el eflujo de xenobióticos, su función principal es mantener la homeostasis celular, se encuentran en todos los dominios de la vida y confieren al organismo que los expresa resistencia a variedad de sustancias como alcaloides, flavonoides, y metales pesados como el aluminio o el cadmio, también son responsables del transporte de ácido abscísico, un regulador de crecimiento vegetal (Miyachi, *et al.*, 2017; Shoji, 2014).

Hablando de sus subfamilias, las proteínas NorM son las primeras proteínas MATE caracterizadas funcional y estructuralmente (Morita *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2000; He, *et al.*, 2010; Long, *et al.*, 2008). En el estado unido al catión de NorM-VC (de *Vibrio cholerae*), un ion Rb^+ se une al lóbulo C, que consiste en TM6–TM12. En el centro del lóbulo C, un par de residuos ácidos (Glu255 y Asp371) forman el bolsillo cargado negativamente, que está altamente conservado entre los miembros de la subfamilia NorM (Miyachi, *et al.*, 2017).

Los análisis mutacionales de NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (NorM-VP) revelaron que la actividad de transporte fue abolida por la sustitución del Asp367 conservado (D367A y D367N), correspondiente a Asp371 de NorM-VC, lo que indica la importancia de este residuo conservado (Otsuka, *et al.*, 2005b).

estudios previos de *Pseudomonas stutzeri* NorM (NorM-PS) mediante calorimetría de titulación isotérmica (Nie, *et al.*, 2016) y espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio (Eisinger, *et al.*, 2018) sugirieron que los residuos ácidos en el centro del lóbulo C (Glu255 y Asp371 de NorM-VC) está involucrado de manera directa en el reconocimiento del sustrato. Por lo tanto, el bolsillo alrededor de Glu255 y Asp371 de NorM-VC puede funcionar como el sitio de unión del sustrato, y los iones Rb^+ y Cs^+ pueden unirse a este sitio imitando los sustratos catiónicos (Miyachi, *et al.*, 2017).

La subfamilia de proteínas F inducibles por daño al DNA (DinF) por sus siglas en inglés (DNA damage-inducible protein F) pertenecen a la familia de proteínas MATE y están ampliamente conservadas entre bacterias y arqueas (Brown, Paulsen & Skurray, 1999; Omote, *et al.*, 2006). Estas proteínas transportan sustratos como bromuro de etidio desde dentro de la célula hacia fuera, esto lo realiza, como todos los MATE, utilizando un gradiente electroquímico de iones H^+ o Na^+ (Begum, *et al.*, 2005; Chen, *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2013; Huda, *et al.*, 2003).

En *Pyrococcus furiosus* hay una DinF (PfMATE) que tiene un Asp en la posición 41 en la TM1 que está altamente conservado entre los MATE procarióticos, (en ambas subfamilias, tanto la DinF como la NorM). Las mutaciones de Asp41 (D41A y D41N) redujeron la actividad de transporte de fármacos e H^+ y la complementación, lo que sugiere la importancia de Asp41 para el transporte de sustrato (Miyachi, *et al.*, 2017).

Un análisis de secuencias de aminoácidos reveló que tanto la subfamilia eMATE como la NorM poseen un par de residuos ácidos conservados en el lóbulo C. Los análisis bioquímicos del MATE humano (hMATE1) demostraron que la mutación neutralizante del residuo ácido en TM7 afectó la afinidad de unión al sustrato y, anuló por completo la actividad de transporte (Otsuka, *et al.*, 2005a). Este resultado sugiere que los eMATE y los NorM comparten un mecanismo de transporte similar (Miyachi, *et al.*, 2017), lo cuál se detalló más adelante con ayuda de la determinación de las estructuras cristalinas de eMATEs de *Arabidopsis thaliana* (AtDTx14) y *Camelia sativa* (CasMATE). CasMATE tiene un bolsillo del lóbulo C está cargado negativamente

y es lo suficientemente grande como para acomodar los sustratos de MATE de la planta, incluida la berberina (Miyachi, *et al.*, 2017).

Los grupos A, B y C en la figura 1.7 corresponden a proteínas MATE de plantas relacionadas con la acumulación de metabolitos secundarios, expulsión de xenobióticos como bromuro de etilo y tetrafenilfosfonio, transporte de hormonas y traslocación de iones de hierro/aluminio respectivamente (Tanaka, Iwaki & Tsukazaki, 2017).

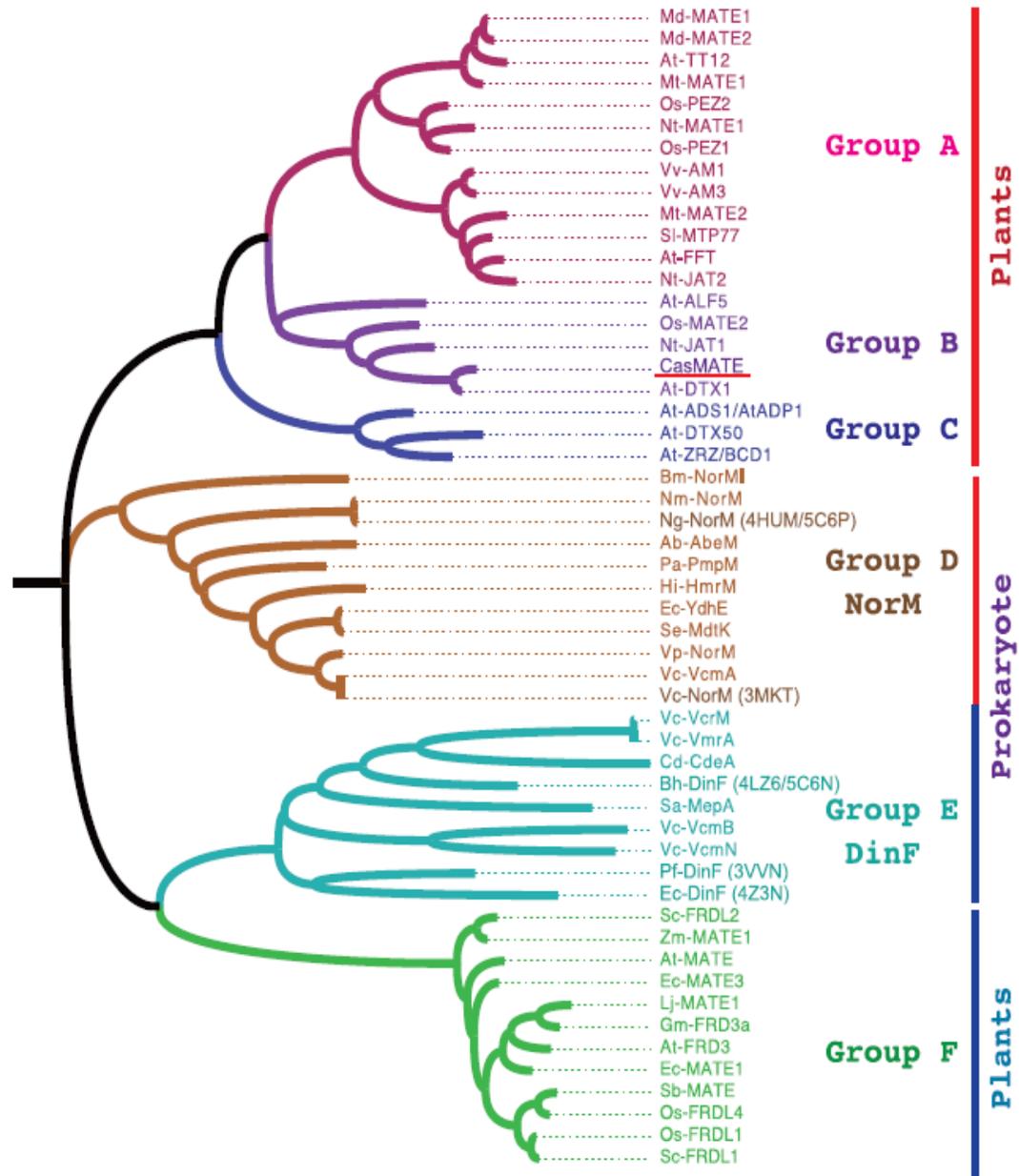


Figura 1.7. Árbol filogenético de familias de proteínas MATE de plantas y procariotas tomado de Tanaka, Iwaki & Tsukazaki (2017).

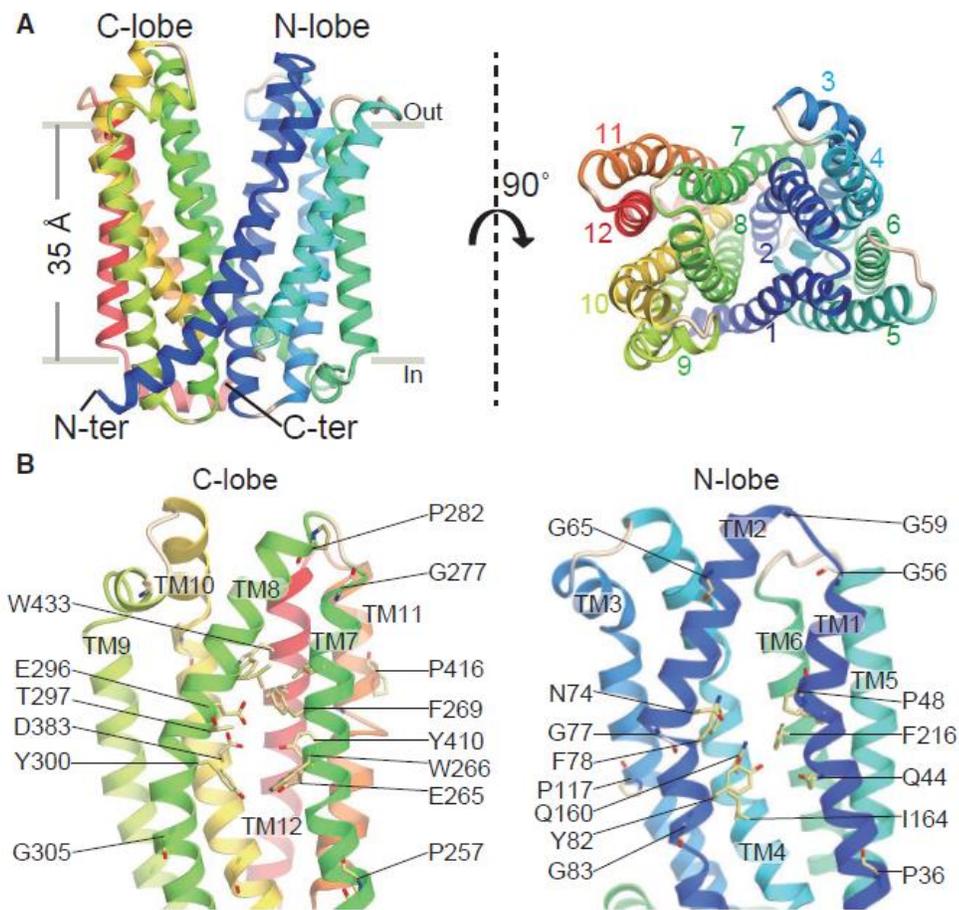


Figura 1.8. A: Representación de listón de CasMATE vista desde la región de la membrana y el lado extracelular. Se enumeran los dominios transmembranales **B:** Acercamiento al lóbulo C y el lóbulo N de la cavidad interna. Tomado de de Tanaka, Iwaki & Tsukazaki (2017).

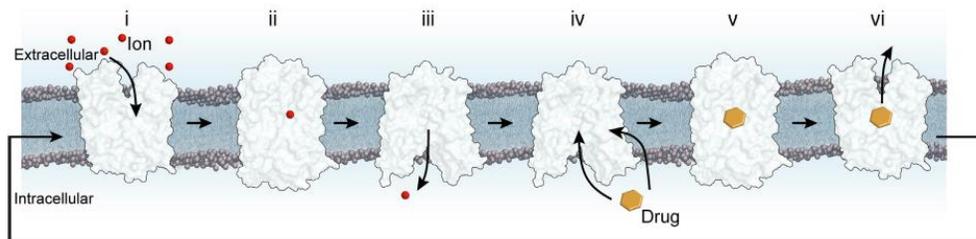


Figura 1.9. Esquema de acceso alternativo en los transportadores MATE tomado de Claxton, Jagessar & Mchaourab, 2021.

Para el transporte de sustancias, se ha propuesto un mecanismo de interruptor basculante similar al utilizado por los principales transportadores de la superfamilia facilitadora, (Law, Maloney & Wang, 2008; Tanaka, *et al.*, 2013) como se muestra en la figura 1.9.

A diferencia de los MATE de plantas, los MATE de arqueas y procariotas tienen una característica del lóbulo N altamente conservado en secuencia y estructura que parece ser esencial para la coordinación de iones y ruta de traslocación (Claxton, Jagessar & Mchaourab, 2021). Los transportadores MATE de 2 plantas: CasMATE (*C. sativa*) y DTX14-At (*A. thaliana*) poseen un parche de aminoácidos ácidos y polares en el lóbulo C, cerca de la cavidad central que se propone que media la unión mutuamente excluyente de H⁺/sustrato (Miyachi, *et al.*, 2017; Tanaka, Y., Iwaki, S., & Tsukazaki, T. 2017; Claxton, Jagessar, & Mchaourab, 2021).

En *A. thaliana* se observaron dos motivos conservados entre sus transportadores MATE, las secuencias son: CGQA localizada entre el TMD2 y el 3 y RVSXNLGA localizada en el TMD8 (Li *et al.*, 2002).

1.8.2.1. Transportadores MATE para alcaloides

Algunos transportadores tipo MATE se han reportado como movilizadores de alcaloides, uno de estos ejemplos es el de *Arabidopsis thaliana* que tiene una proteína MATE encontrada en la membrana plasmática (AtDTX1) que se encarga de eliminar la berberina exógena de las células de esta planta, lo que le permite sobrevivir en concentraciones de esta sustancia que a otras plantas las matarían (Li, *et al.*, 2002). En un estudio en *Coptis japonica* de Takanashi y colaboradores en 2017 se demostró que un transportador MATE (CjMATE1) es responsable de la movilización de berberina a través de la vacuola. Hay más MATE involucrados con el transporte intracelular; en el tabaco se movilizan nicotina y otros alcaloides a través de transportadores como NtMATE1, NtMATE2 encontrados en raíz (Shoji, *et al.*, 2009) y Nt-JAT1 y Nt-JAT2 encontrados en hojas (Morita, *et al.*, 2009; Shitan *et al.*, 2014).

En el transcriptoma XT1 se han encontrado secuencias similares a las mencionadas en el párrafo anterior: AmMATE1, AmMATE2 y AmMATE3 similares a CjMATE1; AmMATE4 similar a los NtMATE1 y 2, y de la misma manera que a AmMATE5 que a su vez es similar a AtDTX1.

1.8.3. Transportadores PUP

Las permeasas de purinas (PUP) por sus siglas en inglés, recientemente también conocidas como permeasas organocatiónicas de plantas (POP) (Jelesko, 2012), son una familia de transportadores que, basado en búsquedas BLASTP recíprocas, se asignaron a una antigua superfamilia de transportadores de fármacos y metabolitos (DMT) (Jack, *et al.*, 2000).

A las proteínas PUP se les dio la designación de código de clasificación de transportador (TC) 2.A.7.14. Una consulta BLAST de NUP1 (un transportador de nicotina en *N. tabacum*) en la base de datos de dominios conservados (CDD) del NCBI identificó un dominio pfam 03151 conservado (valor de expectativa BLASTP = $7,1 \times 10^{-28}$). En CDD, el dominio pfam 03151 está asociado con la superfamilia EamA (Jelesko, 2012).

Sus miembros, son transportadores de alta afinidad específicos para la adenina, la guanina y la hipoxantina, y probablemente tienen una función importante en el transporte de fitohormonas, citoquininas y alcaloides, como la cafeína y la nicotina. Transportan además una variedad de sustratos no nitrogenados, como la vitamina B6 (Jelesko, 2012; Szydlowski *et al.*, 2013; Kato *et al.*, 2015).

La cafeína y la teobromina son alcaloides provenientes de purinas que se unen competitivamente a las PUP (Dastmalchi, *et al.*, 2019). Se encontró en el tabaco una PUP (NtNUP1) que está implicada en el transporte de nicotina, se encuentra en la membrana plasmática y podría estar involucrada en la translocación desde las raíces hacia los órganos aéreos (Hildreth, *et al.*, 2011), donde son recludas en la vacuola por un transportador MATE (Morita, *et al.*, 2009), lo curioso es que la nicotina no es un alcaloide derivado de las purinas, por lo que con este hito se amplía el catálogo de transporte de estas proteínas (Dastmalchi, *et al.*, 2019).

Las búsquedas de similitud y filogenias de PUP y NUP publicadas son consistentes con el origen de la familia PUP/2.A.7.14 en plantas terrestres después de las briofitas (Gillissen *et al.*, 2000; Hildreth *et al.*, 2011). Sin embargo, es improbable que un transportador progenitor PUP/2.A.7.14 se formara completamente *de novo* en plantas. En cambio, es más probable que se derivara de una familia de DMT diferente preexistente en las plantas (Jack *et al.*, 2001; Jelesko, 2012).

El mecanismo de transporte exacto de los PUP no está entendido aún, pero se presume que actúan probablemente como simportadores de protones mediante el uso de mecanismos de transporte activo secundario (Nogia & Pati, 2021; Jelesko, 2012).

En el estudio de Hildreth y colaboradores en 2011, se utilizaron plantas de tabaco transgénicas que expresaban NUP1-RNAi, estas plantas tienen niveles foliares de nicotina reducidos. Sin embargo, estos niveles de acumulación de nicotina en hojas no se deben al transporte alterado de este alcaloide de las raíces a los brotes *per se*, porque las plantas NUP1-RNAi no tienen comprometida su capacidad de transportar proporcionalmente la nicotina exógena alimentada a las raíces hacia las hojas. Más bien, una menor nicotina foliar se correlaciona con niveles más bajos de nicotina en las raíces. Si bien los niveles de expresión de NUP1 afectan claramente el metabolismo general de la nicotina, actualmente se comprende poco el mecanismo molecular por el cual NUP1 afecta los niveles de acumulación de nicotina (Hildreth et al., 2011).

En un estudio sobre la biosíntesis de ABIs realizado por Dastmalchi y colaboradores en 2019, se ensambló un modelo preliminar del genoma de *Papaver somniferum* y notaron una secuencia similar a una PUP dentro de un grupo de genes que codifican varias enzimas biosintéticas de opiáceos (Chen *et al.*, 2018; Facchini *et al.*, 2018). Con ello se identificaron nueve homólogos a PUP en transcriptomas de *P. somniferum* varios de los cuales funcionan como transportadores de ABIs. Estos transportadores aumentan la concentración de los precursores de ABIs como la L-DOPA y S-reticulina dentro de la célula por lo que presumiblemente son importadores de estos (Dastmalchi, *et al.*, 2019).

1.9. RECAPITULACIÓN DE LOS ANTECEDENTES

En las plantas productoras de alcaloides una estrategia común para evitar la citotoxicidad es dividir la biosíntesis y almacenaje de estas moléculas en diferentes tejidos (Loza-Muller, *et al.*, 2021), en *Coptis japonica* se sabe que los alcaloides son producidos en raíz y almacenados en el rizoma (Shitan, 2013). En *Argemone mexicana* la berberina se encuentra principalmente en la parte epigeal y en las hojas (Xool-Tamayo, 2016), en contraste con sus transcritos biosintéticos los cuales están en mayor cantidad en tallo y hojas; la sanguinarina se encuentra en la raíz y las semillas maduras pero los transcritos de las enzimas que se encargan de su biosíntesis no se expresan en semillas, la evidencia antes mencionada sugiere que puede haber participación de transportadores que movilicen estos alcaloides a los diferentes tejidos (Vázquez-Flota, *et al.*, 2018).

Ya se han logrado identificar y caracterizar algunos transportadores ABC en *A. mexicana*, como el AmABCB1 que se localiza en membrana plasmática y pueden mediar el flujo de sanguinarina y berberina, fue aislado de semillas maduras. Este transportador fue identificado en el transcriptoma de plántulas de *A. mexicana* XT1 comparándolo con los transportadores de alcaloides de *C. japonica* y *Thalictrum minus*, se realizaron análisis de sus niveles de expresión en los cuales se demostró que las semillas maduras eran su localización principal, así como también ensayos *in vitro* en levadura en los que se observó que tenía actividad transportadora para berberina y sanguinarina (Loza-Muller, *et al.*, 2021).

Existen otros tipos de transportadores de alcaloides, un transportador ABCG de tamaño completo (CrTPT2) es responsable de la excreción de catharantina hacia la superficie de las hojas de *Catharantus roseus* (Yu & De Luca, 2013). Además de los transportadores ABC también existen otros tipos de transportadores como los MATE y los PUP que se sabe que pueden transportar alcaloides (Shitan *et al.*, 2014). Los MATE son usados en múltiples organismos para mediar el eflujo de xenobióticos, en *Arabidopsis thaliana* un transportador MATE encontrado en la membrana plasmática (AtDTX1) se demostró capaz de eliminar la berberina exógena de las células de esta planta (Li, *et al.*, 2002). Se demostró que un transportador MATE (CjMATE1) es responsable de la movilización de berberina a través de la vacuola en *Coptis japonica* (Takanashi, *et al.*, 2017). También hay transportadores MATE involucrados con la movilización intracelular de nicotina y otros alcaloides del tabaco como los son NtMATE1, NtMATE2 encontrados en raíz (Shoji, *et al.*, 2009) y Nt-JAT1 y Nt-JAT2 en las hojas (Morita, *et al.*, 2009; Shitan *et al.*, 2014).

En particular, los transportadores tipo MATE que movilizan alcaloides, han sido poco estudiados, se han caracterizado con ensayos de transporte mediante la expresión heteróloga en levaduras y su localización subcelular se ha encontrado utilizando métodos como proteínas de fusión con GFP, ensayos de fracción microsomal, western blot y microscopía inmunoelectrónica (Shitan, Kato, & Shoji, 2014). Cabe destacar que los transportadores de alcaloides MATE que se han caracterizado cumplen con funciones de movilización intracelular, pero los transportadores MATE en general no se limitan a las endomembranas y pueden movilizar sustratos dentro y fuera de las células. Solo se ha confirmado la actividad movilizadora de alcaloides de manera endógena de los MATE en *Nicotiana tabacum* y en *Coptis japonica* (Gani, Vishwakarma & Misra, 2021).

De la misma manera existen permeasas de purina (PUP) encargadas del transporte de alcaloides en membrana plasmática como es el caso de la NUP1, encontrada en raíz de tabaco que se encarga de reingresar nicotina desde el medio extracelular hacia el citosol (Hildreth, *et al.*, 2014; Kato et al. 2015); existen más permeasas de purina como las encontradas en el genoma de *Papaver somniferum* que se encargan de aumentar la concentración intracelular de los precursores de ABIs como la L-DOPA y S-reticulina (Dastmalchi, *et al.*, 2019). Los ejemplos anteriores dejan en claro que hay variedad de transportadores de alcaloides en las plantas y tienen múltiples funciones.

Con los datos del transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* se encontró que hay evidencia de otros posibles transportadores de alcaloides por lo que en este trabajo se seleccionarán los candidatos más prometedores para su posterior aislamiento, análisis de expresión, y ensayo de sus actividades transportadoras.

2. JUSTIFICACIÓN

La distribución tisular de los alcaloides en *A. mexicana* sigue patrones diferentes a la de los transcritos involucrados en su biosíntesis. Esto podría deberse a la participación de mecanismos de transporte operando entre las diferentes células y/o tejidos. Recientemente, se logró el aislamiento y caracterización funcional de un transportador de alcaloides tipo ABC-B en semillas de *Argemone* y un análisis bioinformático del transcriptoma de plántulas reveló la presencia de numerosos candidatos a proteínas transportadoras, no sólo del tipo ABC, sino también de otras familias como PUP y MATE. En este trabajo se propone identificar, aislar y caracterizar algunos de estos candidatos. Se propone seleccionar, a partir del transcriptoma disponible, los candidatos más interesantes por novedosos y la viabilidad para su aislamiento y caracterización. Será de interés particular los transportadores de alcaloides tipo MATE ya que se han estudiado poco, aunque en *C. japonica* ya se ha descrito un transportado tonoplástico para berberina. Los datos y conclusiones a las que se lleguen con este trabajo aumentarán el conocimiento sobre las características distintivas de los transportadores movilizadores de alcaloides, abriendo la posibilidad de una utilidad práctica en la industria biotecnológica como herramientas para la obtención de ABIs u otros metabolitos por medio de tecnologías de ingeniería metabólica y de transporte.

3. HIPÓTESIS

Existen sistemas de transporte para alcaloides bencilisoquinolínicos mediados por proteínas de las familias ABC, MATE y PUP, en *Argemone mexicana* se ha documentado la presencia de proteínas de estos tipos, es probable que algunas de estas proteínas estén involucradas en la movilización de ABIs en esta planta.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar, aislar y caracterizar molecularmente cDNAs de *Argemone mexicana* correspondientes a proteínas filogenéticamente relacionadas a transportadores de alcaloides bencilisoquinolínicos funcionalmente caracterizados en otras especies.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar y seleccionar por medios bioinformáticos candidatos a proteínas transportadoras de alcaloides en el transcriptoma de *A. mexicana*.
- Aislar los cDNA de los candidatos seleccionados.
- Caracterizar los patrones de expresión de las proteínas transportadoras seleccionadas en diferentes tejidos y condiciones.
- Caracterizar *in silico* los candidatos seleccionados.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental para cumplir los objetivos se muestra en la Fig. 5.1 y consta de tres etapas.

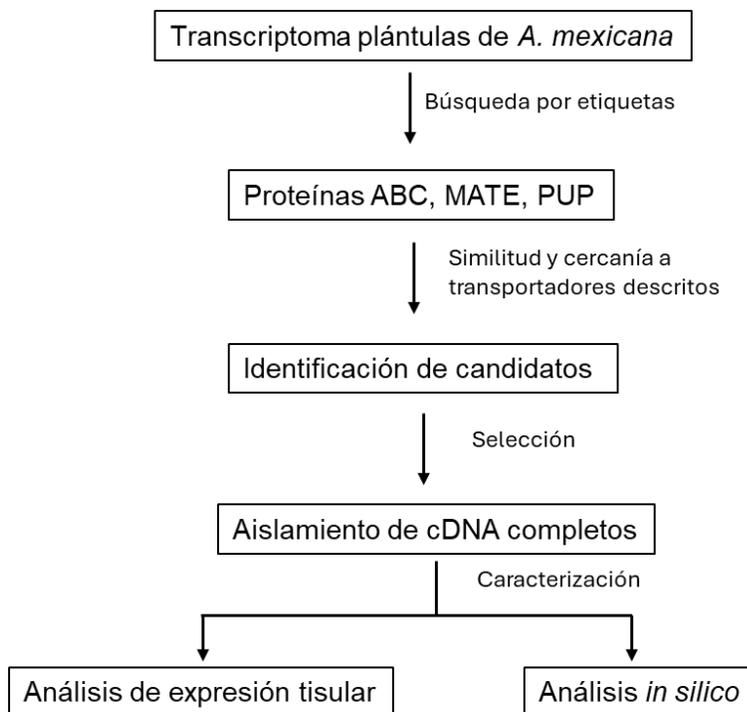


Figura 5.1. Diagrama de la estrategia experimental seguida en este trabajo.

En la primera de ellas se identificarán candidatos a proteínas transportadoras de alcaloides en el transcriptoma XT1 de plántulas en desarrollo. Para ello, las secuencias etiquetadas como proteínas ABC, MATE y PUP se seleccionarán, se organizarán y serán depuradas de acuerdo a criterios establecidos (ver sección 7.2). Las secuencias depuradas serán comparadas contra transportadores conocidos de los diferentes tipos utilizados como referencia. Aquellas con cercanía filogenética a las referencias y que cumplan con los criterios definidos en la sección 7.2, serán seleccionadas como candidatos para el aislamiento de los cDNA correspondientes. La segunda etapa consistirá en el aislamiento de los cDNA de los candidatos seleccionados. Para ello, se extraerá el RNA de diferentes tejidos de plantas maduras y se analizará la abundancia de los candidatos por RT-PCR de punto final. Los cebadores para las amplificaciones se diseñarán basados en secuencias distintivas para cada candidato. Para el aislamiento de los cDNA correspondientes a los candidatos seleccionados se partirá de los tejidos mostrando niveles significativos de los transcritos de interés. Los cDNA se aislarán mediante metodologías estándar de PCR y los productos con presuntos marcos de lectura completos se clonarán en vectores bacterianos para su multiplicación y manipulación. La identidad de los candidatos aislados se verificará por secuenciación. Finalmente, en la tercera etapa, se caracterizarán los candidatos aislados por el nivel de expresión en los diferentes tejidos y por la presencia secuencias involucradas en su localización y funcionamiento como bolsas hidrofóbicas y sitios propensos a fosforilación mediante un análisis *in silico* de las secuencias seleccionadas.

Los detalles de las metodologías desarrolladas en las diferentes etapas se describen en las secciones siguientes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizaron plantas maduras de *Argemone mexicana* colectadas en campo en Mérida, Yucatán, plántulas en desarrollo de 8 semanas de edad germinadas a una temperatura constante de 25°C, humedad relativa del 60% y ciclos de luz y oscuridad de 12 horas. Las suspensiones celulares de *A. mexicana* se tomaron a los 14 días de resiembra de la línea AM1 provenientes de hojas de *Argemone mexicana* (Monforte-González *et al.*, 2019). Las cepas bacterianas utilizadas fueron *E. coli* Top10 químicamente competentes genotipo: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG* y se mantuvieron como se recomienda por los proveedores en medio LB suplementado con los antibióticos recomendados.

6.2. MÉTODOS

Manipulación de ácidos nucleicos.

Extracción de RNA. El RNA total de los diferentes tejidos se extrajo por el método de Rubio-Piña & Vazquez-Flota (2008). La calidad del RNA obtenidos se verificó por observación en geles de agarosa y por el cociente de absorbancia 280/260. Para RT-PCR, el cDNA se preparó con 1mg de RNA total, 0.5µg de oligodT₁₈, 40U de RNAsaout y 200 U de MMLV RT, con 4 ml el buffer 5xFirstStrand en un volumen total de reacción de 20 µL.

PCR. Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en un equipo Veriti ® 96-Well Thermal Cycler Modelo #: 9902 en mezclas conteniendo, 5 picomoles de los cebadores específicos (Tablas 8.1, 8.3), 0.2 mM de la mezcla de dNTP, 2.5 mM de MgCl y 2 U de TaqPol. Para amplificaciones de cDNA se emplearon 150 ng como templado inicial, mientras que para DNA plasmídico se utilizaron 75 ng. Para las amplificaciones de los fragmentos grandes y completos de los transportadores, se usaron mezclas similares que contenían 200 ng de templado inicial, 1.25 U de polimerasa Phusion y se añadió 2.5% del volumen total de la reacción de DMSO. La temperatura de amplificación fue 72°C en todos los casos. El número de ciclos y temperaturas para el alineamiento de los cebadores se muestra en las Tablas correspondientes. Los productos de las amplificaciones se separaron en geles de agarosa 1.4% en buffer TAE 1X (Tris-HCL 40

mM, pH 8.0, ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM) y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador ChemiDoc™ MP Imaging System de *Bioradiations*.

Aislamiento de los cDNA. Los productos de las amplificaciones se separaron por electroforesis y las bandas con los tamaños esperados se extrajeron del gel cortando la zona que los contenían. El fragmento de gel con el DNA se disolvió en Agarose Dissolving Buffer del Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit con número de catálogo D40007 y se procedió con el proceso de purificación según las instrucciones del fabricante. El cDNA así obtenido se cuantificó por fluorescencia en un Nanodrop Lite Spectrophotometer de *Thermoscientific* y se insertó por ligación en los vectores plasmídicos adecuados. Los plásmidos conteniendo los cDNA de interés se transformaron en las cepas bacterianas recomendadas y aquellas con las construcciones correctas se seleccionaron como se describe en las secciones correspondientes.

Reacciones de Ligación. Los fragmentos de DNA de interés fueron clonados en vectores plasmídicos. Para ello, se les agregaron colas de 1 adenina en los extremos 3'. agregando 250 ng de los transportadores (producto de PCR) en un tubo de 200µL, se le añadió 1µl de Taq DNA polimerasa 10x reaction buffer con MgCl₂ posteriormente se le añadieron 5 unidades de Taq DNA polimerasa y agua desionizada para un volumen final de 10µl, se incubó durante 30 minutos a 70°C y se utilizaron 4µl de esta reacción para la ligación con el vector PCR8/GW/TOPO en la que se agregó 1µl del vector y 1µl de solución salina para un volumen total de 6µl que se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente.

Transformación. Se tomó la mitad del volumen de la reacción de ligación “Gateway LR Clonase Enzyme Mix” con número de catálogo 11791020 de *Invitrogen* para transformar células competentes de *E. coli* Top 10 con los vectores de entrada PCR8/GW/TOPO-AmMATE4 y PCR8/GW/TOPO-AmMATE5 en medio SOX, estas bacterias habían sido descongeladas previamente en hielo, se mezcló suavemente con la punta de la pipeta y se mantuvieron en hielo por 30 minutos más, se transfirieron a un baño de agua a 42°C por 90 segundos y después a hielo 5 minutos, después se incubaron por 1 hora a 37°C con una agitación de 200rpm. Se tomaron 100µl de células competentes y se sembraron por extensión con varilla en medio LB suplementado con 100 µg/ml de espectinomicina. Se incubaron las cajas a 37°C por 16 horas.

Posteriormente con una punta de micropipeta se tocan de nuevo las colonias seleccionadas y se depositan con todo y punta a un tubo de 15ml con 4ml de medio LB líquido, tanto las puntas como el tubo y el medio fueron previamente esterilizados, y una concentración de 100 µg/ml de

espectinomycin se incuban durante 16 horas a 37°C con una agitación de 150rpm, luego, se procedió a hacer la extracción de los plásmidos de estas colonias utilizando el kit ZymoPure™ Plasmid Miniprep kit con número de catálogo D4209 de acuerdo a las instrucciones del fabricante, una vez aislados los plásmidos se verificó que el AmMATE5 estuviera en la dirección deseada digiriéndolo con EcoRV, se tomaron 250ng de plásmido para la reacción, se incubó la reacción de 20µl a 37°C durante 1 hora y posteriormente se inactivó la enzima incubándola a 80°C por 20 min. Se corrió un gel de agarosa con sus respectivos controles (no digerido) y se observaron los resultados.

Análisis bioinformáticos. Como fuente para la búsqueda de los candidatos se empleó el transcriptoma XT-1 de plántulas completas de *A. mexicana* (Xool-Tamayo, 2017). Las herramientas utilizadas se describen en las secciones correspondientes.

Para los análisis *in silico* se tomó de base la secuencia del transcriptoma, se tradujeron a cadenas protéicas las cuales se utilizaron para buscar *in silico* péptidos señal, señales de retención en retículo endoplásmico con ayuda de las herramientas bioinformáticas: TargetP - 2.0 en el sitio web [<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TargetP-2.0/>]; ScanProsite tool en el sitio [<https://prosite.expasy.org/scanprosite/>]; SignalP - 5.0 en el sitio web: [<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>]; y su ubicación subcelular probable directamente con las herramienta Plant-mPLOC en el sitio web: [<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>] y BUSCA en el sitio web [<https://busca.biocomp.unibo.it/>] así como WoLF PSORT en la web [<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>] para tener mayor claridad respecto a sus localizaciones dentro de la célula. Las secuencias protéicas también fueron usadas para construir un modelo tridimensional de las proteínas transportadoras con phyre2 (Kelley *et al*, 2015) en el sitio web: [<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>] así como las estructuras tridimensionales de alcaloides propios de *Argemone mexicana* en PubChem (Kim *et al*, 2023) en el sitio web: [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>] y se analizaron las cavidades en un análisis de docking molecular en CB-DOCK2 (Yang Liu *et al*, 2022; Xiacong Yang *et al*, 2022) en el sitio web: [<https://caxdd.labshare.cn/cb-dock2/php/blinddock.php>] en busca de los sitios de unión a sustrato más probable y cavidades en la proteína en las que este pueda interactuar.

Paralelamente con el análisis anterior se identificaron los probables sitios de fosforilación, para ello se utilizó NetPhos - 3.1 (Blom, Gammeltoft & Brunak, 1999) en el sitio web:

[<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/>] a partir de sus secuencias de aminoácidos.

Continuando con la caracterización *in silico*, se llevó a cabo un análisis de hidrofobicidad para reforzar las conclusiones del análisis de fosforilación. Este se realizó mediante la herramienta en línea DeepTMHMM – 1.0 (Jeppe Hallgren, *et al*, 2022) en el sitio web: [<https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/>] a partir de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas.

7. RESULTADOS IDENTIFICACIÓN DE CANDIDATOS

7.1. IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES EN EL TRANSCRIPTOMA DE “*ARGEMONE MEXICANA*”

Se partió de un transcriptoma de plántulas (XT-1) para la búsqueda de secuencias correspondientes a transportadores por revisión de la anotación funcional en primera instancia. Para los análisis posteriores, las etiquetas arrojadas en este rastreo se seleccionaron aplicando criterios que incluían el tipo o familia proteica, la calidad de las secuencias, la completitud del presunto marco de lectura y la similitud a transportadores de alcaloides conocidos.

7.2. SELECCIÓN DE CANDIDATOS A TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES POR ANOTACIÓN FUNCIONAL

Se analizó el transcriptoma XT1 el cual se elaboró de radículas e hipocotilos plántulas *in vitro* de *A. mexicana* y fue ensamblado *de novo* (Xool-Tamayo, *et al.*, 2017). La anotación funcional y taxonómica se realizó mediante la herramienta DIAMOND (Buchfink *et al.* 2021) contra la base de datos “RefSeq non-redundant proteins” de NCBI. Las secuencias correspondientes a transportadores se identificaron a través de búsqueda de términos utilizando la línea de comandos y la instrucción *grep*. Así mismo, se identificaron los dominios proteicos mediante búsqueda dirigida por motivos ocultos de Markov (hmm). Lo anterior se realizó mediante la línea de comandos y usando el portal web <http://hmmer.org/> (HMMER: biosequence analysis using profile hidden Markov models; v3.3.2, 2020) utilizando los dominios distintivos para proteínas tipo ABC, MATE y PUP (Tabla 7.1).

Tabla 7.1. Dominios de referencia para la búsqueda de proteínas transportadoras.

Tipo de transportador	Dominios	
	Clave Pfam	Nombre
ABC	PF00005.30	ABC transporter
	PF00664.26	ABC transporter transmembrane region
	PF01061.27	ABC-2 type transporter
	PF06472.18	ABC transporter transmembrane region 2
	PF12698.10	ABC-2 family transporter protein
	PF19055.3	ABC-2 type transporter
MATE	PF01554	MatE
PUP	PF06516	Purine nucleoside permease (NUP)

Tabla 7.2. Secuencias de transportadores putativos encontradas en el transcriptoma XT1 de las familias ABC, MATE y PUP

Familia	No. de proteínas encontradas en XT1
ABC	870
MATE	102
PUP	40
TOTAL	1012

Esta primera búsqueda arrojó un total de 1012 candidatos de los cuales 870, 102, y 40 correspondían a posibles proteínas ABC, MATE y PUP, respectivamente (Tabla 7.2). Se realizó un primer corte en el que se descartaban todas las secuencias con un E-value $> 3.10^{-18}$ para minimizar los falsos positivos y maximizar los verdaderos positivos (Lane, *et al.*, 2016). Como resultado, se obtuvieron 200 candidatos, de los cuales 132, 19 y 49 correspondieron a las superfamilias ABC, PUP y MATE, respectivamente (Fig. 7.1). Las secuencias de la familia ABC se clasificaron en subfamilias por medio de la construcción de un árbol filogenético por agrupamiento (Fig. 7.2) con el software *Mega 11* (Kumar, *et al.*, 2018), mediante alineamiento múltiple con *clustal W* y reconstrucción por *neighbour joining*, empleando 20 réplicas de *bootstraps*. Se incluyeron proteínas caracterizadas de este tipo ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCF, ABCG y ABCI listadas en la Tabla 7.4 para su segregación. Se encontraron 21 miembros de las subfamilias G, así como 5, 33, 38, 10, 4 y 17 de las subfamilias A, B, C, D, E y F, respectivamente, quedando sin clasificar 4 de las proteínas ABC restantes (Fig 7.2; Tabla 7.3).

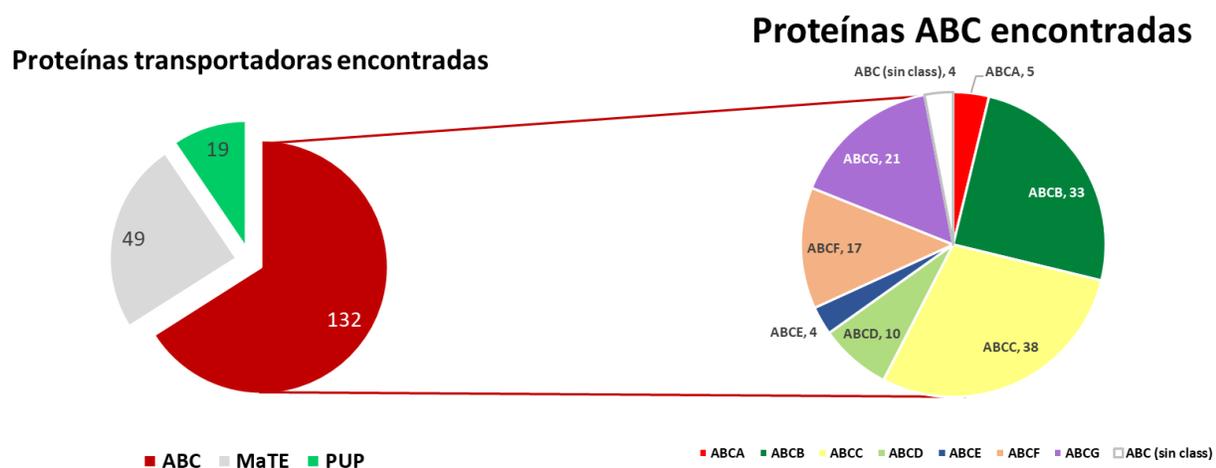


Figura 7.1. Proporción de proteínas transportadoras encontradas en el transcriptoma XT1

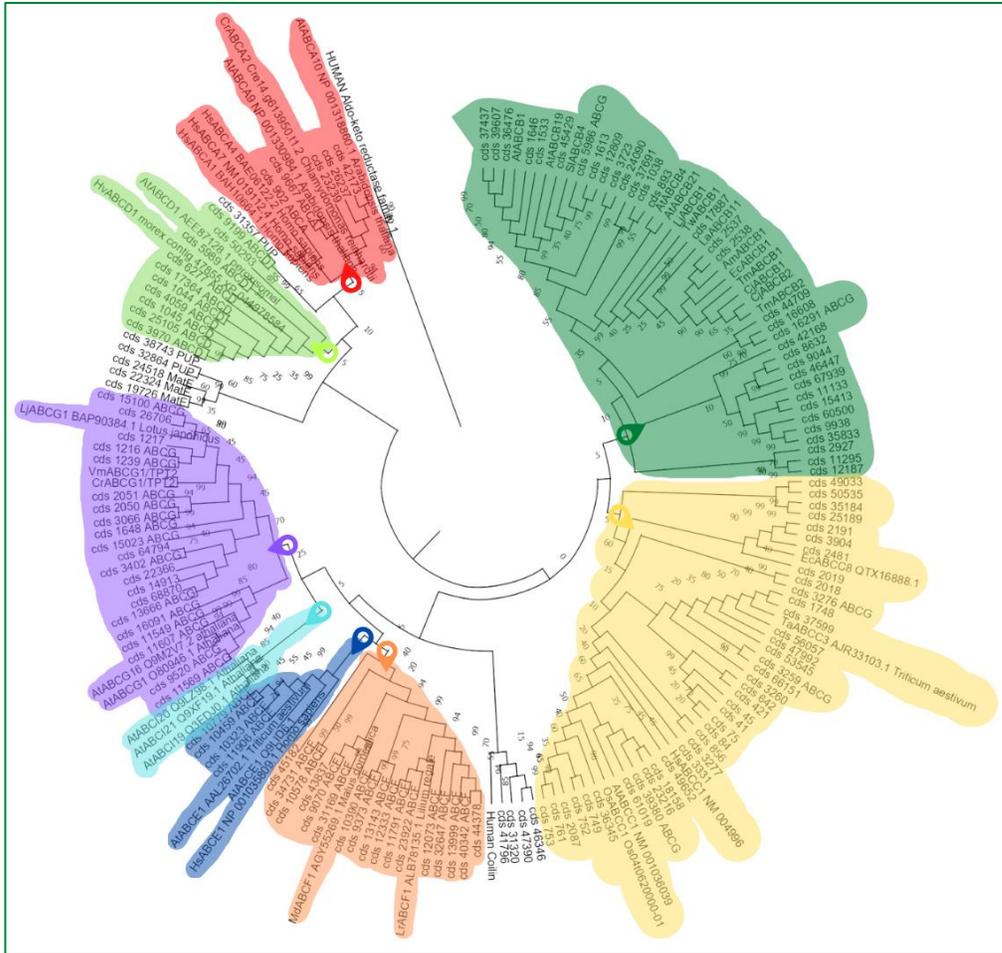


Figura 7.2. Árbol filogenético para clasificar las proteínas ABC con proteínas de referencia (neighbour-joining; 20 bootstraps) código de color en **Tabla 7.3**.

Tabla 7.3. Proteínas ABC clasificadas con su código de color en el árbol filogenético.

	Subfamilia	Cantidad
●	ABCA	5
●	ABCB	33
●	ABCC	38
●	ABCD	10
●	ABCE	4
●	ABCF	17
●	ABCG	21
●	ABCI	0
○	ABC (sin clasificar)	4
	ABC _{total}	132

Tabla 7.4. Proteínas ABC de referencia con número de accesoión.

Subfamilia	Proteína	No. de accesoión
ABCA	AtABCA10	AT5G61740
	CrABCA2	Cre14.g613950
	AtABCA9	NP001320984
	HsABCA4	BAE06122
	HsABCA7	NM019112
	HsABCA1	BAH10664
ABCB	AtABCB1	NP_181228
	AtABCB19	NP_189528
	SlABCB4	NP_001234209
	AtABCB21	NP_191774
	LjABCB1	AB649310
	LaABCB11	PMC8584037
	AmABCB1	MW936653
	TmABCB1	LC029926
	CjABCB1	AB043999
	CjABCB2	AB674325
	TmABCB2	LC029927
	ABCC	EcABCC8
TaABCC3		AJR33103
HsABCC1		NM004996
AtABCC1		NM001036039
OsABCC1		Os04t0620000
ABCD	AtABCD1	AEE87128
	HvABCD1	XP044978584
ABCE	HsABCE1	NP001035809
	AtABCE1	AAL26702
ABCF	LrABCF1	ALB78135
	MdABCF1	AGY55269
ABCG	LjABCG1	BAP90384
	VmABCG1	KC511773
	CrABCG1	KC511771
	AtABCG16	Q9M2V7
	AtABCG1	O80946
ABCI	AtABCI20	Q9LZ98
	AtABCI21	Q9XF19
	AtABCI19	Q3EDJ0

En este punto, decidimos dejar de lado todas las proteínas ABC excepto las de la subfamilia G, debido a que únicamente las subfamilias ABCB y ABCG se han reportado como transportadores de alcaloides (Shitan, Kato & Shoji, 2014), y ya en trabajos previos se encontró un transportador de alcaloides de la subfamilia B (Loza-Müller, 2021), por lo que ya se tiene un representante de esta subfamilia. Continuando con la selección se tomaron en cuenta únicamente los candidatos cuya secuencia incluyera un marco de lectura mayor al 90% del promedio de sus familias para su posterior análisis, esto eliminó a todos los candidatos de la familia PUP, a la gran mayoría de los ABCG quedando 2 representantes de esta familia y a 19 miembros de la familia MATE quedando 21.

Se construyeron árboles filogenéticos para cada grupo por máxima parsimonia y 500 bootstraps. En el primero, se incluían las 21 presuntas proteínas MATE de *Argemone mexicana* y se incluyeron como referencia tanto proteínas transportadoras de alcaloides como proteínas que no son descritas como movilizadores de alcaloides especificadas en la Fig. 7.4, mientras que para las proteínas ABC-G se incluyeron como referencia AtABCG32 (NM128248) y HvABCG (AB534899) que están asociadas a la formación de cutícula en *Arabidopsis thaliana* y en *Hordeum vulgare* respectivamente y como referentes de ABCG transportadores de alcaloides AhTPT2(KC511775), AhTPT5 (KC511776), CrTPT2 (KC511771), CrTPT5 (KC511772), RsTPT2 (KC511779), RsTPT5 (KC511780), TeTPT2 (KC511777), TeTPT5 (KC511778), VmTPT2 (KC511773) y VmTPT5 (KC511774) (Fig. 7.5). Al haber sido agrupados con proteínas que no movilizan alcaloides (Fig 7.5), todos los candidatos ABCG quedan fuera y a partir de este momento sólo se trabajará con los AmMATEs.

Este análisis resultó en la identificación de dos principales clados en los que se agrupan cinco presuntos transportadores tipo MATE que desde ahora llamaremos AmMATE1-AmMATE5; AmMATE1 se trabaja en otro proyecto (Loza-Müller, *et al.* NP), para este trabajo fueron seleccionados los candidatos de AmMATE2 a AmMATE5. Estos, se agruparon junto a las referencias CjMATE1 para AmMATE2, NtJAT2 para AmMATE3 y NtJAT1 y AtDTX1 para AmMATE4 y AmMATE5 (Fig. 7.4; Tabla 7.4). Los candidatos seleccionados cumplían con presentar un marco de lectura completo, estimado (ca. 500 residuos) y mostraron una similitud significativa con las proteínas AtDTX1, NtJAT1, NtMATE1, NtMATE2 o CjMATE1 con porcentaje de identidad >32% y porcentaje de cobertura >93%.

Por otra parte, además de que las presuntas proteínas AmABCG con el dominio PDR no se agruparon en el mismo clado que los transportadores de alcaloides conocidos, al aumentar la

astringencia de selección a solamente marcos de lectura completos (ca. 1500 residuos), ninguna lo cumplió por lo se reafirma la decisión de dejarlos de lado.

Tabla 7.5. Proteínas candidatas a estudio.

ID	Número de aminoácidos	Tipo de transportador	Distribución de dominios	Nombre
UN10812	504	MATE	MATE-MATE	AmMATE2
UN12695	495	MATE	MATE-MATE	AmMATE3
UN13083	481	MATE	MATE-MATE	AmMATE4
UN11095	482	MATE	MATE-MATE	AmMATE5

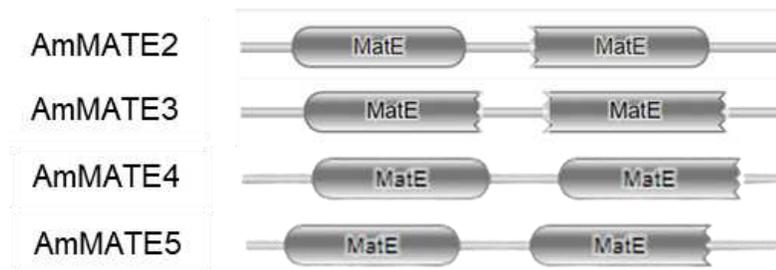


Figura 7.3. Arquitecturas predichas en HMMER v3.3.2 de los transportadores candidatos.

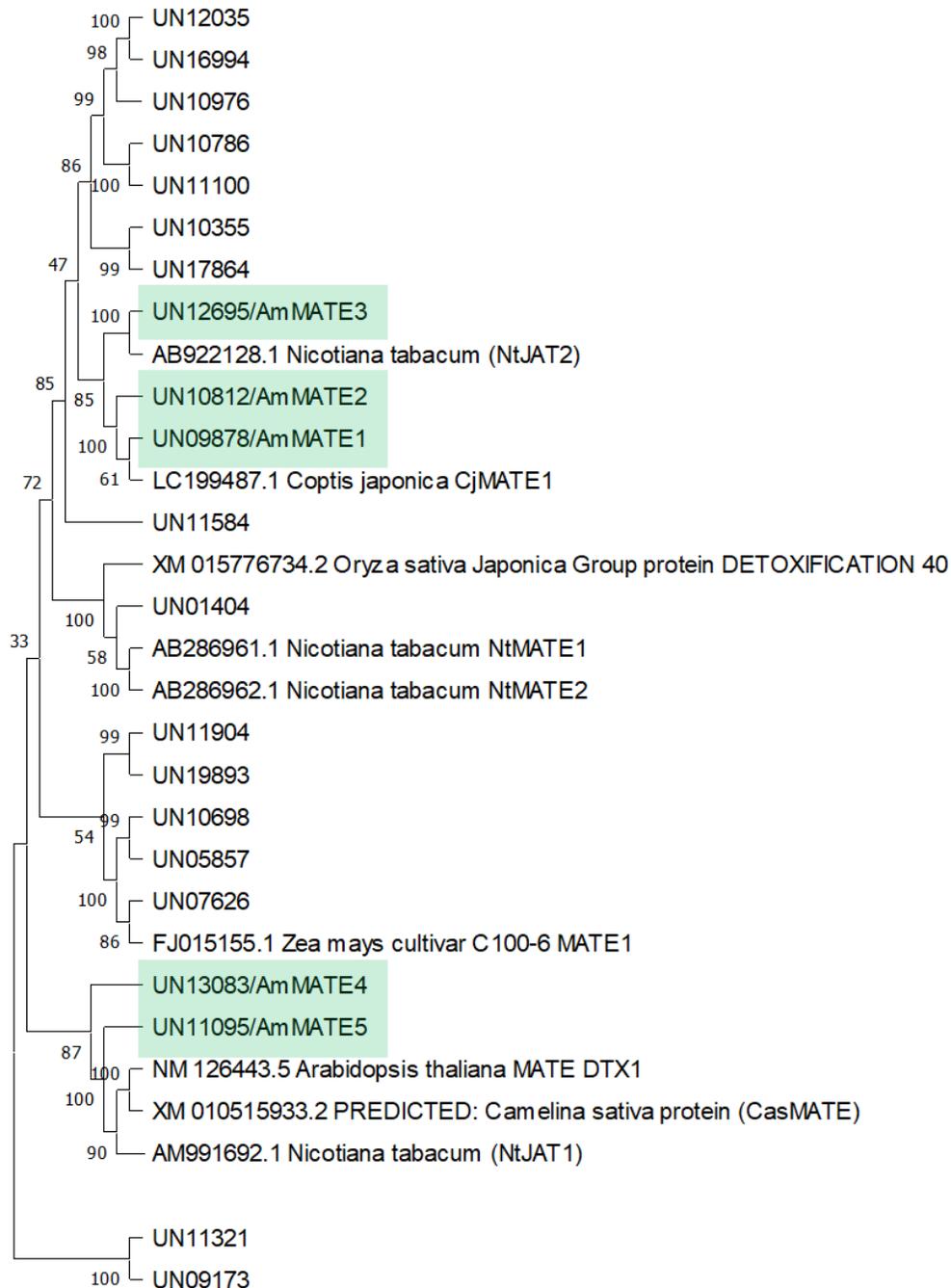


Figura 7.4. Árbol filogenético (maximum parsimony; 500 bootstraps) presuntos AmMATEs contra transportadores MATE que movilizan alcaloides de diferentes especies (*Nicotiana tabacum*, *Coptis japonica* y *Arabidopsis thaliana*), transportadores detoxificantes de *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Camelia sativa*. Los números de accesoión son los siguientes: AtDTX1 (NM126443), CjMATE1 (LC199487), NtJAT1 (Am991692) NtJAT2 (AB922128), NtMATE1 (AB286961) y NtMATE2(AB286962), también están CasMATE (XM010515933), OsDETOX40 (XM015776734) y ZmMATE1 (FJ015155).

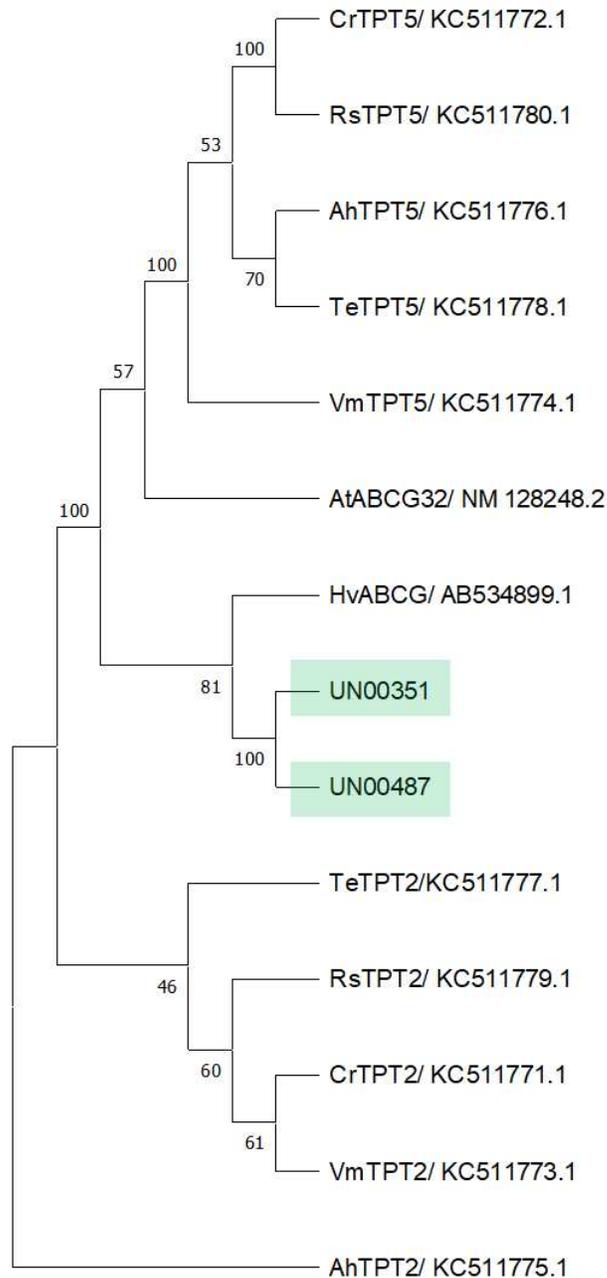


Figura 7.5. Árbol filogenético (maximum parsimony; 500 bootstraps) presuntos AmABCGs contra transportadores ABCG que movilizan alcaloides de diferentes especies (*Catharanthus roseus*, *Vinca minor*, *Amsonia hubrichtii*, *Tabernaemontana elegans* y *Rauvolfia serpentina* y otras especies: *Arabidopsis thaliana* y *Hordeum vulgare*). Los números de accesión son los siguientes: AhTPT2(KC511775), AhTPT5 (KC511776), AtABCG32 (NM128248), HvABCG (AB534899) CrTPT2 (KC511771), CrTPT5 (KC511772), RsTPT2 (KC511779), RsTPT5 (KC511780), TeTPT2 (KC511777), TeTPT5 (KC511778), VmTPT2 (KC511773) y VmTPT5 (KC511774).

8. RESULTADOS AISLAMIENTO DE CANDIDATOS AmMATE2-AmMATE5

8.1. AISLAMIENTO DE LOS POSIBLES TRANSPORTADORES DE ALCALOIDES TIPO MATE DE “*A. MEXICANA*”.

Como resultado del análisis bioinformático, los candidatos AmMATE2, AmMATE3, AmMATE4 y AmMATE5 fueron seleccionados para el aislamiento de su cDNA, cuatro presuntas proteínas tipo MATE, etiquetadas como UN10812, UN12695, UN13083y UN11095 en el transcriptoma y que se denominarán de aquí en adelante como AmMATEs del 2 al 5, respectivamente. En un trabajo previo se había logrado el aislamiento de AmMATE1 (Loza-Müller, *et al.*, NP). De acuerdo con la secuencia del transcriptoma las presuntas AmMATE2 a -5 codifican para marcos de lectura de 1512, 1485, 1446 y 1476 nucleótidos, correspondientes a polipéptidos de 504, 495, 482 y 492 aminoácidos, respectivamente. Adicionalmente, se obtuvieron 76 y 294 nt de los extremos 5' y 3' de las regiones no traducibles de AmMATE2; 29 y 237 nt de los extremos 5' y 3' de las regiones no traducibles para AmMATE3, 35 y 247 para AmMATE4; y 93 y 323 para AmMATE5 (Fig. 8.2). Las diferentes AmMATE mostraron porcentajes de similitud entre 34.24 y 77.47% a transportadores previamente descritos. Así, AmMATE-2 tuvo 77.47% de similitud con CjMATE1 (Takanashi, *et al.* 2017), AmMATE3 60.37% con NtJAT2 (Shitan, *et al.* 2014), mientras que AmMATE4 y AmMATE5 48.34 y 57.48% respectivamente con NtJAT1 (Morita, *et al.* 2009). En todos los casos se encontraron los elementos distintivos del tipo de proteínas, como los motivos CGQA en el dominio N-terminal y el motivo RXSNELGA en el dominio C-terminal (Fig. 8.1). Las zonas divergentes más extensas se encontraron en las regiones en los extremos de las secuencias y en la región posterior al motivo RXSNELGA, sin embargo, existe divergencia a lo largo de todas las secuencias (Fig. 8.1).

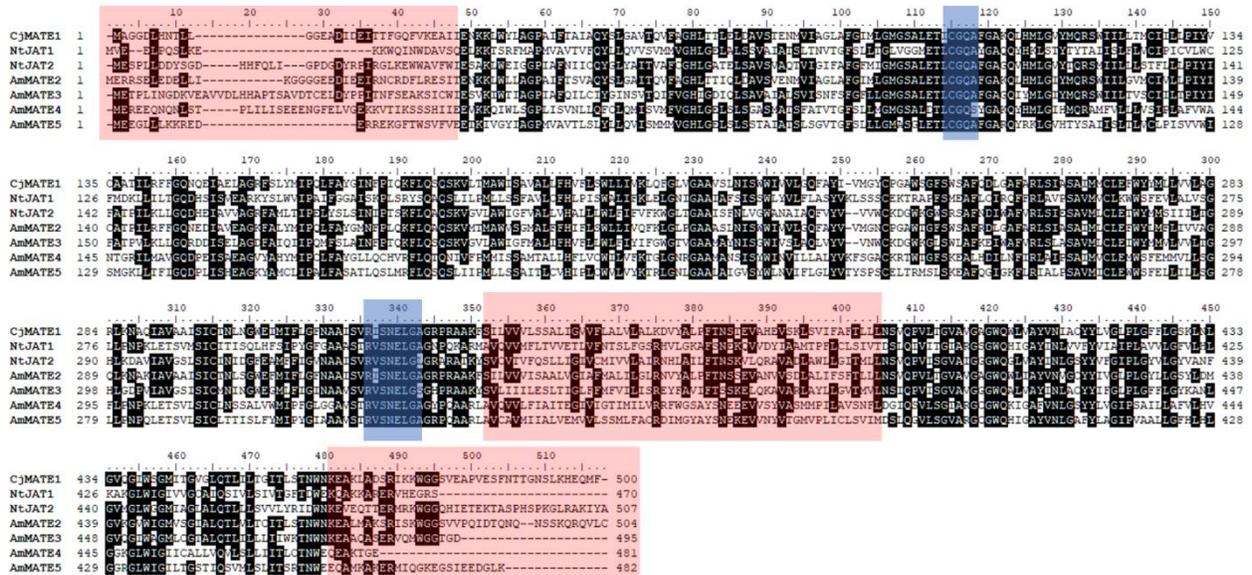


Figura 8.1. Alineamiento de los AmMATE contra CjMATE, NtJAT1 y NtJAT2, sombreado en rojo las regiones más divergentes, sombreado en azul se encuentran los motivos conservados CGQA y RVSNELGA.

El aislamiento de los candidatos seleccionados se realizó mediante una estrategia de PCR. Para ello, primeramente, se diseñaron cebadores específicos sobre regiones divergentes para las diferentes AmMATE, su ubicación topológica y características se encuentran en la Tabla 8.1, esto con el fin de amplificar fragmentos de entre 218 y 540 pb, para cada uno (Tabla 8.1). Para AmMATE2 y AmMATE3 se utilizó RNA de las partes aéreas de plántulas juveniles, suspensión celular y raíz de plántulas juveniles, debido a que el transcriptoma es de plántulas y había mayor probabilidad de encontrarlos en ese estado del desarrollo. RNA de raíces y endospermo de plantas silvestres maduras fue usado para AmMATE5 debido a su similitud con NtJAT1 previamente reportados en raíz, y en endospermo debido a que hay evidencia del movimiento de alcaloides desde la raíz hacia las semillas. Para AmMATE4 se realizó el ensayo en RNA de raíces, debido a su cercanía con AmMATE5 y NtJAT1, y en tallo para tener otro tejido de referencia. Se encontró abundancia de AmMATE2 y AmMATE3 en la parte aérea y raíces de plántulas y suspensiones celulares; Las raíces de plantas maduras mostraron presencia de AmMATE4 y AmMATE5. Este ejercicio se realizó únicamente para definir el tejido para el aislamiento de los cDNA completos de los AmMATES.

Tabla 8.1. Cebadores específicos empleados para la detección de los transcritos de las diferentes presuntas proteínas MATE en tejidos de *A. mexicana*.

Transportador correspondiente	Primers	Secuencia	Ubicación Nucleótidos	Tm°C	Amplicón esperado
AmMATE2 ●	M2Fw ₂	5'GTTTCGCTCGGCTCTCCATTG3'	ORF(783→ 802)	65°C	273bp
AmMATE2 ●	M2Rv ₁	5'CCGACCAATGCCGCTGATA3'	ORF(1055→ 1037)	65°C	
AmMATE3 ●	M3Fw ₂	5'GGGTACTGTTGGTGCGGCTATG3'	ORF(675→ 696)	65°C	290bp
AmMATE3 ●	M3Rv ₁	5'ACATGCCTTCCCAGCCATTG3'	ORF(964→ 945)	65°C	
AmMATE4 ●	M4Fw ₂	5'GGGTTTGAATTAGTTGGTGAGA3'	ORF(67→ 88)	62.1°C	540bp
AmMATE4 ●	M4Rv ₂	5'CATCGCTGAGCTTATCATCATT3'	ORF(606→ 585)	63.4°C	
AmMATE5 ●	M5Fw _{Inimet}	5'ATGGAGGAAGGTTTGTATTG3'	ORF(1→ 22)	55.4°C	218bp
AmMATE5 ●	M5Rv ₂	5'AGAGAAGTAGCAATAGCAGTGC3'	ORF(218→ 197)	56°C	

Tabla 8.2. Condiciones de la PCR para la detección de la presencia tisular de los transcritos de las presuntas proteínas AmMATE en tejidos de *A. mexicana*. A) Condiciones de amplificación para AmMATE2 y AmMATE3; B) Condiciones de amplificación para AmMATE4 y AmMATE5

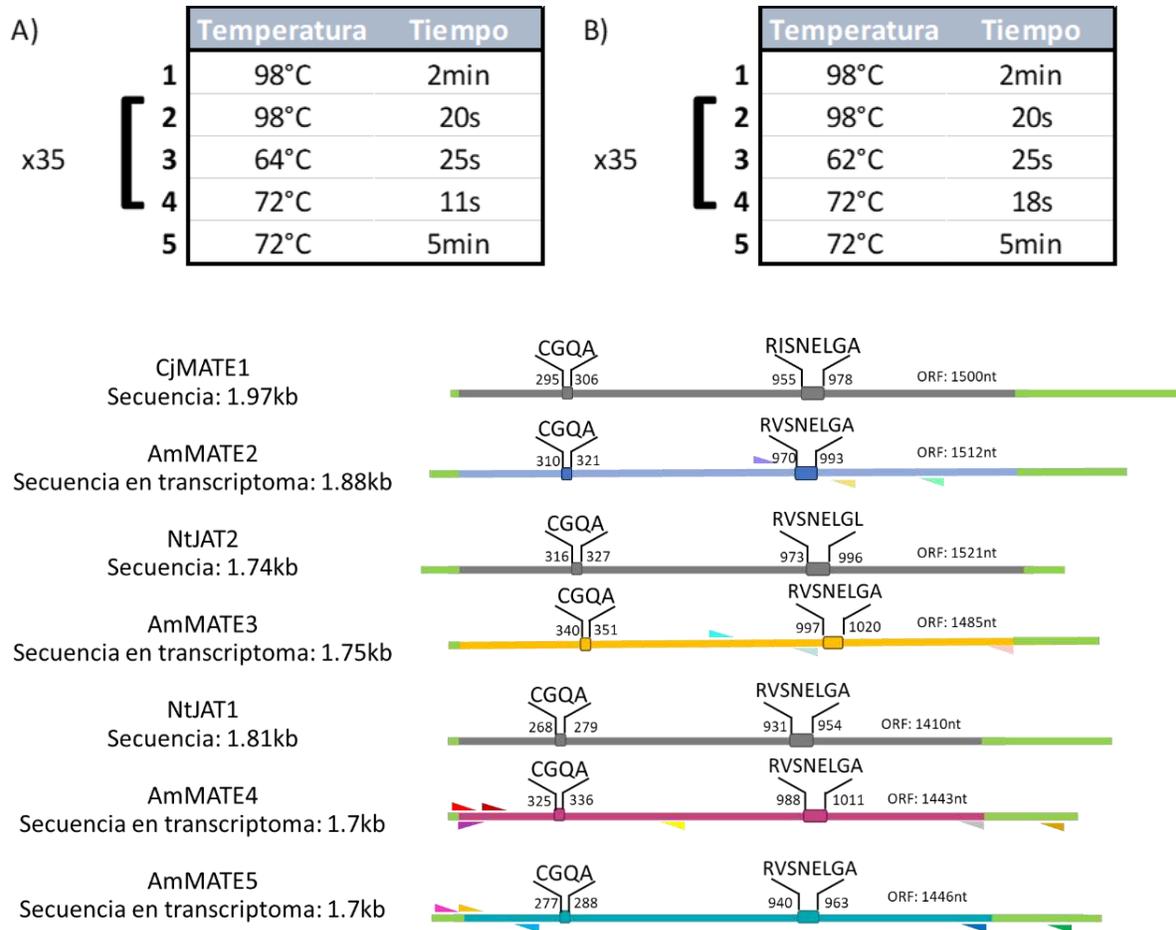


Figura 8.2. Esquema de AmMATEs frente a sus referencias más cercanas (CjMATE1, NtJAT2 y NtJAT1). Los recuadros representan la ubicación topológica de los motivos conservados de los MATEs especificando, con números, los nucleótidos en los que estos inician y terminan; su secuencia proteica se describe en la parte superior. De gris están las secuencias codificantes de las referencias y de azul claro, ámbar, magenta y cian oscuro las de AmMATE2, AmMATE3, AmMATE4 y AmMATE5 respectivamente; en verde claro se representan los UTR 3' o 5' según sea el caso. Los triángulos representan la ubicación topológica y el sentido de los cebadores diseñados, la secuencia y nombre de los mismos puede consultarse en las Tablas 8.1 y 8.3 por código de color.

8.2. AISLAMIENTO DE CDNA DE AmMATES

Tabla 8.3. Cebadores utilizados para el aislamiento de los cDNA de las presuntas proteínas AmMATE por PCR.

Transportador correspondiente	Primers	Secuencia	Ubicación Nucleótidos	Tm°C	Amplificón esperado
AmMATE2	M2Fw ₂	5'GTTTCGCTCGGCTCTCCATTG3'	ORF(783→802)	65°C	505bp
AmMATE2	M2Rv ₂	5'TCCGAGAGGAAGACCGACGA3'	ORF(1287→1268)	66°C	
AmMATE3	M3Fw ₂	5'GGGTAAGTGTGGTGC GGCTATG3'	ORF(675→696)	65°C	816bp
AmMATE3	M3Rv ₂	5'TCTTAATCGCCTGTGCCTCCC3'	UTR3'(+5)→ORF(1470)	66°C	
AmMATE4	M4Fw ₁	5'GAGAATCAGAGAAAGAAAACAAAG3'	UTR5' (-34→ -11)	59.6°C	1642bp
AmMATE4	M4Rv ₁	5'AACTACATGACTTTGCCCTTC3'	UTR3'(+165)→UTR3'(+145)	60.2°C	
AmMATE4	M4Fw _{Inimet}	5'ATGGAGAGAGAAGAACAAAATCAA3'	ORF(1→24)	62.3°C	1443bp
AmMATE4	M4Rv _{Nsc}	5'CTCGCCGTTTTTGCTTCT3'	ORF(1443→1424)	66.7°C	
AmMATE5	M5Fw ₁	5'GGTATCTCTCTACGTCTGTGA3'	UTR5' (-57→ -35)	62.9°C	1734bp
AmMATE5	M5Rv ₁	5'GGTAGCTTTGCAAGACTCAA3'	UTR3'(+236)→UTR3'(+217)	56.4°C	
AmMATE5	M5Fw _{Inimet}	5'ATGGAGGAAGGTTTGTTATTG3'	ORF(1→22)	55.4°C	1446bp
AmMATE5	M5Rv _{Nsc}	5'CTTTAATCCATCCTCCTATT3'	ORF(1446→1425)	56.4°C	

Con ayuda de los cebadores mostrados en la Tabla 8.3, y usando las condiciones de la Tabla 8.4, se amplificaron fragmentos de AmMATE2 y amMATE3 de 505 y 816 bp, (Fig. 7.5) respectivamente y las bandas correspondientes después de separarse en un gel de agarosa fueron cortadas y eluidas.

Tabla 8.4. Condiciones de la PCR para el aislamiento del cDNA de AmMATEs; A) condiciones para aislamiento de AmMATE2; B) condiciones para aislamiento de AmMATE3; C) condiciones de PCR anidada para el aislamiento de AmMATE4; D) condiciones de PCR anidada para el aislamiento de AmMATE5.

A)		Temperatura	Tiempo	B)		Temperatura	Tiempo		
x35	[1	98°C	2min	x35	[1	98°C	2min
		2	98°C	20s			2	98°C	20s
		3	58°C	25s			3	58°C	25s
		4	72°C	25s			4	72°C	25s
		5	72°C	5min			5	72°C	5min
C)		Temperatura	Tiempo	D)		Temperatura	Tiempo		
x35	[1	98°C	60 s	x35	[1	98°C	60 s
		2	98°C	25s			2	98°C	25s
		3	58°C	20s			3	60°C	20s
		4	72°C	50s			4	72°C	50s
		5	72°C	5min			5	72°C	5min
x35	[1	98°C	60 s	x35	[1	98°C	60 s
		2	98°C	25s			2	98°C	25s
		3	58°C	20s			3	57°C	20s
		4	72°C	40s			4	72°C	40s
		5	72°C	5min			5	72°C	5min

A partir de RNA de parte aérea y raíz de plántula y suspensión celular, se obtuvieron productos de 505 y 816 pb para AmMATE2 y AmMATE3, respectivamente (Fig. 8.5), que representaban fragmentos grandes de las regiones c-terminal de estas proteínas, que incluían los motivos RVSNELGA. Estos productos fueron secuenciados y usados posteriormente para el análisis molecular de estos transportadores.

Por otra parte, para el aislamiento de AmMATE4, se partió de RNA de raíces debido a que encontramos presencia del fragmento corto de esta secuencia. Primeramente, se utilizaron los cebadores M4Fw₁ y M4Rv₁ (Tabla 8.3) cuyos productos, esperados eran de 1642 pb y representaban el total del ORF más 34 nucleótidos en el UTR5' y 165 en el UTR3'. En una primera reacción, no se lograron visualizar los productos al ser separados en los geles de agarosa, sugiriendo un bajo nivel de expresión en las condiciones en las que se encontraba el tejido utilizado para la extracción de RNA (Fig. 8.3). Por ello, se utilizó una nueva combinación

de cebadores (M4Fw_{Inimet} y M4Rv_{Nsc}; Tabla 8.3), diseñados para una reacción anidada a partir de los productos de la primera reacción y cuyo producto esperado era de 1443 nucleótidos, eliminándose los UTRs y dejando solamente el ORF correspondiente a AmMATE4. Se utilizaron directamente 5 μ L de la reacción primaria como templado para la reacción y se obtuvo el producto deseado (Fig. 8.6) que se separó por electroforesis en un gel de agarosa 1.2% y que purificó del gel el DNA correspondiente escindiendo las bandas y procesándolas con el kit Zymoclean Gel DNA Recovery Kit de número de catálogo D40007, según lo indica el fabricante. Parte de los productos se conservaron a -20°C, mientras que otra se utilizó para secuenciación en un servicio externo para confirmar su identidad (Fig. 8.12).

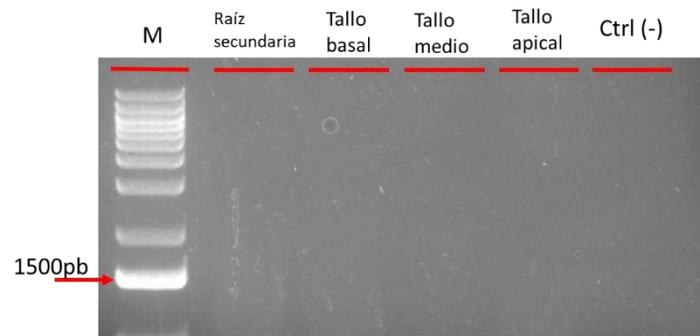


Figura 8.3. Gel de agarosa de la primera PCR para el aislamiento de AmMATE4.

Para el aislamiento de AmMATE5 se partió de RNA total de raíces y endospermo de plantas maduras debido a que aquí se encontró la presencia de este transcrito, también se utilizó tallo de plantas maduras como tejido de referencia. Se utilizaron los cebadores M5Fw₁ y M5Rv₁ (Tabla 8.3) para una primera reacción cuyo producto esperado era de 1734 pb (Fig. 8.2). De nuevo, la amplificación resultó en una baja formación del producto, sugiriendo la baja abundancia del transcrito en las condiciones del tejido utilizado (Fig. 8.4).

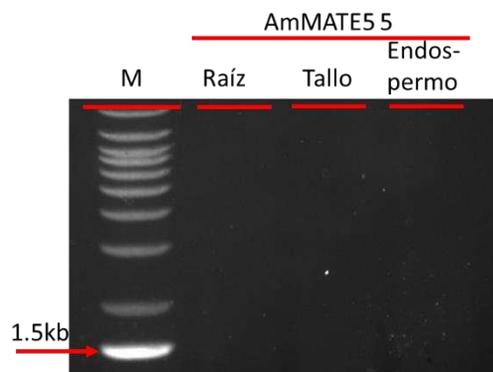


Figura 8.4. Gel de agarosa de la primera PCR para el aislamiento de AmMATE5; Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

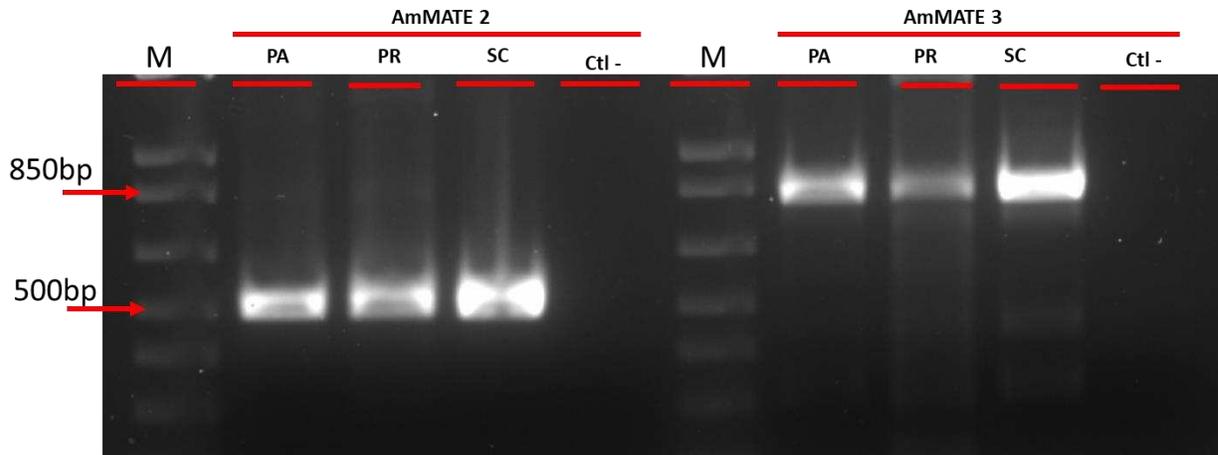


Figura 8.5. Distribución tisular y aislamiento de los transcritos correspondientes a las presuntas proteínas AmMATE2 y AmMATE3. PA, Parte Aérea de la Plántula; PR, Raíz de la Plántula; SC, Suspensión Celular. Ctl – corresponde a la reacción de PCR sin cDNA. Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

Por ello, se realizó una segunda reacción anidada utilizando los cebadores M5Fw_{Inimet} y M5Rv_{NSC} (Tabla 8.3), cuyo producto esperado era de 1446bp (Fig. 8.2) y diferían del primero en que se eliminaron los UTRs, quedándonos solamente con el ORF de la proteína (Fig. 8.6). El producto se separó por electroforesis en agarosa y se aisló como se describió anteriormente. Parte del producto se envió para su secuenciación en un servicio externo (Fig. 8.13, Fig. 8.14).

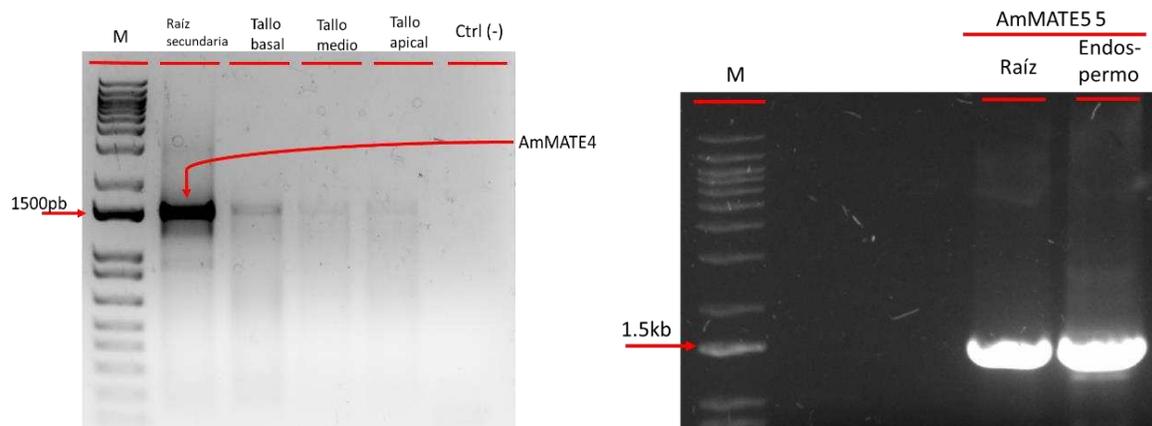


Figura 8.6. Aislamiento de los transcritos correspondientes a las presuntas proteínas AmMATE4 y AmMATE5. Ctl – corresponde a la reacción sin templado. Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

8.2.1. Transformación de *E. coli* con AmMATE4 y AmMATE5 y selección de colonias

AmMATE2 y AmMATE3 pertenecen el mismo clado que AmMATE1 por lo que se cree que comparten características similares, debido a ello, se consideró que por ser parte de un clado distinto al de AmMATE1, tanto AmMATE4 como AmMATE5 pueden tener características diferentes que presenten novedad respecto a los anteriores y en consecuencia, sus cDNAs completos se insertaron en vectores plasmídicos para su multiplicación, almacenamiento y manejo. Los cDNA para los presuntos transportadores AmMATE4 y AmMATE5 se ligaron de manera independiente en PCR8/GW/TOPO como se describe en la sección reacciones de ligación de materiales y métodos. Una parte del producto de la reacción de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* Top 10. La transformación se realizó por choque térmico como se describe en la sección “transformación” de materiales y métodos; las bacterias transformadas se cultivaron en placas de Petri con medio LB suplementado con 100 µg/mL de espectinomicina, se incubaron a 37°C por 16 horas.

En un primer ejercicio no se obtuvieron colonias en la reacción PCR8/GW/TOPO-AmMATE4. No obstante, se obtuvieron cerca de 200 colonias de la reacción PCR8/GW/TOPO-AmMATE5. Se tomó una porción de 15 colonias al azar y se analizaron directamente por PCR utilizando los cebadores M5Fw_{Inimet} y M5Rv_{Nsc} (Tabla 8.3). En 9 de las colonias analizadas se obtuvieron productos de los tamaños esperados y en 12, en un segundo experimento (1446 pb; Fig. 8.7). Paralelamente, se realizaron cultivos en medio líquido de las colonias con el fin de realizar una mini preparación y se tomaron 0.5mL para resguardarlos en una solución de glicerol al 25% a -80°C.

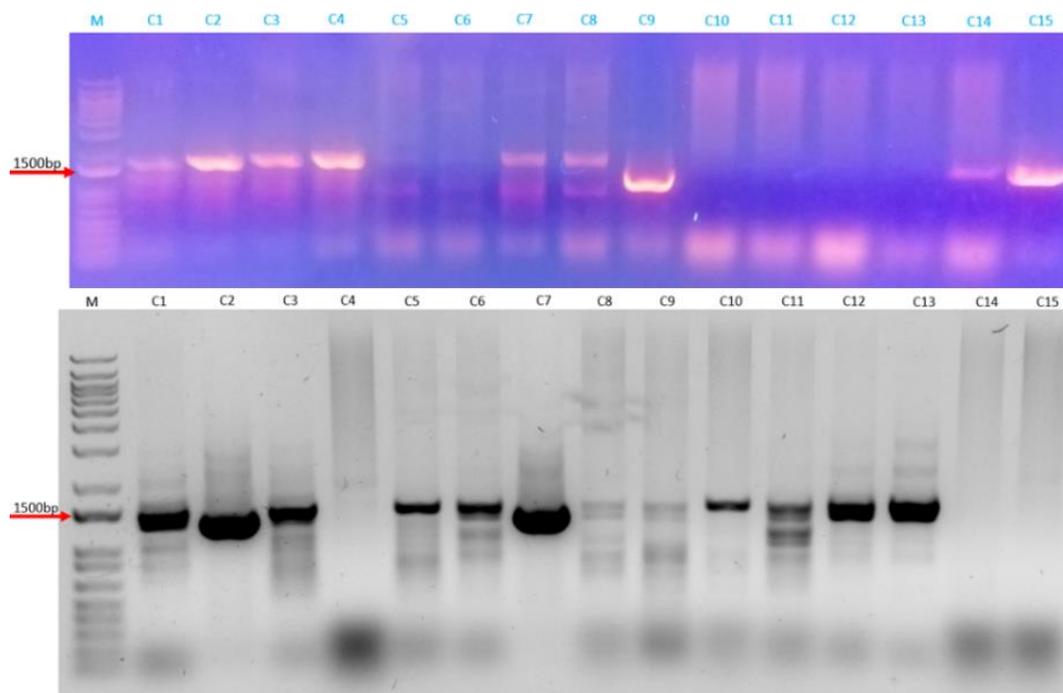


Figura 8.7. Análisis de la presencia de AmMATE5 en las colonias de bacterias transformadas con PCR8/GW/TOPO-AmMATE5. Se tomaron 15 colonias al azar del producto de la reacción de transformación. Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

Se realizaron mini-preparaciones de DNA de las colonias C2, C3, C4 y C15 y de las colonias C2 y C7 con ayuda del GeneJET Plasmid Miniprep Kit con número de catálogo K0503, *thermoscientific*, conforme a las instrucciones del fabricante. Para determinar la orientación de los insertos se digirió el DNA de las colonias anteriores con la enzima de restricción EcoRV. De acuerdo a la posición del inserto en el sitio de clonación del vector (Fig. 8.9), aquellos con la orientación correcta, deberían generar productos de 3753bp y 510 pb, mientras que los insertos para la orientación opuesta los productos serían de 3075 y 1188 pb. Los productos de la digestión EcoRV fueron corridos en un gel de agarosa al 1.2% junto con controles que contenían el DNA sin digerir (Figura 8.9). En la figura 8.8 observamos el perfil de digestión esperado del plásmido PCR8/GW/TOPO_AmMATE5 en sentido y en anti-sentido. Como se observa, los productos fueron de 3075bp y 1188bp indicando que todas las colonias analizadas contenían plásmidos con el inserto de DNA en orientación antisentido (Fig. 8.9).

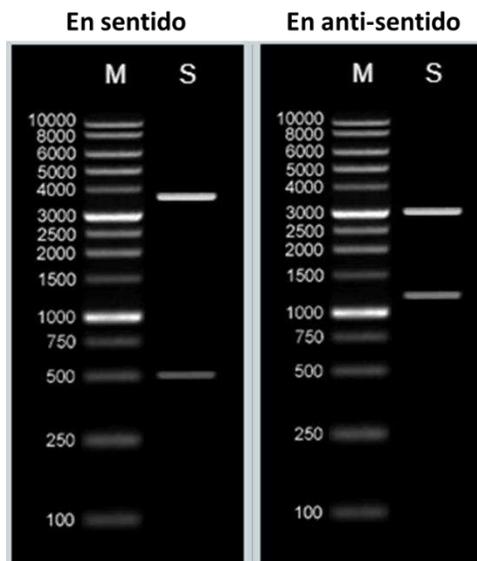


Figura 8.8. Perfil de digestión de PCR8/GW/TOPO-AmMATE5 con EcoRV, en sentido: fragmento de 3753bp y otro de 510bp; en anti-sentido: fragmentos de 3075 bp y 1188bp.

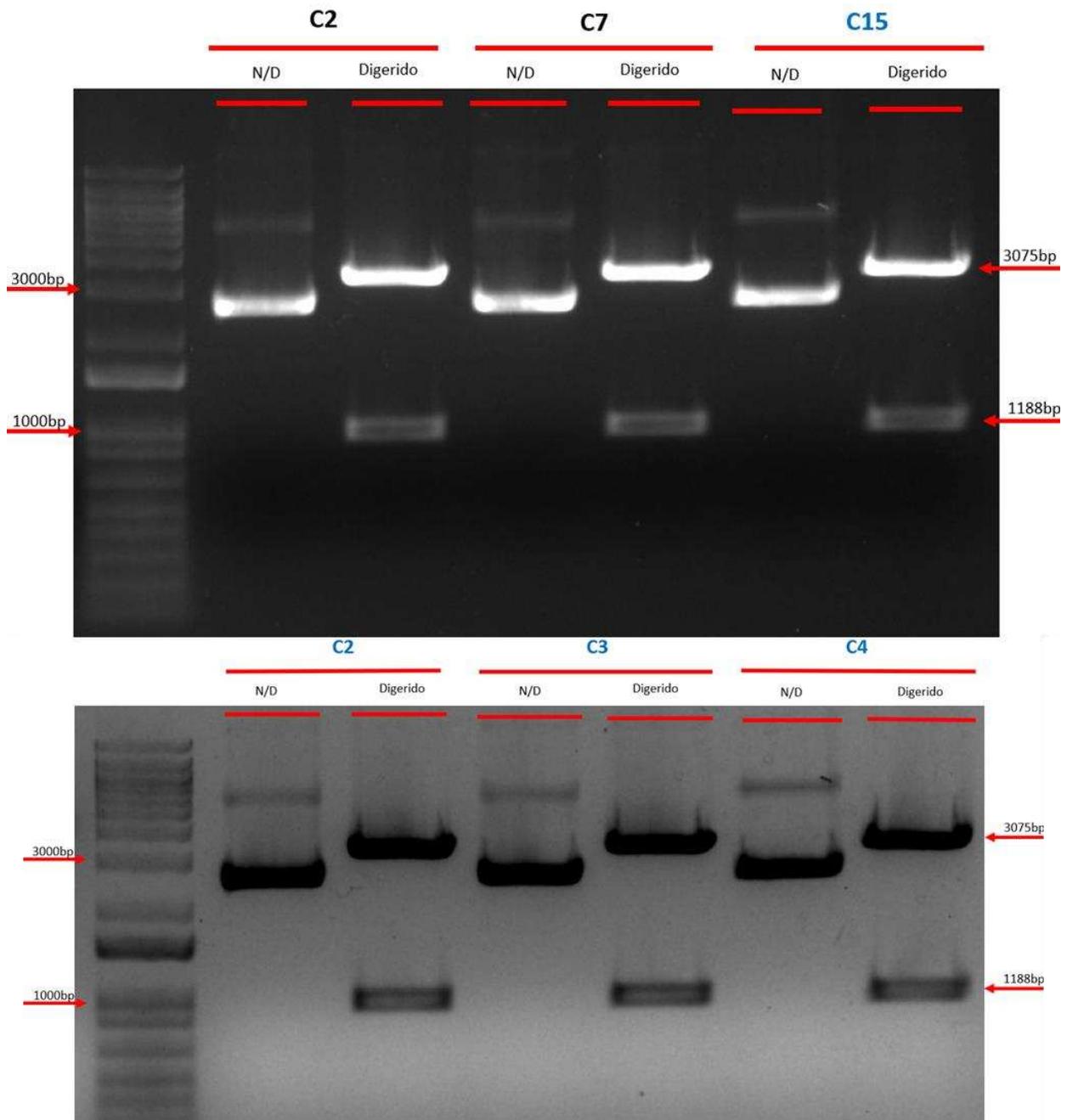


Figura 8.9. Análisis de la orientación de los insertos en los plásmidos de las colonias C2, C7, C15 y C2, C3 y C4. Los plásmidos fueron aislados y digeridos con EcoRV antes de ser separados por electroforesis. Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

8.2.2. Secuenciación de los cDNA correspondientes a las presuntas proteínas MATE de *A. mexicana*.

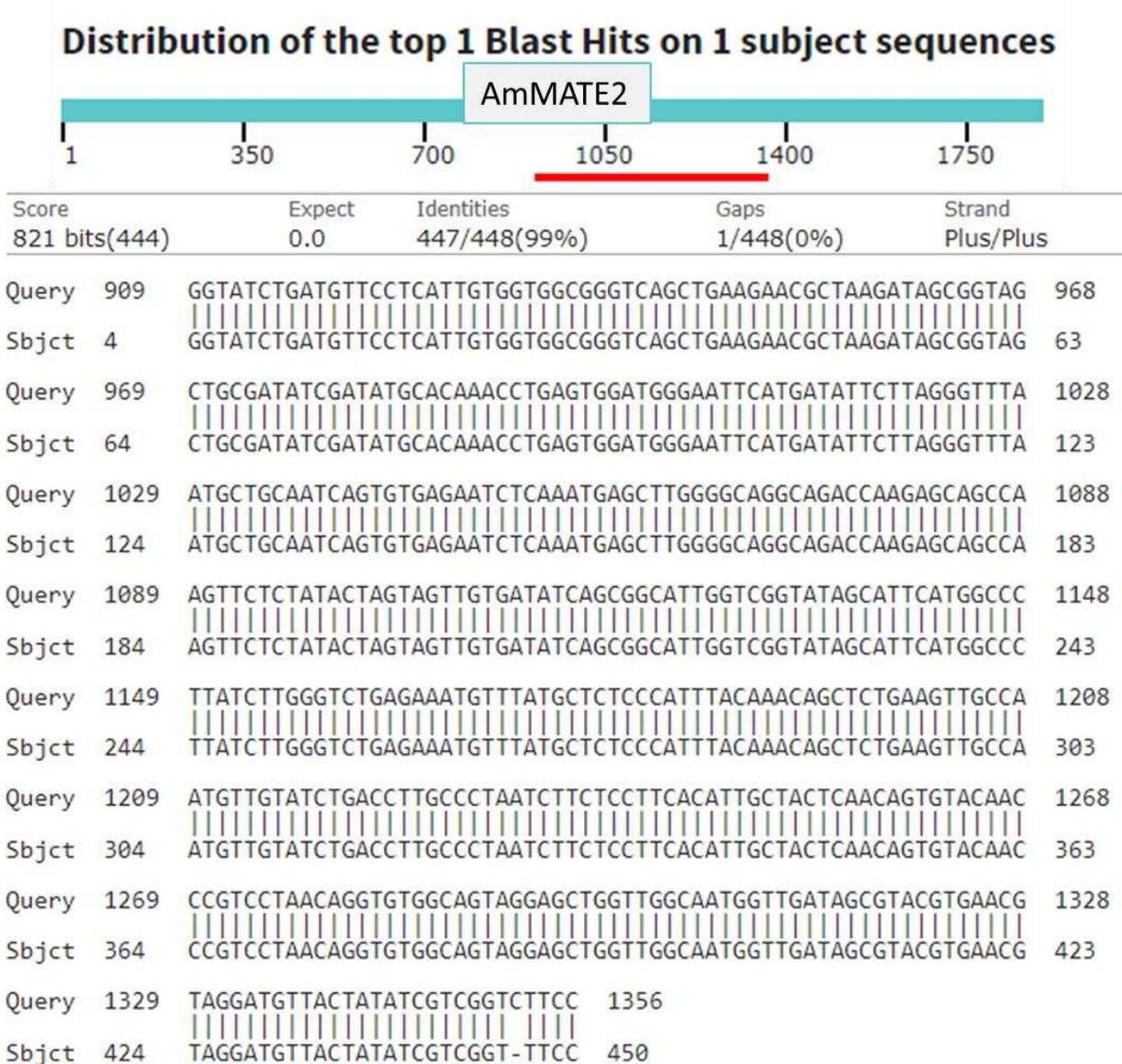
Los cDNA correspondientes a las presuntas proteínas MATE, fueron secuenciados para confirmar su identidad. Para ello, se prepararon las muestras conforme a las instrucciones del prestador del servicio, en un tubo con 10µL se tiene una concentración final de 25ng/ µL de templado y 1 µM del cebador que se utilizará para la reacción de secuenciación (Tabla 8.5). Debido a que, por el momento no se generaron los productos completos de AmMATE2 y AmMATE3, se obtuvieron secuencias parciales. Así, el fragmento secuenciado de AmMATE2 correspondía a un tamaño de 505 pb y representaba gran parte del dominio C-terminal de la proteína (Fig. 8.10; Tabla 8.5). La secuencia del cebador para iniciar la reacción, se encontraba en la región previa al motivo RVSNELGA y el producto aislado mostró una identidad de 99% contra la secuencia del transcriptoma. Por su parte, el fragmento secuenciado de AmMATE3 correspondía a un tamaño de 816 pb, representando el dominio C-terminal de la proteína (Fig. 8.11; Tabla 8.5). La secuencia del cebador para iniciar la reacción, se encontraba en la parte media de la secuencia codificante, al final de la región N-terminal y hasta la región C-terminal, abarcando gran parte de la proteína, el producto aislado también mostró una identidad de 99% contra la secuencia del transcriptoma.

Tabla 8.5. Fragmentos para secuenciación AmMATEs.

AmMATEs	Fragmento enviado	Primer utilizado	Secuencia del primer
AmMATE2	859-1363	M2Fw ₂	5'GTTTCGCTCGGCTCTCCATTG3'
AmMATE3	704-1519	M3Fw ₂	5'GGGTAAGTGTGGTGC GGCTATG3'
AmMATE4	cds	M4Rv ₂	5'CATCGCTGAGCTTATCATCATT3'
AmMATE5	PCR8/GW/TOPO-AmMATE5	M ₁₃ Fw	5'GTAAAACGACGGCCAGTG3'
AmMATE5	PCR8/GW/TOPO-AmMATE5	M ₁₃ Rv	5'GGAAACSGTTSTGACCATG3'

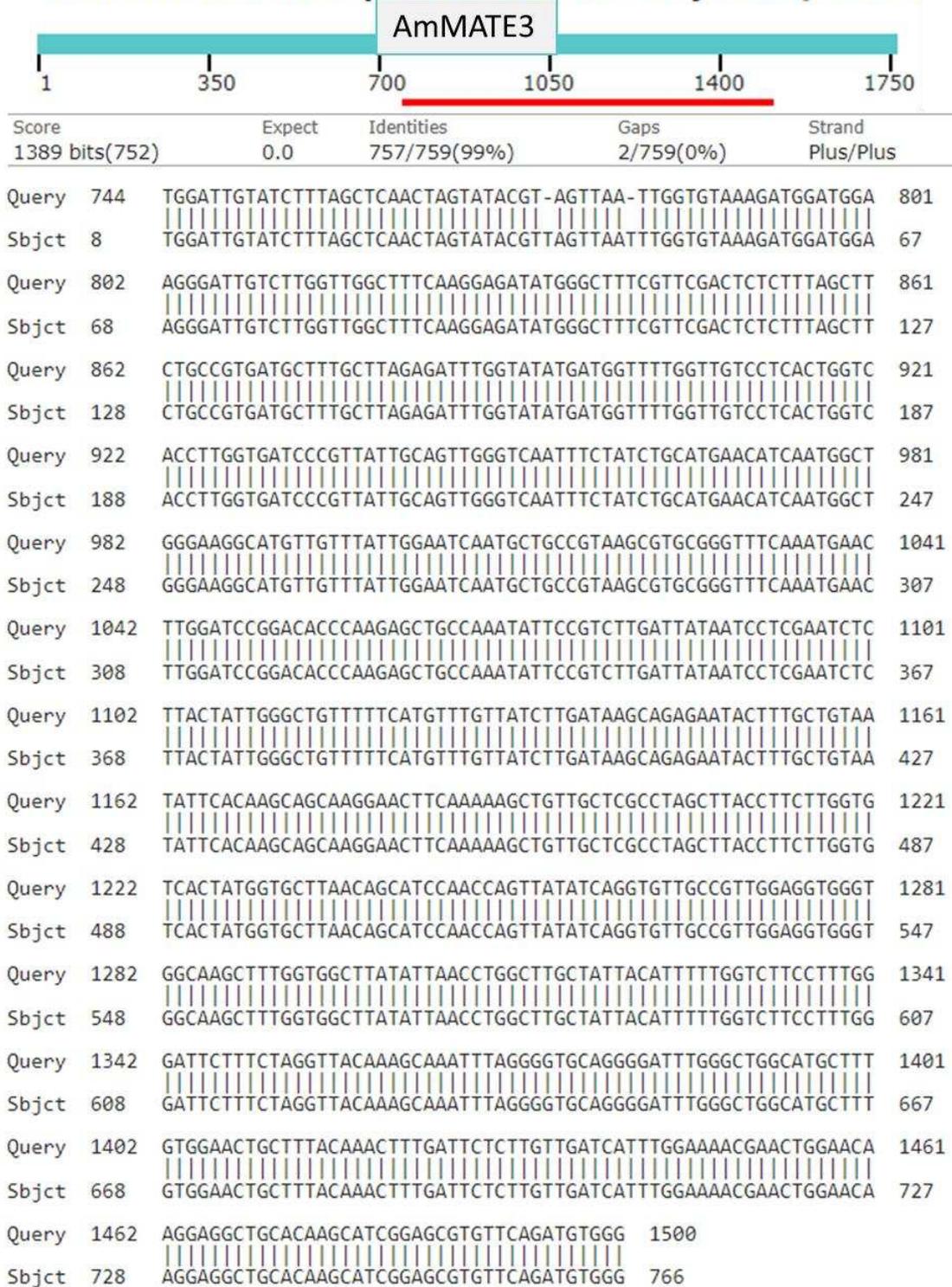
Para AmMATE4 se aisló el producto de PCR completo correspondiente a su ORF y se secuenció utilizando el cebador M4Rv₂. Las secuencias de los cDNA fueron idénticas a las que se encontraron en el transcriptoma, salvo en un par de nucleótidos contiguos casi al final de la secuencia (Fig. 8.12). Para AmMATE5, se aisló PCR8/GW/TOPO-AmMATE5 y se secuenció utilizando los cebadores M₁₃ tratando de abarcar la mayor distancia posible de la secuencia; Se logró secuenciar un fragmento de 1076bp cuya identidad con el AmMATE5 del transcriptoma es de 98% con inserciones en un nucleótido hacia la última parte de la secuencia y otro fragmento de casi 400bp con una identidad de 97% que tenía algunas sustituciones de nucleótido

mayormente frecuentes hacia el final del fragmento secuenciado. La identidad de los cDNA aislados con los ensamblajes del transcriptoma confirman que éstas representan transcritos auténticos de esta planta. Esto es de relevancia considerando que el transcriptoma fue ensamblado *de novo* y sin contar con un genoma de referencia.

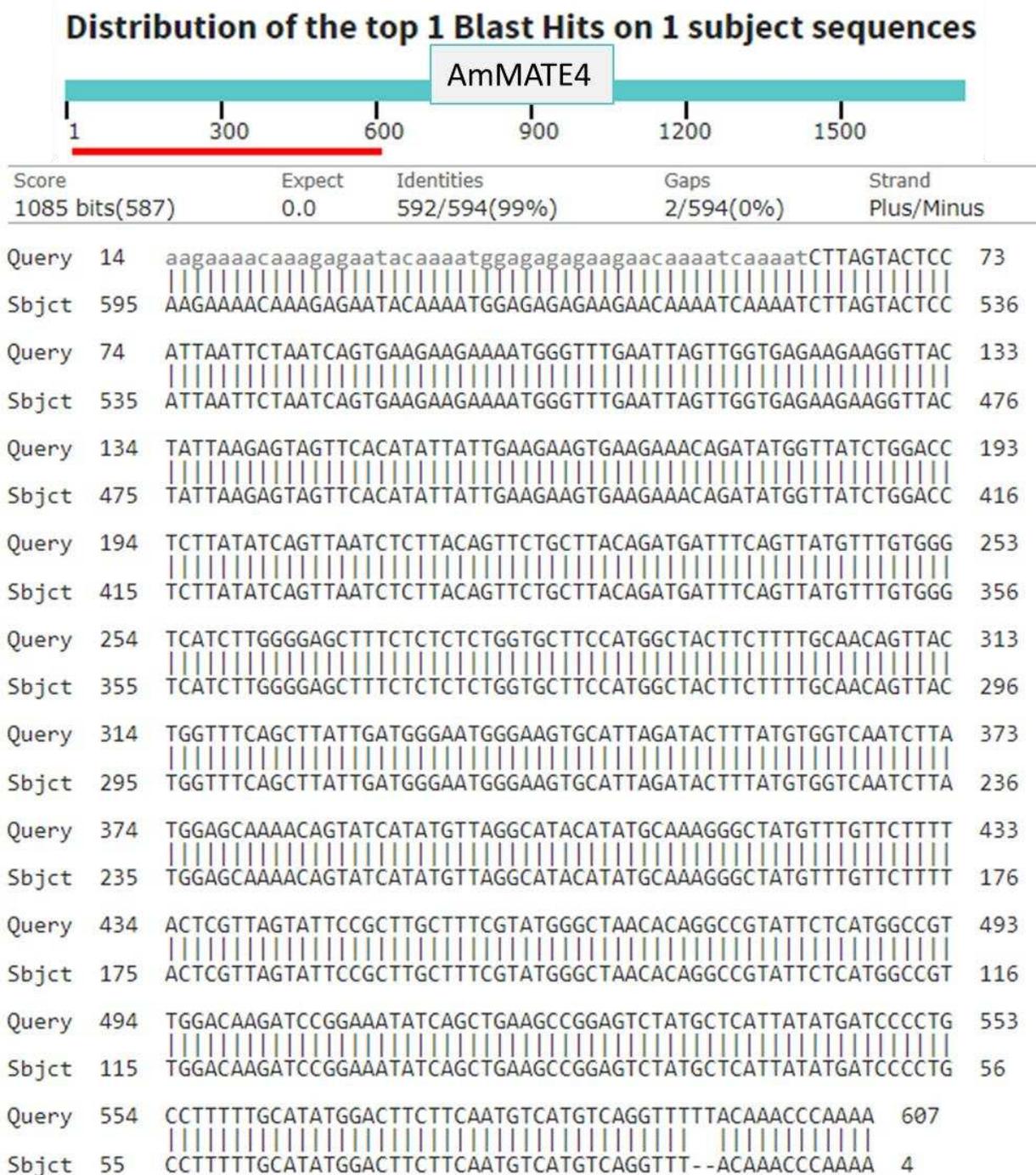


Figuras 8.10. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra el producto de PCR secuenciado. AmMATE2.

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



Figuras 8.11. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra el producto de PCR secuenciado. AmMATE3.

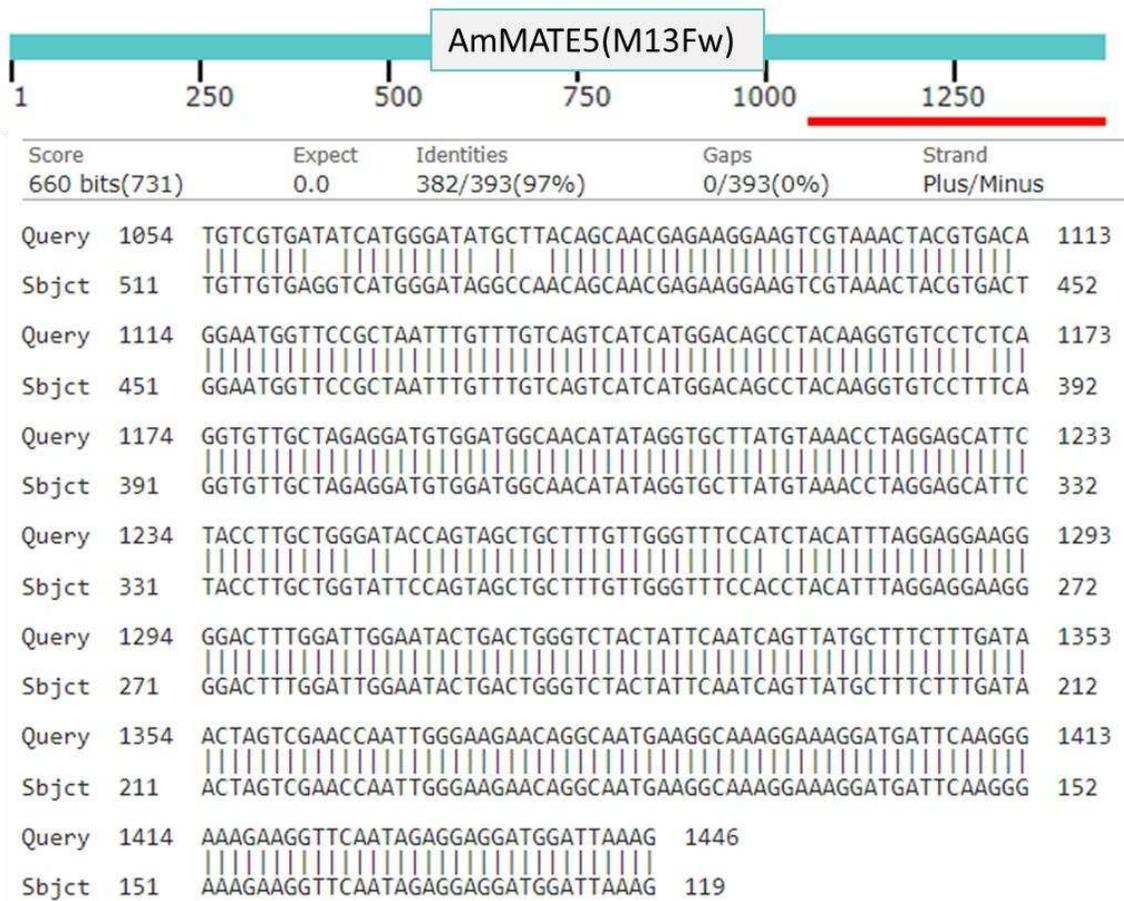


Figuras 8.12. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra el producto de PCR secuenciado. AmMATE4.



Figuras 8.13. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra el plásmido secuenciado. AmMATE5, región 5'.

Distribution of the top 1 Blast Hits on 1 subject sequences



Figuras 8.14. Alineamientos de la secuencia de los AmMATEs contra el plásmido secuenciado. AmMATE5, región 3'.

8.2.3. Síntesis de vectores de entrada con AmMATES

Una vez confirmada la representatividad de los cDNA aislados, y considerando que repetidos ejercicios de clonación resultaron en insertos posicionados en anti sentido en los vectores, se tomó la decisión de diseñar los vectores para su expresión heteróloga, sintetizando químicamente los genes de interés (AmMATE2-AmMATE5) flanqueados con los sitios attL1 y attL2 e insertándolos en el MCS de pUC19. Con el fin de que se lleven a cabo los análisis funcionales, se propusieron vectores de entrada diseñados con tecnología Gateway debido a su fácil manipulación para integrarlo en cualquier vector de destino que contenga esta tecnología de recombinación homóloga.

Para el diseño de los vectores se consideró que, además de permitir la expresión heteróloga en otras plantas como *N. benthamiana*, fuera posible la selección por resistencia antibióticos, así como la inclusión de etiquetas visibles con fluorocromos, para su localización subcelular por microscopía de fluorescencia. La figura 8.15 muestra el mapa de los plásmidos diseñados a partir del vector pUC19 con los sitios de recombinación homóloga attL1 y attL2 flanqueando los AmMATEs sintetizados químicamente. Los marcos de lectura fueron posicionados en el sitio 408 de los vectores, como gen selectivo se dejó la resistencia a ampicilina que tenía el vector original. Se clonaron en los vectores modificados cuatro presuntas proteínas MATE y los plásmidos resultantes tuvieron tamaños de 4396, 4369, 4327 y 4330 bp para AmMATE2, AmMATE3, AmMATE4, y AmMATE5, respectivamente. Los mapas detallados se muestran en la Fig. 8.15.

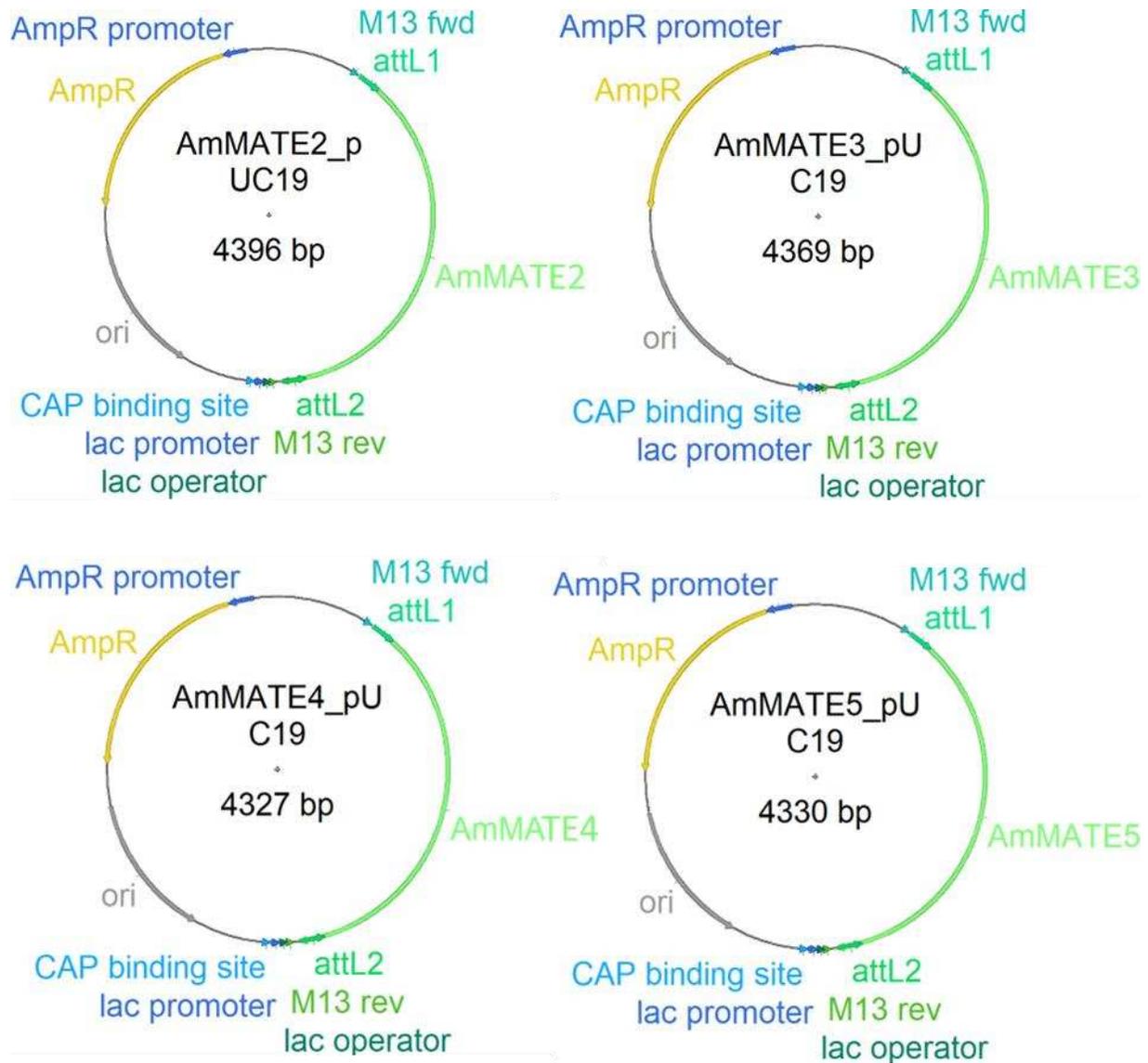


Figura 8.15. Mapa de los plásmidos pUC19-AmMATEs con portado las presuntas proteínas AmMATEs de *A. mexicana*. A) AmMATE2, B) AmMATE3, C) AmMATE4, D) AmMATE5. En azul el promotor del gen de resistencia a ampicilina, De amarillo el gen de resistencia a ampicilina, de verde brillante los ORFs de los AmMATEs, de verde están los sitios de recombinación homóloga attL1 y attL2, de color turquesa el sitio de unión del primer M₁₃Fw, de verde pasto el sitio de unión del primer M₁₃Rv, en gris está el origen de replicación del plásmido. El sentido de las flechas indica el sentido en el que se transcriben los elementos mencionados. Además de los elementos mencionados, se tienen elementos como sitio de unión a CAP o promotor lac que son vestigios del diseño de pUC19 que se tomó como base para construir estos vectores.

9. RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DE TRANSPORTADORES

9.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PRESUNTAS PROTEÍNAS MATE DE “*A. MEXICANA*”

Las probables proteínas MATE aisladas de los tejidos de *A. mexicana* presentan elementos que permiten sugerir su participación como transportadores de alcaloides, como la homología con otros transportadores de alcaloides. Hasta el momento, no nos ha sido posible confirmar esta actividad mediante análisis funcionales, sin embargo, sus patrones de distribución tisular podrían aportar evidencia que soporte esta función, de coincidir con los patrones de distribución de los alcaloides. Por ello, se analizó la presencia de los transcritos correspondientes en tejidos de plantas maduras, como hoja, tallo, raíz, y cápsulas maduras e inmaduras; de hipocótilos y radículas de plántulas en desarrollo, así como de suspensiones celulares (línea AM1) a los 14 días de resiembra. Es importante mencionar que en plantas maduras la berberina se acumula en la mayoría de los tejidos, mientras que la sanguinarina únicamente se encuentra en la raíz y en las semillas maduras (Rubio-Piña & Vázquez-Flota, 2013; Rubio-Piña, 2009), mientras que, en plántulas de dos meses de edad, se observó que los alcaloides reticulina, protopina, alocriptopina, criptopina, berberina y queleritrina se localizan en hoja, tallo, cápsula, látex y raíz, mientras que la sanguinarina se encontró únicamente en la raíz (Chávez, *et al.*, 2011). En plántulas en desarrollo de *A. mexicana*, cuando las radículas emergen durante la germinación, el primer alcaloide en acumularse es la sanguinarina y después de 18 días, coincidiendo con el despliegue de los cotiledones, se puede detectar la presencia de berberina (Xool-Tamayo, 2016). En las suspensiones celulares, la sanguinarina se encuentra predominantemente, encontrándose también otros alcaloides intermediarios como queleritrina, estilopina, protopina y reticulina (Guízar-González, *et al.*, 2012). La presencia de los transcritos en los diferentes tejidos se evaluó por PCR punto final.

Por otra parte, para analizar la posible participación de las presuntas proteínas MATE en el transporte de alcaloides de largas distancias, se realizó un análisis de ubicación subcelular de AmMATE4 y AmMATE5 *in silico*. Esto debido a que nos interesan particularmente las proteínas que se encuentren en membrana plasmática. Para ello, se emplearon los paquetes Plant-mPLOC, BUSCA y WoLF PSORT (Kuo-Chen & Hong-Bin, 2010 [<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>]; Savojardo, *et al.*, 2018 [<https://busca.biocomp.unibo.it/>]; Horton, *et al.*, 2007 [<https://www.genscript.com/wolf-psort.html>]). Adicionalmente, debido a que la actividad de transportadores ABC en *Arabidopsis thaliana*, en particular AtABCG36, es modulado por

modificaciones postraduccionales, también se incluyeron análisis de posibles sitios de fosforilación utilizando NetPhos - 3.1 (Blom, Gammeltoft & Brunak, 1999) en el sitio web: [https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhos-3.1/]. Aunado a esto, se analizó la hidrofobicidad de las proteínas para ver que tan posible es para una cinasa alcanzar dichos sitios con la herramienta DeepTMHMM – 1.0 (Jeppe Hallgren, *et al*, 2022) desde el sitio web: [https://services.healthtech.dtu.dk/services/DeepTMHMM-1.0/].

9.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TISULAR

Se obtuvo RNA total de los tejidos mostrados en la Tabla 9.1.

Tabla 9.1. RNA de tejidos de *A. mexicana*.

Tejido	Concentración (ng/μl)	Relación 260/280	18S amplificado
Hoja	146.06	2.04	Si
Tallo	303.23	2.01	Si
Raíz	103.1	2.08	Si
Cápsula madura	999.3	2.04	Si
Cápsula Inmadura	827.4	2.02	Si
Plántula Aereo	827.4	2.01	Si
Plántula Raíz	356.2	2.08	Si
Suspensión Celular	356.5	2.13	Si

Para analizar la distribución de los AmMATEs se utilizaron los cebadores mostrados en la Tabla 9.1 y las condiciones de la Tabla 9.2. Los productos esperados también se muestran en la Tabla 9.1. En las condiciones del análisis, se observa que, en hojas y tallos de plantas maduras, se presentan niveles considerables de los transcritos para AmMATE 1, para raíces y cápsula inmadura se observa una expresión menor en comparación con los tejidos anteriores, caso contrario para cápsula madura que tiene una fuerte expresión en comparación con los demás tejidos. AmMATE2 no es visible en tejidos de planta madura, por su parte AmMATE3, puede observarse predominantemente en hoja, raíz y cápsula madura (Fig. 9.1). En contraste, AmMATE 4 y AmMATE5 no pudieron detectarse en hoja ni tallo, hay una tenue expresión en raíces en ambos casos, también podemos detectar a ambos en cápsula inmadura con una abundancia ligeramente mayor y a AmMATE5 también se le puede encontrar en cápsula madura (Fig. 9.1). También, la expresión de AmMATE1 en plántulas, tanto hipocótilos como radículas fue muy baja, en comparación con AmMATE2, AmMATE3 y AmMATE5. No se pudo detectar la presencia de transcritos para AmMATE4. Un patrón similar se observó en suspensiones celulares (Fig 9.1;

Tabla 9.2). Esto sugiere que AmMATE4 puede ser un transportador inducible, sólo como respuesta a estímulos particulares, mientras que los demás tienen una expresión basal en condiciones normales en los tejidos en los que se expresan.

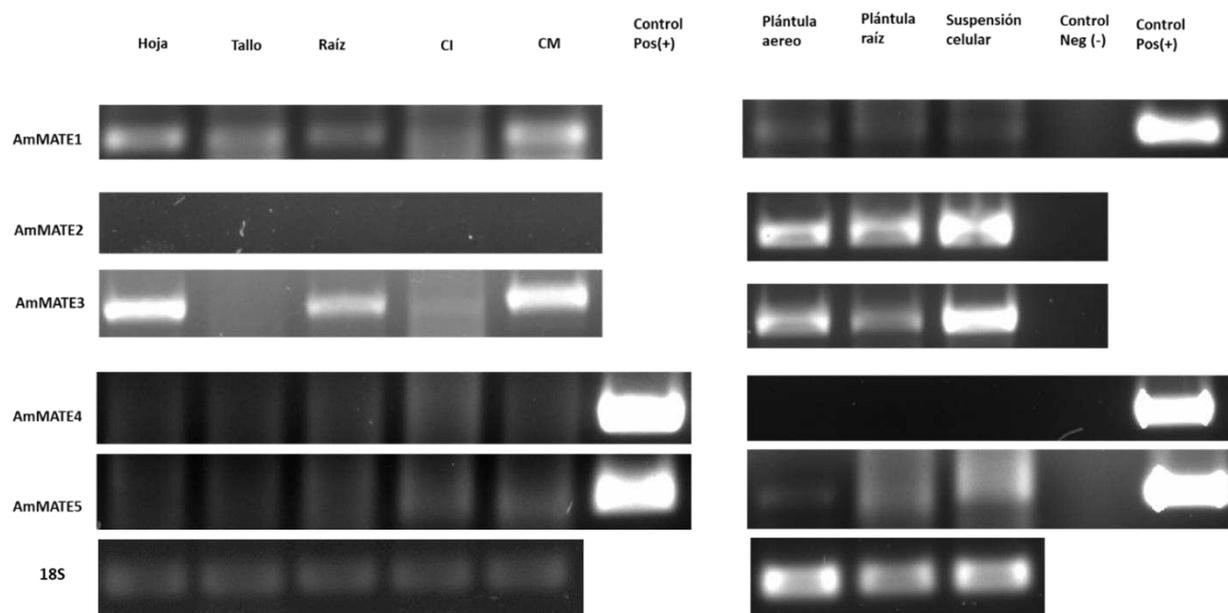


Figura 9.1. Patrón de expresión de AmMATEs por RT-PCR a partir de RNA de tejidos de plantas maduras (A) y plántulas en desarrollo y suspensiones celulares (B) de *A. mexicana*. Las reacciones se realizaron con 200 ng de RNA total y se cargaron los 30 μ L de la reacción. Los controles positivos y negativos en A y B corresponden al ORF aislado de AmMATE4, a pGEM17-AmMATE1 o a PCR8//GW/TOPO-AmMATE5 respectivamente, según sea el caso. Amplicón largo en B representan productos de 505 y 816 pb para AmMATE2 y AmMATE3, respectivamente. Gel de agarosa, 1.2%, teñido con bromuro de etidio, marcador: 1Kb Plus DNA Ladder, número de catálogo 10787018, *invitrogen*.

Tabla 9.2. Distribución tisular de los transportadores MATE de *A. mexicana*.

Transportador	Tejidos de <i>Argemone mexicana</i>							
	Hoja	Tallo	Raíz	Cápsula Inmadura	Cápsula Madura	Plántula Aereo	Plántula Raíz	Suspensión Celular
AmMATE1	+++	+++	++	++	++++	+	+	+
AmMATE2	-	-	-	-	-	+++	+++	++++
AmMATE3	++++	-	++	+	++++	+++	++	++++
AmMATE4	-	-	+	+	-	-	-	-
AmMATE5	-	-	+	+	++	+	+++	+++

9.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL “IN SILICO” DE AmMATE4 Y AmMATE5

Como se mencionó, con el fin de analizar la participación de las presuntas proteínas MATE de *A. mexicana* en el transporte de alcaloides, las secuencias de aminoácidos se analizaron para la presencia de características estructurales relacionadas con esta función, tales como cavidades en las que puedan entrar y tener afinidad los alcaloides. Para ello, se determinó la posible localización subcelular de las proteínas AmMATE2, AmMATE3, AmMATE4, y AmMATE5 por predicción con los paquetes Plant-mPLoc, BUSCA y WoLF PSORT. Con los parámetros predeterminados estos programas mostraron que AmMATE4 y AmMATE5 tenían una alta probabilidad de localizarse en la membrana plasmática, mismo caso con AmMATE2 y AmMATE3. Tomando en cuenta esto, junto con su posición en el árbol filogenético, se seleccionaron AmMATE4 y AmMATE5 para análisis más detallados, como la presencia de cavidades en las que numerosos aminoácidos puedan interactuar a la vez con los sustratos (alcaloides) propios de *Argemone mexicana*, y se hizo el análisis en un primer acercamiento con sus dos alcaloides mayoritarios, sanguinarina y berberina. Se utilizó Pubchem [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>] para obtener la estructura tridimensional de las moléculas de los alcaloides mencionados y Phyre2 [<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>] para obtener la estructura tridimensional de las proteínas y se utilizaron estos archivos como input para el análisis de docking molecular en CB-Dock2 [<https://cadd.labshare.cn/cb-dock2/index.php>] los parámetros fueron ajustados para que resolviera las 15 primeras cavidades que encontrara. Se identificaron las 15 cavidades, 7 de las cuales tenían no menos de 5 aminoácidos que interactuaban con las moléculas analizadas en cada caso (Tablas 8.3, 8.4), tanto en AmMATE-4 como AmMATE5. Estas se clasificaron en dos grupos; internas o externas, según su ubicación respecto a la superficie de la proteína. Se identificaron residuos aminoacídicos específicos con estas características en las cavidades, con los que podrían interactuar con alcaloides específicos de *Argemone mexicana* (Tablas 8.3 y 8.4). Cabe destacar que en la cavidad numerada como 10 (alcanzable desde dentro) de AmMATE4, tanto la berberina como la sanguinarina podrían interactuar con el residuo A337, mientras que en las cavidades 13 (alcanzable desde dentro) de AmMATE5, la berberina podría interactuar con la R314 y la sanguinarina con R314, N317, E318 y A321. Estos residuos corresponden al motivo conservado de las proteínas MATE: RVSNELGA en ambas proteínas. También se generaron modelos en 3D de la proteína y los sustratos en las cavidades. Para ello, se seleccionó la cavidad que se quería observar y se tomó la imagen

correspondiente en el programa. El modelo generado muestra cómo se ubicaría la berberina en la cavidad 1 de AmMATE5 visto en 2 ángulos diferentes (Fig. 9.2).

Tabla 8.3. Presuntos aminoácidos que interactúan con berberina y sanguinarina en las cavidades estudiadas de AmMATE4. En rojo los residuos aminoacídicos que solo interactúan con un solo sustrato estudiado y en negro los que tienen papel en ambas interacciones. En dorado una serina que tiene alta probabilidad de ser fosforilable.

Desde fuera				Desde dentro									
C1		C14		C2		C10		C3		C6		C4	
Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina
ASN58		PHE62	PHE62	LEU14	LEU14	GLN6	GLN6	ARG344	ARG344	MET1	MET1	ARG270	ARG270
GLN61		GLN65	GLN65	ILE15	ILE15	GLN8	GLN8	VAL347	VAL347	GLU2	GLU2	LEU271	LEU271
PHE62	PHE62	MET66	MET66	LEU16	LEU16		ASN9	GLN348	GLN348	ARG3		PRO274	PRO274
GLN65	GLN65	VAL69	VAL69	ILE17		LEU10	LEU10	LEU351	LEU351	GLU4		CYS413	
	MET66	MET70		TRP49			GLU20	THR468	THR468		GLU5	GLY414	GLY414
	VAL69	THR87		TYR113	TYR113	PHE24	PHE24	LEU469	LEU469	LEU108		TRP415	TRP415
SER84	SER84	ASN311	ASN311	TYR118	TYR118	ALA337	ALA337	CYS470			GLN117	GLN416	
THR87	THR87	LEU315	LEU315	GLN190	GLN190	GLY338	GLY338	THR471	THR471	MET120	MET120	LYS417	LYS417
SER88	SER88	TRP372	TRP372	ASN191	ASN191	TYR339	TYR339	ASN472		HIS124	HIS124	GLU476	GLU476
THR91	THR91	ALA375	ALA375	ILE192	ILE192	PRO340	PRO340	TRP473	TRP473	ARG127		THR479	THR479
VAL92	VAL92	TYR376	TYR376	VAL193		GLU474	GLU474			HIS263	HIS263		
PHE95				PHE194	PHE194	ALA477	ALA477			ASP264	ASP264		
SER96					PRO195	LYS478	LYS478			ASN267	ASN267		
MET99					TYR243	GLU481	GLU481			ARG270	ARG270		
VAL279				GLY248	GLY248								
MET283	IMET283			ALA249	ALA249								
	GLU287			ARG252	ARG252								
LEU310	LEU310			THR253									
ASN311	ASN311												
TRP317													
PHE321													

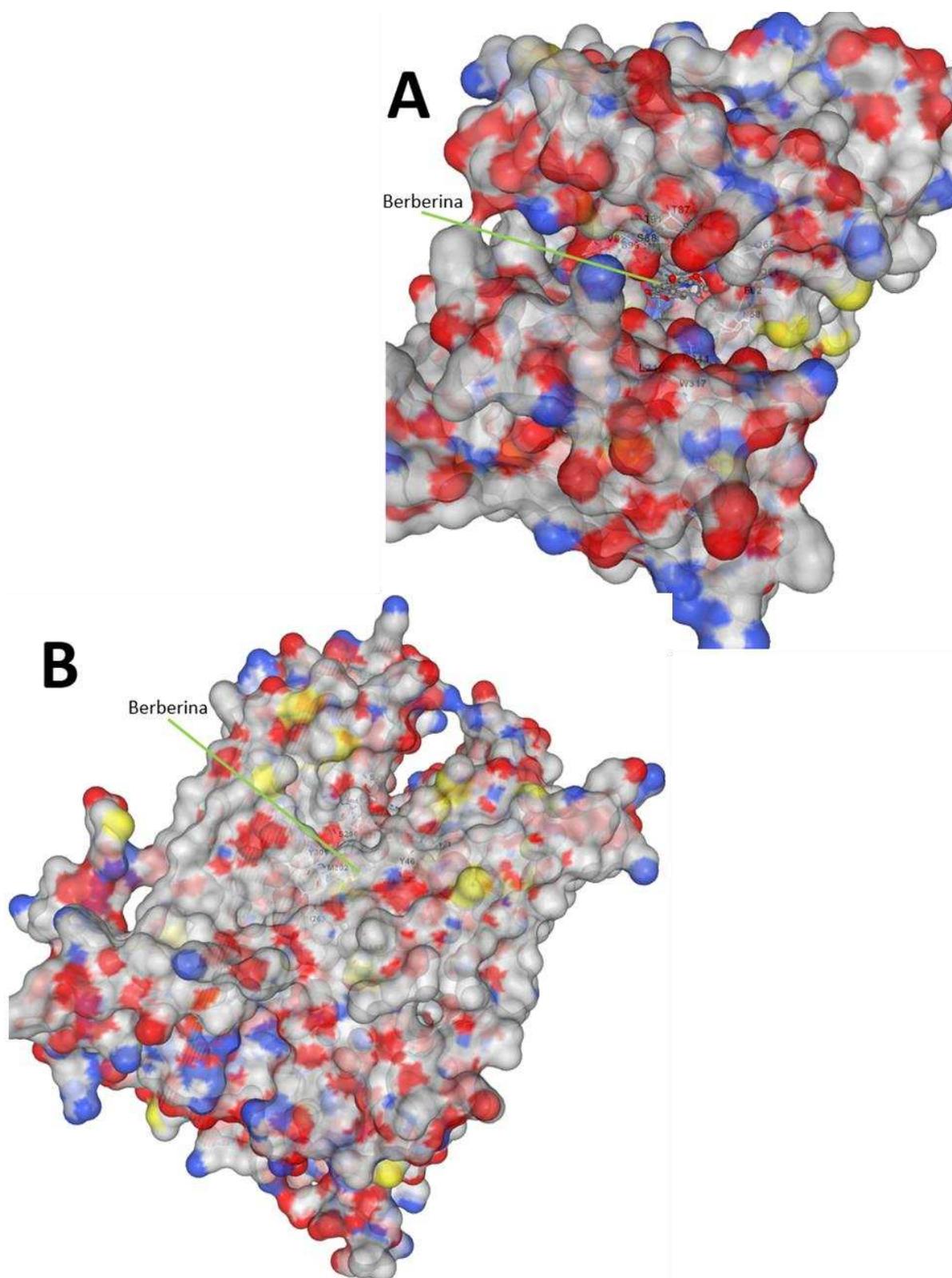


Figura 9.2. Modelo tridimensional de la proteína AmMATE5 interactuando con berberina. El modelo fue generado en CB-Dock2, seleccionando la berberina como sustrato y la cavidad 1. En azul se muestran residuos aminoacídicos cargados positivamente y en rojo los residuos cargados negativamente y en amarillo las serinas de la proteína. La localización de las cavidades se señala con los numerales correspondientes. En A se observa la vista coronal, mostrando el presunto sitio de unión de la berberina, mientras que (B) muestra la imagen lateral. Los residuos probables de unión de los alcaloides se muestran en la Tabla 9.4.

Tabla 9.4. Presuntos aminoácidos que interactúan con berberina y sanguinarina en las cavidades estudiadas de AmMATE5. En rojo los residuos aminoacídicos que sólo interactúan con un sólo sustrato estudiado y en negro los que tienen papel en ambas interacciones. En dorado la serina que tiene alta probabilidad de ser fosforilable.

Desde fuera				Desde dentro									
C1		C4		C5		C6		C12		C13		C15	
Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina	Berberina	Sanguinarina
TYR46	TYR46	TYR46	TYR46		ARG100	ARG15		ALA99	ALA99	ILE30	ILE30	LYS251	
GLN49	ALA68	ALA68	ALA68	GLN101	GLN101		GLU16	GLN101	GLN101	TYR33	TYR33	ARG254	ARG254
METS3		THR71	THR71	TYR102	TYR102	LYS17	LYS17			LEU319		ILE255	
ALA68		SER72	SER72	ARG103	ARG103		PHE19	GLY320	GLY320	PRO37		CYS397	
THR71	THR71	GLY75	GLY75	LYS104	LYS104		THR20	ALA321	ALA321		PHE97	GLY398	GLY398
SER72	SER72	VAL76	VAL76	MET239			SER22	GLY322	GLY322		GLY98	TRP399	TRP399
	GLY75		PHE79	ILE469		GLU26		PRO324			ALA99		HIS401
	VAL76	SER80	SER80	GLN470		GLU27		GLU458			ARG100	GLN460	GLN460
PHE79	PHE79	LEU83	LEU83	GLU477	GLU477	ARG314		ALA461	ALA461	GLN174	GLN174	LYS463	LYS463
SER80	SER80	ILE263		GLU478	GLU478	GLU318		MET462	MET462	SER175	SER175	GLU466	GLU466
LEU83		TRP267	TRP267			GLY322		LYS465	LYS465	ILE177		ARG467	ARG467
ILE263		GLU271	GLU271			ARG323		ILE469	ILE469	ILE178		GLN470	GLN470
TRP267	TRP267	ILE274	ILE274			PRO324				LEU181		GLY471	GLY471
	GLU271	SER291	SER291			GLN325				ARG314	ARG314	LYS472	LYS472
	ILE274	LEU294	LEU294			ALA326					ASN317		
	SER291	THR295	THR295			LEU329					GLU318	GLU473	
LEU294	LEU294	SER298	SER298								ALA321		
THR295	THR295	TYR301									ARG323		
SER298	SER298	MET302	MET302										
MET302	MET302												

9.3.1. Análisis de sitios de fosforilación

Una de las formas de modular la actividad de diferentes proteínas transportadoras es mediante la fosforilación de residuos de serina. Esto sucede sobre motivos R/KXS o R/KXXS, como se ha observado en transportadores ABC (AtABCG36) de *Arabidopsis*. (Aryal, *et al.*, 2022). Por ello, se identificaron presuntos sitios de fosforilación en serinas de AmMATE4 y AmMATE5, como posibles lugares de modulación del transporte. Para ello se utilizó el paquete NetPhos - 3.1, ajustándolo para encontrar residuos de serina con alta probabilidad de ser fosforilados. Para AmMATE4, se encontró un sitio de tipo R/KXXS en la posición 38 con 97% de probabilidad de ser fosforilado por una cinasa no especificada, un sitio R/KXS con 62.9% de probabilidad de ser

fosforilado por una PKC en la posición 247 (Figura 9.3, flecha verde), y otro con 97% de probabilidad en la posición 316. Por su parte, en AmMATE5 se encontraron dos sitios R/KXS en las posiciones 240 y 316 con probabilidad de 96 y 97% respectivamente. Además, un sitio RKXXS en la posición 475 con una probabilidad de 97% de ser fosforilado por otra cinasa no especificada. Cabe destacar en estos resultados que uno de los motivos conservados entre los MATE de plantas, RVSNELGA, es marcadamente uno de estos sitios que pudieran participar en la modulación del transporte con una serina con una alta probabilidad de ser fosforilable.

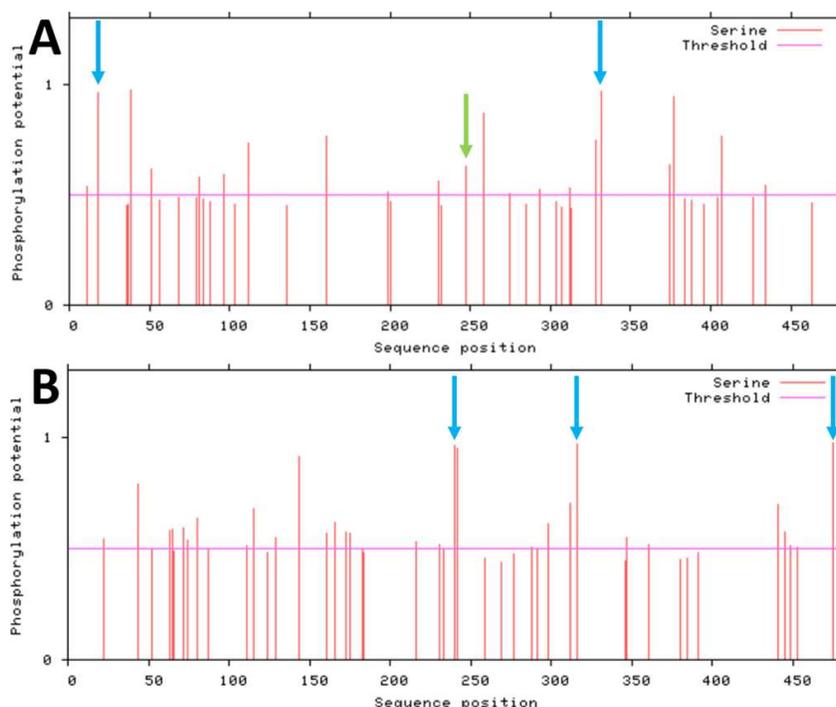


Figura 9.3. Análisis de la presencia de posibles serinas fosforilables en las secuencias proteicas, de AmMATE4 (A) y AmMATE5 (B). Las flechas en azul muestran los sitios R/KXS o R/KXXS que son altamente probables de ser fosforilados el umbral del 50% de probabilidad se marca con color rosa **A:** Para AmMATE4. **B:** Para AmMATE5.

Por otra parte, para determinar si los sitios R/KXS y R/KXXS son alcanzables por las cinasas, se realizó un estudio de hidrofobicidad con el fin de determinar su posición respecto a posibles hélices transmembranales, ya que, de estar dentro de estos dominios, las cinasas no serían capaz de alcanzarlos. Utilizando el paquete DeepTMHMM – 1.0, con sus parámetros estándar, se encontró que ambas proteínas tienen las doce hélices transmembranales de entre 12 y 29

residuos, típicas de las proteínas MATE (Fig. 9.4). Más aún, se encontró que las posibles serinas fosforilables en los motivos R/KXS o R/KXXS se localizan en las horquillas, de la cara interna de la membrana (Fig. 9.5), lo que sugiere que podrían participar en la regulación del transporte.

Con esta información, se propone el modelo mostrado en la Fig. 9.5 de la localización de las regiones de control de las proteínas AmMATE4 y AmMATE5.

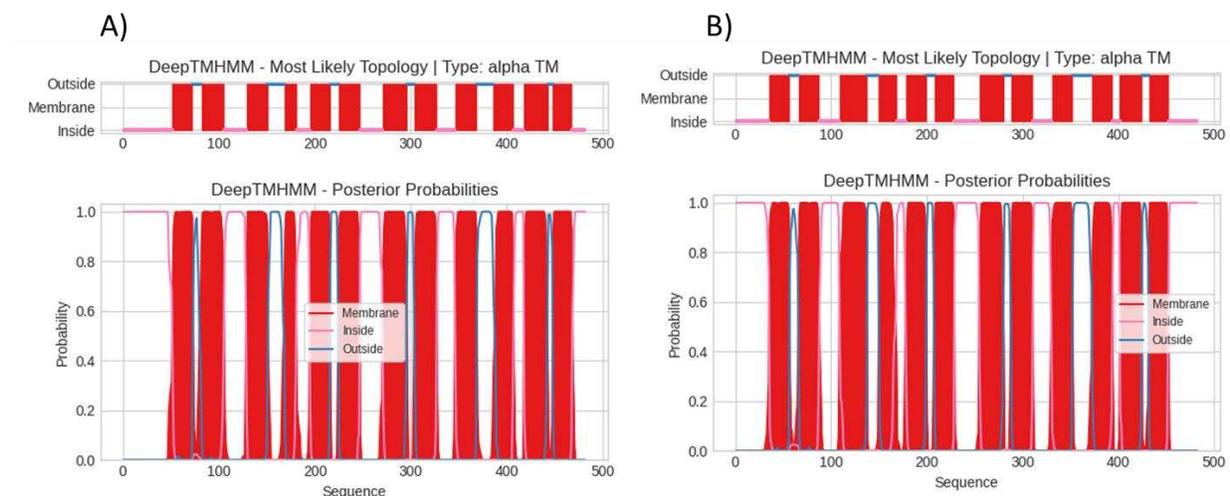


Figura 9.4. Análisis de hidrofobicidad de las proteínas AmMATE4 (A) y AmMATE5 (B). Los paneles superiores muestran el consenso de la distribución de los residuos aminoacídicos en las diferentes regiones (Dentro de la membrana, en la membrana y fuera de la membrana). Mientras que los inferiores muestran la probabilidad de cada residuo de ubicarse correspondientemente en membrana (rojo), dentro de la membrana (rosa) o fuera de la membrana (azul). El modelo se generó con DeepTMHMM – 1.0 ajustado con sus valores de default.

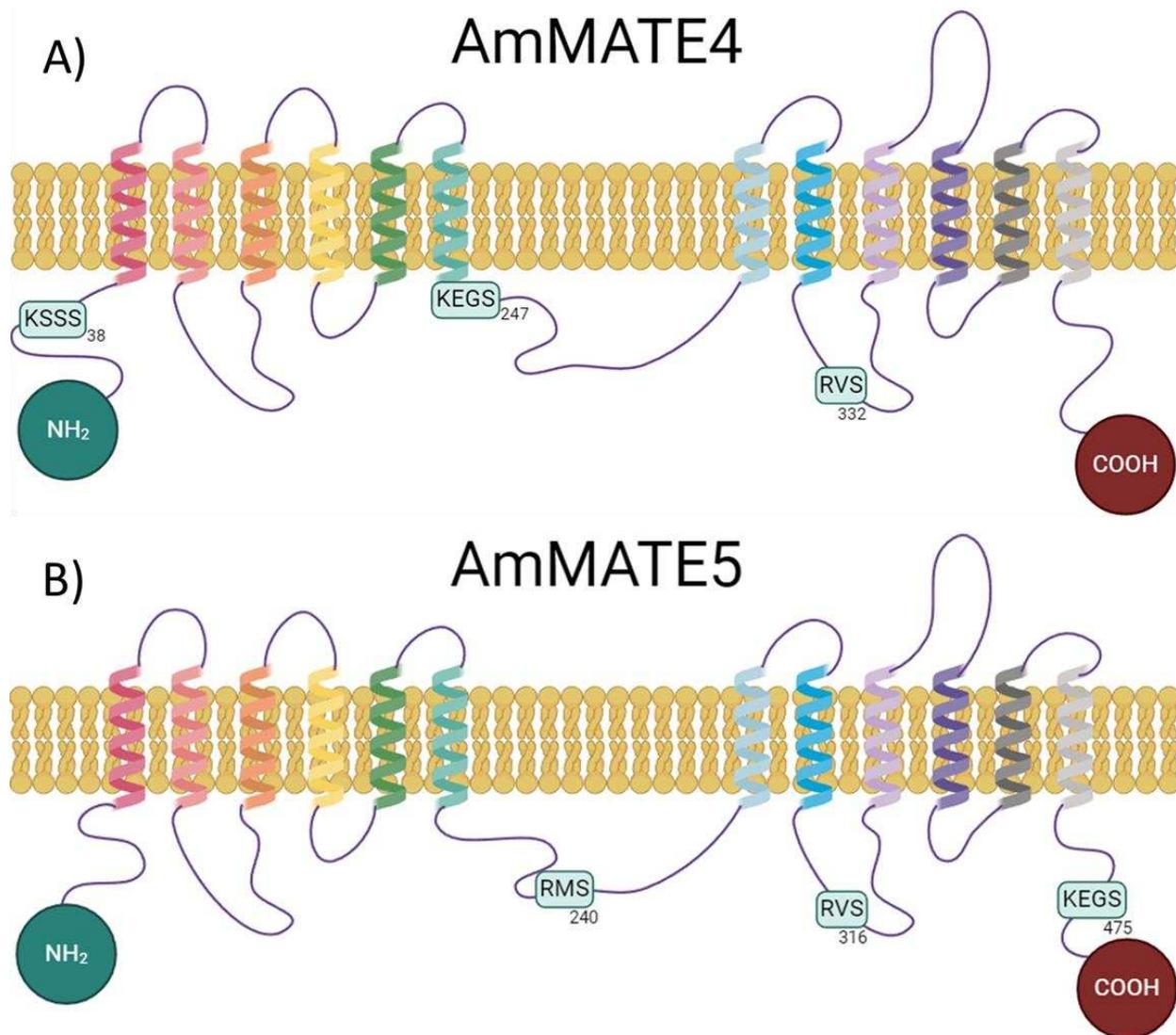


Figura 9.5. Esquematación de la localización de las proteínas MATE en *A. mexicana*. Ambas proteínas la membrana plasmática (de acuerdo con el paquete Wolf pSORT) cruzándola 12 veces la con segmentos de entre 12 y 29 residuos y formado 6 y 7 asas externas y citosólicas respectivamente de entre 5 y 51 residuos. Los sitios R/KXS y R/KXXS, con los residuos de serina propensos a ser fosforilados se muestran en recuadros color menta etiquetando la serina según su posición.

10. DISCUSIÓN GENERAL

Se encontraron 33 y 21 posibles proteínas ABCB y ABCG respectivamente dentro de las que puede haber candidatos a transportadores de alcaloides, sin embargo, no se tomaron en cuenta para este trabajo debido a que no se tiene la secuencia completa de su ORF y en los análisis que se hicieron se identificaron un buen número de candidatos que posteriormente se aislaron y se siguieron trabajando.

Para el aislamiento de los candidatos, nos concentramos en AmMATE4 y AmMATE5 debido a que pertenecen a un clado diferente de AmMATE1 que se estudia en otro trabajo y del que hay evidencia que apunta a que se encuentra en vacuola (Loza-Muller, 2024), por ello, se le dio prioridad a este par por sobre AmMATE2 y AmMATE3, adicionalmente, AmMATE2-AmMATE5 se ubicaron en membrana plasmática en los diferentes softwares de predicción de ubicación subcelular que se utilizaron en este trabajo, por lo que presentan aún más novedad con respecto a AmMATE1.

Hubo una resistencia pronunciada a la transformación con vectores de uso comercial como pENTR1A y PCR8/GW/TOPO para AmMATE4 y AmMATE5 en *E. coli* Top 10 genotipo: *F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG* para AmMATE4 no creció ninguna colonia, mientras que para AmMATE5 pareciera haber una presión selectiva que impedía a las bacterias proliferar si se encontraban transformadas con el AmMATE5 en sentido. Ya ha habido reportes de transportadores ABCB que al subclonarse en vectores de expresión, un “mecanismo desconocido” causa muchas mutaciones en el gen insertado (Shitan, 2015), esto coincide en cierta medida con lo observado en los geles de PCR de colonia que se realizaron en este trabajo. La secuenciación de los fragmentos aislados coincide en más de un 97% de identidad con cada una de las secuencias obtenidas del transcriptoma para todos los casos analizados, estas variaciones podrían deberse a cambios generados en la lectura del proceso de secuenciación, ya que se encuentran marcadamente en los bordes de la secuenciación.

Debido a las dificultades que se encontraron para clonar los AmMATEs, se encargó la síntesis química de los genes de los presuntos transportadores y se clonaron en el vector pUC19 en el MCS (entre *KpnI* y *Sall*), flanqueadas además con el sitio *PstI* y por fuera, los sitios de recombinación para la tecnología Gateway attL1 y attL2 en el extremo N terminal y C terminal

según corresponde. En un primer ensayo, al transformar AmMATE4_pUC19 en *E. coli* Top10, no sobrevivió ninguna colonia para análisis posteriores.

En el ensayo de expresión por PCR punto final, podemos observar que AmMATE2 se encuentra predominantemente en plántula y suspensiones celulares, esto puede deberse a que es utilizado por la planta únicamente en ciertas etapas del desarrollo y no de manera continua. Para AmMATE3, vemos una expresión alta en hoja, raíz, cápsula madura, plántula y suspensiones celulares, lo cual sugiere que es un transportador ampliamente utilizado en los tejidos mencionados y a lo largo de las etapas de desarrollo de la planta; AmMATE4, tiene una expresión prácticamente nula en las condiciones de todos los tejidos evaluados, lo que sugiere que este transportador pudiera ser inducible bajo ciertas condiciones; para el AmMATE5 tenemos que su expresión mayoritaria es en las radículas de las plántulas, pero también se puede encontrar en suspensiones celulares y en la planta madura, en la cápsula madura. Es importante mencionar que los patrones de distribución se deben analizar propiamente con PCR tiempo real para tener datos más precisos.

En los análisis *in silico*, se evaluó la afinidad de las cavidades de AmMATE4 y AmMATE5 por los alcaloides mayoritarios de *Argemone mexicana* (berberina y sanguinarina) como un primer acercamiento para determinar si estas proteínas podrían movilizar estas moléculas, esto se refuerza, con la cantidad de residuos que interactúan con los alcaloides, mostrados en las Tablas 9.3 y 9.4.

También se examinó la secuencia de este par de transportadores en busca de serinas fosforilables en motivos R/KXS o R/KXXS debido a que en *Arabidopsis*, el transportador AtABCG36 está sujeto a la regulación de su transporte mediante la fosforilación de estos sitios particulares (Aryal, *et al.*, 2022). No hay estudios a cerca de la regulación del transporte de alcaloides en los transportadores MATE pero es interesante que el motivo conservado en los MATE de las plantas, RXSNELGA, presente este tipo de configuración. Además de este sitio, prácticamente homogéneo en la familia MATE de plantas, se encontraron otros 2 sitios en cada proteína que pudieran estar sujetos a esta misma regulación. Se realizó el análisis de hidrofobicidad comprobando que estos sitios no caían en partes internas de la membrana, sino más bien en horquillas intramembranales, sugiriendo que pueden ser alcanzables por algún tipo de cinasa.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El transcriptoma XT1 de plántulas de *A. mexicana* es una fuente de datos muy confiable de la que se pueden seguir obteniendo nuevos candidatos a transportadores de alcaloides, u otras proteínas de interés, como hemos visto, su fidelidad con las proteínas obtenidas es prácticamente del 100%, se encontraron 33 proteínas ABCB, 21 ABCG, 19 PUP y otros 44 MATE que quedaron sin analizar debido a que no cumplían con los criterios de completitud que se tenían en ese momento. A pesar de que la información del transcriptoma es certera, en muchos casos es incompleta, por lo que se necesitan técnicas como Race 5' o 3' para poder completar los transcrito de interés. Una alternativa para completar esta información faltante es analizar el genoma de *A. mexicana*, lo que nos puede dar otra perspectiva para la búsqueda de proteínas con una función en particular.

Se seleccionaron cinco transportadores MATE que representan candidatos adecuados para funcionar como transportadores de alcaloides. Sin embargo, podrían no ser los únicos, debido a que el análisis filogenético agrupó clados intermedios entre los candidatos seleccionados. Se necesitaría una investigación centrada únicamente en caracterizar estos transportadores.

Se requieren más estudios para catalogar las proteínas AmMATE2-AmMATE5 como transportadores de alcaloides. Para ello, los ensayos de transporte con diferentes alcaloides serán necesarios. También sería interesante conocer la ubicación subcelular de estos, debido a que puede proveer información de sus funciones en la planta.

El patrón de expresión que se obtuvo necesita ser complementado con análisis de PCR tiempo real para poder tener mayor precisión y seguridad de que estos patrones sean los que tiene la planta para estas proteínas.

En el caso de AmMATE4 y AmMATE5, mostraron una expresión muy baja en todos los tejidos, con respecto a los otros candidatos MATE estudiados. Esto podría deberse a que estos transportadores son inducibles. Esta propuesta es porque son filogenéticamente cercanos a transportadores como el NtJAT1 cuya expresión es mediada por jasmonato (Morita, *et al.* 2009). Para probar esta hipótesis sería necesario evaluar la distribución de estos transportadores en condiciones de infección o directamente después de una inducción con jasmonato u otros inductores.

Con la finalidad de evaluar la localización subcelular de los transportadores AmMATEs se sintetizaron los vectores de entrada correspondientes con las secuencias codificantes de cada uno de ellos. Se construyó el vector de expresión pEG102_AmMATE5_CFP para localizar este transportador mediante fluorescencia por proteínas de fusión para el modelo *Nicotiana benthamiana*. La razón por la que en este trabajo no se evaluaron las localizaciones de los AmMATEs fue debido a que hubo problemas con la disponibilidad del equipo de microscopía confocal.

A pesar de las evaluaciones *in silico* que se realizaron en este trabajo, es necesario complementarlas con los estudios de localización subcelular y de interacciones proteína-proteína correspondientes, así como los ensayos de transporte asociados cuando se dan estas interacciones. La modulación del transporte de las proteínas MATE es un terreno aun inexplorado y que tiene mucha utilidad en la industria biotecnológica.

En conclusión, se clonó el ORF completo de AmMATE5 (1446 bp) en PCR8/GW/TOPO, se aislaron productos de PCR correspondientes al ORF completo de AmMATE4 (1443 bp) y fragmentos de 505 bp y 816 bp para AmMATE2 y AmMATE3 respectivamente, ambos ubicados en el ORF de estos transportadores. Todos los productos anteriores se secuenciaron confirmando así su identidad.

BIBLIOGRAFÍA

- Aniszewski Tadeusz (2015). Alkaloids: chemistry, biology, ecology, and applications. Elsevier.
- Aryal, B., Xia, J., Hu, Z., Tsering, T., Liu, J., Huynh, J., ... & Geisler, M. M. (2022). A phospho-switch provided by LRR receptor-like kinase, ALK1/QSK1/KIN7, prioritizes ABCG36/PEN3/PDR8 transport toward defense. *BioRxiv*, 2022-05.
- Ávalos, A (2009) *Metabolismo secundario de plantas*. Universidad Complutense Madrid
- Banasiak, J., & Jasiński, M. (2022). ATP-binding cassette transporters in nonmodel plants. *New Phytologist*, 233(4), 1597-1612.
- Begum, A., Rahman, M. M., Ogawa, W., Mizushima, T., Kuroda, T., & Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and characterization of four MATE family multidrug efflux pumps from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiology and immunology*, 49(11), 949-957.
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*: 294(5): 1351-1362,.
- Bower, D. M., & Prather, K. L. (2009). Engineering of bacterial strains and vectors for the production of plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82, 805-813.
- Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013). *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 559-567.
- Brown, M. H., Paulsen, I. T., & Skurray, R. A. (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Molecular microbiology*, 31(1).
- Buchfink, B., Reuter, K., & Drost, H. G. (2021). Sensitive protein alignments at tree-of-life scale using DIAMOND. *Nature Methods*, 18(4), 366-368.
- Bürkle, L., Cedzich, A., Döpke, C., Stransky, H., Okumoto, S., Gillissen, B., ... & Frommer, W. B. (2003). Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34(1), 13-26.

-
-
- Campagnaro, G. D., & De Koning, H. P. (2020). Purine and pyrimidine transporters of pathogenic protozoa—conduits for therapeutic agents. *Medicinal Research Reviews*, 40(5), 1679-1714.
- Canarini, A., Kaiser, C., Merchant, A., Richter, A., & Wanek, W. (2019). Root exudation of primary metabolites: mechanisms and their roles in plant responses to environmental stimuli. *Frontiers in Plant Science*, 10, 157.
- Castrense S, Martell P, Fariselli P, Profiti G, Casadio R (2018) BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Res* 46:459–466
- Chávez M.L.D, Rolf M, Gesell A, Kutchan T.M. (2011). Characterization of two methylenedioxy bridge-forming cytochrome P450-dependent enzymes of alkaloid formation in the Mexican prickly poppy *Argemone mexicana*. *Arch Biochem Biophys*.507:186-193.
- Chen, J., Morita, Y., Huda, M. N., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2002). VmrA, a member of a novel class of Na⁺-coupled multidrug efflux pumps from *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology*, 184(2), 572-576.
- Chen X, Hagel JM, Chang L, Tucker JE, Shiigi SA, Yelapaala Y, Chen H-Y, Estrada R, Colbeck J, Enquist-Newman M, et al. (2018) A pathogenesis-related 10 protein catalyzes the final step in thebaine biosynthesis. *Nat Chem Biol*14: 738–743
- Claxton, D. P., Jagessar, K. L., & Mchaourab, H. S. (2021). Principles of alternating access in multidrug and toxin extrusion (MATE) transporters. *Journal of Molecular Biology*, 433(16), 166959.
- Cordell G (1983) Introduction to alkaloids: a biogenic approach. Wiley, New York
- Cucurella, C. N. I. (2002). Glucósidos cardiotónicos. Acción y usos | Farmacia Profesional. Recuperado 6 de octubre de 2022, de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-glucosidos-cardiotonicos-accion-usos-13028926>
- Dastmalchi, M., Chang, L., Chen, R., Yu, L., Chen, X., Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2019). Purine permease-type benzyloquinoline alkaloid transporters in opium poppy. *Plant Physiology*, 181(3), 916-933.

-
-
- De-La-Cruz Chacón, I., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, 17(2), 189-202.
- Dobritsch, M., Lübken, T., Eschen-Lippold, L., Gorzolka, K., Blum, E., MATErn, A., ... & Rosahl, S. (2016). MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides. *The Plant Cell*, 28(2), 583-596.
- Eisinger, M. L., Nie, L., Dörrbaum, A. R., Langer, J. D., & Michel, H. (2018). The xenobiotic extrusion mechanism of the MATE transporter NorM_PS from *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of molecular biology*, 430(9), 1311-1323.
- Facchini, P. J., Huber-Allanach, K. L., & Tari, L. W. (2000). Plant aromatic L-amino acid decarboxylases: evolution, biochemistry, regulation, and metabolic engineering applications. *Phytochemistry*, 54(2), 121-138.
- Facchini PJ, Chen X, Colbeck JC, Tucker J, inventors. (2018). Compositions and methods for making benzyloisoquinoline alkaloids, morphinan alkaloids, thebaine, and derivatives thereof. United States Patent Application No. PCT/US2017/039589
- Funayama, S., & Cordell, G. A. (2014). *Alkaloids: a treasury of poisons and medicines*. Elsevier.
- Gani U, Vishwakarma R, Misra P (2020) Membrane transporters: the key drivers of transport of secondary metabolites in plants. *Plant Cell Rep* 40:1–18
- Gillissen, B., Bürkle, L., André, B., Kühn, C., Rentsch, D., Brandl, B., & Frommer, W. B. (2000). A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12(2), 291-300.
- Girke, C., Daumann, M., Niopek-Witz, S., & Möhlmann, T. (2014). Nucleobase and nucleoside transport and integration into plant metabolism. *Frontiers in plant science*, 5, 443.
- Grotewold, E., Chamberlin, M., Snook, M., Siame, B., Butler, L., Swenson, J., ... & Bowen, B. (1998). Engineering secondary metabolism in maize cells by ectopic expression of transcription factors. *The Plant Cell*, 10(5), 721-740.
- Guízar-González, C., Trujillo-Villanueva, K., Monforte-González, M., & Vázquez-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(1), 19-22.
- Hagel, J.M.; Facchini, P.J. Benzylisoquinoline alkaloid metabolism: a century of discovery and a brave new world. *Plant Cell Physiol.* 2013, 54:647-672.
- Hashimoto, T., & Y. Yamada (1994). Alkaloid biogenesis: molecular aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 45(1), 257-285.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W. X., Zhang, Q., & Chang, G. (2010). Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature*, 467(7318), 991-994.
- Hegnauer, R., 1963a, The taxonomic significance of alkaloids, in: *Chemical Plant Taxonomy* (T. Swain, ed.), Academic Press, San Diego, pp. 389–427.
- Higgins, C. F., & Linton, K. J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(10), 918-926.
- Hildreth SB, Gehman EA, Yang H, Lu RH, Ritesh KC, Harich KC, Yu S, Lin J, Sandoe JL, Okumoto S, et al. (2011) Tobacco nicotine uptake permease (NUP1) affects alkaloid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 18179–18184
- Hong-Bin Shen and Kuo-Chen Chou, "Ensemble classifier for protein folding pattern recognition" *Bioinformatics*, 2006, 22, 1717-1722.
- Horton, P., Park, K. J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C. J., & Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W585-W587.
- Huda, M. N., Chen, J., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2003). Gene cloning and characterization of VcrM, a Na⁺-coupled multidrug efflux pump, from *Vibrio cholerae* non-O1. *Microbiology and immunology*, 47(6), 419-427.
- Jack, D. L., Yang, N. M., & H. Saier Jr, M. (2001). The drug/metabolite transporter superfamily. *European Journal of Biochemistry*, 268(13), 3620-3639.

-
-
- Jelesko JG (2012). An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism. *Front Plant Sci*: 78
- Jeppe Hallgren, Konstantinos D. Tsigirigos, Mads D. Pedersen, José Juan Almagro Armenteros, Paolo Marcatili, Henrik Nielsen, Anders Krogh and Ole Winther (2022). DeepTMHMM predicts alpha and beta transmembrane proteins using deep neural networks. <https://doi.org/10.1101/2022.04.08.487609>
- Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3), 355-363.
- Kato K, Shitan N, Shoji T, Hashimoto T (2015) Tobacco NUP1 transports both tobacco alkaloids and vitamin B6. *Phytochemistry*113: 33–40
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., & Bolton, E. E. (2023). PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.*, 51(D1), D1373–D1380.
- Kim, Y. X., Ranathunge, K., Lee, S., Lee, Y., Lee, D., & Sung, J. (2018). Composite transport model and water and solute transport across plant roots: an update. *Frontiers in Plant Science*, 9, 193.
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B. 2009. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360–1363.
- Krattinger SG, Sucher J, Selter LL, Chauhan H, Zhou B, Tang MZ, Upadhyaya NM, Mieulet D, Guiderdoni E, Weidenbach D et al. 2016. The wheat durable, multipathogen resistance gene Lr34 confers partial blast resistance in rice. *Plant Biotechnology Journal* 14: 1261–1268.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547.

-
-
- Kuo-Chen Chou and Hong-Bin Shen, "Plant-mPLOC: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization", PLoS ONE, 2010, 5: e11335.
- Kuo-Chen Chou and Hong-Bin Shen: "Cell-PLOC: A package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms", Nature Protocols, 2008, 3: 153-162.
- Kuo-Chen Chou and Hong-Bin Shen, "Large-Scale Plant Protein Subcellular Location Prediction", Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 100, 665-678.
- Kuo-Chen Chou, "Using amphiphilic pseudo amino acid composition to predict enzyme subfamily classes", Bioinformatics, 2005, 21, 10-19.
- Laines-Hidalgo, J. I. (2019). Análisis de la síntesis de alcaloides en fruto y semilla de *Argemone mexicana* L [Tesis de maestría]. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Lane, T. S., Rempe, C. S., Davitt, J., Staton, M. E., Peng, Y., Soltis, D. E., ... & Stewart, C. N. (2016). Diversity of ABC transporter genes across the plant kingdom and their potential utility in biotechnology. BMC Biotechnology, 16(1), 1-10.
- Law, C. J., Maloney, P. C., & Wang, D. N. (2008). Ins and outs of major facilitator superfamily antiporters. Annu. Rev. Microbiol., 62, 289-305.
- Lefevre F, Boutry M (2018) Towards Identification of the substrates of ATP-Binding Cassette Transporters. Plant Physiology 178: 18-39.
- Li L, He Z, Pandey GK, Tsuchiya T, Luan S (2002) Functional cloning and characterization of a plant efflux carrier for multidrug and heavy metal detoxification. J Biol Chem 277: 5360–5368
- Liscombe D, Facchini P (2008) Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. Current Opinion in Biotechnology 19: 173-180.
- Long, F., Rouquette-Loughlin, C., Shafer, W. M., & Yu, E. W. (2008). Functional cloning and characterization of the multidrug efflux pumps NorM from *Neisseria gonorrhoeae* and YdhE from *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 52(9), 3052-3060.

-
-
- Loza-Muller, L., Shitan, N., Yamada, Y., & Vázquez-Flota, F. (2021). AmABC1, an alkaloid transporter from seeds of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae). *Planta*, 254(6), 1-8.
- Ma, J. F., Ryan, P. R., & Delhaize, E. (2001). Aluminium tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends in Plant Science*, 6(6), 273-278.
- Matile P (1976) Localization of Alkaloids and Mechanism of their Accumulation in Vacuoles of *Chelidonium majus* Laticifers. *Nova Acta Leopoldina. Supplementum* 7: 139–156
- Minami, H.; Kim, J.S.; Ikezawa, N.; Takemura, T.; Katayama, T.; Kumagai, H.; Sato, F. Microbial production of plant benzyloquinoline alkaloids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105:7393-8.
- Miyauchi, H., Moriyama, S., Kusakizako, T., Kumazaki, K., Nakane, T., Yamashita, K., ... & Nureki, O. (2017). Structural basis for xenobiotic extrusion by eukaryotic MATE transporter. *Nature communications*, 8(1), 1-11.
- Morita, M., Shitan, N., Sawada, K., Van Montagu, M. C., Inzé, D., Rischer, H., ... & Yazaki, K. (2009). Vacuolar transport of nicotine is mediated by a multidrug and toxic compound extrusion (MATE) transporter in *Nicotiana tabacum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2447-2452.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2000). NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na⁺-driven multidrug efflux pump. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6694-6697.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(7), 1778-1782.
- Mueller, M. J., Brodschelm, W., Spannagl, E., & Zenk, M. H. (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(16), 7490-7494.
- Nie, L., Grell, E., Malviya, V. N., Xie, H., Wang, J., & Michel, H. (2016). Identification of the high-affinity substrate-binding site of the multidrug and toxic compound extrusion (MATE)

-
-
- family transporter from *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of Biological Chemistry*, 291(30), 15503-15514.
- Nogia, P., & Pati, P. K. (2021). Plant secondary metabolite transporters: Diversity, functionality, and their modulation. *Frontiers in Plant Science*, 12, 758202.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., & Moriyama, Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends in pharmacological sciences*, 27(11), 587-593.
- 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(4), 1939-1946.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., & Moriyama, Y. (2005a). A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(50), 17923-17928.
- Otsuka, M., Yasuda, M., Morita, Y., Otsuka, C., Tsuchiya, T., Omote, H., & Moriyama, Y. (2005b). Identification of essential amino acid residues of the NorM Na⁺/multidrug antiporter in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1552-1558.
- Paiva, N.L. 2000. An introduction to the biosynthesis of chemical used in plant-microbe communication. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:131-143.
- Paré, P.W., and Tumlinson, J.H. 1998. Cotton volatiles synthesized and released distal to the site of insect damage. *Phytochemistry* 47:521-526.
- Parsons, W. T.; Cuthbertson, E. G. *Noxious Weeds of Australia.*; Inkata Press, CSIRO Publishing: Collingwood VICA Australia, 1992.
- Peña-Cortés, H., and Willmitzer, L. 1995. The role of hormones in gene activation in response to wounding. pp. 395-414. In: P.J Davis (ed.). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.
- Perry, L. G., Weir, T. L., Prithviraj, B., Paschke, M. W., & Vivanco, J. M. (2006). Root exudation and rhizosphere biology: multiple functions of a plant secondary metabolite. *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life*, 403-420.

-
-
- Reddy, A. S., & Day, I. S. (2001). Analysis of the myosins encoded in the recently completed *Arabidopsis thaliana* genome sequence. *Genome Biology*, 2, 1-19.
- Risk JM, Selter LL, Chauhan H, Krattinger SG, Kumlehn J, Hensel G, Viccars LA, Richardson TM, Buesing G, Troller A et al. 2013. The wheat Lr34 gene provides resistance against multiple fungal pathogens in barley. *Plant Biotechnology Journal* 11: 847–854.
- Risk JM, Selter LL, Krattinger SG, Viccars LA, Richardson TM, Buesing G, Herren G, Lagudah ES, Keller B. 2012. Functional variability of the Lr34 durable resistance gene in transgenic wheat. *Plant Biotechnology Journal* 10: 477–487
- Riveroll-Aguirre F. (2022). Diseño de primers para PCR. <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/#reglas-para-el-dise%C3%B1o-de-los-primers>
- Rubio-Piña, Jorge A, & Vázquez-Flota, Felipe A. (2008). Isolation of functional total RNA from *Argemone mexicana* tissues. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(4), 15-16. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-34582008000400015>
- Rubio-Piña, J. (2009). Estudios moleculares sobre la síntesis de alcaloides bencilisquinolínicos de *Argemone mexicana*. Tesis Doctorado Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 1-171.
- Rubio-Piña, J.; Vázquez-Flota, F.A. (2013), Pharmaceutical Applications of the Benzylisoquinoline Alkaloids from *Argemone mexicana* L. *Curr Top Med Chem*. 2013, 13:2200-2207.
- Rueffer, M., & M. H. Zenk (1987). Distant precursors of benzylisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 42(4), 319-332.
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta botánica mexicana*, (14), 3-21.
- Salazar M.A.M., Sandoval R.A.S. y Almendáriz B.J.S. (2016). *Biología Molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud*. (2a ed.). McGraw Hill
- Sauna, Z. E., Kim, I. W., Nandigama, K., Kopp, S., Chiba, P., & Ambudkar, S. V. (2007). Catalytic Cycle of ATP Hydrolysis by P-Glycoprotein: Evidence for Formation of the E^o S

-
- Reaction Intermediate with ATP- γ -S, a Nonhydrolyzable Analogue of ATP. *Biochemistry*, 46(48), 13787-13799.
- Savojardo, C., Martelli, P. L., Fariselli, P., Profiti, G., & Casadio, R. (2018). BUSCA: an integrative web server to predict subcellular localization of proteins. *Nucleic acids research*, 46(W1), W459-W466.
- Schnippenkoetter W, Lo C, Liu G, Dibley K, Chan WL, White J, Milne R, Zwart A, Kwong E, Keller B et al. 2017. The wheat Lr34 multipathogen resistance gene confers resistance to anthracnose and rust in sorghum. *Plant Biotechnology Journal* 15: 1387–1396.
- Schwarzbach, A.E.; Kadereit, J.W. Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (Papaveraceae), and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. *Plant Syst. Evol.* 1999, 218, 257-279.
- Senior, A. E., Al-Shawi, M. K., & Urbatsch, I. L. (1995). The catalytic cycle of P-glycoprotein. *FEBS Letters*, 377(3), 285-289.
- Sharom, F. J., Kretzschmar, T., Burla, B., Lee, Y., Martinoia, E., & Nagy, R. (2011). Functions of ABC transporters in plants. *Essays in Biochemistry*, 50, 145-160.
- Shen, B., Zheng, Z., and Dooner, H.K. 2000. A maize sesquiterpene cyclase gene induced by insect herbivory and volicitin: characterization of wild-type and mutant alleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Vol. 97 (26) 14807-14812.
- Shitan N, Bazin I, Dan K, Obata K, Kigawa K, Ueda K, Sato F, Forestier C, Yazaki K (2003) Involvement of CjMDR1, a plant multidrug-resistance-type ATP-binding cassette protein, in alkaloid transport in *Coptis japonica*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 751–756
- Shitan N, Yazaki K (2007) Accumulation and membrane transport of plant alkaloids. *Curr Pharm Biotechnol* 8: 244–252
- Shitan, N., Dalmás, F., Dan, K., Kato, N., Ueda, K., Sato, F., ... & 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*, 14-1002.

-
-
- 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*, 15-0604.
- Shoji, T., Inai, K., Yazaki, Y., Sato, Y., Takase, H., Shitan, N., ... & Hashimoto, T. (2009). Multidrug and toxic compound extrusion-type transporters implicated in vacuolar sequestration of nicotine in tobacco roots. *Plant Physiology*, 149(2), 708-718.
- Shoji, T. (2014). ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: a common theme among diverse detoxification mechanisms. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 309, 303-346.
- Siarheyeva, A., Liu, R., & Sharom, F. J. (2010). Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis. *Journal of Biological Chemistry*, 285(10), 7575-7586.
- Steudle, E. (2000). Water uptake by plant roots: an integration of views. *Plant and soil*, 226(1), 45-56.
- Stillwell, W. (2016). Membrane transport—Chap. 19. An introduction to biological membranes: Composition, Structure and Function, 423-451.
- Stolarczyk, E., Reiling, C., & Paumi, C. (2011). Regulation of ABC transporter function via phosphorylation by protein kinases. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(4), 621-635.
- Sucher J, Boni R, Yang P, Rogowsky P, Buchner H, Kastner C, Kumlehn J, Krattinger SG, Keller B. 2017. The durable wheat disease resistance gene Lr34 confers common rust and northern corn leaf blight resistance in maize. *Plant Biotechnology Journal* 15: 489–496.
- Szydlowski N, Bürkle L, Pourcel L, Moulin M, Stolz J, Fitzpatrick TB (2013) Recycling of pyridoxine (vitamin B6) by PUP1 in *Arabidopsis* . *Plant J*75: 40–52
- 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.

-
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78.
- Tanaka, Y., Hipolito, C. J., Maturana, A. D., Ito, K., Kuroda, T., Higuchi, T., ... & Nureki, O. (2013). Structural basis for the drug extrusion mechanism by a MATE multidrug transporter. *Nature*, 496(7444), 247-251.
- Tanaka, Y., Iwaki, S., & Tsukazaki, T. (2017). Crystal structure of a plant multidrug and toxic compound extrusion family protein. *Structure*, 25(9), 1455-1460.
- Terasaka, K., Sakai, K., Sato, F., Yamamoto, H., & Yazaki, K. (2003). *Thalictrum minus* cell cultures and ABC-like transporter. *Phytochemistry*, 62(3), 483-489.
- The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis Kelley LA et al. *Nature Protocols* 10, 845-858 (2015)
- Trujillo-Villanueva, K., Rubio-Piña, J., Monforte-González, M., Ramírez-Benítez, E., & Vázquez-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.
- Underwood, W., and Somerville, S.C. (2017). Phosphorylation is required for the pathogen defense function of the *Arabidopsis* PEN3 ABC transporter. *Plant Signal Behav* 12, e1379644.
- Vale, R. D. (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, 112(4), 467-480.
- Vázquez-Flota, F., Rubio-Piña, J., Xool-Tamayo, J., Vergara-Olivares, M., Tamayo-Ordoñez, Y., Monforte-González, M., ... & Mirón-López, G. (2018). Tissue distribution of transcripts involved in biosynthesis of benzyloquinoline alkaloid in mature plants of *Argemone mexicana* L.(Papaveraceae). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(1), 13-21.
- Verma P, Mathur AK, Srivastava A, Mathur A (2012) Emerging trends in research on spatial and temporal organization of terpenoid indole alkaloid pathway in *Catharanthus roseus*: a literature update. *Protoplasma* 249: 255–268

-
- Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E et al. Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 2008; 13:151–9
- Waterman, P. G. (1999). The chemical systematics of alkaloids: A review emphasising the contribution of Robert Hegnauer. *Biochemical Systematics and Ecology*, 27(4), 395-406.
- Wink, M., and Schimmer, O. 1999. Modes of action of defensive secondary metabolites. pp. 17-134. In: M. Wink M. (ed.). *Functions of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Sheffield Academic Press. Sheffield, England. 304 p.
- Xiacong Yang, et al. FitDock: protein-ligand docking by template fitting. *Briefings In Bioinformatics*, 2022.
- Xool-Tamayo, J. F. (2016). Estudio de la relación entre la acumulación de alcaloides bencilisoquinolínicos en diferentes tejidos de *Argemone mexicana* y sus patrones transcripcionales [Disertación de doctorado]. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
- Xool-Tamayo J, Monforte-González M, Rubio-Piña J, Mirón-López G, Vázquez-Flota F (2017) Early developmental onset of alkaloid biosynthesis in Mexican poppy (*Argemone mexicana* L) Papaveraceae. *Phytochem Lett* 20:300–305
- Xool-Tamayo J, Tamayo-Ordoñez Y, Monforte-González M, Muñoz- Sánchez JA, Vázquez-Flota F (2021) Alkaloid biosynthesis in the early stages of the germination of *Argemone mexicana* L. (Papaveraceae). *Plants* 10:2226
- Walker, T. S., Bais, H. P., Grotewold, E., & Vivanco, J. M. (2003). Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiology*, 132(1), 44-51.
- Wilkins, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime reports*, 7.
- Xu, Q.; Lin, M. Benzylisoquinoline alkaloids from *Gnetum parvifolium*. *J. Nat. Prod.* 1999, 62:1025-1027.
- Yan, N. (2015). Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. *Annual review of biophysics*, 44(1), 257-283.

- Yang Liu, et al. CB-Dock2: improved protein-ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*, 2022.
- 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(39), 15830-15835.
- Zhao, J., Huhman, D., Shadle, G., He, X. Z., Sumner, L. W., Tang, Y., & Dixon, R. A. (2011). MATE2 mediates vacuolar sequestration of flavonoid glycosides and glycoside malonates in *Medicago truncatula*. *The Plant Cell*, 23(4), 1536-1555.
- Ziegler, J.; Facchini, P. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. *Annu Rev Plant Biol.* 2008, 59:735-769.