



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"SINTESIS EN *Escherichia coli* DE LAS  
PROTEINAS PEP I Y PEP II DE *Nicotiana glauca*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CLAUDIA PATRICIA IBARRA SANCHEZ



MEXICO, D. F.

2005

m350867



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## JURADO ASIGNADO:

### PROFESORES

Presidente HOMERO HERNANDEZ MONTES

Vocal REBECCA E. FRANCO Y BOURLAND

Secretario FELIPE CRUZ GARCIA

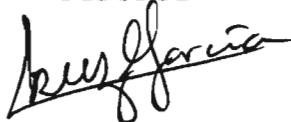
1er sup. RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

2do. Sup. CRISELDA MENDOZA MILLA

### SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

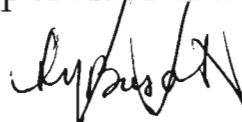
Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, Conjunto  
"E", Facultad de Química, UNAM

Asesor



Dr. Felipe Cruz García

Supervisor técnico



Biol. Grethel Busot González

Sustentante



Claudia Patricia Ibarra Sánchez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al PAIP 6290-15, a la DGPA IN211702 y IN21430, y Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 40614-Q) por el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Dedicada a mi mamá Lilia Sánchez González  
a mi hermano Jorge Enrique Ibarra Sánchez

Y a Edgar Alarcón

# INDICE GENERAL

1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	2
2.1 Reproducción sexual en Angiospermas.....	2
2.1.1 Órganos reproductores.....	4
2.1.1.1 Estambre.....	4
2.1.1.2 Pistilo.....	5
2.1.1.2.1 Formación del ovario.....	5
2.1.1.2.2 Formación del estilo.....	6
2.1.1.2.3 Estigma.....	7
2.1.1.2.4 Tejido de transmisión.....	8
2.2 Interacción polen-pistilo.....	9
2.2.1 Adhesión del grano de polen.....	10
2.2.2 Hidratación del grano de polen.....	10
2.2.3 Activación de la germinación del grano de polen.....	12
2.2.3.1 Crecimiento del tubo polínico.....	13
2.3 Autoincompatibilidad.....	13
2.3.1 Sistema de autoincompatibilidad en la familia <i>Solanaceae</i> .....	16
2.3.2 <i>S-RNasa</i> .....	17
2.3.3 <i>SLF</i> .....	18
2.3.4 Genes modificadores.....	20
2.4 Modelos de la respuesta de AI mediada por <i>S-RNasa</i> .....	22
2.5 Incompatibilidad interespecífica.....	23
3 Objetivos.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos particulares.....	27
4 Materiales y métodos.....	28
4.1 Amplificación de la región codificante de los ADNc de <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> .....	28
4.2 Clonación de los ADNc <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> .....	32
4.3 Sobreexpresión de los ADNc <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> en <i>E. coli</i> .....	35
4.4 Análisis de los patrones proteicos.....	37
4.5 Optimización de las condiciones de inducción para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes.....	38
4.6 Solubilización y recuperación de las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión.....	39
4.7 Purificación de la proteína de fusión.....	41
4.8 Obtención de extractos de proteína total.....	42
4.9 Cuantificación de proteínas.....	43

4.10 Titulación de los sueros anti-PEP I.....	45
4.11 Inmunodetección por Western-blot de la proteína PEP I: como proteína recombinante GST-PEP I y en extractos de proteína total.....	46
5 Resultados.....	48
5.1 Clonación de los ADNc <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> en pGEX-4T-2.....	48
5.2 Análisis de las secuencias de los ADNc quiméricos de <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> con las secuencias originales.....	50
5.3 Sobreexpresión de los ADNc <i>PEP I</i> y <i>PEP II</i> en <i>E. coli</i> BL-21-codon-plus.....	52
5.4 Optimización de las condiciones de sobreexpresión.....	56
5.5 Solubilización de los cuerpos de inclusión.....	59
5.6 Purificación de la proteína de fusión utilizando la fase soluble del extracto proteínico.....	61
5.7 Inmunoanálisis de la proteína recombinante GST-PEP I purificada.....	62
5.8 Inmunoanálisis de la proteína PEP I en extractos de proteína total.....	64
6 Discusión.....	67
7 Conclusiones.....	73
8 Bibliografía.....	74
Apéndice.....	81

## ABREVIATURAS

AC	Autocompatible
Ac	Especies recientemente autocompatibles
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxireibonucleico complementario
AGP	Arabinogalactanos
AI	Autoincompatibilidad
AIG	Autoincompatibilidad gametofítica
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
CTAB	Bromuro de cetil trimetil amonio
GM	Genes modificadores
GST	Glutación-S-transferasa
HV	Hipervariable
IIE	Incompatibilidad interespecífica
IPTG	Isopropiltiogalactósido
IU	Incompatibilidad unilateral
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PELPIII	Proteína tipo extensina del pistilo III
PEP I	Proteína expresada en el pistilo I
PEP II	Proteína expresada en el pistilo II
RE	Retículo endoplásmico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio
TTS	Glicoproteína específica del tejido de transmisión estilar de <i>N. tabacum</i>



# 1 RESUMEN

En las angiospermas existe un sistema genético de reconocimiento específico del polen conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI). La AI es la incapacidad de las plantas hermafroditas fértiles para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977).

Las solanáceas presentan AI gametofítica (AIG) en donde el comportamiento del polen está determinado por su propio genotipo. La AIG está controlada por un único locus multialélico llamado locus *S*, que codifica para una ribonucleasa conocida como S-RNasa (determinante femenina) y la proteína SLF (determinante masculina). Los determinantes deben interactuar en el citoplasma del tubo polínico para que se lleve a cabo el rechazo del polen. Sin embargo, la actividad de la S-RNasa no es suficiente para llevar a cabo el rechazo del polen alelo *S* específico y son necesarios otros factores estilares conocidos como genes modificadores (McClure *et al.*, 2000).

En busca de estos genes modificadores, en nuestro laboratorio se clonaron dos genes *PEP I* y *PEP II*, de *Nicotiana glauca*. El objetivo de este trabajo fue desarrollar la metodología idónea para purificar a las proteínas codificadas por estos ADNc, a partir de cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, para obtenerlas puras y biológicamente activas.

Para cumplir este objetivo, los ADNc *PEP I* y *PEP II* fueron clonados en el vector de expresión pGEX-4T-2 que está bajo el control de un promotor inducible con isopropiltiogalactósido (IPTG). Los productos de la expresión de esta construcción fueron proteínas de fusión entre la proteína glutatión-S-transferasa (GST) y la proteína en estudio. Se localizaron a dichas proteínas en la fracción insoluble de extractos de proteína total bacteriana, por lo que se desarrolló la metodología necesaria para obtener el mayor rendimiento en proteína soluble. Aumentar el nivel de aireación durante el período de inducción resultó ser la mejor opción para este fin. Debido a la baja recuperación de *PEP I* recombinante para ser usada como antígeno y producir anticuerpos policlonales contra ésta, se optó por sintetizar un péptido contenido en la proteína *PEP I* y usarlo como antígeno acoplado a BSA (albumina sérica bovina) y producir anticuerpos mono-específicos policlonales, y utilizar a la proteína *PEP I* recombinante para validarlos.

Durante el desarrollo de este trabajo se realizaron evaluaciones preliminares sobre la expresión de la proteína *PEP I* en diferentes órganos de *N. glauca* BT, así como la expresión de ésta en diferentes especies de *Nicotiana*. Se encontró que *PEP I* únicamente se expresa en el estigma-estilo de *N. glauca* BT. Al evaluar su expresión en el estigma-estilo de las diferentes especies de *Nicotiana* se encontró que esta proteína se expresa preferencialmente en las especies autoincompatibles.

## 2 INTRODUCCION

### 2.1 Reproducción sexual en angiospermas

Las angiospermas son el grupo más dominante de plantas terrestres, y su extensión y variabilidad las han llevado a ser de las más importantes para el ser humano.

Una característica muy importante es su capacidad para reproducirse sexualmente teniendo una estructura única de reproducción, la flor (Raghavan *et al.*, 1997). Numerosas adaptaciones evolutivas fueron necesarias para lograr el actual dominio de las angiospermas, y no es de sorprenderse que debido a que presentan una única estructura morfológica femenina, varias de estas adaptaciones estén específicamente relacionadas con la parte femenina de la flor (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

La flor está compuesta principalmente por cuatro órganos: sépalos, pétalos, estambres y gineceo (pistilo), todos determinados por las características genéticas de cada especie (Goldberg *et al.*, 1993).

Los órganos estériles son los sépalos, que cubren el botón antes de que éste abra y los pétalos de color brillante, que sirven para atraer a los polinizadores. El órgano sexual masculino son los estambres (que producen el polen) y están constituidos por antera y filamento, mientras que el órgano femenino es el pistilo constituido por estigma, estilo y ovario (en su etapa madura).

Los granos de polen son depositados en el estigma del pistilo por varios medios como los insectos, el viento, el agua o por gravedad. En el estigma, un tubo

polínico germina a partir del grano de polen, el cual, penetra el estigma y entra al tejido de transmisión y crece hasta llegar al ovario y entrar en contacto con el gametofito femenino (saco embrionario). En las angiospermas ocurre el fenómeno de “doble fecundación” (Kandasamy *et al.*, 1994) en donde una célula espermática se fusiona con la ovocélula y la otra se fusiona con los núcleos polares. Los dos eventos de fusión dan como resultado la formación de un cigoto diploide y un núcleo endospermico primario triploide (Raghavan *et al.*, 1997).

El cigoto es la primera célula de generación esporofítica ( $2n$ ). Éste despliega un estallido de actividad mitótico dentro del saco embrionario, en donde el núcleo endospermico primario se diferencia en un tejido nutritivo conocido como endospermo.

A nivel celular, durante el crecimiento del endospermo y del embrión, se almacenan grandes cantidades de nutrientes como carbohidratos, proteínas y grasas. El óvulo, que contiene el embrión en desarrollo y el endospermo, se transforma en una semilla.

La semilla madura es el enlace entre la generación gametofítica y la futura generación esporofítica de la planta. El embrión tiene la capacidad de mantenerse metabólicamente inactivo en momentos desfavorables y de reactivarse para la formación de una planta que en la madurez dará flores y semillas, con lo que se conserva el ciclo de vida.

## 2.1.1 Órganos reproductores

### 2.1.1.1 Estambres

El estambre está constituido morfológicamente por la antera y el filamento. El filamento es un tubo de tejido vascular que ancla el estambre a la flor y sirve como conducto de agua y nutrientes. En cambio, la antera contiene los tejidos reproductivos y no reproductivos responsables de la producción y liberación de los granos de polen (Goldberg *et al.*, 1993).

Una antera típica es un órgano con dos lóbulos dentro de los cuales existen dos microsporangios. En el centro de los lóbulos se encuentran el tejido conectivo en el que está embebido el tejido vascular.

El desarrollo de la antera se divide en dos fases generales: durante la primera se establece su morfología, ocurre la diferenciación de células y tejidos y la célula madre de la microspora sufre una división meiótica. Al final de esta fase, la antera posee células y tejidos especializados y las tétradas de las microsporas están presentes en cada saco polínico. Estos tejidos son responsables de funciones reproductivas (formación de la microspora o grano de polen) y no reproductiva (soporte y ruptura de la pared de la antera).

En la segunda fase, el grano de polen se diferencia, la antera se alarga por la elongación del filamento; después degeneran los tejidos y la antera se rompe (dehiscencia) liberando los granos de polen (Goldberg *et al.*, 1993).

En la antera, las microsporas o granos de polen se forman en el esporangio por una división meiótica a partir de los microsporocitos diploides (célula madre). El siguiente paso en la diferenciación del grano de polen es la formación de una

célula vegetativa grande y una célula generativa pequeña debido a una división mitótica asimétrica (Twell *et al.*, 1998; Yang y Sundaresan, 2000). Al tiempo que estos cambios ocurren dentro del grano de polen, se forman dos capas de pared, la capa externa llamada exina, y la capa interna, entina. El paso final de esta diferenciación es la división de la célula generativa para formar dos células espermáticas. El grano de polen maduro está compuesto por una célula vegetativa y una o dos espermáticas, dependiendo de la especie y constituye el gametofito masculino, conocido como la unidad germinativa masculina (Raghavan *et al.*, 1997).

### **2.1.1.2 Pistilo**

Las partes femeninas de una flor son colectivamente conocidas como gineceo, el cual consiste en uno o más carpelos<sup>1</sup>. El término pistilo es también comúnmente usado para describir a las partes femeninas de la flor. Así, el gineceo puede estar formado por un único pistilo o por un conjunto de ellos (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

En la antesis (momento en que abre la flor), el pistilo está conformado por tres partes: el ovario, en la base del pistilo, el cual contiene a los óvulos; el estilo, una extensión a partir del ovario, a través del cual crece el tubo polínico hacia el ovario, y el estigma, en el ápice del estilo, donde los granos de polen se adhieren y germinan (Esaú, 1965).

#### **2.1.1.2.1 Formación del ovario**

El desarrollo del pistilo inicia con la formación del carpelo primordio en el centro del meristemo floral. Una característica del desarrollo temprano del pistilo

---

<sup>1</sup> Los carpelos son hojas modificadas.

es la fusión de carpelos. La fusión es un requerimiento para la formación de un pistilo compuesto de un grupo de carpelos, pero esto también ocurre en plantas con pistilos únicos, en los cuales la fusión del carpelo es necesaria para la formación de un pistilo cerrado (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

De manera paralela al desarrollo del gametofito masculino, se lleva a cabo, la formación del gametofito femenino en el óvulo (contenido en el ovario). Dentro de cada óvulo, la célula madre de la megaspora se diferencia por una primera división nuclear (meiosis) para formar cuatro megasporas haploides. Tres de estas células se desintegran y la que sobrevive forma el saco embrionario. Como resultado de tres divisiones mitóticas del núcleo de la megaspora que sobrevivió seguida de la formación de la pared, el saco embrionario maduro comienza a englobar seis células haploides que son: la ovocélula rodeada por dos células sinérgidas y tres células antipodales. Además, en el saco embrionario se presentan dos núcleos haploides libres dentro del que se fusionan para formar un núcleo diploide central, ahora confinado a la parte remanente del saco embrionario denominada como célula central. De esta manera, un saco embrionario maduro está formado por siete células que representan el gametofito femenino. La ovocélula y el núcleo polar fusionado persisten en el saco embrionario, mientras que las células sinérgidas y antipodales tienen una existencia transitoria. En analogía con la unidad germinativa masculina, la ovocélula, las células sinérgidas y la célula central constituyen la unidad germinativa femenina (Raghavan *et al.*, 1997).

#### **2.1.1.2.2 Formación del estilo**

Al tiempo que el ovario es cerrado, las paredes del carpelo se extienden verticalmente para formar uno o más estilos (Sánchez *et al.*, 2004). Esta extensión es caracterizada por una combinación de división celular y de elongación celular. La

longitud, número y estructura de los estilos son típicos dentro de cada especie y variables entre ellas (Sánchez et al., 2004). El propósito de la extensión estilar es facilitar la polinización apropiada, y la gran variedad de morfologías estilares refleja la variedad de estrategias de polinización encontradas a lo largo de las angiospermas (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

Mientras el estilo se elonga, el tejido interior comienza a diferenciarse para formar el estigma, una zona secretora especializada en la punta del estilo y el tejido de transmisión.

Basado en las características morfológicas, los estilos pueden ser clasificados en: abiertos (huecos) o cerrados. En los estilos abiertos, el tejido de transmisión forma una canal el cual esta lleno de una secreción mucilagosa por donde crece el tubo polínico (Raghavan *et al.*, 1997). En los estilos cerrados el material secretado se acumula entre las células del tejido de transmisión. En estos estilos sólidos el tubo polínico crece hacia el ovario a través de la matriz extracelular de las células (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

### **2.1.1.2.3 Estigma**

La región superior del estilo se diferencia en una estructura secretora, el estigma. Este proceso incluye proliferación celular, extensión de las células de la epidermis para formar papilas uni o multicelulares (Raghavan *et al.*, 1997), y secreción glandular que cubre la superficie de las células receptoras maduras. Los estigmas se han clasificado dependiendo de si la superficie receptiva está libre de secreción o no, en estigmas secos y húmedos (Heslop-Harrison y Shivanna, 1977). Los estigmas secos tienen papilas muy largas que interactúan directamente con el polen, el cual es aceptado si es compatible o rechazado si es incompatible (Sánchez *et al.*, 2004). En los estigmas húmedos la adhesión del polen es facilitado por la

presencia de un exudado el cual puede ser acuoso o lipídico. Las proteínas y carbohidratos están presentes en ambos tipos de exudados (Sánchez *et al.*, 2004).

El exudado estigmático es producido en las células de la zona secretora del estigma. La secreción generalmente comienza antes de la antesis y aumenta notablemente después de la polinización (Kandasamy y Kristen, 1987). El proceso de secreción involucra los siguientes pasos: a) fase de síntesis por parte de organelos específicos de las células papilares, b) transporte a la vecindad de la membrana plasmática y c) salida de los productos terminados (Raghavan *et al.*, 1997). En el exudado estigmático están presentes compuestos fenólicos, carbohidratos, aminoácidos y proteínas (Weber, 1994).

Debajo del exudado, existe una capa delgada de agua (en forma de cristales) que rodea a las células de la zona secretora. Durante la polinización los granos de polen se sumergen a través del exudado y establecen contacto directo con el estigma (Sánchez *et al.*, 2004).

#### **2.1.1.2.4 Tejido de transmisión**

El tejido de transmisión, el cual inicia justo después de la región estigmática, está formado por células generalmente elongadas y fusiformes organizadas en filas verticales (Sedgley y Clarke, 1986). Numerosas variantes en la extensión de este tejido son encontradas en las angiospermas, pero el origen celular del tejido de transmisión y la acumulación de una secreción en la matriz para el crecimiento del tubo polínico se conserva (Gasser y Robinson-Beers, 1993).

Las células del tejido de transmisión son metabólicamente activas y están ampliamente dotadas con ribosomas, mitocondrias, RE rugoso, dictiosomas activos y amiloplastos (Sedgley y Clarke, 1986).



El tejido de transmisión provee un medio físico y químico entre el gametofito femenino y masculino. La sustancia secretada ocupa la matriz extracelular del tejido de transmisión. Estos depósitos extracelulares son altamente enriquecidos en: carbohidratos, proteínas, lípidos, polisacáridos, pectinas, compuestos fenólicos, taninos y enzimas como esterasas, fosfatasas ácidas, peroxidasas, etc., sin embargo, su composición química exacta se desconoce (Bell y Hicks, 1976; Clarke *et al.*, 1979; Knox, 1984; Cresti *et al.*, 1986). Los tubos que emergen de los granos de polen en la superficie estigmática son guiados hacia el ovario dentro de esta matriz. El tejido de transmisión puede proveer de nutrientes al tubo polínico en crecimiento y posee factores quimioatrayentes que dirigen el crecimiento del tubo hacia el ovario (Mascarenhas, 1975; Heslop-Harrison, 1987; Vasil, 1987; Lord y Sanders, 1992).

## **2.2 Interacción polen-estigma**

Durante la polinización de las angiospermas, los granos de polen (gameto masculino) se adhieren a la papila estigmática en la superficie del estilo. Algunos de ellos son hidratados y germinan para formar un tubo polínico (lleva a las células espermáticas), el cual penetra la superficie estigmática y continua su crecimiento a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo hasta llegar al ovario para fecundar al óvulo (Gaude y McCormick, 1999). De esta manera este proceso involucra una serie de interacciones que regulan el crecimiento del tubo polínico para lograr la fecundación con éxito (Cheung *et al.*, 2001).

### **2.2.1 Adhesión del grano de polen**

El paso inicial en la adhesión del polen es la captura, en donde se requiere únicamente a la exina y es independiente de los lípidos y proteínas presentes en la capa del polen (Zinkl *et al.*, 1999). La receptividad del estigma hacia el grano de polen puede persistir por una hora o varios días (Heslop-Harrison, 2000) y es influenciado por varios factores. Los estados apropiados del desarrollo del estigma son cruciales para la receptividad (Sánchez *et al.*, 2004).

Después de la captura del grano de polen, inicia la movilización de la capa del polen, fluyendo hacia el punto de contacto con el estigma. Esta interfase es el sitio donde lípidos, carbohidratos y proteínas del polen y el estigma se mezclan (Swanson *et al.*, 2004) dando evidencia de que las proteínas también contribuyen en la adhesión. Se cree que las moléculas en la superficie del grano de polen aparentemente son complementarias a los componentes de la superficie estigmática para que se lleve a cabo una adhesión correcta (Clarke *et al.*, 1977, 1979). El estado final de la adhesión se da cuando el grano de polen germina y el tubo polínico pasa a través de la interfase hacia la superficie del estigma (Zinkl *et al.*, 1999).

### **2.2.2 Hidratación del grano de polen**

La mayor evidencia de que el reconocimiento polen-estigma se ha llevado a cabo es la circulación de agua desde las células estigmáticas hacia el grano de polen. No obstante, a pesar de que se hayan anclado varios granos de polen al estigma, sólo algunos son preferentemente hidratados (Sarker, Elleman y Dickinson, 1988). La hidratación es considerada como el primer cambio observado en los granos de polen compatibles (Raghavan *et al.*, 1997).

Los granos de polen maduros están altamente deshidratados y son metabólicamente inertes. Solo después de su llegada al estigma el polen recibe los nutrientes y el líquido necesario para activar su metabolismo e iniciar la elongación del tubo polínico dentro del estigma. En flores con estigmas húmedos, los granos de polen son rodeados por el exudado estigmático que fluye hacia el grano de polen, reduciendo la posibilidad de regulación especie-específica en este paso. En contraste, en especies con estigmas secos, la transferencia del fluido no es pasiva y frecuentemente depende de la capa del polen. Esta es clara evidencia para la discriminación del grano de polen durante la hidratación en las plantas con estigmas secos. Sin embargo, no es claro como los lípidos hidrofóbicos de la capa del polen actúan para conducir favorablemente el líquido. Ferrari *et al.*, (1985) sugirieron que la hidrólisis y polimerización de la capa del polen puede reducir la resistencia al flujo del agua entre el estigma y el polen. Otros datos indican que el agua simplemente difunde a través de los lípidos de la capa del polen. Cualquiera que sea el mecanismo, hay evidencia experimental de que los lípidos juegan un papel importante en mediar la hidratación del polen.

La absorción de agua provoca un aumento en el volumen del grano de polen. La membrana plasmática se presenta como una barrera osmótica inadecuada ya que cuando no está hidratada presenta varios grados de imperfección. Por ejemplo, la membrana plasmática de la célula vegetativa está colapsada y es hasta que comienza la hidratación cuando paulatinamente recobra su estructura y organización (Shivanna y Heslop-Harrison, 1981).

Se reconocen tres fases en la hidrodinámica del grano de polen: la primera es el paso de agua desde la papila estigmática hacia el grano de polen; este flujo incrementa el contenido de agua en primera instancia en la célula vegetativa. Algunos cambios sutiles se presentan en la membrana plasmática de esta célula hasta que es reformada. Al continuar el flujo de agua, inicia la segunda fase con la

conversión de la membrana plasmática en una barrera osmótica efectiva; durante esta fase raramente el grano de polen crece hasta su tamaño límite pues comienza a perder agua y solutos por exudación a través de los poros de germinación y a través de los microporos de la capa exina. Las proteínas y otros constituyentes móviles de la pared del polen son probablemente expulsados a la superficie estigmática. En la tercera fase se lleva a cabo la reconstitución completa de la membrana plasmática, esto resulta un paso crítico, pues el subsecuente flujo de agua lo determinará la osmolaridad del citoplasma de las células. El grano de polen adquiere una presión hidrostática considerable, con lo cual, podrá emerger el tubo polínico (Vithanage y Heslop-Harrison, 1979). Por lo tanto, la hidratación es un requisito indispensable para la germinación.

### **2.2.3 Activación de la germinación del grano de polen**

La hidratación transforma al grano de polen de una célula no polar a una altamente polarizada. Para que el tubo polínico pueda emerger, el grano de polen organiza su citoplasma y citoesqueleto para soportar la extensión de un único tubo polínico correspondiente a la célula vegetativa. Estos cambios ocurren pocos minutos después de la hidratación e incluye la formación de estructuras filamentosas que rodean al núcleo, la polarización de la actina del citoesqueleto hacia el sitio por donde va a emerger el tubo polínico, llamados sitio de apertura o poros de germinación (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1992), la reorientación de la célula vegetativa que entra al tubo después de la célula generativa (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1989), migración de mitocondrias, partículas de polisacáridos y cuerpos lipídicos en el sitio de elongación en la punta del tubo polínico (Cresti *et al.*, 1977; Johnson y McCormick, 2001).

### 2.2.3.1 Crecimiento del tubo polínico

Durante la etapa de germinación, a través del sitio de apertura, emerge una punta semiesférica que después dará lugar al tubo polínico. Este entra en la papila estigmática después de la lisis de la cutícula y no puede penetrarla sin la presencia de las proteínas del exudado estigmático, de hecho, se ha propuesto que el grano de polen contribuye con precursores de enzimas y que éstas se activan por factores presentes en la superficie estigmática (Heslop-Harrison, 1981).

El modelo de Cresti y colaboradores (1977) reconoce cuatro diferentes zonas en el tubo polínico en *Lycopersicon peruvianum*. Comenzando por la parte distal se tiene: (a) una zona apical o de crecimiento enriquecida con vesículas, (b) la zona subapical poblada por organelos, (c) la zona nuclear, denominada así por la presencia de los núcleos de las células espermáticas y de la vegetativa y, (d) la zona de vacuolas separada por tapones de calosa.

La elongación del tubo polínico se debe al rápido crecimiento del ápice de la célula vegetativa y a la formación de los tapones de calosa, lo cual asegura que a pesar del enorme tamaño de esta célula su citoplasma quede confinado al extremo apical del tubo polínico. Así, puede observarse en el tubo polínico una parte distal donde el citoplasma fluye continuamente y una parte proximal vacía interrumpida por los tapones de calosa (Raghavan *et al*, 1997).

## 2.3 Autoincompatibilidad

Muchas especies de angiospermas producen flores hermafroditas, esto es, que en la misma flor se presentan tanto el órgano masculino (antera) como el órgano femenino (pistilo) (Kao y McCubbin., 1996). Esta proximidad podría favorecer que en una flor los granos de polen producidos por las anteras lleguen a

la superficie estigmática en el pistilo. Para evitar esto las plantas han evolucionado con mecanismos morfológicos, fisiológicos y genéticos que les permiten en muchos casos evitar la autofecundación, ya que si esto no ocurriera las poblaciones podrían experimentar una depresión genética por endogamia.

Uno de los mecanismos genéticos generados para prevenir la autofecundación es la autoincompatibilidad (AI). Éste ha sido definido por de Nettancourt (1977) como la incapacidad de las plantas hermafroditas fértiles para producir cigotos después de la autopolinización. La AI le permite al pistilo reconocer y rechazar el polen propio o el polen de individuos genéticamente relacionados para así prevenir las cruzas “consanguíneas” y promover la polinización cruzada (McCubbin *et al.*, 2000), además de mantener la diversidad genética.

Algunas plantas AI producen flores con características morfológicas distintas (heteromórficas) en las cuales la posición de los órganos reproductivos dentro de la misma flor se presenta como una barrera para la autofecundación (Kao y McCubbin, 1996; Ebert *et al.*, 1989). El tipo homomórfico es aquel en donde las flores de la misma especie son morfológicamente iguales y lo que difiere entre ellas es el fenotipo del polen. Dependiendo del comportamiento del polen el sistema homomórfico puede ser clasificado en esporofítico o gametofítico. En el sistema gametofítico el fenotipo de AI esta determinado por el genotipo haploide del propio polen, mientras que en el sistema esporofítico el comportamiento de AI del polen esta determinado por el genotipo de la planta madre que lo produce (Figura 1).

El sistema de AI gametofítico se ha encontrado en más de 60 familias de plantas con flores (Kao y McCubbin., 1996), pero solo se ha analizado a nivel molecular en: *Lycopersicon*, *Papaver*, *Petunia*, *Solanum* y *Nicotiana*. En cambio, el

sistema de AI esporofítica es menos común (solo se ha encontrado en 6 familias), y se ha estudiado a detalle en las Brassicaceas.

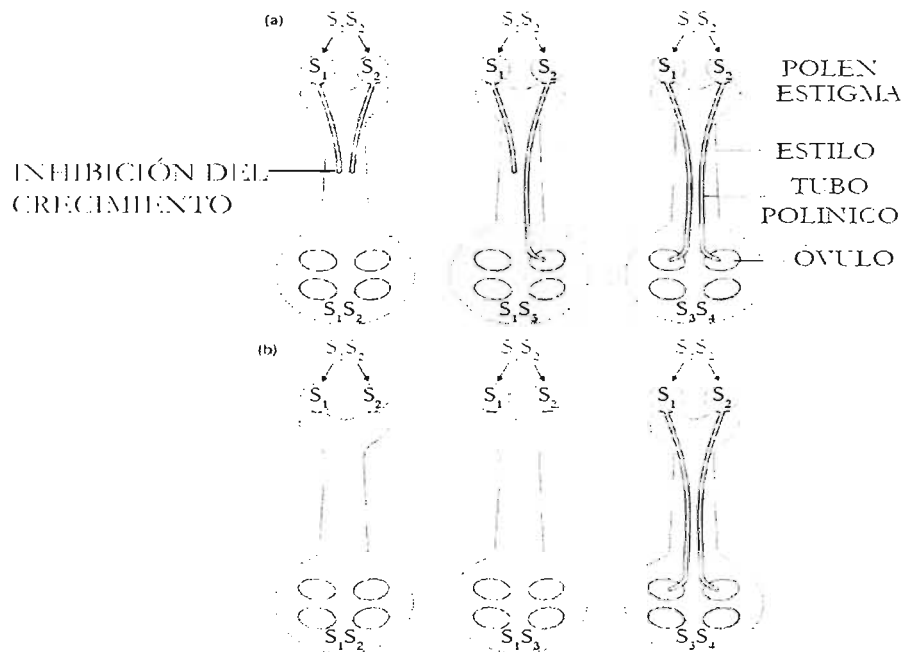


Figura 1. Sistemas de autoincompatibilidad homomórficos en Solanáceas. (a) Autoincompatibilidad gametofítica, el fenotipo del polen está determinado por su propio genoma (haploide). El tubo polínico en crecimiento es inhibido cuando el alelo  $S$  del polen es igual a uno de los alelos  $S$  expresados en el pistilo. Los granos de polen provenientes de una antera  $S_1S_2$  son autoincompatibles con el pistilo  $S_1S_2$  (pistilo de la izquierda). Cuando solo uno de los alelos del polen,  $S_1$ , es igual a uno de los expresados en el pistilo, solo la mitad de los granos de polen, el polen  $S_2$ , son compatibles en el pistilo  $S_1S_3$  (pistilo del centro). Los granos de polen provenientes de la antera  $S_1S_2$  que tiene diferentes alelos  $S$  a los expresados por el pistilo  $S_3S_4$  (pistilo de la derecha) son compatibles. Consecuentemente, los granos de polen  $S_1$  y  $S_2$  pueden germinar, generando el tubo polínico que crece a través del estilo hasta el ovario y efectuar la fecundación. (b) Autoincompatibilidad esporofítica, el comportamiento del polen está determinado por el genotipo (diploide) de la planta de la cual proviene. Cuando uno de los alelos de la planta de la cual proviene el polen es igual a los expresados en el pistilo, la germinación del polen es detenida en la superficie del estigma. Los granos de polen provenientes a partir de la antera  $S_1S_2$  son rechazados tanto por el pistilo  $S_1S_2$  (pistilo de la izquierda) y por el pistilo  $S_1S_3$  (pistilo del centro). Los granos de polen provenientes de la antera  $S_1S_2$  son completamente compatibles con el pistilo  $S_3S_4$  (pistilo de la izquierda), y puede ocurrir la fecundación (Silva y Goring, 2001).

En la AI gametofítica el comportamiento del polen está determinado por su propio genotipo (haploide). Por ejemplo, en una planta diploide  $S_1S_2$ , la antera produce granos de polen que pueden portar el alelo  $S_1$  o el alelo  $S_2$ ; si estos granos de polen se adhieren a un pistilo que exprese estos mismos alelos, los tubos

polínico en crecimiento serán inhibidos (Figura 1, el pistilo de la izquierda). En cambio, si estos granos de polen se adhieren a un pistilo  $S_1S_3$  solo los granos de polen que porten el alelo  $S_2$  son compatibles y los tubos polínicos de los granos de polen  $S_1$  serán inhibidos (Figura 1, pistilo del centro). Mientras que los granos de polen provenientes de la antera  $S_1S_2$  que tiene diferentes alelos  $S$  a los expresados por el pistilo  $S_3S_4$  (pistilo de la derecha) son compatibles. Consecuentemente, los granos de polen  $S_1$  y  $S_2$  pueden germinar, generando el tubo polínico que crece a través del estilo hasta el ovario y efectuar la fecundación.

### 2.3.1 Sistema de autoincompatibilidad en la familia *Solanaceae*

En la familia de las solanáceas, la respuesta de AI es caracterizada por que tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados y tienen una germinación normal. Inicialmente ambos tubos polínicos son morfológicamente iguales. Sin embargo, el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles es inhibido a nivel del tercer segmento superior del estilo. La inhibición es caracterizada por la colocación anormal de calosa, engrosamiento de la pared, hinchazón del tubo polínico y la consecuente ruptura de la punta (Hancock y McClure, manuscrito).

Los estudios genéticos sugieren que la AI en las solanáceas está controlada genéticamente por un único locus polimórfico llamado locus  $S$  (de Nettancourt, 1977). El locus  $S$  está compuesto de un mínimo de dos componentes que se expresan separadamente en el polen (determinante masculina) y el pistilo (determinante femenina) (Hancock y McClure, manuscrito). Se ha demostrado que en la determinante femenina el locus  $S$ , codifica para una familia de proteínas estilares con actividad de ribonucleasa conocidas como  $S$ -RNasas (McClure *et al.*, 1989; McCubbin y Kao, 1996). Éstas son glicoproteínas básicas de alrededor de 30 kDa con un punto isoeléctrico en el rango de pH 7.6 a pH 9.5. Estas proteínas se



encuentran en abundancia en la matriz extracelular del tejido de transmisión en el tercer segmento superior del estilo donde la inhibición del polen se lleva a cabo y escasamente presente en el estilo de flores inmaduras cuando la AI aun no se expresa (Bernatzky, 1993). La determinante masculina del locus S es un gen de ~1.4 kb que codifica una proteína caja F, cuyo transcrito solo fue detectado en antera, polen y tubos polínicos. Este gen fue nombrado *SLF* (S-locus F-box) (Sijacic *et al.*, 2004).

### 2.3.2 S-RNasa

En el mecanismo de AI, las plantas usan el efecto citotóxico de las S-RNasas para prevenir la fecundación no deseada. Las células del tejido de transmisión en el pistilo expresan y secretan S-RNasas hacia la matriz extracelular (Cornish *et al.*, 1987; Anderson *et al.*, 1989), en donde de “alguna manera” son transportadas al citoplasma del tubo polínico, donde ejercen su acción degradando el ARN ribosomal (McClure *et al.*, 1990). Sin embargo, se ha observado que cuando ésta se expresa a niveles muy bajos el ARN no es degradado, sugiriendo que los tubos polínicos tienen alguna resistencia al efecto citotóxico de la S-RNasa. Concluyendo que la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa está directamente implicada en el reconocimiento y rechazo del polen.

Se han reportado más de 30 S-RNasas de siete especies de solanáceas, el análisis de sus secuencias aminoacídicas y la comparación entre ellas revelan un alto grado de diversidad, teniendo una identidad de 38 a 98% (Clark y Kao, 1991). La comparación de estas secuencias ha revelado cinco regiones altamente conservadas nombradas C1 - C5 (Ioerger *et al.*, 1991). Las regiones conservadas C1, C4, y C5 están compuestas de aminoácidos hidrofóbicos implicados en la formación de la estructura de la proteína. Las regiones conservadas C2 y C3 presentan un alto grado de similitud con el sitio activo de la RNasa T2 (fúngica) y

se caracteriza por tener dos residuos de histidina conservados y necesarios para la actividad de RNasa. La S-RNasa presenta 10 residuos de cisteína implicados en la estabilización de la proteína por formar 4 puentes disulfuro (Hancock y McClure, manuscrito).

Todas las S-RNasas son glicoproteínas, teniendo de uno a cinco sitios potenciales para unir N-glicanos (Kao y McCubbin, 1996; Ioerger *et al.*, 1991). Debido a que el número de sitios de glicosilación no es conservado, se tiene una gran variedad de pesos moleculares entre las S-RNasas (Oxley *et al.*, 1998; Woodward *et al.*, 1989). Se ha demostrado que la glicosilación no es requerida para el rechazo del polen (Hancock y McClure).

Las áreas más polimórficas son nombradas regiones hipervariables (HV) y son dos: HVa y HVb (Ioerger *et al.*, 1991). Estas regiones HV son las más hidrofílicas de estas proteínas y se encuentran en la superficie de la molécula, por lo que se ha sugerido que estas regiones están involucradas en la interacción con el producto del alelo S del polen determinando así la especificidad alélica (Silva y Goring, 2001).

### 2.3.3 SLF

Encontrar el gen que codificaba para la determinante masculina (gen S del polen) de la AI llevó mucho más tiempo. Los genes candidatos debían cumplir tres requisitos: 1) estar ligados físicamente al gen S-RNasa, 2) ser altamente polimórfico y 3) expresarse únicamente en antera (Current Perspective Essay, 2004).

Para intentar localizar a este gen, una región de aproximadamente 63 kb, que contenía a la S<sub>2</sub>-RNasa de *Antirrhinum hispanicum* fue secuenciada y se encontraron 10 marcos de lectura abierta adicionales a la secuencia del gen de la S-

RNasa, de los cuales solo uno de ellos era expresado en antera. Este gen se encontraba ~ 9kb adelante del gen de la S-RNasa y codificaba a una proteína que contenía una caja F por lo que fue nombrado *AhSLF* (gen *A. Hispanicum* S-locus F-box) (Lai *et al.*, 2002). Posteriormente este gen fue encontrado en varias especies de *Prunus*, *Petunia* y *Nicotiana*. *SLF* al parecer cumplía con los requisitos necesario para ser el producto del gen S del polen ya que estaba localizado en el locus S y por lo tanto estaba ligado físicamente al gen S-RNasa, era altamente polimórfico (comparable a la S-RNasa) y era un gen específico de antera. En el análisis de la secuencia de 13 de estos genes se identificaron dos regiones altamente variables que fueron nombradas HVa y HVb. La presencia de estas dos regiones es consistente con el papel que podría estar jugando *SLF* como determinante masculina de especificidad (Ikeda *et al.*, 2004).

La identificación y clonación del gen S del polen como una proteína con caja F sugiere que el paso de especificidad, la interacción entre *SLF* y la S-RNasa, esta ligado a la ubiquitinación (Craig y Tyers, 1999). Este sistema (formado por las enzimas E1, E2 y E3) cataliza la formación de cadenas de poliubiquitina en sustratos específicos para la degradación por el proteosoma 26S (Bai *et al.*, 1996). Qiao *et al.* (2004) reportaron que *SLF* se asocia con las proteínas Skp1 y Cull1 que en conjunto forman un complejo de la ubiquitina ligasa E3, llamado SCF. Hay evidencia de que *SLF* interacciona con la S-RNasa, pero no de forma alelo S específica como se esperaba, pues se une a todas las S-RNasas (Qiao *et al.*, 2004). Si *SLF* es un componente del complejo SCF, la interacción con un dominio común para todas las S-RNasas puede conducir a la ubiquitinación y degradación, pero esta interacción puede ser prevenida por una interacción específica entre *SLF* y su correspondiente S-RNasa (Sijacic *et al.*, 2004).

### 2.3.4 Genes modificadores

A pesar de que la actividad de ribonucleasa es requerida para la respuesta de AI, esta no es suficiente. Hay evidencia que sugiere que en las solanáceas otros factores estilares o genes modificadores (GM) son requeridos para modular la respuesta de AI, adicionales a SLF y a las S-RNasas. Estos GM se han clasificado en tres grupos: el grupo I está integrado por factores que afectan directamente la expresión de los genes que determinan la especificidad de la reacción; el grupo II está compuesto por factores que interactúan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad y, por lo tanto, son factores que se requieren específicamente para el rechazo del polen; el grupo III incluye genes que controlan la respuesta de AI y también están involucrados en otros eventos de la interacción polen-pistilo (McClure *et al.*, 2000).

En *Nicotiana* se ha reportado que se requieren factores del grupo II, por ejemplo cuando la S<sub>C10</sub>-RNasa es expresada en una planta transgénica de *N. plumbaginifolia*, que es un especie autocompatible (AC) que no expresa S-RNasas, las plantas no fueron capaces de llevar a cabo el rechazo alelos-S-específico del polen S<sub>C10</sub>. Sin embargo, cuando estas plantas transgénicas se cruzaron con *N. alata* BT, que no expresa ninguna S-RNasa, pero presenta todo el entorno genético necesario para que se lleve a cabo el rechazo del polen, los híbridos resultantes adquirieron la capacidad de rechazar el polen S<sub>C10</sub> (Murfett *et al.*, 1996). Con lo anterior se demostró que la respuesta de AI de los híbridos [*N. plumbaginifolia* transgénica (con S<sub>C10</sub>-RNasa pero AC) X *N. alata* BT (sin S-RNasas AC)], depende de factores diferentes a las S-RNasas heredados por *N. alata* BT.

Uno de estos genes modificadores del grupo II es la proteína HT-B (de *Nicotiana alata*) el cual codifica para una proteína de 101 aminoácidos, rica en asparaginas, que presenta un péptido señal hacia el extremo amino (McClure *et al.*, 1999), por lo que se piensa es secretada en la matriz extracelular del tejido de

transmisión. La proteína HT-B se expresa fuertemente en estilos de plantas autoincompatibles de *N. alata*, pero no se detecta en estilos de especies autocompatibles, como es el caso de *N. plumbaginifolia*. Además de ser una proteína específica del estilo, presenta un patrón de expresión similar al de las S-RNAsas, es decir su expresión aumenta en la antesis. Experimentos con plantas transgénicas de *Nicotiana* en donde fue silenciado HT-B, demuestran que estas son incapaces de rechazar su propio polen, demostrando que HT-B es requerido para el rechazo alelo S-específico del polen (McClure *et al.*, 1999). HT-B es capaz de ingresar a tubos polínicos tanto compatibles como incompatibles, pero en las cruza compatibles es degradado (Goldraij *et al.*, sometido).

Otro gen modificador que se identificó codifica una glicoproteína de 120 kDa (120K). Estudios de inmunolocalización indicaron que esta proteína entra a los tubos polínicos en crecimiento (Lind *et al.*, 1996). Recientemente se demostró que 120K es requerida para el rechazo S-especifico del polen, ya que cuando su expresión fue suprimida, usando la técnica de ARN de interferencia, en híbridos transgénicos *N. plumbaginifolia* AC x *N. alata* AI, estos no fueron capaces de llevar a cabo el rechazo del polen S-especifico (Hancock *et al.*, 2005).

Se ha encontrado que existen otras proteínas estilares que podrían clasificarse como GM clase III. Estas proteínas se unen mayoritariamente a dos S-RNAsas (la  $S_{C10}$  y la  $S_{A2}$ -RNasa). La primera proteína de unión es la glicoproteína específica del tejido de transmisión estilar de *N. tabacum* (TTS), que se ha sugerido estar involucrada en la nutrición del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1995). TTS ha sido caracterizada y clasificada como una glicoproteína rica en arabinogalactanos (AGP) (Sommer-Knudsen *et al.*, 1996). Cheung *et al.*, (1995) sugieren que TTS actúa como quimioatrayente y dirige el crecimiento del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1995). Esta proteína se una a la pared del tubo polínico donde es desglicosilada por

una hidrolasa ubicada en la membrana del tubo polínico para nutrirse de sus azúcares (Wu *et al.*, 1995).

La segunda, es una metaloproteína de 11 kDa (Nap11) con un dominio de unión a cobre que también se localiza en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (Cruz-García *et al.*, observación no publicada). La tercera proteína es conocida como PELPIII (proteína tipo-extensina del pistilo III) que está asociada a los tapones de calosa que se forman a lo largo del tubo polínico (De Graff, 2000). PELPIII no tiene propiedades quimioatrayentes y no es requerido para la polinización compatible en tabaco (Bosch, 2002).

Una hipótesis de cómo pudieran participar los productos de los genes modificadores en la respuesta de AI gametofítica de las solanáceas, es que estos factores interactúen con las S-RNasas para formar complejos moleculares en el estilo que funcionen en el reconocimiento y/o en el transporte de éstas al citoplasma del tubo polínico, sitio donde las S-RNasas actúan (Cruz-García *et al.*, 2003).

## **2.4 Modelos de respuesta de AI mediada por S-RNasa**

Es generalmente aceptado que la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa es esencial para su funcionamiento en AI, aunque no ha sido demostrado definitivamente, que en cruas AI la degradación del ARN de los tubos polínicos por la S-RNasa resulta en la inhibición de su crecimiento en el estilo (Kao y Tsukamoto, 2004). Sin embargo, muchos aspectos respecto a los mecanismos moleculares aun no son claros. Diferentes modelos han sido descritos para explicar como en las cruas AI las S-RNasas pueden mediar la degradación específica del ARN de los tubos polínicos (Thomson y Kirch, 1992; Kao y McCubbin, 1996).

Uno de ellos, el más popular es el modelo del inhibidor, que en forma simple, predice que los productos del alelo S del polen funcionan como inhibidores generales de las S-RNAsas localizados en el citosol del tubo polínico, interfiriendo con la actividad de ribonucleasa de todas las S-RNAsas excepto la S-RNasa alelo específica (Kao y McCubbin, 1996). Sin embargo, este modelo no predice por que falla el rechazo del polen en ausencia de factores estilares como HT-B y 120K. Por ello un nuevo modelo ha sido propuesto (Goldraij *et al.*, enviado a publicación), el cual predice que la entrada de las S-RNAsas al tubo polínico no es alelo-S-específica, pero que éstas entran probablemente por endocitosis y se mantienen en un compartimiento (vacuolas). Algunas de estas S-RNAsas pueden escapar del sistema endomembranoso y ser liberadas en el citosol en donde pueden interactuar con SLF de manera no específica. Si esta interacción es alelo S específica (SLF<sub>1</sub>/S<sub>1</sub>-RNasa, por ejemplo), la proteína HT-B es estabilizada y el compartimiento que contiene a las S-RNAsas se rompe para liberar a las S-RNAsas que consecuentemente degradan el RNA del tubo polínico y se detiene su crecimiento. En cambio, si la interacción no es S específica (SLF<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>-RNasa), HT-B es degradado y la S-RNasa no es liberada al citosol permitiendo por lo tanto el crecimiento del tubo polínico al ovario (Goldraij *et al.*, enviado a publicación).

Sin embargo, aun existen muchas interrogantes para poder establecer claramente el mecanismo por el cual se da la respuesta de autoincompatibilidad.

## 2.5 Incompatibilidad interespecífica

Los mecanismos que controlan la polinización interespecífica han recibido menos atención que aquellos que controlan la polinización intraespecífica. Las dificultades inherentes en el estudio de las cruza interespecíficas representan grandes barreras, por ejemplo, problemas con el análisis de la segregación (segregación aberrante de cromosomas, etc.). Además, debido a la gran diversidad

de tipos de polen que pueden llegar al estigma de una flor, no es razonable esperar que un mecanismo común sea el responsable del fracaso en todas las especies. Sin embargo, se espera un alto grado de complejidad en los mecanismos del rechazo del polen interespecífico (McClure *et al.*, 2000).

La incompatibilidad interespecífica (IIE) ha sido definida como “alguna respuesta después de la llegada del polen al estigma, la cual previene, a través de la ausencia de germinación del polen o un comportamiento anormal de los tubos polínicos, la formación de cigotos híbridos combinando los genomas de dos especies fértiles o ecotipos fértiles” (McClure *et al.*, 2000).

Harrison y Darby (1955) encontraron cierta relación entre la AI y la incompatibilidad interespecífica llamándola incompatibilidad unilateral (IU). Realizaron diferentes cruzas entre ocho especies diferentes y encontraron que cuando los pistilos utilizados pertenecían a especies AC éstos aceptaban el polen tanto de especies AC como de especies AI; mientras que en las cruzas en donde se utilizaban pistilos AI el polen de especies AI era compatible, mientras que las cruzas con especies AC era incompatible (Hiscock *et al.*, 1998).

Más tarde Lewis y Crowe (1958) propusieron que la conexión entre AI e IU estaba determinada por la regla de unilateralidad AI x AC en donde: el polen proveniente de especies AC es rechazado por especies AI, pero la polinización recíproca es compatible, confirmando lo encontrado por Harrison y Darby (1955). La correlación observada entre AI e IU afirma la hipótesis de que la IU podría estar controlada por el locus S. Sin embargo, esta hipótesis resulta controversial ya que existen muchas excepciones a la regla, las cuales fueron explicadas como anomalías en el funcionamiento de las especies AC. Lewis y Crowe (1958) propusieron que estas especies anómalas eran consecuencia de la evolución, en donde las especies AI pasaron a ser AC, debido a mutaciones en locus S (Hiscock y Dickinson, 1993).



Por lo tanto, hacen distinción entre dos clases de especies autocompatibles: las que son totalmente autocompatibles (AC) y las especies recientemente autocompatibles ("Ac"). El pistilo de especies AC aceptan el polen de especies AI pero en la cruzada recíproca el polen es rechazado. Las especies "Ac" también aceptan el polen de especies AI pero a diferencia de las especies AC las "Ac" rechazan su propio polen, mientras que el polen de especies "Ac" es compatible tanto con pistilos AC como AI.

Trabajando con *Nicotiana*, Pandey (1981) aportó evidencia genética del locus S como el control de la IU; manejó el concepto del complejo gen-S, que codifica para dos especificidades. La especificidad "primaria" la cual es responsable de controlar el reconocimiento interespecífico, y la especificidad "secundaria" la cual controla la AI (Hiscock *et al.*, 1998). Usando el modelo del complejo gen-S, y asumiendo varios niveles de erosión del complejo durante la evolución de las especies AC a partir de las AI, Pandey (1981) fue capaz de explicar todas las excepciones a la regla descrita por Lewis y Crowe (1958) (Hiscock *et al.*, 1998).

Las excepciones a la regla de Lewis y Crowe (1958) son frecuentemente usadas por otros autores para evidenciar que el locus S no está implicado en la IU y promover un modelo alternativo conocido como "incongruencia" (Hogenboom, 1975b; Mutschler y Leidl, 1994), que propone que la incompatibilidad interespecífica está bajo control poligénico y es totalmente independiente del locus S.

Hogenboom (1975a) propuso el modelo genético de incongruencia en donde la congruencia o incongruencia de las cruces interpoblacionales es determinado por "genes barrera" en el pistilo y los correspondientes "genes de penetración" del polen; estos genes se consideran distintos a los que controlan la AI (Chetelat y De Verna, 1991). La incongruencia se enfoca en la coadaptación entre el polen y el pistilo; sin embargo, el polen proveniente de diferentes especies no tienen el

mismo grado de adaptación y esto le quita mérito al modelo de incongruencia. Pero este mismo modelo fue reafirmado cuando se comprobó que el rechazo del polen ocurre en una posición diferente del pistilo y que la morfología de la inhibición presenta características diferentes a las presentadas en la AI (Ascher y Peloquin, 1968; Hogenboom, 1975a).

Por otra parte, Murfett *et al.* (1996) brindaron evidencia contundente del papel del locus *S* en la IIE. Estos investigadores demostraron que la S-RNasa es suficiente en algunas especies de *Nicotiana*, para provocar el rechazo del polen. Sin embargo, también reportan que existen mecanismos independientes del locus *S*, los cuales están controlados por otros genes ajenos al locus *S*. Este es el caso de *N. alata* BT, un cultivo que no expresa S-RNasa y rechaza el polen de *N. tabacum*, inhibiendo el crecimiento del tubo polínico en el primer tercio del estilo (Cruz-García, observación no publicada), pero la crucea recíproca es totalmente funcional. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de identificar genes implicados en el rechazo del polen inter-específico, para entender con mayor claridad el mecanismo molecular que permite a las plantas mantener identidad como especie.

## 3 OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

1. Sobreexpresar y purificar a las proteínas *PEP I* y *PEP II* de *Nicotiana alata* en *Escherichia coli*.

### OBJETIVOS PARTICULARES

1. Clonar los ADNc *PEP I* y *PEP II* en un vector de expresión y sobreexpresarlos en *E. coli*.
2. Optimizar las condiciones de la sobreexpresión de *PEP I* y *PEP II* para sintetizarlas como proteínas solubles.
3. Purificar a las proteínas de fusión GST-*PEP I* y GST-*PEP II* de extractos totales de *E. coli*.
4. Evaluar los anticuerpos contra la proteína de fusión GST-*PEP I*.
5. Evaluar la expresión de la proteína *PEP I* en diferentes órganos de *Nicotiana alata* BT y en los estigmas-estilos de diferentes especies de *Nicotiana*.

# 4 MATERIALES Y MÉTODOS

## 4.1 Amplificación de la región codificante de los ADNc de *PEP I* y *PEP II*

En base a las secuencias de los ADNc de *PEP I* y *PEP II* se diseñaron iniciadores de la síntesis de ADN (cebadores) para flanquear la región codificadora (Figura 2). Los cebadores para *PEP I* incluyeron en el extremo 5' un sitio de restricción *Bam*HI y en el 3' un sitio *Eco*RI. El ADNc de *PEP II* quedó flanqueado en su extremo 5' por el sitio de restricción *Bam*HI y en el extremo 3' por el sitio de restricción *Sal*I. El vector de expresión pGEX 4T-2 (Figura 3) presenta en su sitio múltiple de clonación estos sitios de restricción. La generación del sitio *Bam*HI en ambos ADNc permitió la conservación del marco de lectura entre el último codón del extremo carboxilo terminal de la glutatión-S-transferasa (GST) y el primero del amino terminal de la proteína a fusionar. Los sitios de restricción *Eco*RI y *Sal*I localizados después de *Bam*HI permitieron que el ADNc se insertara direccionalmente en el plásmido y que hubiera un codón de término (TGA) posterior a este sitio para garantizar la terminación correcta de la proteína recombinante.

### a) PEP I

```
ADNc_1 -----ATGAAATCCTTTATTTTCAGCTTCCTCTTGCT
ADNc_2 -----ATGAAATCNTTTATTTTCAGCTTCCTCTTGCT

ADNc_1 TTCAACTACTCTCTCTTTGCTTCCCTTTGTAGTCTTTTCATCATCTTTCACTTCACCAA
ADNc_2 TTCAACTACTCTCTCTTTGCTTCCCTTTGTAGTCTTTTCATCATCTTTCACTTCACCAA
       BamHI
5' - CTGT GGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGAC - 3'
----->
ADNc_1 TCCCATTTGCCTTCCCCTACTACTGATGATGACAACGATTTACCTGTA CTTTCCGAAGT
ADNc_2 TCCCATTTGCCTTCCCCTACTACTGATGATGACAACGATTTACCTGTA CTTTCCGAAGT

ADNc_1 GCTAGACACAAACGGCAAACCGCTCCAGATTGGCGAAGAGTACCACATTATCTCCGCTAG
ADNc_2 GCTAGACACAAACGGCAAACCGCTCCAGATTGGCGAAGAGTACCACATTATCTCCGCTAG

ADNc_1 CTGGAGAACCGCGCGCGGTATACTTAACCAATCTTACA AACACCAAATGTCCAAACGA
ADNc_2 CTGGAGAACTGGCGCGCGGTATACTTAACCAATCTTACA AACACCAAATGTCCAAACGA

ADNc_1 CGTCGTCCAACACTGGGAAGGTTCCAAAGACGGCATGCCCGTGAAATTC TTTACGATGGA
ADNc_2 CGTCGTCCAACACTGGGAAGGCTCCAAAGACGGCATGCCCGTGAAATTC TTTACGATGGA

ADNc_1 CCCCGAGGTCGCACCTTCTAGTGTCTGTACGTGAAACTAATGACATTAATATTATGTTCTC
ADNc_2 CCCCGAGGTCGCACCTTCTAGTGTCTGTACGTGAAACTAATGACATTAATATTATGTTCTC
```

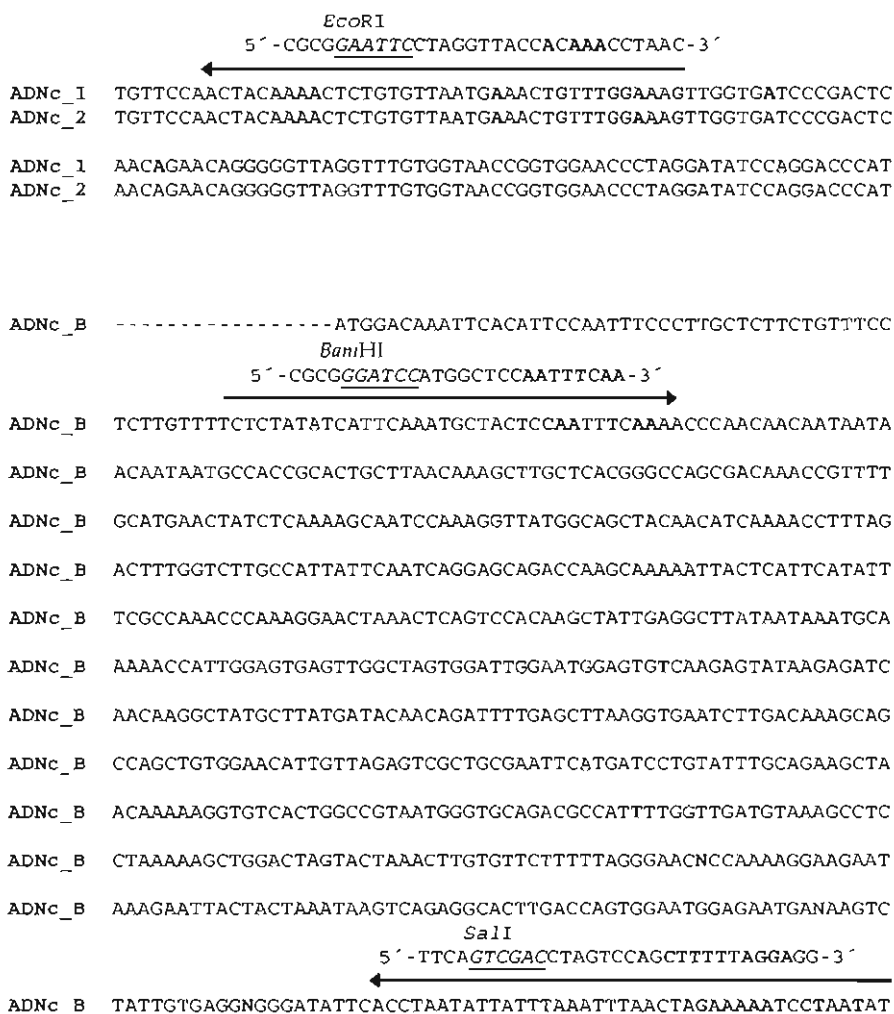


Figura 2. Alineamiento a nivel de nucleótidos de algunas secuencias originales de los ADNc *PEP I* y *PEP II* con los cebadores diseñados para flanquear la región codificadora. En ambos casos se muestran con negritas las regiones utilizadas para el diseño de los cebadores. a) Alineamiento de dos clonas de *PEP I* con los cebadores diseñados para amplificar la región codificadora; al inicio de la secuencia se observa el cebador *Forward* en donde se muestra el sitio de restricción para la enzima *BamHI* con cursivas y subrayado, más adelante se muestra el cebador *Reverse* en donde se incluyó el sitio de restricción *EcoRI*. b) Secuencia a nivel de nucleótidos de una clona de *PEP II* alineadas con los cebadores diseñados para flanquear la región codificadora. Se muestra al inicio de la secuencia el cebador *Forward* que incluye el sitio de corte para la enzima *BamHI* y al final de la secuencia se indica el cebador *Reverse* en donde se muestra con cursivas y subrayado el sitio de corte para la enzima de restricción *SalI*.

La síntesis de los ADNc quiméricos por PCR (Tabla 1), se realizó utilizando como molde ADN plasmídico recombinante con los ADNc *PEP I* o *PEP II*. La longitud de los productos de PCR esperados fue: 396 pb para *PEP I* y 543 pb para *PEP II*.

**Tabla 1.** Reactivos y condiciones de PCR utilizados para la amplificación de los ADNc de *PEP I* y *PEP II*.

1.1.1	Reactivo	Concentración	Condiciones	Número de ciclos
	<sup>2</sup> ADN templado	--	94°C – 1 min.	1 ciclo
	<sup>3</sup> Amortiguador 10x	1x	94°C – 30 seg.	} 30 ciclos
	<sup>4</sup> dNTP's 20mM	0.2mM	66°C – 1 min.	
	Cebador R 20 µM	0.2µM	72°C – 1 min.	
	Cebador F 20 µM	0.2µM	72°C – 4 min.	1 ciclo
	<i>Taq</i> polimerasa 5 u/µl	2.5 u		

Los productos del PCR se analizaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio. Las bandas de ADN fueron visualizadas con una lámpara UV. A partir de estos geles los productos de la amplificación fueron purificados usando un kit de purificación de ADN separado en gel (QIAGEN)<sup>5</sup>.

El protocolo de purificación de ADN separado en gel fue el siguiente:

- Antes de iniciar: Precalentar una alícuota del amortiguador TE (ver Apéndice) a una temperatura entre los 65° y 70°C. Equilibrar un baño de agua o un bloque de calentamiento a 50°C. Verificar que al amortiguador de lavado (ver Apéndice) se le haya agregado el etanol (agregar 140 mL).

1. Cortar el área del gel que contiene el ADN usando una navaja de afeitar limpia. Minimizar la cantidad de agarosa alrededor del fragmento.
2. Pesar el gel.
  - a. Para geles de agarosa  $\leq 2\%$ , depositar no más de 400 mg de gel en un tubo de polipropileno de 1.5 mL. Dividir el gel excedente en tubos

<sup>2</sup> El ADN templado fue el plásmido recombinante pTriplEx2.

<sup>3</sup> Tris-HCl 200 mM (pH 8.4) y KCl 500 mM.

<sup>4</sup> Mezcla de desoxirribonucleótidos en la misma cantidad.

<sup>5</sup> Algunos amortiguadores no tienen su composición, ya que la empresa que los fabrica no la incluye.

adicionales. Adicionar 30  $\mu\text{L}$  del amortiguador de solubilización de gel (ver Apéndice) por cada 10 mg de gel.

- b. Para geles de agarosa  $\geq 2\%$ , depositar no más de 400 mg de gel en un tubo de polipropileno de 5 mL. Dividir el excedente de gel en tubos adicionales. Adicionar 60  $\mu\text{L}$  de amortiguador de solubilización de gel por cada 10 mg de gel.
3. Para solubilizar el gel incubar a  $50^{\circ}\text{C}$  por 15 min. Mezclar por inversión cada 3 min. Después de que el gel se ha disuelto, incubar por 5 min más.
4. Colocar una columna de purificación de ADN en un tubo de lavado de 2 mL. Pipetear la mezcla del paso 3 en la columna y centrifugar a 13 000 rpm por 1 min. Descartar el eluato.
5. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de amortiguador de solubilización de gel en la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min, posteriormente centrifugar a 13 000 rpm por 1 min. Descartar el eluato.

NOTA: Este lavado es recomendado cuando se han agregado más de 250 mg de gel en la columna o cuando se requiere de alta pureza como cuando el ADN se va a secuenciar o se va a usar para transcripción *in vitro*.

6. Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de amortiguador de lavado en la columna e incubar por 5 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 min. Descartar el eluato. Centrifugar nuevamente por 1 min para remover los residuos del amortiguador.
  7. Pasar la columna a un tubo de recuperación de 1.5 mL. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de TE precalentado a  $65^{\circ}\text{C}$ - $70^{\circ}\text{C}$  directamente en el centro de la columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente, posteriormente centrifugar a 13 000 rpm por 2 min. Recuperar el eluato con el ADN.
- Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

## 4.2 Clonación de los ADNc *PEP I* y *PEP II*

El producto de la amplificación por PCR de los ADNc *PEP I* y *PEP II* al igual que el vector de expresión pGEX 4T-2, fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI para el caso de *PEP I* y, con las endonucleasas *Bam*HI y *Sal*I para el caso de *PEP II* (Tabla 2).

**Tabla 2.** Condiciones de digestión de los ADNc y del vector de expresión pGEX, para generar los extremos cohesivos necesarios para su reacción de ligado.

<sup>6</sup> Reactivo	Concentración
Producto de PCR- <i>PEP I</i>	----
<i>Bam</i> HI 10 u/ $\mu$ L	0.18 u
<i>Eco</i> RI 10u/ $\mu$ L	0.18 u
Amortiguador Y <sup>+</sup> 2X	0.4X
<sup>7</sup> Volumen final	10 $\mu$ l
Producto de PCR- <i>PEP II</i>	----
<i>Bam</i> HI 10 u/ $\mu$ L	0.15 u
<i>Sal</i> I 10 u/ $\mu$ L	0.15 u
Amortiguador O <sup>+</sup> 10X	0.75x
Volumen final	20 $\mu$ l

\* Se utilizaron las mismas condiciones para el vector.

Los productos de las digestiones fueron fraccionados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.5% y purificados a partir de éste con el protocolo antes descrito. Los productos purificados de *PEP I* y *PEP II* fueron ligados al vector de expresión pGEX-4T-2 digerido. Las condiciones de la reacción de ligado se presentan en la tabla 3.

---

<sup>6</sup> Los reactivos utilizados son de Fermentas.

<sup>7</sup> El volumen final se alcanza agregando H<sub>2</sub>O desionizada.



**Tabla 3.** Reactivos utilizados en la reacción de ligado.

<b>Condiciones de la reacción de ligado</b>	
PGEX digerido	2 $\mu$ L
PEP I ó PEP II digerido	5 $\mu$ L
Amortiguador T <sub>4</sub> ligasa 5x	1x
T <sub>4</sub> ADN ligasa	1 u
Incubación a 26°C toda la noche	

El producto de la reacción de ligado se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  siguiendo el siguiente protocolo:

1. A 100  $\mu$ L de células competentes (ver Apéndice) agregar 10  $\mu$ L de la reacción de ligado.
2. Incubar por 30 min en hielo.
3. Incubar a 42°C por 45 seg.
4. Incubar en hielo por 2 min.
5. Adicionar 950  $\mu$ L de medio SOC (LB con glucosa estéril 20mM (ver Apéndice)).
6. Incubar 2 horas a 37°C con agitación constante.
7. Centrifugar a 13 000 por 2 min y desechar el sobrenadante.
8. Resuspender el botón en 400  $\mu$ L de LB. Tomar 100  $\mu$ L y esparcirlos en una placa de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL).
9. Incubar a 37°C toda la noche.

Debido a que el vector de expresión pGEX presenta un gen que confiere resistencia a ampicilina, las células transformantes pueden seleccionarse en medio LB con este antibiótico.

Con el fin de corroborar que las colonias transformantes contenían el plásmido recombinante, varias colonias fueron recuperadas y su ADN plasmídico

purificado (Rapid Plasmid Miniprep System/Marlingen Bioscience)<sup>8</sup>. La presencia del inserto fue corroborado por PCR bajo las condiciones antes mencionadas y por digestión del vector con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Eco*RI en el caso de *PEP I* y con *Bam*HI/*Sal*I para el caso de *PEP II*.

El procedimiento para purificar el ADN plasmídico es el siguiente:

Antes de iniciar: Precalentar una alícuota de amortiguador TE (ver Apéndice) a una temperatura de entre 65 y 70°C. Verificar que la RNasa A (20 mg/mL en amortiguador de suspensión celular) ha sido agregada al amortiguador de suspensión celular (ver Apéndice) a una concentración final de 20 µg/µL; además, que no se ha formado un precipitado en la solución de lisis celular (ver Apéndice). Verificar que el etanol haya sido agregado al amortiguador de lavado (ver Apéndice).

1. Centrifugar de 1 a 5 mL de un cultivo celular incubado toda la noche, hasta remover todo el medio.
2. Adicionar 250 µL del amortiguador de suspensión celular al paquete celular y resuspenderlo hasta homogeneizar.
3. Adicionar 250 µL de la solución de lisis celular. Mezclar ligeramente por inversión del tubo cinco veces. NO UTILIZAR VORTEX. Incubar a temperatura ambiente por 5 min.
4. Adicionar 350 µL de amortiguador de neutralización (ver Apéndice) y mezclar inmediatamente por inversión del tubo cinco veces. NO UTILIZAR VORTEX. Centrifugar la mezcla a 13 000 rpm por 10 min.
5. Colocar una columna en un tubo de lavado de 2 mL. Cargar el sobrenadante del paso 4 en la columna. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 min. Descartar el eluato.

---

<sup>8</sup> Algunos amortiguadores no tienen su composición, ya que la empresa que los fabrica no la incluye.

6. (Lavado opcional): Adicionar 500  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lavado opcional (ver Apéndice) a la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min. Descartar el eluato. NOTA: Este lavado es recomendado cuando se usan cepas de bacterias ricas en nucleasas.
  7. Lavado de la columna: Adicionar 700  $\mu\text{L}$  del amortiguador de lavado a la columna. Centrifugar a 13 000 rpm por 1 min. Descartar el eluato. Centrifugar de nuevo a 13 000 rpm por 1 min para remover el amortiguador de lavado residual.
  8. Pasar la columna a un tubo limpio de 1.5 mL. Adicionar 75  $\mu\text{L}$  de amortiguador TE precalentado, directamente en el centro de la columna. Incubar a temperatura ambiente por 1 min, luego centrifugar a 13 000 rpm por 2 min.
- Todas las centrifugaciones se realizan a temperatura ambiente.

Una vez seleccionadas las clonas con los plásmidos recombinantes fue necesario saber si se habían clonado en el marco de lectura correcto y si su secuencia codificaba para las proteínas correspondientes. Para esto se secuenciaron en el Instituto de Fisiología de la UNAM, los ADNc provenientes de las clonas recuperadas y se realizó un alineamiento con la secuencia original.

### **4.3 Sobreexpresión de los ADNc *PEP I* y *PEP II* en *E. coli***

A partir de las clonas transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se purificó el ADN plasmídico y con éste se transformaron células de *E. coli* BL21-codon-plus. Ambos protocolos se mencionaron anteriormente. Para la selección de estas últimas se utilizó medio LB con ampicilina a una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las clonas obtenidas se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  en LB con glicerol al 15%.

Una vez que se corroboró por digestión o PCR (condiciones presentadas anteriormente) que las clonas recuperadas de *PEP I* y *PEP II* en BL21-codon-plus contenían el plásmido recombinante, se eligió una de ellas para llevar a cabo la sobreexpresión de la proteína quimérica. Se establecieron las condiciones de trabajo realizando un experimento piloto antes de realizar la sobreexpresión de la proteína a gran escala.

El protocolo para inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante se presenta a continuación:

- a) Crecer la colonia de interés en 5 mL de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 µg/mL y cloranfenicol 50 µg/mL, a 37°C con agitación constante de 12 a 13 h.
- b) Tomar 50 µL del cultivo e inocularlos en 1 mL de medio LB (sin antibiótico).
- c) Incubar a 37°C con agitación constante por 2 h.
- d) Centrifugar a 13 000 rpm por 2 min eliminar el sobrenadante y agregar medio LB nuevo.
- e) Adicionar IPTG<sup>9</sup> (isopropiltiogalactosido) a una concentración final de 0.5 mM e incubar a 37°C con agitación constante durante 2 h.
- f) Centrifugar a 13 000 rpm por 3 min, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 200 µL de PBS (ver Apéndice). Guardar 60 µL de sobrenadante (muestra antes de lisar).
- g) Centrifugar a 13 000 rpm por 3 min y eliminar el sobrenadante.
- h) Resuspender en 140 µL de solución de lisis celular (ver Apéndice).
- i) Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- j) Congelar las muestras en nitrógeno líquido y descongelarlas, dos veces.

---

<sup>9</sup> Se parte de un stock con una concentración de 100 mM. El IPTG debe estar estéril.

- k) Centrifugar a 13 000 rpm por 3 min para remover los restos celulares.
- l) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio. Tomar 30  $\mu$ L para posterior análisis (fracción soluble).
- m) Resuspender el botón en 140  $\mu$ L de PBS. Guardar 30  $\mu$ L para posterior análisis (fracción insoluble).
- n) Las muestras deben ser almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso.

NOTA: Se realiza el mismo procedimiento con un control que consiste en células BL21 codon-plus que fueron transformadas en el pGEX no recombinante.

Las diferentes alícuotas obtenidas, fueron analizadas por SDS-PAGE. Este análisis electroforético se realizó con geles discontinuos que consistieron en un gel apilador (ver Apéndice) a una concentración de acrilamida de 4% y pH de 6.8 y un gel separador (ver Apéndice) a una concentración de acrilamida al 12.5% y pH de 8.8. Se realizaron geles por duplicado, uno destinado a la tinción de las proteínas con azul de Coomassie (ver Apéndice), y el otro gel para transferirlo a una membrana de nitrocelulosa y realizar la inmunodetección por Western blot de la proteína GST.

#### **4.4 Análisis de los patrones proteínicos**

El gel de poliacrilamida destinado para la inmunodetección se transfirió a una membrana de PVDF a 75 mA por una hora utilizando el equipo TransBlot®SD/Semi-Dry Transfer Cell de BioRad (ver Apéndice, amortiguador de transferencia). Esta membrana se tiñó con Rojo Ponceau (ver Apéndice) para comprobar que la transferencia se había llevado a cabo satisfactoriamente, mediante la visualización de las bandas correspondientes a las proteínas teñidas en rojo. Posteriormente se llevó a cabo la inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales contra la proteína GST.

Las condiciones para la inmunodetección fueron las siguientes:

- a) Lavar la membrana con agua desionizada para eliminar el Rojo Ponceau.
- b) Incubar la membrana, con las proteínas, en solución de bloqueo (ver Apéndice) a 4°C toda la noche o a temperatura ambiente mínimo 2 h con agitación constante.
- c) Desechar la solución.
- d) Agregar la solución de bloqueo fresca con el primer anticuerpo policlonal (anti-GST) a una dilución de 1:2 500 (en solución de bloqueo) e incubar con suave agitación por dos horas a temperatura ambiente.
- e) Desechar la solución.
- f) Lavar la membrana dos veces durante 5 y 10 min con PBS (ver Apéndice).
- g) Hibridar con el segundo anticuerpo (anti-conejo acoplado a peroxidasa) a una dilución de 1:40 000 (en solución de bloqueo) e incubar a temperatura ambiente con agitación suave por una hora.
- h) Desechar la solución.
- i) Hacer tres lavados con PBS a temperatura ambiente (10 min cada lavado).
- j) Revelar la membrana con quimioluminiscencia (ver Apéndice), y película fotográfica sensible (Kodak Biomax MS).

#### **4.5 Optimización de las condiciones de inducción para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes**

Con el objetivo de que las proteínas se acumulasen mayoritariamente en la fracción soluble fueron optimizadas las condiciones de inducción de la sobreexpresión. Para la optimización de esta metodología solo se trabajó con la proteína recombinante GST-PEP I ya que de la proteína quimérica GST-PEP II se observaba mayor cantidad de proteína en la fracción soluble que la de PEP I.

Durante la inducción se modificaron dos parámetros, la temperatura y la aireación (Villaverde y Mar, 2003). La temperatura se bajó de a 37°C (control) a 28°C y para aumentar la aireación lo que se hizo fue que, en lugar de llevar a cabo la sobreexpresión de la proteína de fusión en tubos Eppendorf de 1.5 mL, ésta se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL.

Se realizaron las siguientes pruebas:

Temperatura	Aireación
28°C	Normal
	Alta
37°C	Normal
	Alta

En un experimento adicional para dirigir a la proteína hacia la fracción soluble se adicionó glucosa al 0.2% y etanol al 2%, durante el período de inducción (Nygaard y Harlow, 2001).

Ambos experimentos se realizaron con el protocolo de sobreexpresión antes mencionado.

#### **4.6 Solubilización y recuperación de las proteínas recombinantes a partir de cuerpos de inclusión**

En este procedimiento se usó el agente surfactante de tipo catiónico, bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB;  $(\text{CH}_3)_3 - \text{N}^+ - \text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{Br}$ ), para solubilizar a las proteínas recombinantes a partir de los cuerpos de inclusión (Puri *et al.*, 1993). El protocolo seguido se presenta a continuación:

Se tomó en cuenta que un mL de cuerpos de inclusión equivale aproximadamente a 100 mg de proteína total base seca; o aproximadamente a 3.72 g de células de *E. coli* húmedas, esto debido a que la concentración de proteína

durante la solubilización debe ser de 40 mg/mL (Puri *et al.*, 1993). Por lo tanto, como primer paso fue necesario medir el volumen de cuerpos de inclusión para que en base a ello se calculara la cantidad de reactivos a agregar para alcanzar la concentración deseada. El protocolo seguido fue el siguiente:

- a) Adicionar el CTAB a una concentración final de 5% y  $\beta$ -mercaptoetanol al 1%.
- b) Incubar a temperatura ambiente por una hora con agitación suave.
- c) Homogeneizar.
- d) Centrifugar a 4000 rpm por 5 min.
- e) Recuperar la fracción soluble en un tubo limpio.
- f) Almacenar a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Para remover el exceso de detergente, primero se utilizaron columnas de exclusión molecular, Econo-Pac (BioRad) con un límite de exclusión de 6000 Da. Estas columnas sirven como un primer paso de desalado. El siguiente paso para eliminar el detergente fue la diálisis contra PBS, utilizando membranas (Spectrapor/molecular porous membran) con un corte de 6000 – 8000 Da. Las muestras se dializaron por aproximadamente 18 h, posteriormente se cambió el amortiguador exterior y se dializó por dos horas más.

Una vez que las muestras fueron dializadas fue necesario concentrarlas. Se usaron filtros de Amicon Ultra-4 con un corte de 10000 Da (Millipore) y el volumen final fue de 3 mL.



## 4.7 Purificación de la proteína de fusión

Las proteínas recombinantes fueron purificadas utilizando la resina glutatión sefarosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB), que permite la purificación de la proteína de fusión a GST en un solo paso.

El protocolo de purificación fue el siguiente:

- a) Por cada mililitro de proteína soluble agregar 20  $\mu$ L de glutatión sefarosa 4B al 50%.
- b) Incubar con rotación constante a temperatura ambiente por 30 min.
- c) Centrifugar la suspensión a  $\sim$ 2000 rpm por 5 min para sedimentar la matriz. Eliminar el sobrenadante y guardar una alícuota (UB = fracción no unida) para analizarlo por SDS-PAGE.
- d) Lavar el botón con 10 volúmenes de la resina suspendida en PBS (1 volumen de resina = 0.5 volúmenes de glutatión sefarosa 4B al 50%) y centrifugar a  $\sim$ 2000 rpm por 5 min. Eliminar el sobrenadante (guardar para poder analizar por SDS-PAGE).
- e) Repetir el lavado dos veces más y guardar los eluatos para analizarlos por SDS-PAGE.

La elusión de la proteína se llevó a cabo de la siguiente manera:

- a) A la matriz sedimentada adicionar 1 mL de amortiguador de elusión (ver Apéndice) por cada mililitro de volumen de la resina en suspensión.
- b) Mezclar suavemente para resuspender la matriz. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos para eluir a la proteína de fusión de la matriz.
- c) Centrifugar a  $\sim$ 2000 rpm por 5 min para sedimentar la matriz y recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.

- d) Repetir los tres pasos anteriores dos veces más. Guardar los eluatos para posterior análisis con SDS-PAGE.

El resultado de la purificación fue analizado por SDS-PAGE.

## 4.8 Obtención de extractos de proteína total

Se prepararon extractos de proteína total de diferentes órganos de plantas adultas de *Nicotiana alata* BT: tallo, ovario, sépalo, hoja, pétalo, antera y estigma-estilo (estos últimos colectados después de la antesis). Además, se prepararon extractos de proteína total de estigma-estilo (maduros) de especies de *Nicotiana* tanto autocompatibles (AC) como autoincompatibles (AI). Las especies AC fueron: *N. glauca*, *N. longiflora*, *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*; las especies AI fueron: *N. alata* 3AC, *N. alata* BT (mutante que no expresa S-RNasa), *N. alata* 110-18, *N. forgetiana*, *N. bonariensis*, *N. alata* 18AI y *N. alata* 1-2. Además de los híbridos *N. alata* 3-20 x *N. plumbaginifolia* y *N. alata* x *N. plumbaginifolia* (Ya se contaba con algunos extractos de las especies por lo que no fue necesario prepararlos).

1. Pesar el tejido (200 mg de los órganos de *N. alata* BT y 100 mg de los estigmas-estilos de las diferentes especies) y colocarlo en un mortero<sup>10</sup>.
2. Agregar 500 µL de amortiguador de extracción (ver Apéndice) por cada 100 mg de tejido. El amortiguador de extracción debe estar recién preparado.
3. Macerar el tejido hasta que se observe un extracto homogéneo.
4. Recuperar el extracto del mortero con una pipeta<sup>11</sup> y colocarlo en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.

---

<sup>10</sup> Durante la preparación de los extractos todo el material a utilizar se mantenga frío para evitar que se activen las proteasas celulares.

<sup>11</sup> Se recomienda cortar la punta de la pipeta en su extremo inferior para poder recuperar el extracto debido a que su consistencia espesa dificulta su manipulación.

5. Centrifugar a 10 000 rpm por 20 min a 4°C para separar los residuos celulares de los elementos solubles.
6. Recuperar 200 µL del sobrenadante en un tubo limpio y seco. Separar una alícuota para la cuantificación de las proteínas.
7. Al resto del extracto añadirle amortiguador de muestra (ver Apéndice) (concentración final 1X).
8. Calentar por cinco minutos a 94°C.
9. Conservarlas a -20°C hasta su uso.

#### 4.9 Cuantificación de proteínas

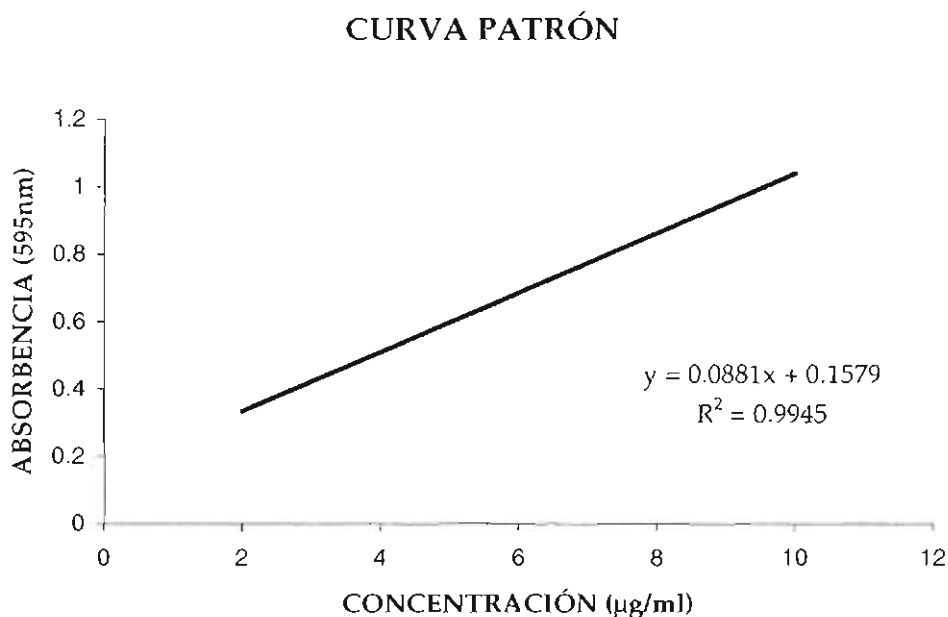
A partir del extracto crudo se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford (BioRad). Se utilizó una curva patrón para proteínas, la cual fue construida utilizando diferentes diluciones de una solución estándar de 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA). La curva patrón se construyó de la siguiente manera:

- a) En 7 tubos rotulados colocar la cantidad de solución estándar, agua desionizada y reactivo de Bradford (BioRad) para llegar a un volumen final de 1 mL de acuerdo a la siguiente tabla:

Volumen de solución estándar de BSA (µL)	Volumen de agua desionizada (µL)	Volumen de reactivo de Bradford (µL)	Concentración final de BSA (µg/mL)
0	800	200	Blanco
2	798	200	2
5	795	200	5
10	790	200	10

- b) Mezclar con ayuda de un vortex.
- c) Incubar por cinco minutos a temperatura ambiente.

- d) Leer la absorbencia a 595 nm.
- e) Trazar la curva patrón graficando Absorbencia (A) vs Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).



Preparación de la muestra: 5  $\mu\text{L}$  de muestra más 795  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 200  $\mu\text{L}$  de reactivo de Bradford (Realizar por duplicado). Mezclar con ayuda de un vortex, incubar por cinco minutos a temperatura ambiente y leer la absorbencia a 595 nm. Interpolan los valores obtenidos en la curva patrón y realizar los cálculos correspondientes para obtener la concentración real de proteína total en los extractos (ver Apéndice).

Una vez cuantificada la proteína se realiza un análisis por SDS-PAGE de los diferentes extractos asegurándose de cargar la misma cantidad de proteína. En nuestro caso, de los diferentes órganos de *N. alata* BT cargamos 5  $\mu\text{g}$  de proteína total y en el caso de las diferentes especies 10  $\mu\text{g}$  (ver Apéndice).

#### 4.10 Titulación de los sueros anti-PEP I

Se mandaron a sintetizar anticuerpos contra un péptido diseñado a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína PEP I con la empresa Sigma-Genosys. La empresa envió los sueros de los primeros tres sangrados de la inmunización de dos conejos (15685 y 15686); además, de los respectivos sueros preinmunes. Antes de utilizarlos fue necesario titularlos para encontrar la dilución a la cual va a ser utilizado en la inmunodetección de la proteína en los diferentes extractos.

Los anticuerpos contra el péptido PEP I del tercer sangrado fueron titulados utilizando los extractos proteínicos de estilos de *N. alata* BT y *N. alata* 110-18. Para ello se utilizaron diferentes diluciones de anticuerpo en solución de bloqueo (Tabla 4) incubando contra 10 µg de proteína total del extracto, las cuales fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE y transferidas a una membrana PVDF (75 mA, 50 minutos). Se siguieron las condiciones antes mencionadas.

**Tabla 4.** Diluciones utilizadas para determinar el título de los anticuerpos.

Conejo	Dilución	1:1000	1:3000	1:5000	1:10000	1:15000
15685	Preinmune	✓	✓	✓	✓	✓
	3° sangrado		✓	✓	✓	✓
15686	Preinmune	✓		✓	✓	✓
	3° sangrado		✓	✓	✓	✓

El protocolo de inmunodetección fue el siguiente:

1. Incubar la membrana con las proteínas con solución de bloqueo (ver Apéndice) a 4°C toda la noche.
2. Desechar la solución y agregar solución de bloqueo fresca con la dilución adecuada al título del primer anticuerpo (anti-PEP I) e incubar con agitación suave por dos horas a temperatura ambiente.

3. Desechar la solución y lavar la membrana dos veces durante 5 y 10 min con PBS (ver Apéndice) con Tween 20 al 0.1%.
4. Hibridar con el segundo anticuerpo (anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina) a una dilución de 1:20 000 (en solución de bloqueo) e incubar a temperatura ambiente con agitación suave por una hora.
5. Desechar la solución.
6. Hacer tres lavados con PBS a temperatura ambiente (10 min cada lavado).
7. Incubar la membrana con amortiguador de fosfatos pH 9.5 (ver Apéndice) durante 10 minutos.
8. Revelado:
  - a) Colocar la membrana en 10 mL de amortiguador pH 9.5 al que le fueron agregados 100  $\mu$ L de NBT (ver Apéndice) y 100  $\mu$ L de BCIP (ver Apéndice) y revelar hasta la intensidad deseada.
  - b) Detener la reacción con agua desionizada y agregar un poco de solución EDTA<sup>12</sup>.

#### **4.11 Inmunodetección por Western-blot de la proteína PEP I: como proteína recombinante GST-PEP I y en extractos de proteína total**

Una vez obtenido el título del anticuerpo a utilizar, fue necesario demostrar que estos anticuerpos eran capaces de reconocer a la proteína recombinante GST-PEP I para posteriormente inmunodetectar a la proteína PEP I en los extractos de proteína total de las plantas y que los resultados fueran confiables.

Para realizar las pruebas de inmunodetección de la proteína recombinante GST-PEP I se utilizó la fracción con la proteína purificada por cromatografía de afinidad (glutación sefarosa 4B, Amersham Pharmacia Biotech AB). Estas proteínas

---

<sup>12</sup> No importa la concentración y el pH de la solución de EDTA.

fueron separadas electroforéticamente por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12.5%; al igual que los extractos de proteína de los diferentes órganos de *N. alata* BT y de las diferentes especies a evaluar. Se realizaron dos geles, uno destinado a la inmunodetección y el otro fue teñido con azul de Coomassie y sirvió como duplicado del primero.

Las condiciones de inmunodetección fueron las mismas que se utilizaron en la titulación del anticuerpo.

# 5 RESULTADOS

## 5.1 Clonación de los ADNc PEP I y PEP II en pGEX-4T-2

Los ADNc PEP I y PEP II se clonaron en el sitio múltiple de clonación del vector de expresión pGEX 4T-2 (Figura 3). Este vector está diseñado para que los polipéptidos que se expresan queden fusionados al extremo carboxilo terminal de la proteína glutatión-S-transferasa (GST), la cual es una proteína citoplásmica de 26 kDa común en eucariontes. La GST que se sintetiza a partir de este tipo de vectores tiene una masa molecular de 29 kDa debido a los codones que fueron agregados para formar el sitio múltiple de clonación seguido por codones de término de la traducción en los tres marcos de lectura. La expresión génica de la proteína es inducida desde el promotor *tac*, por un análogo de la lactosa, el isopropiltiogalactósido (IPTG) (Ausubel *et al.*, 1997).

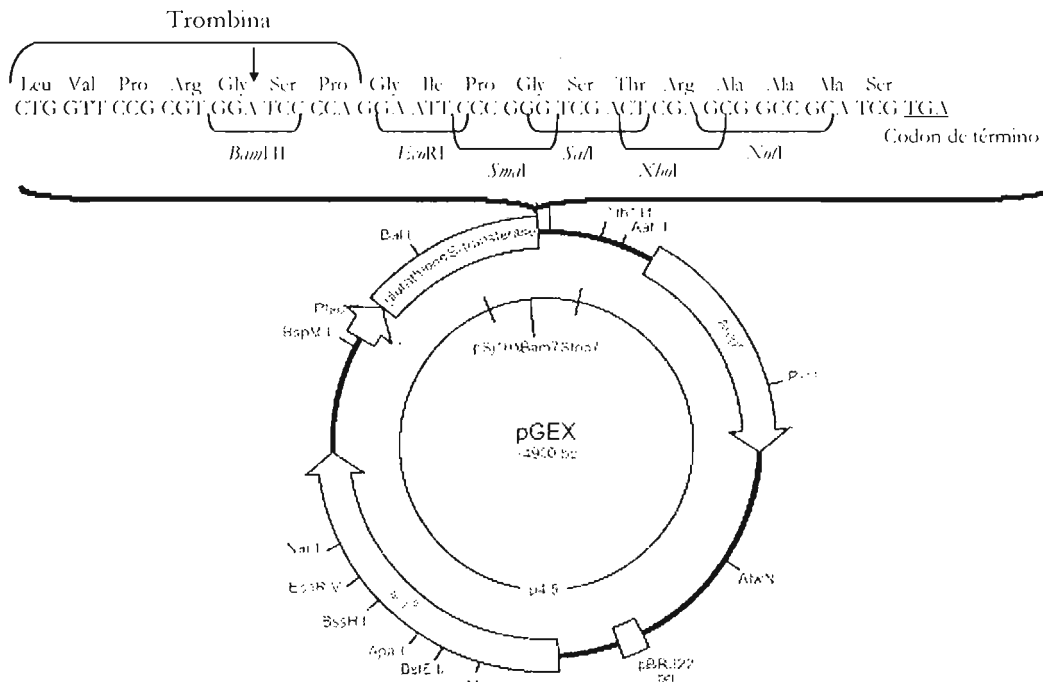


Figura 3. Vector de expresión pGEX-4T-2. Se muestra el promotor *tac* seguido por la GST en donde el codon de término normal es reemplazado por un sitio múltiple de clonación seguido por codones de término de la traducción en los tres marcos de lectura; la secuencia de reconocimiento de la proteasa sitio específica trombina; el gen *Amp<sup>R</sup>* que codifica para una β-lactamasa; el origen de replicación del ADN, *Ori*; un fragmento del operon *lac* que contiene el alelo de sobreexpresión *lacI<sup>q</sup>* de el represor *lac* y una parte del gen *lacZ*.



Para clonar los ADNc *PEP I* y *PEP II* en el vector pGEX-4T-2 primero se realizó una amplificación por PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para flanquear el ADNc de *PEP I* con los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI (Figura 3); mientras que el ADNc de *PEP II* con los sitios *Bam*HI y *Sal*I (Figura 3). Los productos de estos PCRs fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes para generar los extremos cohesivos necesarios para ligarlos al vector de expresión pGEX, el cual a su vez fue cortado con las enzimas necesarias en cada caso. En la figura 4, se muestran los productos de la digestión después de ser separados electroforéticamente. Los fragmentos obtenidos presentaron una longitud aparente de 400 pb para *PEP I* y de 500 pb para *PEP II*, aproximándose al tamaño esperado de 396 pb para *PEP I* y 543 pb para *PEP II*.

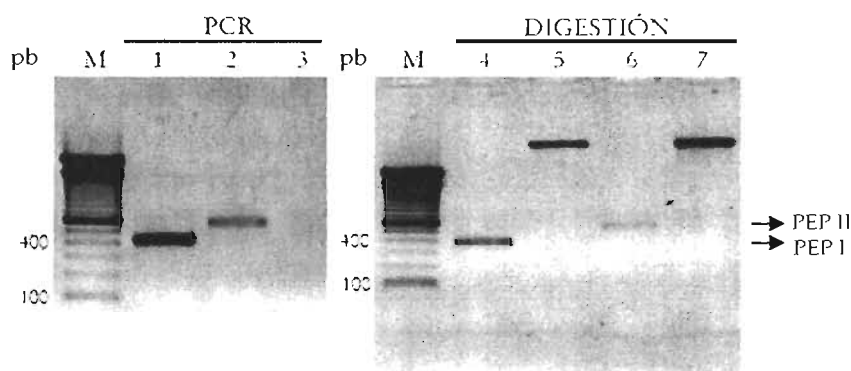
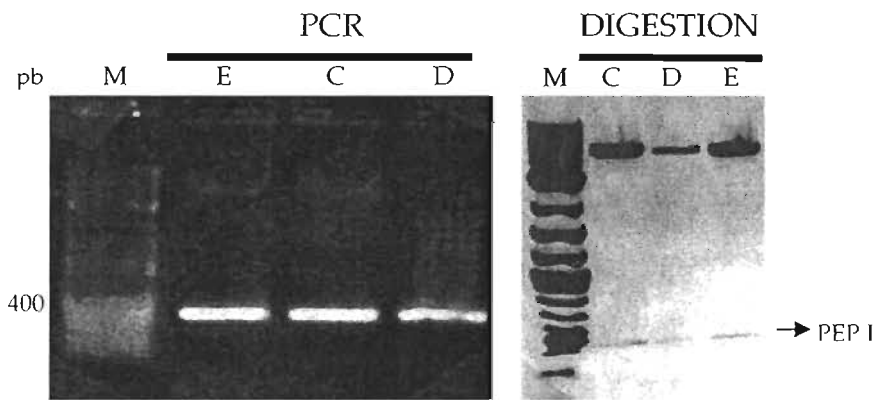


Figura 4. Separación electroforética en un gel de agarosa al 1.5%, de los productos de PCR de los ADNc *PEP I* y *PEP II*, y digeridos con enzimas de restricción *Bam*HI/*Eco*RI y *Bam*HI/*Sal*I, respectivamente. M, marcador 100 pb; carriles 1 y 2 producto de PCR del ADNc *PEP I* y ADNc *PEP II*; 3 control de amplificación ( $H_2O$ ); 4 y 5, *PEP I* y pGEX digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Eco*RI; 6 y 7, *PEP II* y pGEX digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*I.

Con el producto de la reacción de ligado se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y se aislaron varias colonias transformadas. Sólo las clonas pGEX\_I C, D y E de *PEP I* (Figura 5a) y la clona pGEX\_II C de *PEP II* (Figura 5b) fueron recombinantes. Esto fue comprobado por PCR y un análisis de restricción.

a) PEP I



b) PEP II

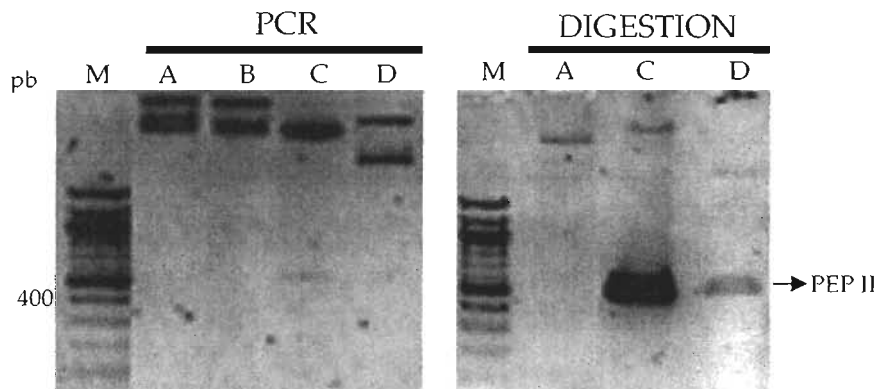


Figura 5. Análisis de las colonias transformadas con el vector pGEX recombinante. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR y digestiones para corroborar la presencia del ADNc *PEP I* en las colonias transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . b) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos PCR y digestiones para corroborar la presencia del ADNc *PEP II* en las colonias transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para a) y b) M, marcador de 100 pb; A, B, C, D y E corresponden a las clonas con el mismo nombre.

## 5.2 Análisis de las secuencias de los ADNc quiméricos de *PEP I* y *PEP II* con las secuencias originales

Antes de sobreexpresar los ADNc *PEP I* y *PEP II* provenientes de las clonas de DH5 $\alpha$ , fue necesario asegurarse que éstos no presentaran alguna inserción o deleción que pudieran alterar su marco de lectura y tener la certeza de que la proteína que se produjera fuera aquella que se deseaba. Para ello los plásmidos recombinantes se purificaron y secuenciaron.

Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple a nivel de nucleótidos con la secuencia original (Clustalw). Se encontró que las secuencias de las clonas C y E de PEP I y la clona C de PEP II no presentaban ninguna mutación y su marco de lectura era correcto (Figura 6).

**A**

```

ADNc PEP I      ATTGTCCTTCCCCTACTACTGATGATGACAACGATTTACCTGTACTTTC
pGEX PEP I C    GGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGACAACGATTTACCTGTACTTTC
pGEX PEP I E    GGATCCATGCCCACTACTACTGATGATGACAACGATTTACCTGTACTTTC
                BamHI M P T T T D D D N D L P V L S
ADNc PEP I      CGAAGTGCTAGACACAAACGGCAAACCGCTCCAGATTGGCGAAGAGTACC
pGEX PEP I C    CGAAGTGCTAGACACAAACGGCAAACCGCTCCAGATTGGCGAAGAGTACC
pGEX PEP I E    CGAAGTGCTAGACACAAACGGCAAACCGCTCCAGATTGGCGAAGAGTACC
                E V L D T N G K P L Q I G E E Y H
ADNc PEP I      ACATTATCTCCGCTAGCTGGAGAACCGGCGGCGGCGTATACTTAACCAAT
pGEX PEP I C    ACATTATCTCCGCTAGCTGGAGAACCGGCGGCGGCGTATACTTAACCAAT
pGEX PEP I E    ACATTATCTCCGCTAGCTGGAGAACCGGCGGCGGCGTATACTTAACCAAT
                I I S A S W R T G G G V Y L T N
ADNc PEP I      CTTACAAACACCAAATGTCCAACGACGTCGTCCAACACTGGGAAGGCTC
pGEX PEP I C    CTTACAAACACCAAATGTCCAACGACGTCGTCCAACACTGGGAAGGCTC
pGEX PEP I E    CTTACAAACACCAAATGTCCAACGACGTCGTCCAACACTGGGAAGGCTC
                L T N T K C P N D V V Q H W E G S
ADNc PEP I      CAAAGACGGCATGCCCGTGAAATTCTTTACGATGGACCCCGAGGTCGCAC
pGEX PEP I C    CAAAGACGGCATGCCCGTGAAATTCTTTACGATGGACCCCGAGGTCGCAC
pGEX PEP I E    CAAAGACGGCATGCCCGTGAAATTCTTTACGATGGACCCCGAGGTCGCAC
                K D G M P V K F F T M D P E V A P
ADNc PEP I      CTTCTAGTGTGCTACGTGAAACTAATGACATTAATATTATGTTCTCTGTT
pGEX PEP I C    CTTCTAGTGTGCTACGTGAAACTAATGACATTAATATTATGTTCTCTGTT
pGEX PEP I E    CTTCTAGTGTGCTACGTGAAACTAATGACATTAATATTATGTTCTCTGTT
                S S V V R E T N D I N I M F S V
ADNc PEP I      CCAACTACAAAACCTCTGTGTTAATGAAACTGTTTGGAAAGTTGGTGATCC
pGEX PEP I C    CCAACTACAAAACCTCTGTGTTAATGAAACTGTTTGGAAAGTTGGTGATCC
pGEX PEP I E    CCAACTACAAAACCTCTGTGTTAATGAAACTGTTTGGAAAGTTGGTGATCC
                P T T K L C V N E T V W K V G D P
ADNc PEP I      CGACTCAACAGAACAGGGGGTTAGGTTTGTGGTAACCGGTGGAACC
pGEX PEP I C    CGACTCAACAGAACAGGGGGTTAGGTTTGTGGTAACCTAGGAATTC
pGEX PEP I E    CGACTCAACAGAACAGGGGGTTAGGTTTGTGGTAACCTAGGAATTC
                D S T E Q G V R F V V T * EcoRI

```

**B**

```

ADNc PEP II     ATATCATTCAAATGCTACTCCAATTTCAAAACCCAACAACAATAATAACA
pGEX PEP II C   GGATC-----CATGGCTCCAATTTCAAAACCCAACAACAATAATAACA
                BamHI M A P I S K P N N N N N N
ADNc PEP II     ATAATGCCACCGCACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAA
pGEX PEP II C   ATAATGCCACCGCACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAA
                N A T A L L N K A C S R A S D K
ADNc PEP II     CCGTTTTGCATGAACTATCTCAAAGCAATCCAAAGGTTATGGCAGCTAC
pGEX PEP II C   CCGTTTTGCATGAACTATCTCAAAGCAATCCAAAGGTTATGGCAGCTAC
                P F C M N Y L K S N P K V M A A T
ADNc PEP II     AACATCAAAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAG
pGEX PEP II C   AACATCAAAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAG
                T S K P L D F G L A I I Q S G A D
ADNc PEP II     ACCAAGCAAAAATTACTCATTATTTTCGCAAACCCAAGGAACATAAA
pGEX PEP II C   ACCAAGCAAAAATTACTCATTATTTTCGCAAACCCAAGGAACATAAA
                Q A K I T H S Y F A K P K G T K

```

```

ADNc PEP II      CTCAGTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAAACCATTGGAG
pGEX PEP II C   CTCAGTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAAACCATTGGAG
                  L S P Q A I E A Y N K C K N H W S
ADNc PEP II      TGAGTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTGTCAAGAGTATAAGAGATCAAC
pGEX PEP II C   TGAGTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTGTCAAGAGTATAAGAGATCAAC
                  E L A S G L E W S V K S I R D Q Q
ADNc PEP II      AAGGCTATGCTTATGATACAACAGATTTTGAGCTTAAGGTGAATCTTGAC
pGEX PEP II C   AAGGCTATGCTTATGATACAACAGATTTTGAGCTTAAGGTGAATCTTGAC
                  G Y A Y D T T D F E L K V N L D
ADNc PEP II      AAAGCAGCCAGCTGTGGAACATTGTTAGAGTCGCTGCGAATTCATGATCC
pGEX PEP II C   AAAGCAGCCAGCTGTGGAACATTGTTAGAGTCGCTGCGAATTCATGATCC
                  K A A S C G T L L E S L R I H D P
ADNc PEP II      TGTATTTGCAGAAGCTAACAAAAAGGTGTCAGTGGCCGTAATGGGTGCAG
pGEX PEP II C   TGTATTTGCAGAAGCTAACAAAAAGGTGTCAGTGGCCGTAATGGGTGCAG
                  V F A E A N K K V S L A V M G A D
ADNc PEP II      ACGCCATTTTGGTTGATGTAAAGCCTCTAAAAAGCTGGACTAGTACTAA
pGEX PEP II C   ACGCCATTTTGGTTGATGTAAAGCCTCTAAAAAGCTGGACTAGTACTAA
                  A I L V D V K P P K K L D * SaII

```

Figura 6. Alineamiento múltiple de los ADNc provenientes de las clonas de *E. coli* DH5 $\alpha$  aisladas con la secuencia de nucleótidos del ADNc original. (A) Se muestra el alineamiento a nivel de nucleótidos de la clona C (pGEX PEP I C) y E (pGEX PEP I E) con el ADNc original de *PEP I*; se señalan los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Eco*RI. (B) Se muestra el alineamiento de la clona C (pGEX PEP II C) con el ADNc original de *PEP II*; se señalan los sitios de corte para las enzimas *Bam*HI y *Sa*II.

### 5.3 Sobreexpresión de los ADNc *PEP I* y *PEP II* en *E. coli* BL-21-codon-plus

Las proteínas *PEP I* y *PEP II* podrían ser purificadas directamente del tejido vegetal ya que por estudios previos se sabe que éstas se expresan únicamente en el pistilo. Sin embargo, para realizar los experimentos de caracterización es preciso reunir gran cantidad de material vegetal para obtener proteína nativa y pura en abundancia. La alternativa de esto fue sintetizarla en *Escherichia coli*. De esta bacteria se pueden preparar cultivos a gran escala, además de que se cuenta con una serie de cepas mutantes que presentan las características deseadas para la producción óptima de la proteína. En nuestro caso utilizamos la cepa BL21-codon-plus de *E. coli*, debido a que es deficiente en la producción de proteinasas (*OmpT* y *Lon*) que podrían dañar a la proteína quimérica. Además, contiene el gen *I* del bacteriófago T7 que codifica para la ARN polimerasa T7 bajo el control del promotor *lac* UV5, por lo que se puede inducir su expresión con IPTG. Esta cepa

también cuenta con dos plásmidos que codifican ARNt para codones raros en *E. coli* (arginina, isoleucina y leucina).

Una vez que se comprobó que las secuencias de ADN de las clonas de *PEP I* y *PEP II* en DH5 $\alpha$  no presentaban ninguna mutación, se eligieron las clonas pGEX\_I C y pGEX\_II C para aislar y purificar ADN plasmídico y con éste transformar células de *E. coli* BL21-codon-plus. De esta segunda transformación se aislaron dos clonas transformantes de PEP I, que fueron nombradas C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub> y cuatro de PEP II, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>. Las cuales liberan el ADNc correspondiente después de la digestión con enzimas de restricción (Figura 7).

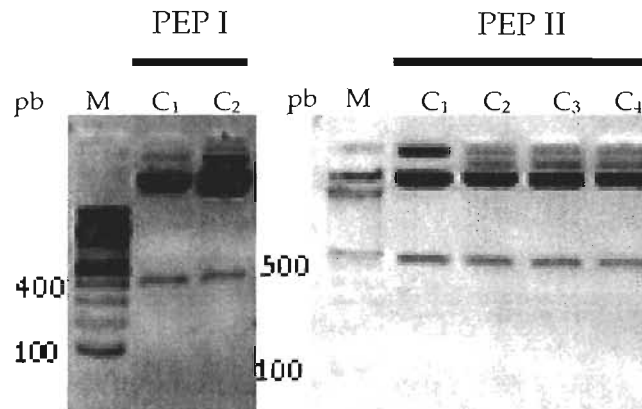


Figura 7. Corroboración de la presencia de los ADNc de *PEP I* y *PEP II* en las clonas transformadas de BL21. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.5% de los productos de digestión de los plásmidos recombinantes aislados de las clonas transformantes de PEP I y PEP II en BL21-codon-plus. M, marcador de 100 pb; C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub> corresponden a los nombres de las clonas analizadas.

Se eligieron las clonas pGEX\_I C<sub>1</sub> de PEP I y pGEX\_II C<sub>4</sub> de PEP II para inducir la expresión de los ADNc. En un primer análisis electroforético por SDS-PAGE de los extractos proteínicos totales, se observaron dos proteínas muy conspicuas que se inducían con IPTG una de ~39.5 kDa en el caso de PEP I (Figura 8A, carriles 3, 5 y 7) y una de ~45.1 kDa para PEP II (Figura 8B, carriles 3, 5 y 7), lo que correspondió con la masa molecular esperado en cada caso. Asimismo, en estas figuras, se observa que las proteínas de interés se acumularon en la fracción insoluble (Figura 8, carril 7).

De igual modo, se indujo la sobreexpresión de las clonas que contenían plásmido no recombinante y por lo tanto, solo expresaban a la proteína GST (Figura 8A, carriles 8 a 13 y Figura 8B carriles, 8 a 12). Los resultados mostraron que en las fases inducidas con IPTG se encontraba una proteína con un peso aproximado a los 30 kDa (Figura 8A carriles 11 y 13, y figura 8B, carriles 9 y 12). Además de que esta banda proteínica fue más conspicua que las demás, lo que indicó que posiblemente era la GST cuyo peso esperado era de 29 kDa. Al comparar los patrones de bandeado proteínico de esta clona con una no inducida (Figura 8, carriles 10) la banda correspondiente a la GST no se distinguía de las demás proteínas. Con estos resultados se demostró que la sobreexpresión se estaba llevando a cabo en las clonas inducidas con IPTG y que el método era eficiente.

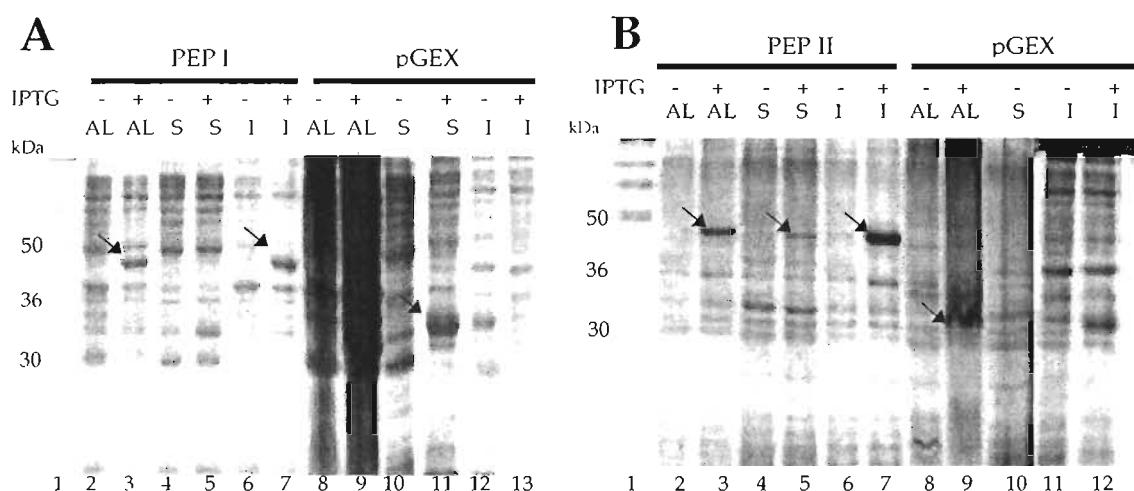


Figura 8. Análisis electroforético por SDS-PAGE de la sobreexpresión de los cADN *PEP I* y *PEP II*. Extractos de proteína total bacteriana fueron fraccionados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5% teñido con azul brillante de Coomassie. Las puntas de flecha indican la posición de la proteína que está siendo inducida. A, análisis de la sobreexpresión del ADNc *PEP I*; B, análisis de la sobreexpresión del ADNc *PEP II*; -, control de no inducción; +, inducción con IPTG; pGEX; control de inducción sobre el plásmido no recombinante; kDa, marcador de peso molecular; AL, control antes de lisar; S, fase soluble; I, fase insoluble.

Para asegurar la síntesis de las proteínas quiméricas de GST observadas en los geles teñidos con azul de Coomassie era correcta, se corroboraron los resultados por Western-blot (Figura 9). La inmunodetección se hizo utilizando

anticuerpos específicos contra la GST debido a que las proteínas de interés PEP I y PEP II, quedaron fusionadas al extremo carboxilo terminal de esta proteína. Los resultados confirmaron lo observado anteriormente: las proteínas que se estaban sobreexpresando efectivamente eran las proteínas de fusión ya que como se observa en la figura 9A (carriles 2, y 6), se detectó una proteína de aproximadamente 40 kDa, el peso esperado para la proteína de fusión GST-PEP I. Asimismo, en la figura 9B (carriles 2, 4 y 6), se detectó una proteína de aproximadamente 50 kDa una masa cercana al peso molecular esperado para la proteína de fusión GST-PEP II. Sin embargo, nuevamente se observa que ambas proteínas se estaban dirigiendo mayoritariamente a la fracción insoluble (Figura 9, carriles 6).

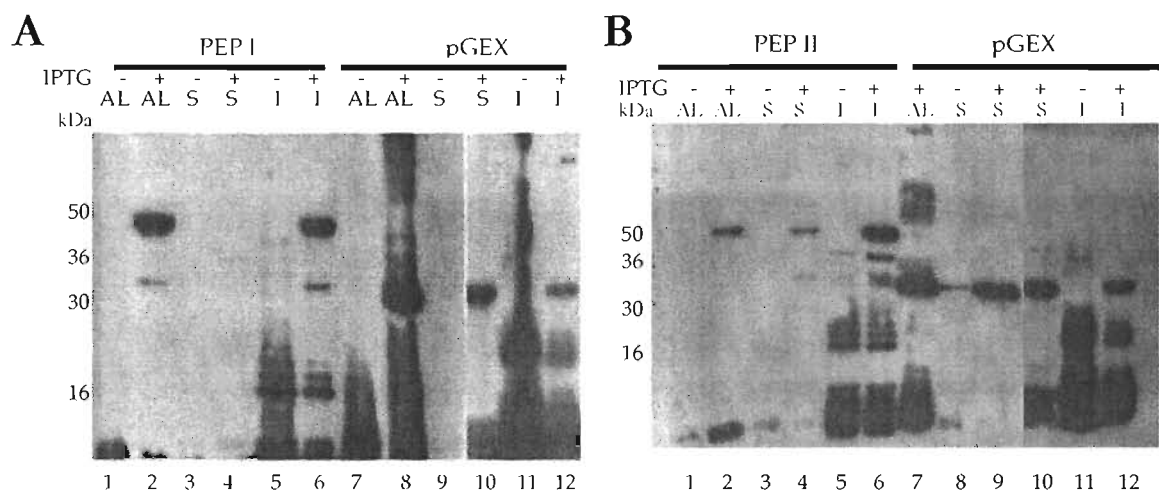


Figura 9. Análisis por Western-blot de la sobreexpresión de los ADNc de *PEP I* y *PEP II*. La inmunodetección se realizó con anticuerpos policlonales anti-GST. A) sobreexpresión del ADNc *PEP I*, B) sobreexpresión del ADNc *PEP II*. -, control de no inducción; +, clona inducida con IPTG; pGEX, control de inducción sobre plásmido no recombinante; AL, control antes de lisar; S, fracción soluble; I, fracción insoluble.

Por lo común, las proteínas producidas en *E. coli* se dirigen a la fracción soluble de la bacteria y pueden ser purificadas a partir de un lisado celular; sin embargo, la expresión de genes ajenos a *E. coli* frecuentemente conduce a la agregación de las proteínas formando estructuras conocidas como cuerpos de

inclusión (Tsumoto *et al.*, 2003), siendo este caso el de las proteínas PEP I y PEP II, ya que en los resultados mostrados en la figura 7 se ve claramente que ambas proteínas se dirigen mayoritariamente a la fracción insoluble. Una explicación acerca de la formación de los cuerpos de inclusión es que la mayor parte de las proteínas no bacterianas (recombinantes) producidas son incapaces de alcanzar la conformación nativa, especialmente a altas velocidades de transcripción (Villaverde y Mar, 2003). Estas proteínas parcialmente plegadas presentan regiones hidrofóbicas expuestas lo que provoca una interacción intermolecular promoviendo la formación de los cuerpos de inclusión (Villaverde y Mar, 2003). La agregación de las proteínas en cuerpos de inclusión puede minimizarse controlando parámetros como la temperatura, la velocidad de expresión, etc. Sin embargo, estas estrategias no resultan en el mismo grado de éxito para diferentes polipéptidos y consecuentemente, la producción de proteínas solubles resulta de un proceso de prueba y error.

Ante esta situación se presentaban dos opciones: 1) optimizar condiciones para tratar que las proteínas permanecieran en la fracción soluble, modificando diferentes parámetros y 2) aceptar la formación de los cuerpos de inclusión y desarrollar estrategias para solubilizarlos, renaturalizar a las proteínas y obtenerlas correctamente plegadas.

Con el objetivo de determinar cuál de estas opciones era la más conveniente para alcanzar el mayor rendimiento en cuanto a proteína pura y activa se desarrolló la metodología necesaria para ambos casos.

#### **5.4 Optimización de las condiciones de sobreexpresión**

Se inició con la optimización de las condiciones para dirigir a la proteína recombinante a la fracción soluble. Los parámetros que se modificaron fueron la



temperatura y el nivel de aireación. Se recomienda bajar la temperatura de crecimiento dentro de un rango de 20 a 30°C e incrementar la aireación. Se venía trabajando con una temperatura de 37°C, por lo que se decidió bajar la temperatura a 28°C y aumentar el nivel de aireación. Con estas condiciones se esperaba que la proteína recombinante se dirigiera a la fracción soluble; sin embargo, como se observa en la figura 10 (A y B, carriles 3, 5, 7 y 9) la mayor parte de la proteína seguía en la fracción insoluble.

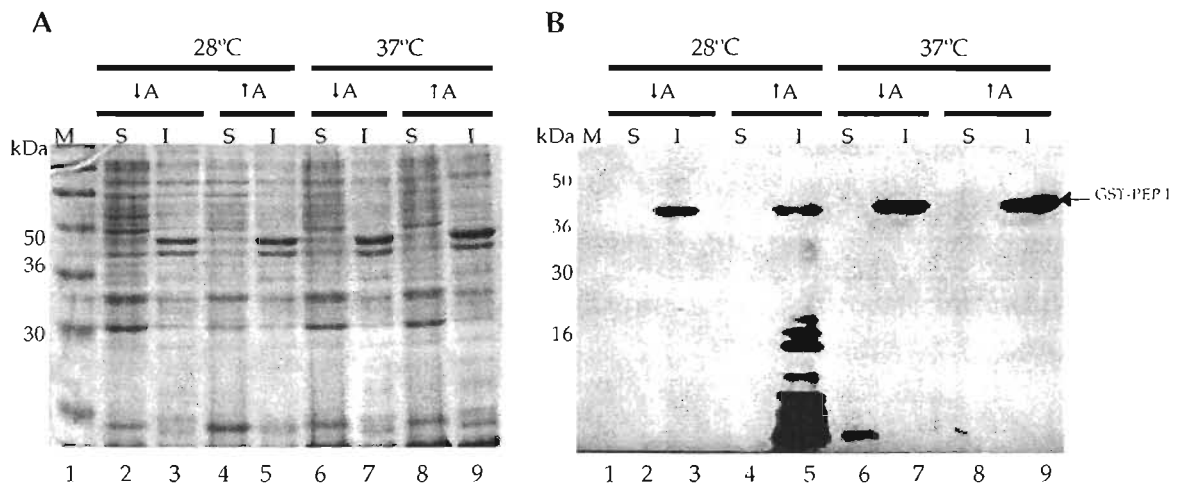


Figura 10. Análisis electroforético por SDS-PAGE de las fracciones proteicas soluble e insoluble después de la sobreexpresión a diferentes condiciones de temperatura y aireación, en donde se observa que la proteína de fusión se dirigió mayoritariamente a la fracción insoluble (I). ↓A, nivel de aireación normal; ↑A, nivel de aireación alto; S, fracción soluble de extractos proteínicos totales; I, fracción insoluble de extractos proteínicos totales; M, marcadores de peso molecular en kDa. A, tinción con azul brillante de Coomasie. B, Inmunodetección de la proteína GST fusionada a PEP I.

Durante el crecimiento del cultivo bacteriano además de la proteína recombinante se están produciendo otras proteínas propias de *E. coli*. Para que estas sean funcionales deben ser correctamente plegadas, con la ayuda de proteínas chaperonas (Villaverde y Mar, 2003). La proteína recombinante también necesita de las proteínas chaperonas que la ayuden a plegarse correctamente. Sin embargo, parece que las chaperonas enfocan su actividad a las proteínas propias de la célula dejando a un lado a la proteína recombinante que no alcanza a plegarse totalmente y forma cuerpos de inclusión. La glucosa es un metabolito que actúa como represor

catabólico sobre algunas proteínas propias de las células, por lo que al no producirse en gran cantidad las chaperonas quedan libres y pueden asistir a la proteína recombinante a plegarse correctamente y que no haya intermediarios parcialmente plegados que se agreguen y formen cuerpos de inclusión. Además, se agregó etanol al medio para impedir interacciones hidrofóbicas.

Los resultados presentados en la figura 11, indican que este tratamiento tampoco repercutió en la formación de los cuerpos de inclusión, pues al comparar el carril 5, que representa un control en donde la sobreexpresión se llevo a cabo con altos niveles de aireación pero sin agregar glucosa ni etanol; con el carril 11 donde se aplicó la fracción insoluble de la sobreexpresión en presencia de glucosa y etanol se observa una señal de la misma intensidad. Lo esperado era una banda proteínica más intensa en la muestra tratada con glucosa y etanol, en la fracción soluble.

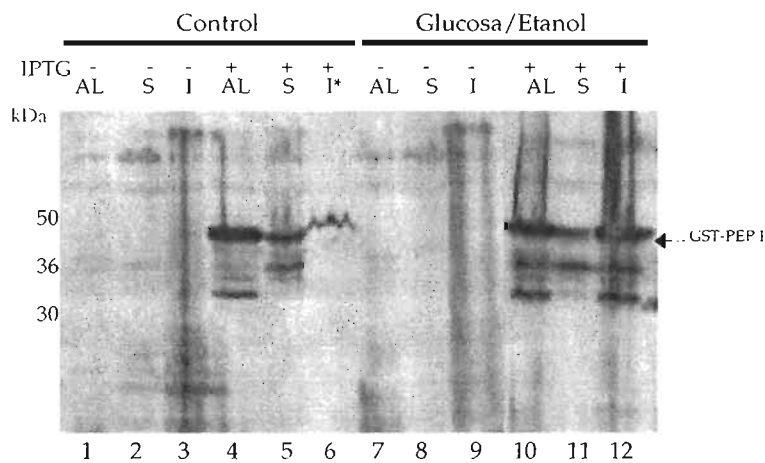


Figura 11. Análisis por Western-blot de la proteína recombinante GST-PEP I, en donde la sobreexpresión se realizó en presencia de glucosa y etanol. Control que representa a la sobreexpresión en ausencia de etanol y glucosa; Glucosa/Etanol, sobreexpresión en presencia de glucosa y etanol. AL, fracción antes de lisar; S, fracción soluble de extractos proteínicos totales; I fracción insoluble; - Control negativo de inducción. + Clona tratada con IPTG para llevar a cabo la sobreexpresión. kDa; marcadores de peso molecular. I\*, esta fracción fue tratada con el detergente CTAB para solubilizar los cuerpos de inclusión. La membrana con la proteína se incubó con anti-GST a una dilución de 1:2000.

Con los resultados obtenidos se decidió que la sobreexpresión se debe llevar a cabo a 37°C con un alto grado de aireación y que no es necesario agregar las

moléculas aditivas, etanol y glucosa y que en estas condiciones obtenemos un rendimiento mayor de proteína recombinante en la fracción soluble.

## 5.5 Solubilización de los cuerpos de inclusión

La segunda opción fue aceptar la formación de los cuerpos de inclusión y a partir de ellos purificar la proteína de fusión. El trabajar con cuerpos de inclusión presenta ciertas ventajas, una de ellas es que pueden ser purificados con muy pocos contaminantes y pueden ser usados directamente como antígenos, además de que la proteína se encuentra protegida de la proteólisis. La desventaja más importante es que se requieren más pasos para obtener una proteína con una conformación nativa correcta (Vallejo y Rinas, 2002). La estrategia general para recuperar a las proteínas incluye tres pasos consecutivos: 1) aislamiento y lavado de los cuerpos de inclusión, 2) solubilización de las proteínas agregadas y 3) replegamiento de las proteínas solubles. Siendo el tercer paso el más crítico, pues el plegamiento de las proteínas no es un procedimiento fácil y requiere de optimización para proteínas específicas. Este paso también es determinante para la eficiencia completa del proceso (Villaverde y Mar, 2003).

La elección de la solubilización de los cuerpos de inclusión va a depender de para que va a ser utilizada la proteína. Debido a que requeríamos una proteína biológicamente activa, no se podían utilizar agentes que la alteraran químicamente, o que intervinieran en el plegamiento. Así que se decidió utilizar un detergente, el CTAB (Puri *et al.*, 1993), para interrumpir las interacciones hidrofóbicas en los cuerpos de inclusión y por lo tanto solubilizarlos sin alterar químicamente a la proteína. Además para iniciar la renaturalización de la proteína solo se necesita removerlo. Para remover el CTAB se puede utilizar cualquier método que lo diluya. Además, de que el decremento de éste no debía ser muy lento pues podía

provocar que varias proteínas estuvieran parcialmente plegadas y nuevamente se agregaran.

Para optimizar las condiciones de solubilización se trabajó únicamente con la fracción insoluble de PEP I. Para retirar el detergente se utilizaron columnas filtración molecular que sirven como primer paso de desalado y se colectaron fracciones de 1 mL (8 fracciones en total). Con la finalidad de recuperar la mayor cantidad de proteína estas fracciones se juntaron y concentraron con un filtro Amicon-Ultra (10000 Da, de exclusión). Esta muestra fue analizada por Western-blot y anti-GST. Estos resultados se muestran en el carril 6 de la figura 11, que corresponde a las proteínas provenientes de la fracción insoluble tratada con CTAB. La inmunodetección evidenció una proteína con un peso molecular aproximado de 40 kDa, el esperado para la proteína de fusión GST-PEP I.

Debido a que las proteínas PEP I y PEP II quedaron fusionadas a la proteína GST se pudieron purificar por cromatografía de afinidad con la resina glutatión-sefarosa. Esta resina tiene unido covalentemente al glutatión oxidado y la GST tiene gran afinidad hacia él. Así la proteína recombinante se une específicamente a la resina a través de la GST, y es eluída al agregar glutatión reducido que desplaza a la proteína recombinante. Los resultados del análisis electroforético (no mostrados) indicaron que la proteína de fusión no se unió a la glutatión sefarosa posiblemente por la influencia del CTAB. Es por ello que se decidió dializar la muestra antes de aplicarla a la glutatión sefarosa.

El experimento se repitió, pero esta vez además de pasar la muestra por la columna de filtración molecular, fue sometida a diálisis contra PBS por aproximadamente 20 horas para eliminar el CTAB. Sin embargo, la proteína de fusión no recupera su conformación nativa lo que provocó que no pudiera unirse a la glutatión sefarosa para su purificación (Resultados no mostrados).

## 5.6 Purificación de la proteína de fusión utilizando la fase soluble del extracto proteínico

Debido a que no se tuvo éxito al tratar de renaturalizar a la proteína de fusión lo que hizo imposible su purificación, se decidió purificar a las proteínas a partir de lo recuperado en la fase soluble del extracto proteínico (Figura 12). A pesar de que se creía que era muy poca la proteína de fusión GST-PEP I presente en la fracción soluble, al analizar los resultados de la purificación (Figura 12A) se encontró que ésta se estaba uniendo de manera específica a la resina de glutatión sefarosa. En comparación, la proteína de fusión GST-PEP II es más abundante en dicha fracción, como se puede observar en la figura 12B; se encontró proteína en todos los eluatos. Se detectó proteína en el carril en donde se cargó el eluato que contiene todo aquello que no se une a la columna por que seguramente la resina se saturó y la proteína no pudo pegarse.

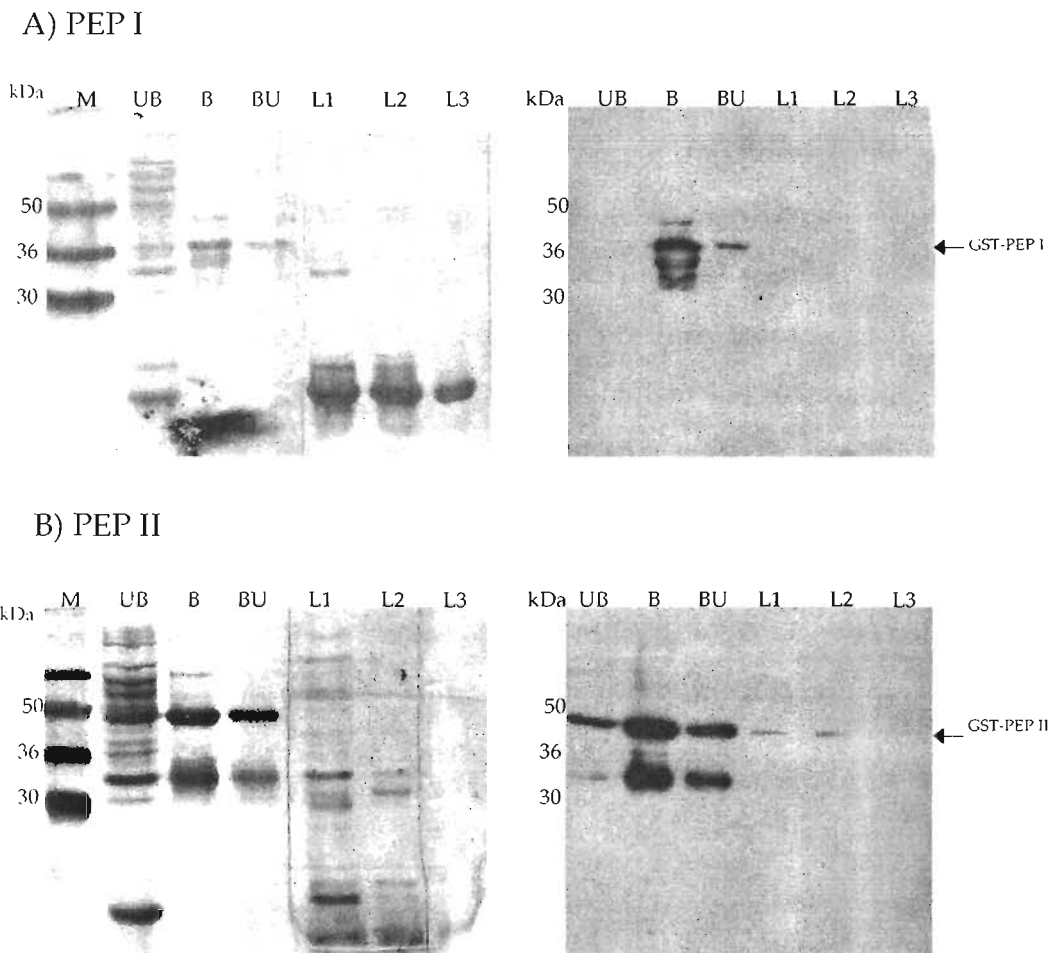


Figura 12. Purificación de las proteínas de fusión GST-PEP I y GST-PEP II utilizando glutatión sefarosa. Se muestra el análisis electroforético por SDS-PAGE al 12.5% de las diferentes las diferentes fracciones de purificación además del análisis por Western-blot contra la proteína GST. A) GST-PEP I y B) GST-PEP II. M; marcadores de peso molecular en kDa; UB, todo aquello que no se pegó a la resina; B, lo que se pegó en la resina y fue eluido con glutatión reducido; BU, segunda elusión con glutatión reducido; L1, L2 y L3, lavados realizados con PBS 1X.

## 5.7 Inmunoanálisis de la proteína recombinante GST-PEP I purificada

Debido a la baja recuperación de PEP I recombinante para ser usada como antígeno y producir anticuerpos policlonaes contra ésta, se optó por sintetizar un peptido contenido en la proteína PEP I y usarlo como antígeno acoplado a BSA y producir anticuerpos monoespecíficos policlonaes, y utilizar a la proteína PEP I recombinante para validarlos. Una vez titulados los sueros anti-PEP I fue necesario saber si éste incluye anticuerpos que reconocen a la proteína PEP I Este

experimento fue crucial ya que si el suero anti-PEP I reconocía específicamente a PEP I recombinante, se podía tener la certeza de que la proteína inmunodetectada con el suero anti-PEP I, en extractos de proteína total de *N. alata*. Para ello se utilizaron los diferentes eluatos obtenidos de la purificación de la proteína de fusión GST-PEP I por medio de la glutatión sefarosa. En los resultados del análisis por Western-blot utilizando el suero anti-PEP I 15685 a una dilución 1:10000 (Figura 13B), se observó que el anticuerpo estaba reconociendo a una proteína entre los marcadores de peso molecular de 36 y 50 kDa, el esperado para la proteína de fusión era de ~40kDa, esta proteína estaba presente en la fracción que corresponde a las proteínas de unión a la resina de glutatión sefarosa (Carril B de la figura 13B), por lo que era muy probable que fuera la proteína de fusión GST-PEP I. Al comparar estos resultados con un Western-blot realizado con anticuerpos policlonales anti-GST (1:2000) (Figura 13A), se observó que las proteínas reconocidas por este anticuerpo presentaban la misma masa molecular que las que eran reconocidas por el anticuerpo anti-PEP I. Con estos resultados se pudo asegurar que el anticuerpo anti-PEP I reconocía específicamente a esta proteína y que *E. coli* estaba produciendo efectivamente a PEP I fusionada a GST.

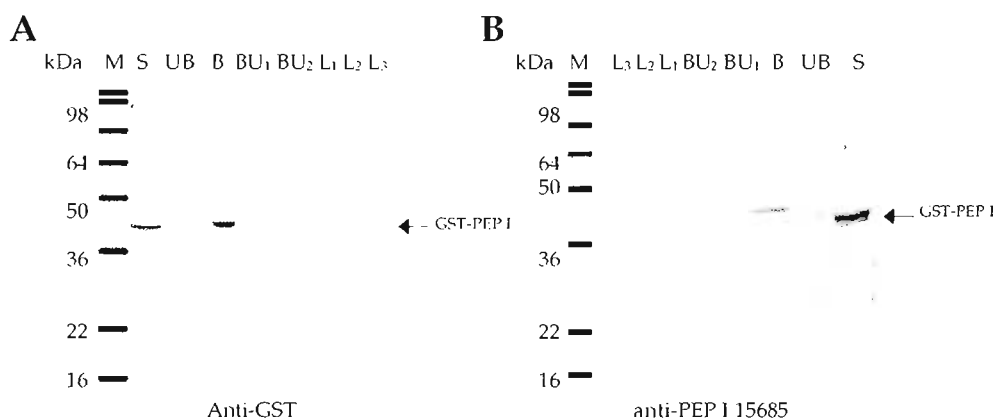


Figura 13. El anticuerpo anti-PEP I reconoce a la proteína de fusión. Inmunodetección de la proteína quimérica GST-PEP I utilizando diferentes anticuerpos. A) Western-blot utilizando anticuerpos anti-GST (1:2000). B) Western-blot utilizando el suero del conejo 15686. C) Inmunodetección realizada utilizando el suero del conejo 15685. En los tres casos M, marcador de peso molecular en kDa; S, fracción soluble de extractos proteínicos de cultivos bacterianos; UB, fracción no unida a la resina de glutatión sefarosa; B, fracción unida a la glutatión sefarosa; BU<sub>1-2</sub>, lavados después de eluir con glutatión reducido; L<sub>1-3</sub>, lavados con PBS1X.

## 5.8 Inmunoanálisis de la proteína PEP I en extractos de proteína total

Una vez que se comprobó que los anticuerpos del suero 15685 reconocían específicamente a la proteína PEP I, se evaluó la expresión de esta proteína en diferentes órganos de *N. alata* BT. Estos resultados se muestran en la figura 14, en donde se observa que los anticuerpos anti-PEP I detectan a una proteína de alrededor de 25kDa presente sólo en el extracto proteínico del estigma-estilo. Esta banda proteínica se ubica entre los marcadores de peso molecular de 22 y 36 kDa, esperado para PEP I. Con esto se comprobó que también el nivel de proteína PEP I es específica del estilo-estigma, ya que no fue inmunodetectada en ningún otro órgano.

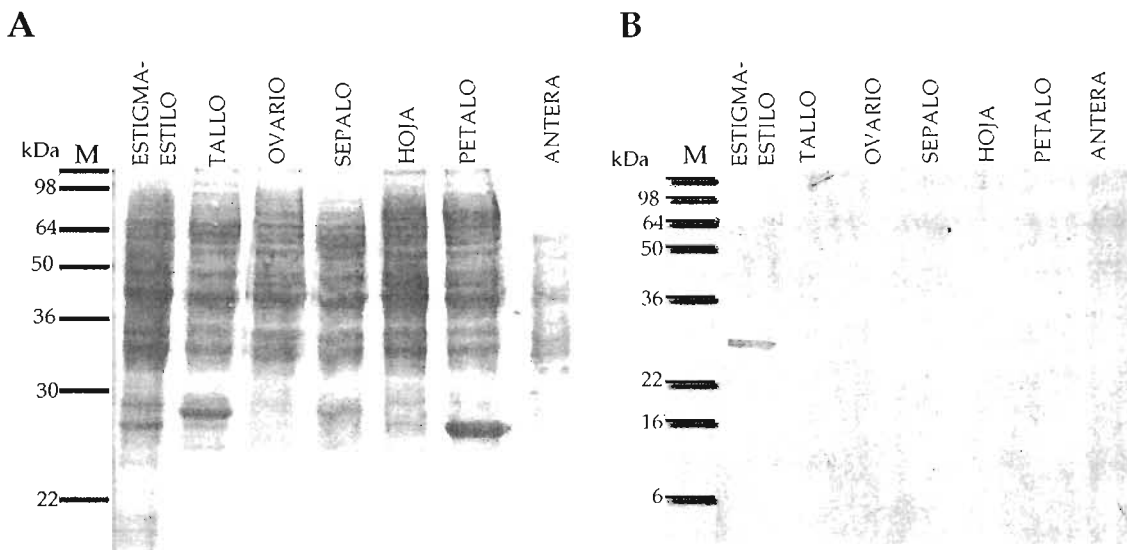


Figura 14. Evaluación de la expresión de la proteína PEP I en diferentes órganos de *N. alata* BT. A) gel teñido con azul brillante de Coomassie que sirve como control de cargado. B) inmunolocalización de la proteína PEP I en los diferentes órganos de *N. alata* BT utilizando el suero del conejo 15685 a una dilución 1:10000. En cada caso se cargaron 10  $\mu$ g proteína/carril. En ambos casos M y kDa marcador de peso molecular.

Los datos previos en el laboratorio también indicaban que a nivel de transcrito *PEP I* se expresaba en plantas autoincompatibles y no en las autocompatibles, pero no se sabía si esto ocurría con la proteína, también en este estudio se incluyeron más especies AC de *Nicotiana*, evaluando extractos



proteínicos de sus estilos-estigmas. Los resultados mostraron que efectivamente PEP I sólo estaba presente en especies AI ya que se inmunodetectaron proteínas con pesos moleculares entre los marcadores de 22 y 36 kDa, esperado para la proteína PEP I (Figura 15B del carril 1 al 7). En cambio, en los extractos proteínicos de las especies AC, el anticuerpo no reaccionó con ninguna proteína (Figura 15B, carriles 10 a 13). También se evaluó la expresión de esta proteína en dos híbridos *N. alata* 110-18 (AI) x *N. plumbaginifolia* (AC) y *N. alata* 3-20 (AI) x *N. plumbaginifolia* (AC). *N. plumbaginifolia* por sí sola es una especie AC por faltarle muchos factores necesarios para la respuesta de AI, pero al cruzarse con plantas AI los híbridos resultantes heredan todos los factores necesarios para la respuesta de AI y por eso son AI. Como se pudo observar en los resultados, la proteína PEP I está presente en ambos híbridos (Figura 15B, carriles 8 y 9) y no en *N. plumbaginifolia* AC por lo que se puede asegurar que en ambos casos, PEP I fue heredado de *N. alata*. Por otra parte, es probable que las diferentes proteínas que detecta el suero anti-PEP I, se debe a isoformas de PEP I con diferentes grados de glicosilación, ya que en la secuencia primaria de PEP I se predicen sitios de glicosilación.

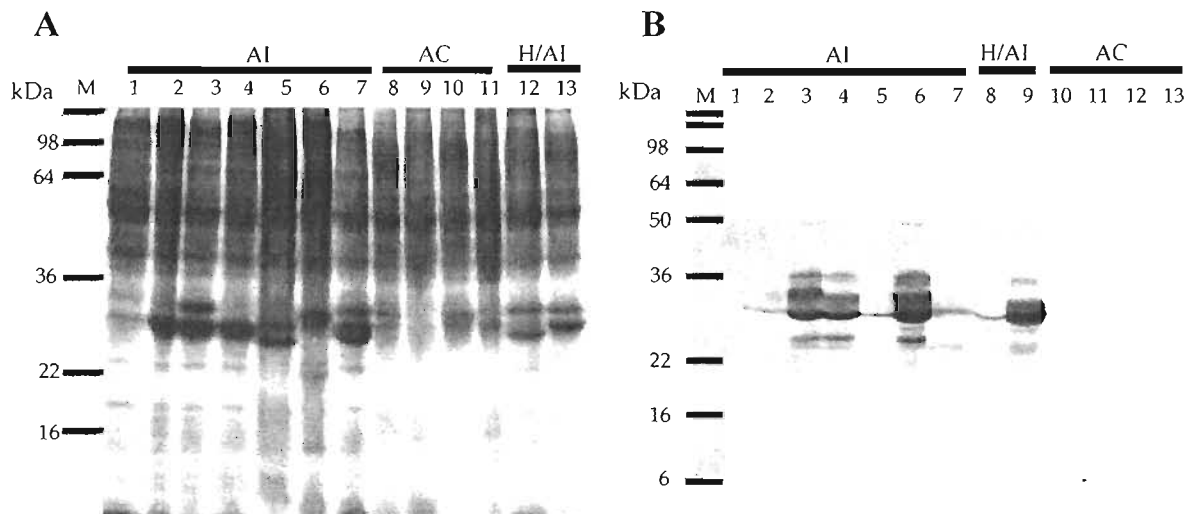


Figura 15. Evaluación de la expresión de la proteína PEP I en los estigma-estilo de diferentes especies de *Nicotiana*. En A: Gel de poliacrilamida al 12.5% teñido con azul brillante de Coomassie que sirve como control de cargado, 1) *N. alata* BT, 2) *N. alata* 110-18, 3) *N. alata* 18AI, 4) *N. alata* 1-2, 5) *N. forgetiana*, 6) *N. bonariensis*, 7) *N. alata* 3AC, 8) *N. plumbaginifolia*, 9) *N. tabacum*, 10) *N. longiflora*, 11) *N. glauca*, 12) Híbrido [*N. alata* 3-20 x *N. plumbaginifolia*], 13) Híbrido [*N. alata* 110-18 x *N. plumbaginifolia*]. En B: Inmunodetección de la proteína PEP I utilizando el suero 15685 a una dilución 1:10000; 1) *N. bonariensis*, 2) *N. forgetiana*, 3) *N. alata* 1-2, 4) *N. alata* 18AI, 5) *N. alata* 110-18, 6) *N. alata* 3AC, 7) *N. alata* BT, 8) Híbrido [*N. alata* 110-18 x *N. plumbaginifolia*], 9) Híbrido [*N. alata* 3-20 x *N. plumbaginifolia*], 10) *N. plumbaginifolia*, 11) *N. tabacum*, 12) *N. longiflora*, 13) *N. glauca*. En ambos casos se cargaron 10  $\mu$ g de proteína por carril y la dilución utilizada del suero fue de 1:10000. M, marcador de pesos moleculares en kDa.

## 6 DISCUSIÓN

El mecanismo de autoincompatibilidad ha sido ampliamente estudiado por muchos autores y se ha encontrado que la determinante femenina es una proteína con actividad de ribonucleasa, llamada S-RNasa, y que esta actividad es necesaria para llevar a cabo el rechazo del polen alelo-S-específica (McClure et al., 1989; McCubbin y Kao, 1996). Recientemente se ha descubierto que la determinante masculina es una gen que codifica a una proteína con caja F, llamada SLF (Sijacic et al., 2004). La interacción entre ambas determinantes es crucial para que se lleve a cabo el rechazo del polen en las cruzas autoincompatibles. Además, se ha reportado que se necesitan otros factores estilares, codificados por los genes conocidos como genes modificadores (GM), para que la reacción del rechazo del polen ocurra apropiadamente. En *Nicotiana alata* se han reportado solo dos GM que participan directamente en el rechazo del polen S-específico: HT-B y 120K (McClure et al., 1999; Hancock et al., 2005). El mecanismo molecular de acción de estos factores aun no ha sido completamente establecido. A pesar de la identificación de estos GM, el mecanismo de rechazo del polen es muy complejo y los estudios genéticos predicen la participación de otros factores estilares no ligados al locus S.

En nuestro laboratorio nos hemos dado a la tarea de estudiar los componentes ya conocidos como HT-B, 120K, NaTTS y la misma S-RNasa, tratando establecer el mecanismo molecular de cómo estas proteínas actúan en las cruzas compatibles e incompatibles. Aunado a esto, también nos hemos dado a la búsqueda de otros GM estilares y del polen involucrados en el mecanismo de autoincompatibilidad.

En este contexto, utilizando técnicas de hibridación sustractiva encontramos dos genes que pudieran estar involucrados en este mecanismo. Estos dos genes

fueron llamados *PEP I* y *PEP II* que codifican para proteínas expresadas exclusivamente en el pistilo, según el análisis de transcritos (ARNm). El transcrito de *PEP II* es detectado en un estado temprano del desarrollo del estigma (2 a 3.5 cm) y su expresión se incrementa gradualmente durante el desarrollo hasta la antesis. El transcrito de *PEP I* se expresa específicamente en el estigma maduro. De manera interesante, se encontró que el ARNm de *PEP I* parece tener una expresión exclusiva de especies AC. Sin embargo, esta información se limita a nivel de transcrito, desconociéndose si estos patrones de expresión se mantienen a nivel de proteína. Para resolver lo anterior, es necesario obtener anticuerpos policlonales específicos que permitan comprobar la conducta de sus transcritos, así como comprobar que estas proteínas se encuentran en el tejido de transmisión al igual que HT-B, 120K, NaTTS (Cheung *et al.*, 2001), sitio por donde se dirige el tubo polínico al ovario.

Para obtener los anticuerpos específicos contra las proteínas *PEP I* y *PEP II* y evaluar su actividad enzimática, es necesario aislar a la proteína pura. El objetivo de esta investigación fue precisamente éste, obtener a las proteínas *PEP I* y *PEP II* puras. Para cumplir este objetivo, se sintetizó en un sistema heterólogo a las proteínas *PEP I* y *PEP II* como proteínas quiméricas fusionadas a la proteína GST. La importancia de tener a *PEP I* y *PEP II* como proteínas de fusión es que se cuenta con todos los materiales y métodos necesarios para la purificación de la proteína GST, y al estar ésta unida a las proteínas de interés por consecuencia también se pueden purificar. Inicialmente purificar a una proteína de fusión es fácil cuando a ésta se le encuentra en la fracción soluble de extractos proteínicos bacterianos. Sin embargo, muchas veces las proteínas quiméricas se agregan y forman cuerpos de inclusión (Tsumoto *et al.*, 2003). Este fue precisamente el caso de las proteínas de fusión GST-*PEP I* y GST-*PEP II*. Para ello se montó un protocolo de purificación para obtener proteínas nativas apropiadamente plegadas y con actividad biológica completa. Estas técnicas están en constante desarrollo y cada proteína puede ser

tratada de forma diferente para obtener mejores resultados (Villaverde y Mar, 2003). A pesar de que se cree que intentar prevenir la agregación de las proteínas resulta en general en un fracaso y que es preferible obtenerlas a partir de los cuerpos de inclusión (Villaverde y Mar, 2003), en nuestro caso fue la mejor opción. Inicialmente se intentó dirigir a las proteínas de fusión a la fracción soluble modificando parámetros tales como la temperatura y el nivel de aireación; sin embargo, los resultados obtenidos no fueron completamente satisfactorios, ya que lo que se esperaba era lograr que la proteína en su totalidad se solubilizara y se acumulara en la fracción soluble. Solo una parte de la proteína se dirigía a la fracción soluble cuando se aumentaba considerablemente la aireación. La acumulación en la fracción insoluble se puede atribuir a que los cuerpos de inclusión son estructuras dinámicas que se forman por un desbalance en el equilibrio entre proteínas formando cuerpos de inclusión y proteínas solubles (Villaverde y Mar, 2003). En este tipo de experimentos en donde se da la sobreexpresión de proteínas, la velocidad de la síntesis es muy alta lo que provoca una acumulación de proteínas parcialmente plegadas, que desplazan el equilibrio hacia los cuerpos de inclusión (Mar y Villaverde, 2001).

Posteriormente con el fin de obtener mayor cantidad de proteína soluble, se decidió solubilizar los cuerpos de inclusión. A pesar de que esta opción es recomendada por muchos autores (Villaverde y Mar, 2003; Tsumoto *et al.*, 2003; Puri *et al.*, 1993; Nygaard y Harlow, 2001), en nuestro caso no nos resultó. Villaverde y Mar (2003) recomiendan que para solubilizar a los cuerpos de inclusión se debe utilizar un agente químico que no dañe la estructura química de la proteína y recomienda el uso de detergentes como el SDS y el CTAB. Este último también es recomendado por Puri *et al.* (1993), por lo que se decidió utilizarlo. Para renaturalizar a las proteínas únicamente debe retirarse el detergente por diálisis (Villaverde y Mar 2003); sin embargo, a pesar de haber dializado los extractos no pudimos recuperar la proteína de fusión por cromatografía de afinidad a glutatión-

sefarosa. Esto se lo atribuimos a la desnaturalización de la proteína quimérica durante el proceso de disolución de los cuerpos de inclusión. Esto pudiera deberse a que la proteína ya no recupero su plegamiento nativo después del tratamiento a pesar de haber removido el detergente o que la diálisis no remueve completamente al detergente y por ende la proteína quimérica no se pliega correctamente.

Dados los problemas para recuperar una cantidad importante de proteína PEP I recombinante para utilizarla como antígeno e inducir la producción de anticuerpos policlonales, se optó por sintetizar un péptido diseñado a partir de la secuencia de la proteína PEP I. Este péptido fue acoplado a BSA e inyectado a un conejo para producir anticuerpos policlonales mono-específicos. La especificidad y capacidad del anticuerpo de reconocer a PEP I como antígeno fueron determinadas evaluando su capacidad de reaccionar con la proteína recombinante GST-PEP I. Efectivamente el anti-PEP I reconoció específicamente a la proteína de fusión (Figura 13). Con estos anticuerpos se corroboraron los resultados obtenidos anteriormente a nivel de transcrito sobre la expresión específica del gen de *PEP I* en pistilos. Los resultados obtenidos por inmunodetección mostraron que efectivamente la proteína PEP I únicamente está presente en el estilo-estigma (Figura 14) y que no se encuentra en ningún otro órgano y además de que sólo está presente en las especies incompatibles evaluadas (Figura 15).

El hecho de que PEP I únicamente se exprese en especies AI lo hace particularmente interesante, ya que a la fecha no se han identificado genes involucrados en la respuesta de incompatibilidad interespecífica (IIE). La IIE ha sido definida como "alguna respuesta después de la llegada del polen al estigma, la cual previene, a través de la ausencia de germinación del polen o un comportamiento anormal de los tubos polínicos, la formación de cigotos híbridos combinando los genomas de dos especies fértiles o ecotipos fértiles" (McClure *et al.*, 2000). En la IIE se sigue la regla SC x SI propuesta por Lewis y Crowe (1958) en

donde el polen proveniente de una especie AC es rechazado por especies AI pero la polinización recíproca es compatible (McClure *et al.*, 2000).

En un estudio muy completo Murfett *et al.* (1996) establecieron que en la IIE el locus S tiene una participación importante en el rechazo del polen a través de las S-RNasas. Sin embargo, en este mismo estudio se demuestra que además del locus S, existen otros genes independientes a las S-RNasas, que están evitando las cruzas interespecíficas. Un ejemplo es el caso de *N. alata* BT, que presenta el entorno genético del rechazo del polen, pero que no expresa S-RNasas y por ende es autocompatible. En este experimento se hicieron cruzas entre *N. alata* BT (♀) y *N. tabacum* (♂), resultando en el rechazo del polen de *N. tabacum*. Sin embargo, la cruce recíproca funciona correctamente formando semillas (Murfett *et al.*, 1996). En un estudio más avanzado en nuestro laboratorio, se ha encontrado que en este mecanismo especie-específico del rechazo del polen, los estilos de *N. alata* BT inhiben el crecimiento del polen de *N. tabacum* en el primer tercio. Debido a que estas especies no producen S-RNasas, es evidente, que otros factores diferentes a las S-RNasas están involucrados. De esta manera, dadas las características de expresión de PEP I, como su especificidad en el estilo de especies AI, se propone ésta como un buen candidato para ser uno de estos factores, que controlan la polinización especie-específica. No obstante, su función en este proceso debe ser constatado en plantas transgénicas de *N. alata* BT donde PEP I esté silenciado, una investigación que se está llevando a cabo en nuestro laboratorio.

¿Cómo podría participar PEP I en el rechazo del polen en cruzas interespecíficas?

En un análisis a nivel de nucleótidos (Clustalw) se encontró que el ADNc de PEP I presenta homología con los inhibidores de tripsina de tipo Kunitz (NCBI/GenBank). Estos inhibidores de proteasas se han implicado en la defensa de las plantas ante los patógenos (Atkinson *et al.*, 1993). De manera interesante se ha reportado que un gran número de proteínas relacionadas con esta función han

sido aisladas de pistilos (Atkinson *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 1992; Milligan y Gasser, 1995). Partiendo de estos dos hechos y de la propuesta de que la respuesta de incompatibilidad se ha relacionado evolutivamente con el mecanismo de interacción planta-patógeno, se podría especular que estas proteínas estarían involucradas en el reconocimiento célula-célula, ya que tanto el proceso de interacción planta-patógeno y el de reconocimiento del polen, suponen estos reconocimientos (Dickinson, 1994). En ambos casos, una célula elongada (tubo polínico) emerge de una estructura parecida a una espora (grano de polen o espora fúngica) en la superficie de una planta hospedera y penetra por crecimiento dentro o entre las paredes celulares.



## 7 CONCLUSIONES

- Las proteínas PEP I y PEP II se expresan correctamente en *E. coli* como proteínas de fusión GST-PEP I y GST-PEP II, y se acumulan preferencialmente en cuerpos de inclusión y en menor proporción en la fase soluble.
- La proteína PEP I se expresa específicamente en el estigma-estilo de *Nicotiana glauca* BT.
- La proteína PEP I se expresa preferencialmente en las especies autoincompatibles estudiadas de *Nicotiana*.

## 8 BIBLIOGRAFIA

Anderson M. A., McFadden G. I., Bernatzky R., Atkinson A., Orpin T., Dedman H., Tregear G., Fernley R., y Clarke, A. (1989) *Plant Cell* 1:483.

Ascher P. D. y Peloquin S. J. (1968) Pollen tube growth and incompatibility following intra- and interspecific pollinations in *Lilium longiflorum*. *American Journal of Botany* 55: 1230-1234

Atkinson A. H., Heath R. L., Simpson R. J., Clarke A. E. y Anderson M. A. (1993) Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into five homologous inhibitors. *Plant Cell* 5:203-213.

Ausubel F., Brent R., Kinystone R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A. y Struhl. (1997). Short protocols in molecular biology. Wiley and Sons Inc. USA.

Bai C., Sen P., Hofmann K., Ma L., Goebel M., Harper J. W. y Elledge S. J. (1996) SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86: 263-274

Bell J., y Hicks G. (1976) transmitting tissue in the pistil of tobacco: Light and electron microscopic observations. *Planta* 131: 187-200

Bernatzky R. (1993) Genetic Mapping and Protein Product Diversity of the Self-Incompatibility Locus in Wild Tomato (*Lycopersicon peruvianum*). *Biochem Genet* 31:173-184

Bosch M. (2002) A functional study of pistil-specific proline-rich glycoproteins, Catholic University of Nijmegen, Netherlands.

Chetelat R. T. y De Verna J. W. (1991) Expression of unilateral incompatibility in pollen of *Lycopersicon pennellii* is determined by major loci on chromosomes 1, 6 and 10. *Theor Appl Genet* 82: 704-712

Cheung A., Wang H., y Wu H. (1995) A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393

Cheung A. Y., Wu H., de Graaf B. y Mariani C. (2001) Hydroxylproline-rich glycoproteins in plant reproductive tissues: Structure, functions and regulation. *Cell Mol. Life Sci.* 58: 1418-1429

Clarke A. E., Considine J. A., Ward R. y Knox R. B. (1977). Mechanism of pollination in *Gladiolus*: roles of the stigma and pollen-tube guide. *Ann. Bot.* 41: 15-20

Clarke A. E., Gleeson P., Harrison S. y Knox R. B. (1979). Pollen-Stigma interactions: identification and characterization of surface components with recognition potential. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 76: 3358-3362

Clark A. G. y Kao T.-H. (1991) Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among predates specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9826-9827

Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I., y Clarke, A. E. (1987) *Nature*, **326**:99.

Craig K. L. y Tyers M. (1999) The F-box: a new motif for ubiquitin dependent proteolysis in cell cycle regulation and signal transduction. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **72**: 299-328

Cresti M., Hepler P. K., Tiezzi A. y Ciampolini F. (1986) Fibrillar structure in *Nicotiana* pollen: Changes in ultrastructure during pollen activation and tube emission. *Biotechnology and Ecology of Pollen*, Edit. WILEY, New York, p. p. 283-288

Cresti M., Pacini E., Ciampolini F. y Sargatti G. (1977) Germination and early tube development in vitro of *Lycopersicum peruvianum* pollen: ultrastructure features. *Planta* **136**: 239-288

Cruz-Garcia F., Hancock C. N. y McClure B. (2003) S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.* **54**: 123-130

Current Perspective Essay (2004). S-RNase and SLF Determine S-Haplotype-Specific Pollen Recognition and Rejection. *Plant Cell* **16**: 2840-2847

De Graff B. H. J. (2000) Pistil proline-rich proteins in *Nicotiana tabacum*, their involvement in pollen-pistil interaction, Catholic University of Nijmegen, Netherlands.

De Nettancourt, D. (1977) Incompatibility in Angiosperms. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.

Dickinson H. (1994) Simply a social disease? *Nature* **367**: 517-518.

Dumas C. Y Gaude T. (1981). Stigma-pollen recognition and pollen hydration. *Phytomorphology* **31**: 191-201

Ebert P. R., Anderson M. A. Bernatzky R., Altschuler M. y Clarke A. E. (1989) Genetic polymorphism of self-incompatibility in flowering plants. *Cell* **56**: 255-262

Esau K. (1965) Anatomy of Seed Plants. Edit John Wiley&Sons, Nueva York, p.p. 234-271

Ferrari T. E., Best V., More T. A., Comstock P., Muhammad A. y Wallace D. H. (1985) Intercellular adhesions in the pollen-stigma system: pollen capture, grain binding, and tube attachments. *Am. J. Bot.* **72**:146674

Gaude T. y McCormick S. (1999) Signaling in pollen-pistil interactions. *Cell Dev. Biol.* **10**: 139-147

Gasser C. S. y Robinson-Beers K. (1993) Pistil Development. *Plant Cell* **5**: 1231-1239

- Gu Q., Kawata E. E., Morse M. J., Wu H.M. y Cheung A. Y. (1992) A flower-specific cADN encoding a novel thionin in tobacco. *Mol Gen Genet* **234**:89-96.
- Goldberg R. B., Beals T. P. y Sanders P. M. (1993) Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* **5**: 1217-1229
- Goldraj A., Kondo K., Lee C. B., Hancock C. N., Sivaguru M., Vazquez-Santana S., Kim S., Phillips T. E., Cruz-Carcia F. y McClure B. (sometido) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*.
- Hancock C. N., Kent L. y McClure B. A. (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**: 716-723
- Harrison B. J., Darby L. A. (1955) Unilateral hybridisation. *Nature* **176**: 952
- Heslop-Harrison J. (1987) Pollen germination and pollen-tube growth. *Int. Rev. of Cytol.* **107**: 1-78
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1981) The pollen stigma interaction in the grasses. 2. Pollen tube penetration and the stigma response in Secales. *Acta Bot Neerl.* **30**: 289-307
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1989) Conformation and movement of the vegetative nucleus of the angiosperm pollentube: Association with the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **93**: 299-308
- Heslop-Harrison J. y Heslop-Harrison Y. (1992) Intracellular motility the actin cytoeskeleton and germinability in the pollen of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Sex Plant Reprod.* **5**: 247-255
- Heslop-Harrison Y. (2000) Control gates and micro-ecology: The pollen-stigma interaction in perspective. *Ann. Bot.* **85** (suppl.): 5-13.
- Heslop-Harrison Y. y Shivanna K. R. (1977) The receptive Surface of the angiosperms stigma. *Ann. Bot.* **41**: 1233-1258
- Hiscock S. J. y Dickinson H. G. (1993) Unilateral incompatibility within the Brassicaceae: further evidence for the involvement of the self-incompatibility (S)-locus. *Theor Appl Genet* **86**: 744-753
- Hiscock S. J., Doughty J. y Dickinson G. (1998) Unilateral incompatibility and the S (Self-incompatibility)-locus. In S. J. Owens and P. J. Rudall (Editors). *Reproductive Biology*, pp. 31-46. Royal Botanic Gardens, Kew

Hogenboom N. G. (1975a) Breaking breeding barriers in *Lycopersicon*. 5. The inheritance of unilateral incompatibility between *L. peruvianum* (L) MILL. And *L. esculentum* MILL. And the genetics of its breakdown. *Euphytica* **21**: 405-414

Hogenboom N. G. (1975b) Incompatibility and incongruity. Two different mechanisms for the non-functioning of intimate partner relationship. *Proc. R Soc London Ser B* **188**: 361-375

Hong-Yan LI, Julie E. Gray (1999) Molecular Characterization of a cADN, NTS13, Encoding a Defensin-like Protein in Tobacco Styles (Accession No. X99403). (PGR99-071) *Plant Physiol.* **120**: 633

Ikeda K., Igc B., Ushijima K., Yamane H., Hauck N. R., Nakano R., Sassa H., Iezzoni A. F., Kohn J. R., y Tao R. (2004) Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**: 235-243

Ioerger T. R., Gohlke J. R., Xu B. y Kao T.-H. (1991) Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* **4**: 81-87

Jauh G. Y. y Lord E. M. (1996). Localization of pectins and arabinogalactan-proteins in Lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen tube and style, and their possible roles in pollination. *Planta* **199**: 251-261

Johnson S. A. y McCormick S. (2001) Pollen germinates precociously in the anthers of *raring-to-go*, an *Arabidopsis* gametophytic mutant. *Plant Physiol.* **126**: 685-695

Kao T.-H. y McCubbin A. G. (1996) How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12059-12065

Kao T.-H. y Tsukamoto T. (2004). The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: S72-83.

Kandasamy M. K. y Kristen U. (1987) Developmental aspects of ultrastructure histochemistry and receptivity of the stigma of *Nicotiana glauca*. *Ann Bot.* **60**: 427-732

Kandasamy M., Nasrallah J. B. y Nasrallah M. E. (1994) Pollen-pistil interactions and developmental regulation of pollen tube growth in *Arabidopsis* *Development* **120**: 3405-3408

Knox R. B. (1984) Pollen-pistil interactions. In *Encyclopedia of Plant Physiology* Vol. 17. H. F. Linskens and J. Heslop-Harrison, eds (Berlin: Springer Verlag), pp. 508-608

Lai Z., Ma W., Han B., Liang L., Zhang Y., Hong G., y Xue Y. (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* **50**: 29-42.

Lewis D., y Crowe L. K. (1958) Unilateral interespecific incompatibility in flowering plants. *Heredity* **12**: 233-256

Lind J., Böning I., Clarke A. y Anderson M. (1996) A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* *in vivo*. *Sex. Plant Reprod.* **9**:75-86

Lord E. M. y Sanders L. C. (1992) Roles for the extracellular matrix in plant development and pollination: A special case of cell movement in plants. *Dev. Biol.* **153**: 16-28

Mar C. M. y Villaverde A. (2001) Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS Letters* **489**: 29-33

Mascarenhas J. P. (1975) The biochemistry of angiosperm pollen development. *Bot. Rev.* **41**: 259-314

McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., y Clarke, A. E. (1990) *Nature* **347**:757.

McClure B. A., Mou B., Canevascini S. y Bernatzky R. (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 13548-13553

McClure B. A., Harring V., Ebert P. R., Anderson M. A., Simpson R. J., Sakiyama F. y Clarke A. E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957

McClure B. A., Cruz-García F., Beecher B. S. y Sulaman W. (2000) Factors affecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Annals of Bot.* **85**: 113-123

McCubbin, A. G. y Kao, T. H. (1996) Molecular mechanisms of self-incompatibility. *Curr. Op. Biotechnol.* **7**: 150-154

McCubbin A. G. y Kao T.-H. (2000) Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **16**: 333-364

Milligan S. B. y Gasser C. S. (1995) Nature and regulation of pistil-expressed genes in tomato. *Plant Mol Biol* **28**: 691-711.

Murfett J., Strabala T. J., Zurek D. M., Mou B., Beecher B. y McClure B. A. (1996) S-RNases and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen rejection pathways contribute to a unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**: 943-958

Mutschler M. A. and Liedl B. E. (1994) Interspecific crossing barriers in *Lycopersicon* and their relationship to self-incompatibility. In: Williams E. G. Clarke A. E. Knox R. B. (editors), Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. Dordrecht: Kluwer, 164-188

Nygaard F. B. y Harlow K. W. (2001) Heterologous Expression of Soluble, Active Proteins in *Escherichia coli*: The Human Estrogen Receptor Hormone-Binding Domain as Paradigm. *Protein Express. Purif.* **21**: 500-509

Oxley D., Munro S. L. A., Craik D. J., y Bacic A. (1998) *J. Biochem.* **123**: 978

Pandey K. K. (1981) Evolution of unilateral incompatibility in flowering plants: further evidence in favour of twin specificities controlling intra- and interspecific incompatibility. *New Phytologist* **89**: 705-728

Puri N. K., Cardamone M., Crivelli E., y Traeger C. (1993) Characterization of a Truncated Form of Recombinant Porcine Growth Hormone Generated *in Vitro* during Solubilization of Inclusion Bodies. *Protein Express. Purif.* **4**: 164-175

Qiao H., Wang H., Zhao L., Zhou J., Huang J., Zhang Y., y Xue Y. (2004) The F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**: 528-595

Qiao H., Wang H., Zhao L., Zhou J., Lai Z., Zhang Y., Robbins T. P., y Xue Y. (2004) The F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> controls the pollen function of S-Rnase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: 2307-2322

Raghavan V. (1997) Reproductive Biology of Angiosperms: retrospect and prospect. En: Molecular embryology of flowering plants. Editorial Cambridge University, New York, p. p. 1-14, 17-60, 181-243

Sánchez A. M., Bosch M., Bots M., Nieuwland J., Feron R. y Mariani C. (2004) Pistil Factors Controlling Pollination. *Plant Cell* **16**: S98-S106

Sarker R. H., Elleman C. J. y Dickinson H. G. (1988) Control of pollen hydration in *Brassica* requires continued protein synthesis and glycosilation in necessary por intraspecific incompatibility. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **85**: 4340-4344

Sedgley M. y Clarke A. E. (1986) Immunogold localization of arabinogalactan-proteins in the developing style of *Nicotiana glauca*. *Nord. J. Bot.* **6**: 591-598

Shivanna K. R. y Heslop-Harrison J. (1981) Membrane state and pollen viability. *Ann. Bot.* **47**: 759-770

Sijacic P., Wang X., Skirpan A. L., Wang Y., Dowd P. E., McCubbin A. G., Huang S. y Kao T-H. (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305

Silva N. F. y Goring D. R., (2001) Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cell Mol. Life Sci.* **58**: 1988-2007

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Sommer-Knudsen J., Clarke A. E., y Bacic A. (1996) *Plant J.* **9**:71
- Swanson R., Edlund A. F. y Preuss D. (2004) Species specificity in pollen-pistil interactions *Annu. Rev. Genet.* **38**: 793-818.
- Thomson R., y Kirch H. (1992) The S-locus of flowering plants: When self-rejection is self-interest. *Trends Genet.* **9**: 381-387
- Tirlapur U. K., Ca G., Faleri C., Moscatelli A., Scali M., Del Casino C., Tiezzi A. Y Cresti M. (1995) Confocal imaging and immunogold electron microscopy of changes in distribution of myosin during of pollen hydration, germination and pollen tube growth in *Nicotiana tabacum*. *L. Zygote* **2**: 63-68
- Tsumoto K., Ejima D., Kumagai I., y Arakawa T. (2003) Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Express. Purif.* **28**: 1-8
- Twell D., Park S. K., y Lalanne E. (1998) Asimetric division and cell-fate determination en developing pollen. *Trends Plant Sci.* **3**: 305-310.
- Vallejo L. F. y Rinas U. (2002) Strategies for refolding inclusion body proteins. In: Villaverde A. ed. Protein Production in Bacterial Cell Factories. *Trivandrum, India: Research Singpost*, pp. 59-71
- Vasil I. K: (1987) Physiology and culture of pollen. *Int. Rev. Cytol.* **107**: 127-174
- Villaverde A. y Mar Carrió M. (2003) Protein aggregation in recombinant bacteria: role of inclusion bodies. *Biotechnology Letters* **25**: 1385-1395
- Vithanage H. I. M. V. y Heslop-Harrison J. (1979) The pollen-stigma interaction: fate of fluorescent labeled pollen-wall proteins on the stigma surface in rye (*Secale cereali*) *Ann. Bot.* **43**: 113-114
- Weber M. (1994) Stigma, style and pollen tube pathway in *Smyrniium perfoliatum* (Apiaceae). *Int. J. Plant Sci.* **155**: 437-444
- Woodward J. R., Bacic A., Jahnen W. y Clarke A. E. (1989) N-linked glycan chains on S-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana alata*. *Plant Cell* **1**: 511-514
- Wu H., Wang H., y Kao T. H. (1995) A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosilated by pollen tubes and displays a glycosilation gradient in the flower. *Cell* **82**: 395-403
- Yang W. C., y Sundaresan V. (2000) Genetics of gametophytic biogenesis in Arabidopsis, *Curr. Opin. Plant biol.* **3**: 53-57.
- Zinkl G. M., Zwiebel B. I., Grier D. G., and Preuss D. (1999) Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: A species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* **126**: 5431-5440.



# APÉNDICE

## Amortiguador de elusión

- a) Tris-Cl pH 8: 50mM
- b) Glutación reducido (GIBCO BRL): 15mM
- c) Guardar en alícuotas de 1 mL a -20°C hasta su uso. No utilizar la solución después de haber sido descongelada 5 veces.

## Amortiguador de extracción de proteínas

- a) NaCl 50mM
- b) Tris-HCl 50 mM
- c)  $\beta$ -mercaptoetanol 1%  
pH = 8

## Amortiguador de transferencia (para Western-blot)

- a) Tris: 3 g
- b) Glicina: 14.4g
- c) SDS: 1 g
- d) Metanol: 200 mL
- e) Aforar a un litro con H<sub>2</sub>O desionizada

Se incuba el gel en amortiguador de transferencia por 15 minutos al igual la membrana de nitrocelulosa y seis papeles filtro (de las mismas dimensiones del gel). Se colocan tres papeles filtro, la membrana, el gel y tres papeles filtros adicionales, y se coloca la otra placa previamente humedecida.

## Amortiguador de suspensión celular

- a) Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM
- b) EDTA 10 mM

## Amortiguador de solubilización del gel

La empresa no incluye su concentración.

Contiene perclorato de sodio concentrado, acetato de sodio y TBE)

## Amortiguador de neutralización

La empresa no incluye su concentración.

Contiene acetato e hidrocloreuro de guanidina

## Amortiguador de lavado

La empresa no incluye su concentración.

Contiene NaCl, EDTA y Tris-HCl (pH 8.0)

## Amortiguador de lavado opcional

La empresa no incluye su concentración.

Contiene acetato, hidrocloreuro de guanidina etanol y EDTA

### **Amortiguador TE**

- a) Tris-HCl (pH 8.0) 100mM
- b) EDTA 0.1 mM

### **Células competentes**

- a) Inocular una colonia de *E. coli* en 50 mL de LB contenidos en un matraz de 250 mL. Incubar con agitación constante (250 rpm) a 37°C toda la noche.
- b) Inocular 4 mL de cultivo en 400 mL en un matraz de 2L.
- c) Dejar crecer a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una  $A_{590}$  de 0.375.
- d) Vaciar el cultivo en 4 tubos de polipropileno de 250 mL estériles y dejarlos en hielo de 5 a 10 minutos.
- e) Centrifugar a 3000 rpm, 7 minutos a 4°C.
- f) Resuspender gentilmente cada botón celular en 20 mL de solución de  $\text{CaCl}_2$  fría.
- g) Centrifugar a 3000 rpm, 5 minutos a 4°C.
- h) Resuspender cada botón celular en 20 mL de solución de  $\text{CaCl}_2$  fría. Mantener resuspendidas las células en hielo por 30 minutos (el contenido de los tubos puede ser juntado en uno solo).
- i) Centrifugar a 3000 rpm, 7 minutos a 4°C.
- j) Resuspender el botón celular con 5 mL de la solución de  $\text{CaCl}_2$  fría y dividir en alícuotas de 100  $\mu\text{L}$ .
- k) Sumergir los tubos en nitrógeno líquido y finalmente guardarlos a -80°C.

### **Medio LB líquido**

- a) Tristona :10 g
- b) Extracto de levadura: 5g
- c) NaCl: 5g
- d) Aforar a 1L
- e) Esterilizar por autoclave

### **Medio LB sólido**

- a) Antes de aforar, agregar 15 g de agar pro cada litro de medio LB

### **PBS 10X**

- a) NaCl: 40.0314 g (1.37 M)
- b) KCl: 1.0065 g (27 mM)
- c)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ : 5.7635 g (43mM)
- d)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ : 0.9650 g (14mM)
- e) Disolver con 300mL de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada
- f) Ajustar a pH 7.3
- g) Aforar a 500 mL
- h) Esterilizar por autoclave

Este amortiguador se prepara a una concentración 10X y se almacena a temperatura ambiente. Se hace una dilución para obtener PBS 1X que se almacena a 4°C, y esta es la concentración a la que se usa.

### **Rojo Ponceau**

Disolver 0.5 g de Ponceau S en un mililitro de ácido acético y aforar a 100 mL con agua desionizada

### **SDS-PAGE**

Acrilamida al 30%

- a) acrilamida 29.2 g
- b) Bis-acrilamida 0.8 g
- c) H<sub>2</sub>O c.b.p. 100 mL

Amortiguador del gel apilador 2X (pH 6.8)

- a) Tris-Cl 7.88 g
- b) SDS (dodecil-sulfato de sodio) 0.4 g
- c) H<sub>2</sub>O c.b.p. 100 mL

Amortiguador del gel separador 2X (pH 8.8)

- a) Tris-Cl 23.64 g
- b) SDS 0.4 g
- c) H<sub>2</sub>O c.b.p. 100 mL

Amortiguador de muestra 6X

- a) Tris 0.28 M pH 6.8
- b) Glicerol al 30% (v/v)
- c) SDS al 1%
- d) Azul de bromofenol 0.0012%
- e) DTT (ditiotreitól) 0.5M
- f) Aforar a 10 mL con H<sub>2</sub>O desionizada

Amortiguador de corrida 10X

Este se utiliza 1X (una vez concentrado) tanto en el cátodo como en el ánodo de la cámara de electroforesis.

- a) Tris-base 30.32 g
- b) Glicina 144 g
- c) SDS 10 g
- d) Aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O

### **Solución de bloqueo**

- a) Leche descremada: 5%(w/v)
- b) Tween 20: 0.6%
- c) Los reactivos se disuelven con PBS 1X

### **Solución de lisis celular**

- a) NaOH 200 mM
- b) SDS 1% (w/v)

### Tinción de proteínas en gel de poliacrilamida con azul brillante de Coomassie

- Al finalizar la electroforesis, dejar el gel en solución teñidora (metanol 50% + ácido acético 10% + azul brillante de Coomassie 0.5%) de 30 a 50 minutos.
- Retirar la solución teñidora (se puede reutilizar posteriormente) y realizar lavados con agua desionizada hasta obtener la nitidez deseada.

**Bromocloroindolil fosfato / nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT).** Forma un precipitado azul-púrpura, resultado de la desfosforilación y posterior oxidación de BCIP a índigo, acoplada a la reacción de NBT a diformazon. La reacción es progresiva lo que facilita el control de la misma ajustando el tiempo de desarrollo.

### Cálculos para obtener la concentración real de proteína total en los extractos

La absorbencia obtenida para las muestras se interpola en la curva patrón para obtener una concentración en  $\mu\text{g/mL}$ , para obtener la concentración real de proteína presente en la muestra, este valor debe multiplicarse por factor de dilución (200). Los resultados fueron los siguientes:

Extracto de:	A(1) <sub>595 nm</sub>	A(2) <sub>595 nm</sub>	Concentración ( $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )
<i>N. glauca</i>	0.635	0.642	1.091
<i>N. longiflora</i>	0.487	0.593	0.867
<i>N. tabacum</i>	0.572	0.570	0.938
<i>N. plumbaginifolia</i>	0.602	0.596	1.001
<i>N. alata</i> 110-18	0.771	0.723	1.337
<i>N. alata</i> BT	0.650	0.600	1.060
Tallo	0.359	0.323	0.416
Ovario	0.573	0.582	0.717
Sépalo	0.388	0.395	0.530
Hoja	0.733	0.719	1.289
Pétalo	0.359	0.323	0.419
Antera	0.783	0.779	1.414