



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

Interacción física entre las proteínas
estilares HT-B y 120K.

T E S I S

Que para obtener el título de :

Química Farmacéutica Bióloga

P R E S E N T A

:

Perla Vanessa Danaé Maqueda Márquez



México D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Bertha Resendiz Vázquez.
Vocal	Prof. María Elena Ibarra Rubio.
Secretario	Prof. Felipe Cruz García.
1er. Suplente	Prof. Euclides Ávila Chávez.
2°. Suplente	Prof. Antonio Ulises López Gutierrez.

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica del Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García y con apoyos de los proyectos:

- ✦ CONACYT. Número de proyecto: 40614-Q
- ✦ DGAPA. Número de proyecto: IN207406
- ✦ PAIP. Número de proyecto: 629015

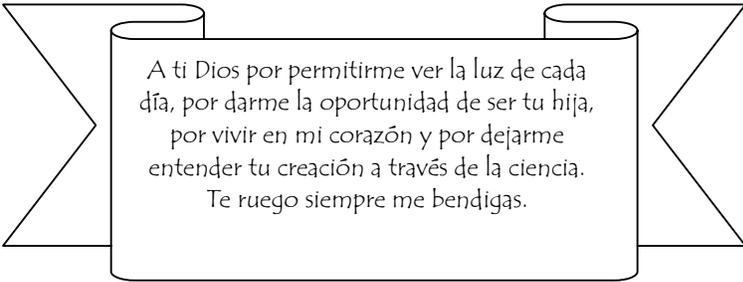
Asesor del tema: Dr. Felipe Cruz García.

Supervisor técnico: M. en C. Andrea Edith Hernández Navarro.

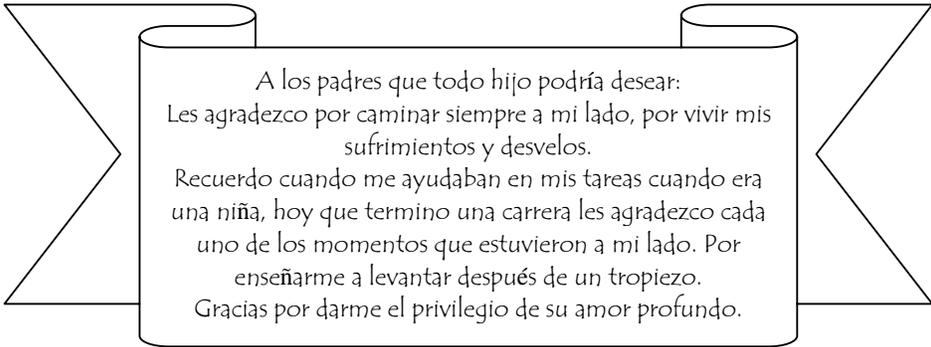


Sustentante: Perla Vanessa Danaé Maqueda Márquez

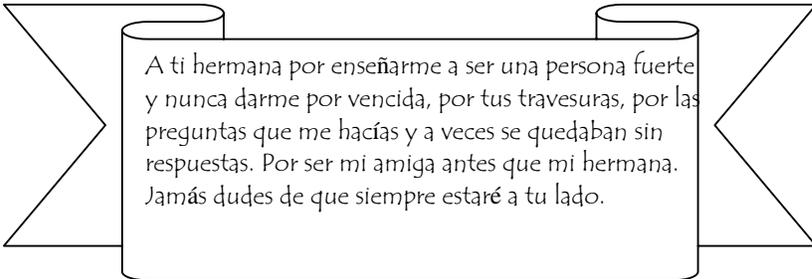
AGRADECIMIENTOS



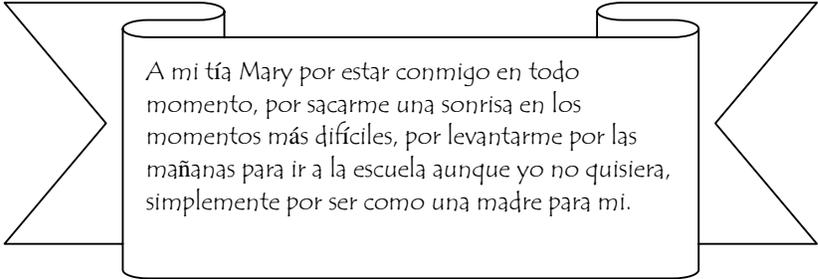
A ti Dios por permitirme ver la luz de cada día, por darme la oportunidad de ser tu hija, por vivir en mi corazón y por dejarme entender tu creación a través de la ciencia. Te ruego siempre me bendigas.



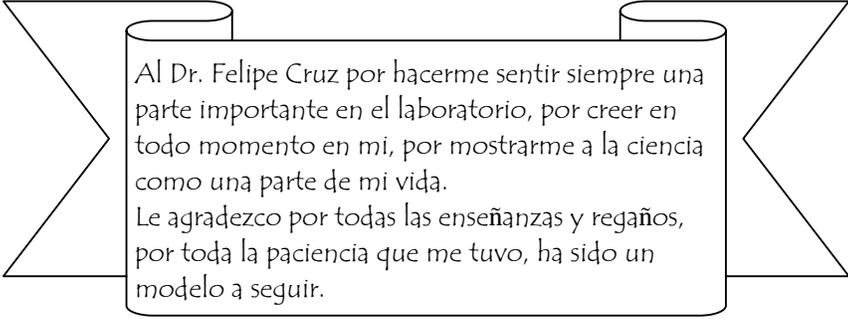
A los padres que todo hijo podría desear: Les agradezco por caminar siempre a mi lado, por vivir mis sufrimientos y desvelos. Recuerdo cuando me ayudaban en mis tareas cuando era una niña, hoy que termino una carrera les agradezco cada uno de los momentos que estuvieron a mi lado. Por enseñarme a levantar después de un tropiezo. Gracias por darme el privilegio de su amor profundo.



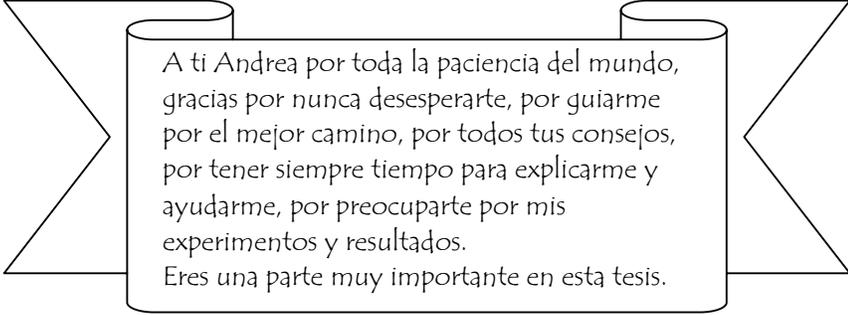
A ti hermana por enseñarme a ser una persona fuerte y nunca darme por vencida, por tus travesuras, por las preguntas que me hacías y a veces se quedaban sin respuestas. Por ser mi amiga antes que mi hermana. Jamás dudes de que siempre estaré a tu lado.



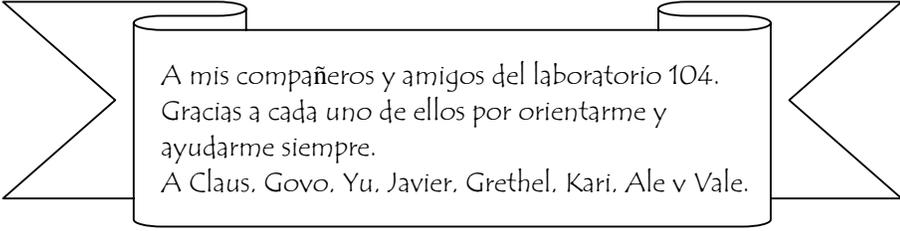
A mi tía Mary por estar conmigo en todo momento, por sacarme una sonrisa en los momentos más difíciles, por levantarme por las mañanas para ir a la escuela aunque yo no quisiera, simplemente por ser como una madre para mi.



Al Dr. Felipe Cruz por hacerme sentir siempre una parte importante en el laboratorio, por creer en todo momento en mi, por mostrarme a la ciencia como una parte de mi vida.
Le agradezco por todas las enseñanzas y regaños, por toda la paciencia que me tuvo, ha sido un modelo a seguir.



A ti Andrea por toda la paciencia del mundo, gracias por nunca desesperarte, por guiarme por el mejor camino, por todos tus consejos, por tener siempre tiempo para explicarme y ayudarme, por preocuparte por mis experimentos y resultados.
Eres una parte muy importante en esta tesis.



A mis compañeros y amigos del laboratorio 104.
Gracias a cada uno de ellos por orientarme y ayudarme siempre.
A Claus, Govo, Yu, Javier, Grethel, Kari, Ale y Vale.

Agradecemos al Colegio de Profesores de la Facultad de Química de la UNAM y a la sección 024 de la Asociación Autónoma del Personal Académica de la UNAM, al apoyo otorgado para la realización de esta tesis, a través de la Cátedra Raúl Cetina Rosado.

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN.....	13
1 ANTECEDENTES.....	14
1.1 Órganos reproductores de las angiospermas.....	14
1.1.1 Órgano masculino.....	15
1.1.2 Órgano femenino.....	16
1.2 Interacción polen-pistilo.....	18
1.2.1 Captura del grano de polen.....	19
1.2.1.1 Adhesión del grano de polen en el estigma.....	19
1.2.1.2 Hidratación del grano de polen.....	19
1.2.2 Germinación del grano de polen.....	20
1.2.3 Crecimiento del tubo polínico.....	20
1.3 Sistemas de incompatibilidad.....	21
1.3.1 Sistema de autoincompatibilidad esporofítico.....	22
1.3.2 Sistemas de autoincompatibilidad gametofítico.....	25
1.3.2.1 La SRNasa, determinante femenina del rechazo del polen S- específico.....	26
1.3.2.2 La determinante masculina del rechazo del polen S- específico.....	27
1.3.2.3 Genes modificadores no ligados al locus <i>S</i> involucrados en el rechazo del polen.....	28
1.3.2.4 Modelos del rechazo del polen en sistemas basados en S- RNasas.....	31
2 HIPÓTESIS	34
3 OBJETIVOS GENERAL y PARTICULARES.....	34
4 MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
4.1 Transformación de células competentes BL21 codon plus.....	35
4.2 Inducción de la sobreexpresión de HT-B.....	36
4.3 Comprobación de que la proteína de interés muestra un patrón de sobreexpresión.....	37
4.4 Tinción con nitrato de plata.....	39
4.5 Sobreexpresión a gran escala.....	40
4.6 Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	41
4.7 Purificación de la proteína de fusión utilizando la resina glutatión sepharosa	41

4.8 Desalación y concentración de la proteína de fusión.....	44
4.9 Ensayos de <i>pull down</i> entre las proteínas estilares HT-B y 120K.....	44
4.10 Estudio de las interacciones proteína-proteína entre HT-B y 120K , por el método de doble híbrido.....	46
4.11 Purificación de plásmido (Maxipreparaciones).....	55
4.12 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	56
5 RESULTADOS.....	58
5.1 Sobreexpresión de HT-B y comprobación de que la proteína de interés muestra un patrón de sobreexpresión.....	58
5.2 Sobreexpresión de HT-B a gran escala.....	60
5.3 Purificación de la proteína de fusión utilizando la resina glutatión-sepharosa.....	61
5.4. Ensayos de <i>pull down</i> entre las proteínas estilares HT-B y 120K.....	65
5.5 Estudio de las interacciones proteína-proteína entre HT-B y 120K por el método de doble híbrido.....	67
6 DISCUSIÓN.....	73
7 CONCLUSIONES.....	78
8 BIBLIOGRAFÍA.....	79
9 APÉNDICE.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Verticilos florales de las angiospermas.
- Figura 2.** Partes del óvulo de una angiosperma.
- Figura 3.** El proceso de la polinización y la doble fecundación.
- Figura 4.** Tubo polínico y partes que lo constituyen.
- Figura 5.** Morfos florales en plantas heterostílicas.
- Figura 6.** Control genético de la AIS.
- Figura 7.** Modelo sobre el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen *S* específico en TPs en un sistema esporofítico.
- Figura 8.** Control genético de la AIG.
- Figura 9.** Modelo sobre el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen *S* específico en tubos polínicos compatibles e incompatibles en un sistema gametofítico.
- Figura 10.** Vector pACT2.
- Figura 11.** Vector pAS2-1.
- Figura 12.** Vector pGADT7.
- Figura 13.** Vector pGEM.
- Figura 14.** Sobreexpresión de GST-HT-B.
- Figura 15.** Sobreexpresión a gran escala de la proteína de fusión GST-HT-B.
- Figura 16.** Purificación de las proteínas de fusión GST-HT-B y GST, por cromatografía de afinidad.
- Figura 17.** Segunda purificación de la proteína de fusión GST-HT-B.
- Figura 18.** Reproducibilidad de la purificación de GST-HT-B.
- Figura 19.** Purificación a gran escala de la proteína de fusión GST-HT-B y de la proteína GST, utilizando la resina glutatión sepharosa.
- Figura 20.** Ensayo de *pull down* entre GST-HT-B y 120K.
- Figura 21.** Amplificación por PCR del cDNA del C-120K.
- Figura 22.** Reacción de digestión del cDNA de C-120K con la enzima *EcoRI*.
- Figura 23.** Reacción de digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI* de la clona 3 de 120K
- Figura 24.** Reacción de digestión del vector pACT2 con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

Figura 25. Alineamiento de la secuencia de C-120K.

Figura 26. Secuencia de 120K pACT2 en lenguaje de aminoácidos.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos y cantidades necesarios par la curva de cuantificación de la proteína HT-B por el método de Bradford.

Tabla 2. Reactivos y concentraciones de cada uno de los reactivos utilizados para la amplificación del cDNA.

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del cDNA de 120K.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes para una reacción de ligación.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes para una reacción de digestión con la enzima *EcoR1*.

Tabla 6. Reactivos y volúmenes para una reacción de digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

Tabla 7. Condiciones de inducción de la proteína HT-B.

Tabla 8. Resultados del doble híbrido.

ABREVIATURAS

AC	Autocompatible.
ADE	Adenina.
AI	Autoincompatibilidad.
AIS	Autoincompatibilidad esporofítica.
AIG	Autoincompatibilidad gametofítica.
AGP	Arabinogalactoproteína.
Amp	Ampicilina.
ARC	Armadillo repeat containing-1.
Asn	Asparagina.
Asp	Aspártico.
dd	Destilada desionizada.
DUC	Dominio de unión a cobre.
ECM	Matriz extra celular.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
GM	Genes modificadores.
GSH	Glutación reducido.
GST	Glutación S- transferasa.
HIS	Histidina.
IIE	Incompatibilidad inter-específica.
kD	Kilodaltones.
IPTG	Isopropiltiogalactósido.
LB	Luria bacterias 25.8.
LEU	Leucina.
MPLK	<i>M</i> locus protein kinase.
pb	Pares de bases.
PBS	Amortiguador fosfato salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Membrana PVDF	Membrana de difluoruro de polivinilideno.
<i>N.alata</i>	<i>Nicotiana alata</i> .
NaTTS	<i>Nicotiana alata</i> transmitting tissue specific glycoprotein.
<i>Ngp1</i>	<i>Nicotiana glutinosa P1</i> .
RNA	Ácido ribonucléico.
RNAi	Ácido ribonucléico de interferencia.
rRNA	Ácido ribonucléico ribosomal.
Rnasa	Ribonucleasa.
SCF	Skp1, Culina y proteínas con caja F.
SCR	<i>S</i> locus cystein rich.
SDS	Sodio dodecil sulfato.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.
SI	Sistema de incompatibilidad.
SLF	<i>S</i> locus F-box o caja F del locus <i>S</i> .
SLG	<i>S</i> locus glycoprotein.
SP11	<i>S</i> locus protein 11.
SRK	<i>S</i> locus receptor kinase.

TP.....Tubo polínico.
TRP.....Triptofano.
TT.....Tejido de transmisión.
UASG.....Upstream activated séquense for the yeast Gal genes.
X-gal..... X galactosidasa.
Y2H.....Doble híbrido.

RESUMEN

La autoincompatibilidad (AI) es un mecanismo mediante el cual las células del estilo rechazan su propio polen evitando que se lleve a cabo la autofecundación, favoreciendo así la diversidad genética. En las Solanaceas como *Nicotiana alata*, este proceso está regulado por el locus *S*, el cual codifica al menos dos proteínas: la S-RNasa o determinante femenina y SLF o determinante masculina. La S-RNasa se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo (TT), por donde crece el tubo polínico (TP) hacia el ovario y luego se transporta al citoplasma de éste en donde degrada al RNA si la cruce es AI. SLF es una proteína específica del TP con una caja F asociada con la degradación de proteínas.

Además de la S-RNasa y SLF, se requiere de otros factores para que se presente el rechazo del polen. Entre ellos se encuentran las proteínas estilares HT-B y 120K.

HT-B es una proteína ácida de 8.2 kDa con una región rica en Asn y Asp hacia la región del extremo carboxilo y con tres posibles sitios de prenilación. Además durante la polinización compatible e incompatible se transporta al interior del TP. Cuando HT-B se silencia en plantas transgénicas de *Nicotiana*, éstas no rechazan el polen propio.

120K es una arabinogalactoproteína específica de estilos de *N. alata* y que ingresa al TP en cruces compatibles e incompatibles. *In vitro*, forma parte de un complejo de proteínas con las S-RNasas y su presencia en los tubos polínicos es indispensable para la AI.

Hasta el momento se desconoce el papel bioquímico de HT-B y 120K en el rechazo del polen *S*-específico, una posibilidad podría ser mediante la formación de complejos entre ellas, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar las interacciones entre HT-B y 120K. Para ello, fue necesario inducir la sobreexpresión de HT-B recombinante fusionada a la glutatión S transferasa (GST) y purificarla por medio de una cromatografía de afinidad con la resina de glutatión sepharosa. La proteína GST-HT-B recombinante y 120K nativa purificada de estilos de *N. alata* se utilizaron para realizar un ensayo de *pull down*, el cual consistió en incubar a la proteína 120K con una resina GST-HT-B. Los eluatos obtenidos se analizaron por SDS-PAGE y por inmunodetección utilizando un anticuerpo anti-120K. Los resultados mostraron que HT-B y 120K interactúan *in vitro*.

Para corroborar los resultados anteriores, se evaluó la interacción proteína-proteína utilizando el sistema de doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, no fue posible recuperar levaduras transformantes que expresaran a HT-B y 120K, probablemente porque su coexpresión fue letal para las levaduras.

ANTECEDENTES

1.1 Órganos reproductores de las angiospermas

Las angiospermas son las plantas que producen flores y sus semillas se encuentran en el interior de un fruto (Gasser y Robinson-Beers, 1993). Son el grupo mayoritario en el mundo de los vegetales vasculares y están presentes en la mayor parte de los ecosistemas. Se estima que actualmente hay unas 300,000 especies de angiospermas.

Biológicamente, el papel primordial de las flores es el de producir semillas a partir de la fecundación del óvulo después de la polinización.

La flor consiste de cuatro verticilos dispuestos centrífugamente alrededor de un eje. Los dos más externos son verticilos vegetativos y los dos internos son sexuales (Figura 1). El verticilo más externo es el cáliz y está formado por los sépalos. Es comúnmente, aunque no siempre, verde y sirve como elemento de protección.

La corola está formada por los pétalos y es un verticilo externo a menudo coloreado que desempeña la función de atracción.

El androceo es el verticilo reproductivo masculino y está constituido por los estambres, los cuales están formados por el filamento y la antera que es la que produce el polen.

El gineceo es el verticilo reproductivo femenino y está constituido por los carpelos, los que a su vez están formados por el pistilo (estigma, estilo y ovario). Este último contiene a los óvulos (Goldberg *et al.*, 1993).

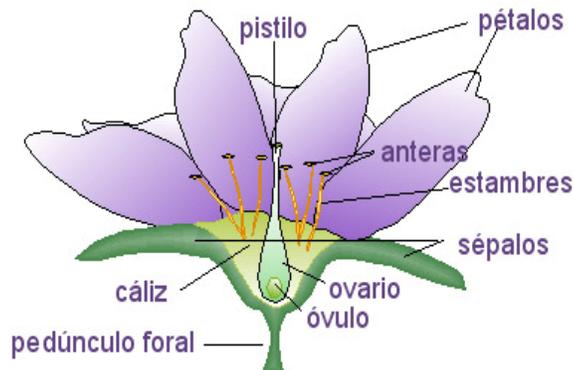


Figura 1. Verticilos florales de las angiospermas.

1.1.1 Órgano masculino

El androceo está compuesto por un conjunto de estambres, que comprenden el órgano reproductor masculino. Cada estambre está formado por el filamento y la antera. La antera está constituida generalmente por cuatro sacos polínicos o microsporangios. Al desarrollarse estas estructuras forman las microsporas y éstos a su vez forman los granos de polen (gametofito masculino). Cada una de estas células contiene dos núcleos haploides. El filamento es un tubo de tejido vascular que une el estambre a la flor, su función es la de proveer los nutrientes necesarios al grano de polen (Goldberg *et al.*, 1993).

El grano de polen o gametofito masculino es una estructura bi o tricelular con una cubierta formada por dos capas, una interna denominada intina y otra externa, la exina.

La intina, está presente en todos los granos de polen cubriéndolos en su totalidad, está compuesta por polisacáridos y pequeñas cantidades de pectina y proteínas. La exina, por otra parte, cubre a la intina excepto a nivel de las aperturas germinativas donde está ausente o adelgazada (Domínguez-Carmona, 2004).

El grano de polen joven ya formado sufre una primera división mitótica para formar el núcleo generativo y el núcleo vegetativo. Por estar rodeados de citoplasma y plasmalema se habla de una célula generatriz y de una célula vegetativa (Twell *et al.*, 1998; Yang y Sundaresan, 2000). Una segunda mitosis divide al núcleo de la célula generatriz, formando dos núcleos espermáticos o gametos masculinos también llamadas células espermáticas, las cuales son responsables de la doble fecundación que se llevará a cabo en el saco embrionario del óvulo (Raghavan *et al.*, 1997). El núcleo vegetativo será el encargado del desarrollo del tubo polínico (TP).

Cuando los granos de polen ya están maduros, se abre la antera (proceso de dehiscencia) y éstos se liberan para polinizar la parte femenina de la flor (Goldberg *et al.*, 1993).

1.1.2 Órgano femenino

El pistilo, el órgano reproductor femenino, comprende tres partes: el estigma, el estilo y el ovario (Goldberg *et al.*, 1993).

El estigma, compuesto por células papilares, secreta sustancias que estimulan la germinación de los granos de polen. El exudado producido por el estigma tiene actividad quimiotrópica para inducir el desarrollo del TP, además de facilitar su paso al estilo (Raghavan *et al.*, 1997).

La región entre el estigma y el ovario se define como estilo, cuyo interior está compuesto por un tejido especializado que provee los nutrientes necesarios para el crecimiento del TP, llamado tejido de transmisión (TT), el cual se localiza desde la superficie estigmática, se extiende a lo largo del estilo y continúa hasta el ovario (Clarke, 1979). El TT provee un medio físico y químico entre el gametofito femenino y el masculino, secreta sustancias enriquecidas en carbohidratos, lípidos, compuestos fenólicos, enzimas, etc, que ocupan toda la matriz extracelular (Clarke *et al.*, 1979; Gaget, 1984; Cresti *et al.*, 1986).

Dentro del ovario se encuentra el óvulo, lugar de formación de megasporas y del megagametofito o saco embrionario. El óvulo consiste de: tegumento externo (primina), tegumento interno (secundina) (que puede ser uno o incluso dos), un cuerpo central de células llamado nucela, el saco embrionario (gametofito femenino), el funículo o soporte de conexión del óvulo a la placenta y una región donde los tegumentos se unen al funículo llamado calaza. El pequeño poro de apertura que dejan los tegumentos al envolver la nucela se llama micrópilo (figura 2) (Clarke *et al.*, 1979).

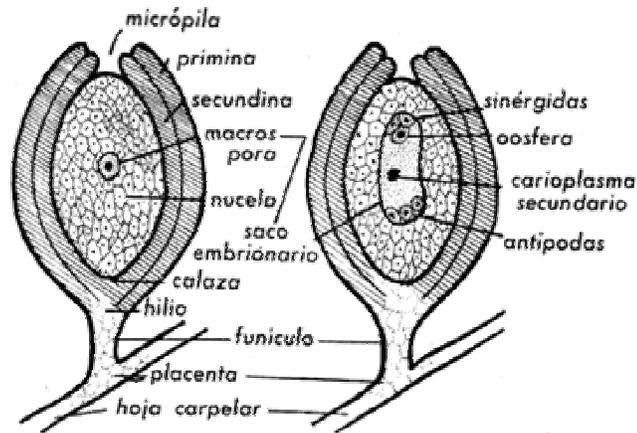


Figura 2. Partes del óvulo de una angiosperma.

Los tubos polínicos una vez que han alcanzado dos óvulos eventualmente depositan las células espermáticas en el saco embrionario. Un núcleo de las células espermáticas se fusiona con la ovocélula, restableciendo la ploidía $2n$ y el otro con los núcleos polares de la célula central parece originar un endospermo $3n$ (Figura 3).

En las angiospermas los granos de polen se depositan en la superficie del estigma; si el polen y el estigma son compatibles, el polen se elonga hasta formar el TP, el cual crece hasta llegar al micrópilo del óvulo. El TP se elonga a través del TT y cambia de dirección continuamente debido a un gradiente de Ca^{2+} y a otros factores quimiotácticos que los guían hasta encontrar el óvulo (Raghavan *et al.*, 1997).

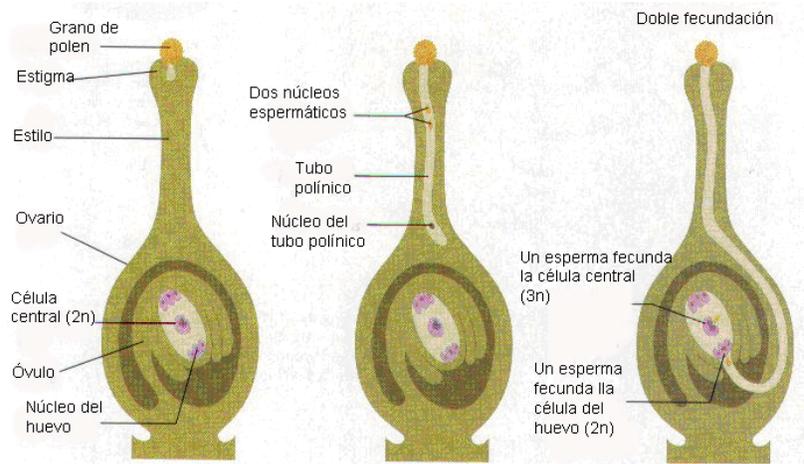


Figura 3. El proceso de la polinización y la doble fecundación en angiospermas.

1.2 Interacción polen –pistilo.

Para que se lleve a cabo el proceso de fecundación es necesaria la interacción entre el polen y el pistilo, lo que ocurre en el momento en que el grano de polen se posa sobre el estigma receptivo (Franklin-Tong, 1999).

Los eventos que ocurren desde la llegada del polen al estigma hasta su entrada por el micrópilo del ovario se resumen de la siguiente manera:

- 1.- Captura del grano de polen.
 - a) Adhesión del grano de polen en el estigma,
 - b) Hidratación del grano de polen,
- 2.- Germinación del grano de polen,
- 3.- Elongación del TP,
- 4.- Viaje del TP hacia el ovario,
- 5.- Recepción del TP en el ovario.

1.2.1 Captura del grano de polen.

La receptividad del estigma es la capacidad para capturar el polen por adhesión, permitir su hidratación y en consecuencia su germinación para producir un tubo polínico (Gaude y McCormick, 1999).

1.2.1.1 Adhesión del grano de polen en el estigma

Para capturar el grano de polen, transportado al estigma por polinizadores bióticos (insectos) y abióticos (viento), el estigma secreta sustancias de adhesión. La adhesión depende del tipo de estigma a donde llega el grano de polen. Si se trata de un estigma húmedo, la adhesión será de tipo no selectivo, en cambio, si llega a un estigma seco, la adhesión será selectiva. En este caso se llevará a cabo el entrecruzamiento o mezcla de los componentes (proteínas y lípidos) tanto del estigma como del polen (Gaude y McCormick, 1999). El paso final de la adhesión es cuando el grano de polen germina y el TP pasa a través de la interfase hacia la superficie del estigma (Zinkl *et al.*, 1999; Dickinson *et al.*, 1998; Heizmann *et al.*, 2000). Sin embargo, se puede dar la adhesión del grano del polen en la superficie estigmática y no llevarse a cabo la hidratación y por lo tanto tampoco la germinación (Heslop-Harrison *et al.*, 1985).

1.2.1.2 Hidratación del grano de polen

La mayor parte de los granos de polen maduros cuando son desprendidos de las anteras están casi deshidratados, con un 15 a 35% de agua (Heslop-Harrison, 1985; Buitink *et al.*, 2000). El exudado estigmático (estigmas húmedos) o el estigma papilar (estigmas secos) transportan rápidamente hacia el grano de polen el agua y nutrientes necesarios.

El estigma es el encargado de favorecer la hidratación de los granos de polen compatibles, mientras que en ocasiones restringe la hidratación de aquellos incompatibles (Dickinson, 1998), es por eso que la hidratación es considerada como el primer cambio observado en los granos de polen compatibles (Raghavan *et al.*, 1997).

Se sugiere que la presencia de lípidos tanto en la superficie estigmática como en los granos de polen, modula la hidratación de polen deshidratado, mientras que las proteínas median el reconocimiento de polen compatible e incompatible (Chaudhury *et al.*, 1998).

1.2.2 Germinación del grano de polen.

Una vez hidratado el grano de polen, emerge el TP. Para que esto ocurra, el TP reorganiza su citoplasma y citoesqueleto lo que le permite soportar la elongación. También se forman estructuras filamentosas que rodean al núcleo, hay polarización de la actina del citoesqueleto hacia el poro de geminación (Heslop-Harrison, 1985), reorientación de la célula vegetativa y migración de mitocondrias, partículas de polisacáridos y cuerpos lipídicos hacia el sitio de elongación en la punta del TP (Edlund *et al.*, 2004).

1.2.3 Crecimiento del tubo polínico

El último paso para la fecundación es el crecimiento del tubo polínico a través del estilo y a lo largo de la matriz extracelular del tejido de transmisión. La célula vegetativa inicia el crecimiento del TP por elongación y mediado por microfilamentos.

Existen cuatro diferentes zonas en el TP, comenzando por la zona distal se tienen: a) una zona apical o de crecimiento enriquecida por vesículas, mientras el tubo avanza, el citoplasma y las células espermáticas se concentran en esta región, b) la zona subapical poblada por organelos, c) la zona nuclear denominada así por la presencia de los núcleos de las células espermáticas y vegetativa y, d) la zona de vacuolas separada por tapones de calosa que se van depositando a lo largo del TP (Figura 4) (Taylor *et al.*, 1997).

El tubo polínico se nutre de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, hasta ponerse en contacto con el saco embrionario. La velocidad de crecimiento del TP es de gran importancia, ya que éste debe llegar al saco embrionario antes de que el óvulo pierda su fertilidad (Taylor *et al.*, 1997).

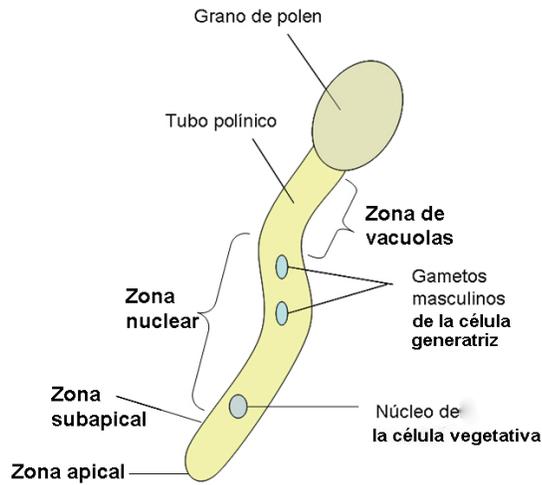


Figura 4. Tubo polínico y partes que lo constituyen.

1.3 Sistemas de incompatibilidad

Los sistemas de incompatibilidad se clasifican en heteromórficos y homomórficos. La autoincompatibilidad heteromórfica (heterostilia) se refiere a la presencia de varios morfos florales en una población, ya sea distílica (dos morfos) o tristílica (tres morfos) (Figura 5). La heterostilia se ha reportado en 25 familias y se cree que ha surgido de manera independiente en varias ocasiones durante la evolución de las angiospermas (Athanasiou y Shore, 2001).

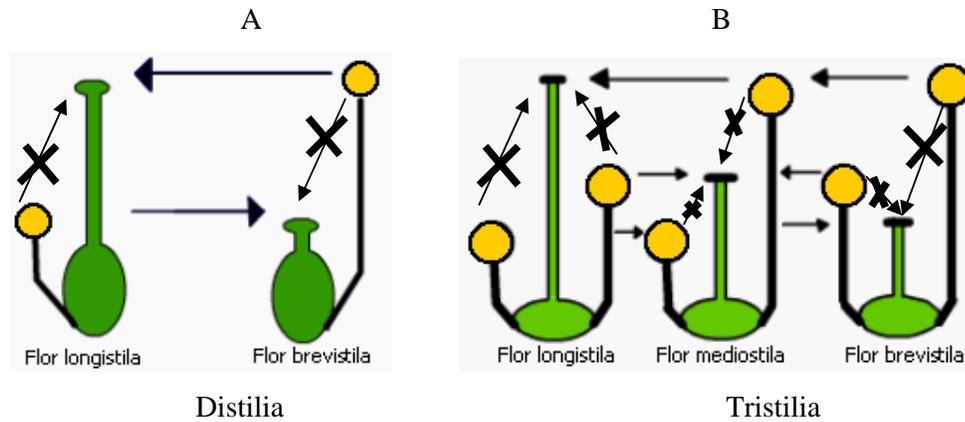


Figura 5. Morfos florales en plantas heterostílicas. A. Distilia, B. Tristilia. Las flechas indican la posibilidad de entrecruzamiento y las flechas tachadas las cruzas no permitidas. La posibilidad de fecundación se basa en el tamaño tanto de la antera como del ovario, los granos de polen de una antera larga podrán fecundar a un ovario grande, por lo que los granos de polen de una antera corta sólo podrán fecundar a un ovario pequeño.

En el sistema de incompatibilidad homomórfico existe un solo morfo floral en la población, y la compatibilidad en muchas especies está generalmente controlada por un solo locus multialélico conocido como el locus *S*, el cual determina la especificidad de la polinización tanto en la parte masculina (polen) como en la femenina (pistilo) (de Nettancourt, 1997; Franklin-Tong *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de control genético en los sistemas de autoincompatibilidad (AI) homomórficos: el control gametofítico (AIG) y el control esporofítico (AIS) (Newbigin *et al.*, 2005; Clark, 1991).

1.3.1 Sistema de autoincompatibilidad esporofítico

En el sistema esporofítico el comportamiento de AI del polen está determinado por el genotipo diploide de la planta (esporofito) que lo produce. En este sistema se llevará a cabo una cruce compatible sólo entre plantas que no comparten alelos *S* (Figura 6).

El sistema de incompatibilidad AIS se ha estudiado principalmente en la familia Brassicaceae, donde se detectaron varias características importantes, entre ellas, que el polen es tricelular, que su viabilidad es muy corta con respecto al pistilo receptor, que por

lo general el estigma es seco y que el rechazo del polen en cruza incompatibles se da a nivel del estigma (de Nettancourt, 2001; McCubbin, 1999; Silva, 2001).

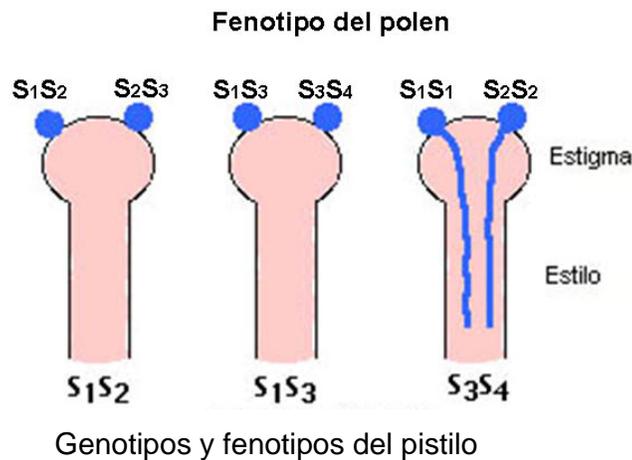


Figura 6. Control genético en la AIS. Si el polen posee al menos una proteína *S* idéntica al del pistilo, el grano de polen será rechazado y no se llevará a cabo el crecimiento del TP, una cruce compatible sólo se dará cuando el grano de polen lleve dos proteínas *S* diferentes a las producidas por el estigma.

El sistema de autoincompatibilidad esporofítico codifica los genes *SRK* (determinante femenina) y *SP11* (determinante masculina), entre otros (Takayama e Isogai, 2005; Stein, 1991). La proteína *SRK* (*S* locus receptor kinase), es un receptor tipo serina-treonina cinasa que se localiza en la membrana celular de las papilas estigmáticas. La proteína *SP11* (*S*-locus protein 11), también llamada *SCR* (*S*-locus cysteine-rich), es una proteína rica en cisteína que en la mayoría de los haplotipos *S* es sintetizada por las células diploides del tapete de la antera (Schoper, 1999; Suzuki, 1999; Takayama, 2000). Durante la polinización *SP11* penetra la pared celular de las papilas estigmáticas e interacciona físicamente con *SRK* de manera *S* específica; esta unión induce la autofosforilación de *SRK*, promoviendo una cascada de señalizaciones que conduce al rechazo del polen (Franklin *et al.*, 2003).

Existen otras proteínas involucradas en la AIS tales como *SLG* (*S*-locus glycoprotein), *ARC1* (Armadillo-Repeat-Containing 1) y *MPLK* (*M* locus protein kinase) (Gu, 1998; Mazzurco, 2001; Murase, 2004; Shiu, 2001). La glicoproteína del locus *S* (*SLG*), se

localiza también en la pared celular de la papila estigmática y no es esencial para el reconocimiento del polen. Sin embargo, potencia el rechazo del polen en algunos haplotipos *S* (Kusaba, 2001; Suzuki, 2003, 2000). La proteína ARC1, es estigmática e interacciona con el dominio citoplasmático de SRK. Esta interacción promueve la fosforilación de ARC1 *in vitro* y se cree que actúa como un efector positivo en la señalización de la AI. ARC1 tiene actividad de ligasa de ubiquitina E3, por lo que se propone que al ser fosforilada por SRK se promueve la ubiquitinación y degradación de proteínas estigmáticas que permiten la germinación del polen y/o del crecimiento del TP (Stone, 1999, 2003). MPLK es una proteína tipo cinasa sin la cual se pierde la respuesta de AI (Takayama e Isogai, 2005; Murase, 2004). MPLK podría estar formando complejos con SRK durante el rechazo del polen *S* específico aunque no se conoce cuál es la relación entre estas proteínas (Takayama e Isogai, 2005) (Figura 7).

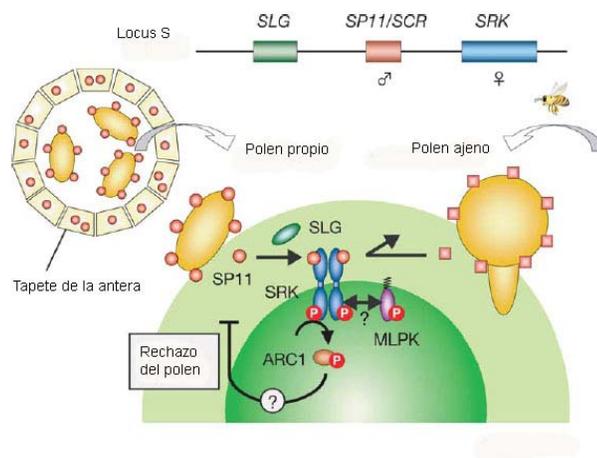


Figura 7. Modelo sobre el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen *S* específico en TPs en un sistema esporofítico. El locus *S* consiste de tres genes, *SRK*, *SP11* y *SLG*. *SRK* es la determinante femenina y se encuentra en la membrana plasmática de la papila estigmática. *SP11* es la determinante masculina y se expresa predominantemente en el tapete de la antera y se acumula en la cubierta del polen durante la maduración de éste. Durante la polinización, *SP11* penetra la pared celular de la papila y se une a *SRK* de manera haplotipo *S* específica, esta unión induce la autofosforilación de *SRK*, a través de una cascada de señales que resulta en el rechazo del polen. *SLG* no es esencial para el reconocimiento específico, pero intensifica el proceso de incompatibilidad en algunos haplotipos *S*. La cascada de señalización no ha sido claramente caracterizada, pero existen efectores positivos como *MPLK* y *ARC1*. *MPLK* se localiza en la membrana celular de la papila y puede formar complejos de señalización con *SRK*. *ARC1*, una ligasa de ubiquitina E3 se une al dominio de cinasa de *SRK* dependiente de fosforilación, la degradación del proteasoma de este sustrato puede resultar en el rechazo del polen (Takayama e Isogai, 2005).

1.3.2 Sistema de autoincompatibilidad gametofítico

En el sistema de AIG, los componentes que determinan la incompatibilidad son el producto de la expresión del genoma haploide del grano de polen (gametofito masculino); por eso el nombre de incompatibilidad gametofítica.

La AIG es menos restrictiva que la esporofítica, ya que sólo se requiere que uno de los dos productos del alelo S del pistilo coincida con el del polen. Es decir, sólo va a ser rechazado el polen que posea un alelo S idéntico a alguno de los dos alelos S del pistilo diploide de la planta receptora, aquél polen con alelo S distinto al del pistilo receptor, no será rechazado (Figuras 6 y 8) (Franklin *et al.*, 2003).

Por ejemplo, una planta diploide con el genotipo S_1S_2 , producirá granos de polen con el alelo S_1 ó S_2 , mientras que el genotipo del pistilo diploide será S_1S_2 . Cuando los granos de polen con el alelo S_1 ó S_2 lleguen al estigma, podrán germinar pero el crecimiento del TP será inhibido a nivel del estilo. Por otro lado, si el polen lleva un alelo S diferente (S_3) a los que porta el estilo diploide, el polen será aceptado y el TP alcanzará el saco embrionario y se llevará acabo la fecundación para producir una progenie con individuos S_1S_3 y S_2S_3 (Figura 8).

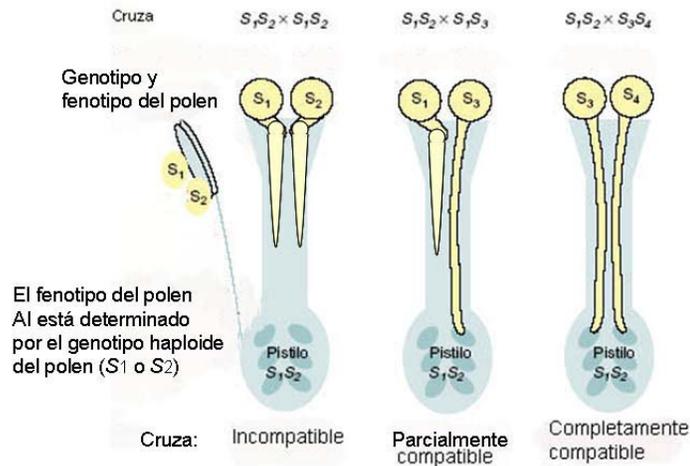


Figura 8 Control genético de la AIG. Cuando el polen lleva el haplotipo S_1 , éste será incompatible con un pistilo con haplotipo S_1 . Si la planta posee un haplotipo S_1S_2 , producirá la mitad del polen con haplotipo S_1 y la mitad con haplotipo S_2 . Cuando se da una cruza entre el polen con un haplotipo S igual a alguno de los dos haplotipos que lleva el pistilo, se dará una reacción de incompatibilidad, y ocurrirá la inhibición del crecimiento del TP (Modificado de Franklin *et al.*, 2003).

1.3.2.1 La S-RNasa es la determinante femenina del rechazo del polen.

El producto génico del locus S , en las familias Rosaceae (ej: almendro, cerezo, rosál, manzano), Scrophularaceae (ej: linaria, bignonia) y Solanaceae (ej: patata, tomate, pimienta, tabaco), es una glicoproteína con actividad de ribonucleasa a la que se ha llamado S-RNasa (McClure *et al.*, 1989; Kao y McCubbin, 1996).

Se han reportado mas de 50 S-RNasas de siete especies de Solanaceas, el análisis de sus secuencias aminoacídicas y la comparación entre ellas revelan un alto grado de polimorfismo con un rango de identidad entre el 38 y el 98% (Clark y Kao, 1991).

Las S-RNasas tienen dos papeles importantes:

- 1.- Determinar la especificidad femenina del rechazo del polen,
- 2.- Como agente citotóxico que controla la inhibición del crecimiento del TP incompatible.

Se propone que las S-RNasas actúan como citotoxinas alelo S -específicas que degradan el RNA del polen en polinizaciones incompatibles. Esto se basa en el hecho de que cuando se presenta la reacción de AI, el RNA del TP de *N. alata*, sobre todo el rRNA, es degradado (McClure *et al.*, 1990).

Las S-RNasas incluyen en su secuencia un péptido señal, el cual es procesado para rendir una proteína madura de aproximadamente 200 residuos de aminoácidos. Las S-RNasas son proteínas básicas, con un punto isoeléctrico en el rango de 7.6 a 9.5, con un número variable de N-glicanos, y un peso molecular de 28 a 35 kDa dependiendo del grado de glicosilación (Woodward *et al.*, 1989). Se expresan en el estigma, el estilo y el ovario y son secretadas hacia la matriz extracelular del TT del estilo, sitio por el cual crece el TP al ovario (Anderson *et al.*, 1986; Broothaerts *et al.*, 1995; Sassa *et al.*, 1996; Xue *et al.*, 1996).

La estabilidad de la estructura de la S-RNasa se da por las interacciones no covalentes y por puentes disulfuro (Ioerger *et al.*, 1990). En su secuencia existen cinco regiones conservadas (C1, C2, C3 C4 y C5) y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1990). Se piensa que las regiones hipervariables podrían mediar la especificidad del *S*-específico, al interactuar con la determinante masculina (Ioerger *et al.*, 1990). Por otro lado, Karunanandaa *et al.* (1994) demostraron que los N-glicanos no son esenciales para las S-RNasas en cuanto a su función para rechazar el polen.

1.3.2.2 La determinante masculina del rechazo del polen *S*-específico

Después de encontrar a la determinante femenina involucrada en el rechazo del polen *S* específico, fue necesario encontrar al gen que codificaba a la determinante masculina, ésta debía cumplir con varios requisitos: 1) estar ligado físicamente al gen de la S-RNasa, 2) ser altamente polimórfico y 3) expresarse solamente en el polen (McClure, 2004). Después de varios años se encontró una proteína con una caja F a la que se llamó SLF (S-Locus F box), la cual cumplía con estos requisitos (Lai *et al.*, 2002; Kipreos *et al.*, 2000)

Su participación como la determinante alélica masculina se demostró por la transformación de plantas homocigas S_1S_1 y de plantas heterocigas S_1S_2 y S_2S_3 de *Petunia inflata* con el transgen SLF_2 , provocando que la función del alelo *S* del polen se perdiera (Sijacic *et al.*, 2004).

Se ha observado que SLF interactúa de manera inespecífica con variables alélicas de la S-RNasa, así como con otras proteínas tales como ASK y proteínas similares a culina. La

hipótesis es que existe un complejo Skp1-culina-SLF involucrado en la degradación de la S-RNasa “propia” o incompatible por la vía del proteasoma 26A (Qiao *et al.*, 2004).

Se especula que la región N-terminal de SLF podría funcionar en la resistencia contra las S-RNasas debido a la presencia de la caja F altamente conservada y que la región C-terminal podría funcionar en el rechazo específico del haplotipo S, debido a sus dos regiones hipervariables (Kao y Tsukamoto, 2004).

Existen controversias respecto a la importancia de la función de *SLF* en el rechazo del polen, pues algunos estudios sugieren que su pérdida es letal para el polen (McClure, 2004). Sin embargo, un estudio en *Prunus* de Ushijima *et al.* (2004) demuestra que algunas mutaciones en *SLF* no son letales y no ocasionan la pérdida de la respuesta de AI.

El papel de *SLF* en el rechazo del polen se ha asociado con la degradación de proteínas, ya que las proteínas con caja F forman complejos ubiquitina ligasa como (SCF) (Skp1, Culina y proteínas con caja F) cuya función es, en conjunto con otras enzimas, la de mediar la ubiquitinación de proteínas que después pueden ser degradadas por el proteasoma 26 S (Bai *et al.*, 1997).

1.3.2.3 Genes modificadores no ligados al locus S involucrados en el rechazo del polen

Es claro que los productos del locus S son las determinantes genéticas que proporcionan la especificidad en los sistemas de incompatibilidad en Solanaceas, Rosaceas y Scrophulariaceas. Sin embargo, hay evidencia genética que indica que tanto en la AIG como en la AIS existen otros genes importantes cuyos productos participan en la vía bioquímica del rechazo del polen los cuales son llamados genes modificadores (GM) (Anderson y de Winton, 1986; Mather, 1985; Ai *et al.*, 1991; Brian *et al.*, 2001; Kao y Tsukamoto *et al.*, 2004).

McClure *et al.* (1999) dividieron a los GM en tres grupos:

El grupo I incluye genes cuyos productos regulan la expresión de las determinantes de la especificidad (*SLF* y *S-RNasa*) en la respuesta de incompatibilidad.

El grupo II comprende GMs que regulan la actividad biológica de las determinantes de especificidad, es decir interaccionan genética o bioquímicamente, pero no afectan

directamente su expresión, además de que no participan en ningún otro evento de la interacción polen-pistilo.

Los factores del grupo I y II tienen funciones específicas en la AI, por lo que las mutaciones en estos genes resulta en AC.

El grupo III incluye factores con múltiples funciones, tanto en el proceso de AI, como en diversos procesos en el pistilo. Los defectos en los genes de este grupo resultarían en esterilidad.

A la fecha sólo se ha comprobado la función de dos GMs (*HT-B* y *120K*) en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

HT-B es un factor del grupo II, el cual es una proteína rica en asparagina. La proteína *HT-B* madura tiene una masa de 8.2 kDa y su localización es específica del estilo (O'Brien, 2002; McClure *et al.*, 1999). Su papel en la AI fue confirmado silenciando su gen por antisentido y RNA de interferencia (RNAi) en plantas transgénicas de *Nicotiana* y *Solanum*, ya que las plantas transgénicas pasaron de ser AI a AC. Además, se comprobó que el crecimiento de los tubos polínicos en los estilos de estas plantas no se afectó, lo que confirma que *HT-B* participa exclusivamente en la autoincompatibilidad sin afectar otros eventos de la polinización (McClure *et al.*, 1999).

La secuencia aminoacídica de *HT-B* incluye en el extremo carboxilo un par de secuencias consenso (CaaX, CXC y CC) a las que podrían unírseles grupos isoprenoides como residuos de geranil o farnesil, los cuales por su carácter de hidrofobicidad podrían colaborar para anclarla a membranas celulares (Galichet y Grisse, 2003).

La proteína *120K* es una arabinogalactoproteína específica de estilos de *N. alata*, de un peso molecular de 120 kDa, por eso su nombre, forma complejos *in vitro* con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005) e ingresa al TP (Lind *et al.*, 1994) sin importar si las cruas son compatibles o incompatibles (Godraij *et al.*, 2006). En cruas compatibles y en etapas tempranas de la polinización de cruas incompatibles, *120K* se localiza delimitando a la vacuola donde se encuentran secuestradas las S-RNasas en el TP. Aunque en etapas tardías (36 h) de una polinización incompatible, *120K* ya no se detecta en los TPs (Goldraij *et al.*, 2006). Estas evidencias hacen suponer que *120K* se encuentra asociada a sistemas

membranosos en el TP y que su participación en el rechazo del polen podría ser importante en la liberación de las S-RNAsas de su compartimiento. 120K no está involucrada en el transporte de las S-RNAsas al citoplasma del TP, ya que en plantas transgénicas donde fue silenciada por RNAi, no se afectó su transporte (Hancock *et al.*, 2005).

Además de HT-B y 120K, existen otras proteínas como NaTTS, PELP III, Nap11 y NaTrxh (Cruz García *et al.*, 2005; Juárez-Díaz *et al.*, 2006), aunque su función en la AI no se conoce.

La proteína NaTTS (*Nicotiana alata* Transmitting Track Specific) es una arabinogalactoproteína, homóloga de la proteína estilar TTS de *N. tabacum* (Wu *et al.*, 2000; Cheung, 1995), TTS se trasloca a las paredes de los TPs y es desglicosilada por una hidrolasa ubicada en la membrana del TP para que ésta se nutra de sus azúcares (Wu *et al.*, 1995). En *Nicotiana*, esta proteína promueve la elongación de los TPs y los atrae en sistemas de cultivo de TPs semi *in vivo* (Cheung *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 2000), el incremento del contenido de azúcares de esta proteína a lo largo del estilo, puede guiarlos hacia el ovario (Cheung, 1995).

Nap11 es una metaloproteína similar a una fitocianina, cuyo cDNA contiene un marco de lectura abierto que codifica a una proteína de 10.6 kDa. En su extremo amino presenta una señal de secreción que al ser procesada generaría una proteína madura de 9 kDa. Pertenece a las proteínas de unión a cobre tipo I y se propone que participa en reacciones redox en la pared celular (Ryden y Hunt, 1993, Nersissian *et al.*, 1996; 1998). El dominio de unión a cobre se localiza en la superficie, lo que permitiría una fácil interacción con moléculas pequeñas.

La función de Nap11 se desconoce, aunque se sabe que en *N. alata* forma parte de un complejo con NaTTS, PELP III y la S-RNasa (Cruz-García *et al.*, 2003; 2005). En *Lilium longiflora* se reportó que una proteína ortóloga a Nap11 tiene actividad de quimioattractor durante el crecimiento de los TPs (Kim *et al.*, 2003), pero esto no ha sido comprobado en *N. alata*. La sobreexpresión de la quimocianina en *A. thaliana* ocasiona el crecimiento errático de los TPs (Dong *et al.*, 2005).

NaTrxh, codifica una tiorredoxina tipo h, que se secreta a la matriz extracelular del estilo, colocalizando en las S-RNasas. Además, reduce *in vitro* a la S-RNasa de manera específica (Juarez-Díaz *et al.*, 2006).

Nap11, PELP III, NaTTS y NaTrxh representarían factores del grupo III (McClure *et al.*, 1999; Cruz-García *et al.*, 2003, 2005).

1.3.2.4 Modelos del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasa.

Actualmente existen dos modelos para explicar el mecanismo del rechazo del polen por medio de la interacción de la determinante femenina y la masculina, así como de los productos de los genes modificadores.

El modelo propuesto por Hua y Kao (2006) supone que el producto del alelo S del polen (SLF) está localizado en el citoplasma del TP y que en las cruas compatibles, SLF interacciona “fuertemente” con las S-RNasas promoviendo su degradación vía el proteasoma 26S, mientras que en las cruas incompatibles la interacción es “débil”, evitando la degradación de las S-RNasas y permitiéndoles llevar a cabo la degradación del RNA.

Este modelo anterior se apoya en la fuerza de las interacciones entre la S-RNasa y SLF observadas *in vitro*. Sin embargo, este modelo no explica las grandes cantidades de S-RNasa que se encuentran en los tubos polínicos respecto a las cantidades de SLF y no involucra a los genes modificadores.

El modelo del secuestro de S-RNasas en vacuolas de los tubos polínicos (Goldraij *et al.*, 2006), propone que la S-RNasa, SLF, 120K y HT-B son los componentes de un sistema específico del rechazo del polen.

Las S-RNasas junto con otras proteínas de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo como HT-B y 120K, se introducen al citoplasma del TP, posiblemente por endocitosis tanto en cruas compatibles como incompatibles, de forma que se encuentran

compartimentalizadas en una vacuola, evitando que el RNA del TP se degrade (Goldraij *et al.*, 2006).

En las cruzas compatibles, un factor hipotético promueve la degradación de HT-B, evitando que se liberen las S-RNAsas de la vacuola y por lo tanto que se degrade el RNA; mientras que en las cruzas incompatibles, el compartimiento de las S-RNAsas se rompe mediante la acción de HT-B, quien se encuentra estable posiblemente debido a la inhibición de la proteína hipotética del polen que media su degradación o a su interacción con otra proteína que la estabilice. Esta inhibición podría estar ocasionada por la interacción *S* específica entre S-RNAsas y SLF. Por lo tanto, Goldraij *et al.* (2006) proponen que la interacción de las dos determinantes con alelos *S* idénticos permitirá la estabilización de HT-B, la ruptura del compartimiento donde se encuentran las S-RNAsas y su consecuente liberación y acción citotóxica. La especificidad en este mecanismo está dada por la interacción entre SLF y las S-RNAsas. Dado que SLF reside en el citoplasma del TP, al menos una pequeña cantidad de S-RNAsas debe estar presente en el citoplasma de éste.

Hasta el momento no se sabe cómo la interacción de la S-RNasa y SLF controla la degradación de HT-B ni el rompimiento de la membrana vacuolar. Sin embargo, resultados de Goldraij *et al.* (2006) demuestran que el compartimiento de las S-RNAsas se encuentra estable en ausencia del factor estilar HT-B (Figura 9).

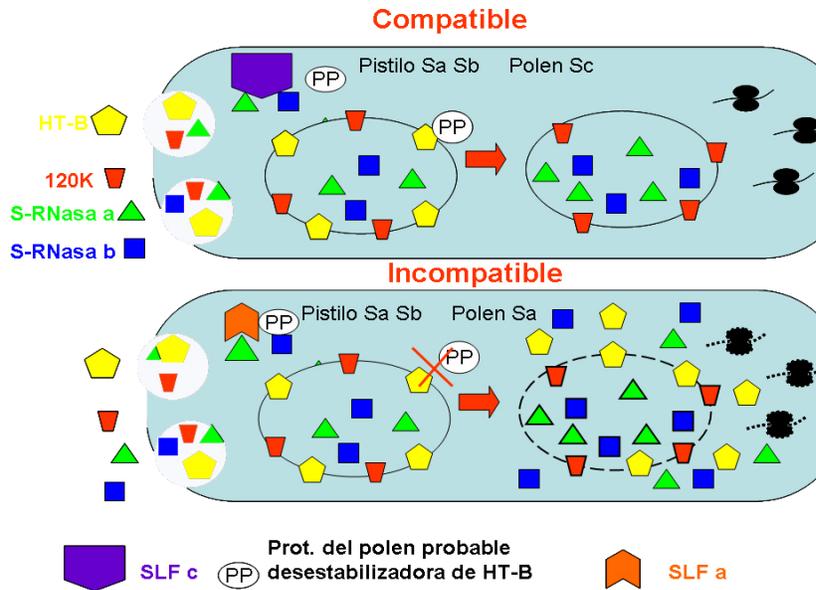


Figura 9. Modelo sobre el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen *S* específico en tubos polínicos compatibles e incompatibles en un sistema gametofítico. En una cruz compatible las proteínas estilares HT-B, 120K y las S-RNasas entran en una vacuola por endocitosis hacia el tubo polínico. HT-B y 120K se localizan en la membrana vacuolar delimitándola, una posible proteína del polen degradada a HT-B y la membrana vacuolar no se degrada, impidiendo que escapen las S-RNasas, por lo tanto no realizan su efecto citotóxico, de esta manera se lleva a cabo el rechazo del polen. En el caso de una cruz incompatible las proteínas estilares HT-B, 120K y las S-RNasas entra al tubo polínico desde la matriz extracelular de igual forma que en cruza compatibles, en el interior del tubo polínico la interacción de S-RNasa_a y SLF_a inhiben a la posible proteína del polen degradadora de HT-B, por lo tanto no interaccionan y HT-B no es degradada, la membrana vacuolar si es degradada, las S-RNasas salen para realizar su efecto citotóxico sobre el RNA del polen y por lo tanto se lleva a cabo el rechazo del polen. (Modificado de Goldraij *et al.*, 2006).

La proteína estilar 120K ya en la vacuola del tubo polínico donde se encuentra a la S-RNasa, se localiza delimitando el complejo vacuolar (Goldraij *et al.*, 2006) junto con HT-B. Sin embargo, se desconoce cómo participa en el rechazo del polen, sólo se sabe que es indispensable debido a que plantas transgénicas de *Nicotiana* con 120K silenciada pierden la capacidad de rechazar el polen de manera *S*-específica (Hancock *et al.*, 2005).

Con base en los antecedentes mencionados, es posible sustentar la interacción física entre HT-B y 120K en la membrana vacuolar donde se encuentran secuestradas las S-RNasas dentro del TP.

HIPÓTESIS

Debido a que las proteínas estilares HT-B y 120K son necesarias en el rechazo del polen y a que colocalizan en la vacuola del tubo polínico junto con las S-RNasas, es posible que HT-B y 120K interactúen físicamente como parte del mecanismo que conduce al rechazo del polen en *Nicotiana*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si las proteínas estilares HT-B y 120K interactúan físicamente.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✦ Inducir, sobreexpresar y purificar a la proteína recombinante HT-B en *E. coli*.
- ✦ Evaluar la interacción física entre HT-B y 120K.

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Transformación de células competentes *E.coli* BL21 codon plus.

Un vector de expresión es un sistema biológico que se utiliza en el proceso de la transferencia de un gen exógeno al interior de una célula, puede ser un virus o un plásmido que transporta una secuencia de DNA al interior de una célula huésped y allí dirige la síntesis de una proteína determinada.

En el laboratorio se cuenta con colonias de *E.coli* DH5 α transformadas con el vector pGEX-4T-2. Este vector está diseñado para que proteínas como HT-B puedan ser expresadas en *E. coli* y que su purificación se realice bajo condiciones no desnaturizantes. Además, cuenta con un gen marcador de resistencia a ampicilina (*Amp^r*). El cDNA de *HT-B* está fusionado al cDNA que codifica al extremo carboxilo de la glutatión S transferasa (GST), la cual es una proteína citoplasmática de 26 kDa.

El protocolo para la sobreexpresión de HT-B fusionada a GST es el siguiente:

- 1.-Añadir 3 μ l de plásmido a 100 μ l de células competentes.
- 2.-Incubar en hielo por 30 min.
- 3.-Incubar los tubos a 42 °C durante 3 min e inmediatamente pasarlos a hielo por 1 min.
- 4.-Añadir 4 volúmenes de medio SOC (Ver apéndice) a las células e incubar a 37°C durante 2 h con agitación a 14,000 g.
- 5.-Centrifugar a 14,000 g durante 30 s.
- 6.-Tirar el sobrenadante y añadir 100 μ l de medio LB
- 7.-Resuspender el botón celular.
- 8.-Sembrar en cajas con medio LB con ampicilina 100 μ g / ml.
- 9.-Incubar a 37°C durante toda la noche.

10.-Tomar una colonia de células transformantes y sembrar en 6 mL de medio LB líquido con Amp (100µg/ml) e incubar toda la noche a 37°C.

11.-Hacer alícuotas de 1mL de las células anteriores y congelar en medio LB con glicerol al 15%.

4.2 Inducción de la sobreexpresión de *HT-B*

Dado que HT-B es una proteína muy lábil, no es posible purificarla de estilos de *N. alata*, por lo que se indujo la sobreexpresión de HT-B recombinante fusionada a la GST. El producir esta proteína de fusión permite purificarla por cromatografía de afinidad utilizando una matriz de sepharosa con glutatión unido covalentemente (glutatión sepharosa).

Para sobreexpresar a HT-B y obtener altos rendimientos en la producción de esta proteína, se utilizó una cepa de *E.coli* denominada BL21 codon plus. Esta cepa contiene el gen *I* del bacteriófago T7 que codifica a la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, por lo que se puede inducir su expresión con isopropiltiogalactósido (IPTG), un análogo no hidrolizable de la lactosa (Carsten-Peter *et al.*, 2001).

Para realizar la sobreexpresión el protocolo es el siguiente:

- 1.-Tomar 15 µl del cultivo congelado en glicerol e inocular en 3 ml de medio 2xYTA (Ver apéndice).
- 2.-Incubar a 37° C con agitación a 14,000 g hasta que alcance una D.O. de A₆₀₀ 0.5 a 0.7 (2 a 3 h).
- 3.- Agregar a los cultivos IPTG a una concentración final de 0.1 mM y continuar la incubación de 2 a 3 h.
- 4.-Centrifugar por 5 min a 14,000 g y desechar el sobrenadante.
- 5.-Resuspender el botón bacteriano en 300 µl de PBS 1X (Ver apéndice) a 4°C. Guardar

10 µl de las células resuspendidas para analizarlas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE).

6.-Lisar a las células con amortiguador de lisis.

7.-Centrifugar a 14,000 g por 5 min para remover el material insoluble, el cual debe ser resuspendido en 300 µl de PBS 1X. Guardar 10 µl de ambas fracciones (material insoluble resuspendido y material soluble) para analizarlas por SDS-PAGE y conocer de ésta forma la localización de la proteína.

4.3 Comprobación de la sobreexpresión de HT-B

Se hicieron geles de poliacrilamida al 12.5 o 15 % para realizar un análisis por SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de PVDF a 150 mA y 100 V por 50 min para realizar la inmunodetección, en todos los casos se hizo un control teñido con azul brillante de Coomassie y/o nitrato de plata.

Las condiciones para la inmunodetección fueron las siguientes:

- 1.-Incubar las membranas en solución de bloqueo toda la noche a 4°C o 1 h a temperatura ambiente, con agitación suave.
- 2.-Desechar la solución de bloqueo y agregar el primer anticuerpo preparado en solución de bloqueo (Ver apéndice) (anti GST 1:2,000 o anti HT-B 1:20,000), incubar a 4°C con agitación suave toda la noche o 2 h a temperatura ambiente.

Nota: a partir de este punto no se deben dejar secar las membranas.

- 3.-Quitar el primer anticuerpo y lavar la membrana con PBS-T 1X dos veces por 5 y 10 min respectivamente.

Nota: el primer anticuerpo se puede reutilizar si se congela a -20°C.

- 4.-Agregar el segundo anticuerpo preparado en solución de bloqueo e incubar por 1 h

a temperatura ambiente con agitación suave.

Nota: como segundo anticuerpo se puede utilizar anticonejo acoplado a fosfatasa alcalina a un título de 1: 10,000 o anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano a un título de 1:40,000

5.-Hacer tres lavados de 10 min cada uno con PBS-T 1X (Ver apéndice PBS 10X).

6a.-Para revelar, en caso de haber utilizado el segundo anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina:

a) Incubar la membrana con buffer pH = 9.5 por 10 min (Ver apéndice).

b) En 10 ml de amortiguador pH = 9.5 agregar 100 µl de NBT y 100 µl de BCIP (Ver apéndice).

Agregar ésta solución a la membrana y revelar hasta que aparezcan bandas con la intensidad deseada.

c) Detener la acción de la fosfatasa alcalina con agua destilada y desionizada (dd) y EDTA.

6b.-Para revelar, en caso de haber utilizado el anticuerpo acoplado a peroxidasa de rábano:

a) Preparar la solución para revelado por quimioluminiscencia (Ver apéndice).

b) Introducir la membrana en la solución de revelado por 2 min.

c) Colocar la membrana dentro de un cassette.

d) Cortar una película del mismo tamaño de la membrana y colocarla encima de ésta.

Nota: a partir de este punto se debe trabajar en el cuarto oscuro con iluminación adecuada.

4.4 Tinción con nitrato de plata

La técnica de tinción con plata permite observar hasta 0.25 ng de proteína en los geles de poliacrilamida, mientras que con una tinción con azul de Coomassie se observan hasta 25 ng.

El protocolo es el siguiente:

- 1.-Incubar el gel con metanol al 50 % toda la noche.
- 2.-Hacer 3 lavados de 10 min cada uno con agua destilada desionizada (dd).
- 3.-Dejar el gel en agua dd toda la noche.
- 4.-Incubar el gel en 100 ml de metanol al 50% con 100 µl de formaldehído al 37% por 1.5 h.
- 5.-Quitar la solución y lavar rápidamente 3 veces con agua dd, realizar un cuarto lavado y dejar el gel en agua mientras se prepara la solución A, B y C (Ver apéndice).
- 6.-Desechar el agua y agregar la solución C.
- 7.-Agitar por 15 min a temperatura ambiente.
- 8.-Eliminar la solución C y lavar 3 veces con abundante agua dd durante 5 min cada vez.
- 9.-Durante el último lavado preparar la solución D (Ver apéndice).
- 10.-Agregar la solución D y dejar revelando hasta que aparezcan las proteínas.
- 11.-Detener la reacción de revelado con ácido acético al 10 % y metanol al 50%.

4.5 Sobreexpresión de HT-B a gran escala

Ya que se analizaron los resultados obtenidos a partir de la sobreexpresión de HT-B a pequeña escala y se tuvieron las condiciones estandarizadas, se realizó la inducción de la sobreexpresión a gran escala con el fin de obtener mayor cantidad de la proteína recombinante para hacer una posterior purificación y los ensayos de *pull down*.

El protocolo es el siguiente:

- 1.-Tomar 10 ml de cultivo congelado con glicerol e inocularlos en 1 L de medio 2xYTA, dividir el cultivo en dos matraces de 2 L para que la proporción sea de un 25% del volumen total del matraz y de ésta forma asegurar una aireación adecuada, incubar a 37° C con agitación constante por 3 h o hasta alcanzar una A_{600} de 0.5 a 0.7
- 2.-Agregar a los cultivos IPTG 100 mM a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión de HT-B y continuar la incubación por 2 h mas.
- 3.-Centrifugar el cultivo a 2,000 g por 10 min a 4°C para sedimentar las células.
- 4.-Desechar el sobrenadante.
- 5.-Resuspender el botón celular en 50 µl de PBS 1X a 4°C por cada ml de cultivo, por lo tanto se resuspende en 50 ml.
- 6.-Lisar a las células con un sonicador realizando 10 pulsaciones por periodos de 30s a una frecuencia de 20 a 30 MHz y manteniendo a las células en hielo (la solución se tornará un poco transparente) o bien lisar incubando por 30 min en el amortiguador de lisis (Ver apéndice).
- 7.-Agregar tritón X-100 a una concentración final de 1 % (partir de una solución al 20%). Mezclar suavemente durante 30 min para una mejor solubilización de la

proteína.

8.-Centrifugar a 8,000 g y guardar el sobrenadante.

4.6 Cuantificación de proteína por el método de Bradford

El método se basa en la unión del colorante ácido azul de Coomassie G-250 a la solución de proteínas, esto ocasiona un cambio en la coloración de la muestra en relación a la concentración de proteína. Cuando ocurre la unión del colorante con una proteína, la absorbancia máxima cambia de 465 a 595 nm por lo que la cuantificación se lleva a cabo leyendo la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 595 nm (Bradford, 1976). Los valores obtenidos son comparados con una curva patrón, lo que permite obtener la concentración de proteínas totales en la muestra

A continuación se muestra una tabla indicando las cantidades de los reactivos necesarios para realizar la curva patrón.

Tabla 1. Reactivos y cantidades necesarios para la curva de cuantificación de proteína por el método de Bradford.

BSA (mg/ml)	Agua dd (μl)	Reactivo de Bradford (μl)
0	800	200
2	798	200
5	795	200
10	790	200
15	785	200
20	780	200
25	775	200

4.7 Purificación de la proteína de fusión utilizando la resina glutatión sepharosa

La resina que se utilizó fue glutatión sepharosa 4B (Amersham Pharmacia Biotech AB), esta resina tiene unido de manera covalente al glutatión oxidado, la GST por su parte tiene gran afinidad por éste, por lo tanto, el complejo HT-B-GST se pega a la columna con gran

afinidad; las proteínas no específicas se eluyen de la resina con lavados en los que se varía la fuerza iónica.

Para recuperar a la proteína de fusión, es necesario eluirla por competencia con glutatión reducido, ya que éste último presenta mayor afinidad hacia el glutatión oxidado que hacia la GST. Al romper los enlaces disulfuro que se generan entre la GST y el glutatión oxidado de la resina, se libera la proteína de fusión.

La purificación de la proteína se efectuó a partir de la fase soluble del sonicado bacteriano.

El protocolo es el siguiente:

- 1.-Empacar una columna agregando 2 ml de glutatión sepharosa 4B por cada 100 ml de la fase soluble del sonicado.
- 2.-Lavar la resina con PBS 1X (1ml de PBS por cada 1.33 ml de resina) por 20 min con agitación continua a temperatura ambiente.
- 3.-Centrifugar a 14,000 g por 5 min para sedimentar la matriz y desechar el sobrenadante.
- 4.-Añadir a la resina 10 ml de PBS 1X por cada 1.33 ml de resina para que la resina quede diluida al 50 %
- 5.-Mezclar por inversión, centrifugar a 6,000 g por 5 min y desechar el sobrenadante.
- 6.-Añadir la fase soluble del sonicado bacteriano e incubar por 1 h a temperatura ambiente.
- 7.-Centrifugar a 6,000 g por 5 min, eliminar el sobrenadante (proteína no unida) y guardar una alícuota para analizarlo por SDS-PAGE.
- 8.-Lavar la resina con 1 ml de PBS 1X (2 veces).
- 9.- Lavar la resina con 1 ml de NaCl 200 mM

10.- Hacer un último lavado con 1 ml de PBS 1X, guardar alícuotas de cada uno de los lavados para analizarlos por SDS-PAGE.

Elusión de la proteína de fusión:

- 1.-Agregar 1 ml de amortiguador de elusión de glutatión reducido.
- 2.-Incubar por 10 min a temperatura ambiente con rotación continua.
- 3.-Centrifugar por 5 min a 6,000 g, guardar el sobrenadante (en esta fracción se encontrará la proteína de interés).
- 4.-Repetir el paso 1, 2 y 3 dos veces para recuperar la mayor cantidad de proteína posible.
- 5.-Para eliminar el glutatión reducido, pasar la fracción eluida de la resina por un centricon con una membrana que permita filtrar proteínas con un peso molecular menor o igual a 10,000 kDa. Dejar en un volumen final de 1 ml.

Para realizar una segunda purificación de la fracción parcialmente purificada anteriormente, es necesario volver a unirla a la resina, para ello se debe seguir el siguiente protocolo:

- 1.-Incubar por 1 h a temperatura ambiente la fracción obtenida en el paso 5 del protocolo antes mencionado junto con la resina de glutatión sepharosa, en una proporción igual al mencionado para la primera purificación (paso 1).
- 2.-Centrifugar a 6,000 g por 5 min y descartar la proteína no unida, guardar una alícuota para analizar por SDS-PAGE.
- 3.-Lavar con 1 ml de PBS 1X (2 veces).
- 4.-Agregar 1 ml de buffer de elusión para despegar al complejo GST-HT-B de la resina (3 veces).

5.-Pasar por un centrifugador con una membrana que permita filtrar proteínas con un peso molecular menor o igual a de 10,000 kDa. Concentrar a un volumen final de 1 ml.

La resina utilizada, puede ser regenerada de la siguiente manera (Manual Amersham Biosciences Glutathione Sepharose 4B)

- 1.-Lavar la columna añadiendo 4 volúmenes de hidróxido de sodio (NaOH) 0.5 - 1.0 M y dos volúmenes de agua dd.
- 2.-Desechar la solución anterior.
- 3.-Equilibrar con un volumen de agente antimicrobiológico (etanol al 20 % y acetato de sodio 0.2M).

4.8 Desalado y concentración de la proteína de fusión.

- 1.-Agregar 1 ml de PBS 1X a un centrifugador con una membrana que permita filtrar proteínas con un peso molecular menor o igual a 10,000 kDa.
- 2.-Centrifugar a 1,000 g por 30 min a 4°C.
- 3.-Desechar el PBS 1X eluido del centrifugador (fracción inferior).
- 4.-Agregar la proteína al centrifugador y centrifugar a 1,000 g por 30 min a 4 °C.
- 5.-Guardar la fracción que quedó retenida en el centrifugador (HT-B concentrada) y la que se eluyó para analizarlas por SDS-PAGE.

4.9 Ensayos de *pull down* entre las proteínas HT-B y 120K

El ensayo de *pull down* consistió en mantener pegada a GST-HT-B a la matriz de glutatión sepharosa y hacer pasar por ella a la proteína 120K. Se hicieron lavados con diferente

fuerza iónica para quitar las uniones no específicas. Se eluyó a GST-HT-B junto con la proteína 120K con un amortiguador con glutatión reducido y se analizó por SDS PAGE. Cabe mencionar que estos experimentos fueron acompañados de los controles pertinentes: a) un *pull down* utilizando únicamente GST para descartar que la proteína 120K retenida se uniera a GST y no a HT-B y b) un *pull down* utilizando la columna de glutatión sepharosa sin GST-HT-B para descartar que la proteína retenida se hubiera unido a la columna.

El protocolo es el siguiente:

- 1.-Incubar por 1 h a temperatura ambiente al complejo GST-HT-B (70 µg) con 10 µl de resina.
- 2.-Lavar 2 veces con 1 ml de PBS 1X cada vez.
- 3.-Lavar con 1 ml de NaCl (1M).
- 4.-Lavar con 1 ml de PBS 1X.
- 5.-Verificar por SDS-PAGE y Western blot que no se despegue el complejo de la resina, es decir, que no aparezca la proteína en los eluatos correspondientes a los lavados anteriores.
- 6.-Pasar 5 volúmenes de amortiguador por la columna.
- 7.-Incubar la resina con el complejo por 2 h a temperatura ambiente.
- 8.-Descartar la proteína no unida, guardar una alícuota para analizar por SDS-PAGE.
- 9.-Lavar 5 veces con 1 ml de amortiguador cada vez. No juntar los eluatos.
- 10.-Agregar 1 ml de amortiguador de elusión, incubar por 10 min a temperatura ambiente. Repetir 3 veces.
- 11.-Precipitar todas las fracciones con etanol absoluto a -20°C mínimo por 2 h y resuspender en 20 µl de agua dd.
- 12.-Analizar todas las fracciones por SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección con un anticuerpo anti 120K (1:10,000).

4.10 Estudio de las interacciones proteína-proteína entre HT-B y 120K, por el método de doble híbrido

Para corroborar la posible interacción encontrada por la técnica de *pull* down entre las proteínas estilares HT-B y 120K, se utilizó el sistema de doble híbrido (Y2H) en levaduras, el cual permite detectar interacciones proteína-proteína en un sistema *in vivo* como *Saccharomyces cerevisiae*. Esencialmente, el sistema permite detectar interacciones entre una proteína “anzuelo” y una proteína “presa”. La técnica Y2H está basada en que *S. cerevisiae* cuenta con varios factores transcripcionales que tienen en proteínas diferentes sus dominios de unión al DNA y el dominio de activación (Fields y Song, 1989), los cuales deben interactuar físicamente para activar la transcripción de genes reporteros. En este caso el Y2H se basa en el factor transcripcional de *Gal 4* y el promotor *Gal 4*. La cepa que se utilizó fue AH109 de *Saccaromyces cerevisiae*, la cual cuenta con tres genes reporteros (*ADE2*, *HIS3* y *MEL1*), que permiten seleccionar las colonias con interacciones positivas al conferir prototofía a adenina (*ADE*) e histidina (*HIS*) así como un color azul dado por la activación del gen *MEL1* que codifica para una α -galactosidasa, la cual es secretada al medio donde se encuentra su substrato, el X- α gal, que al ser hidrolizado origina un producto azul (Manual Matchmaker Library Construction y Manual Yeast Protocols). Para los ensayos de doble híbrido, se clonó el cDNA del extremo carboxilo de 120K en el vector pACT-2 (figura 10), donde se encuentra el dominio de activación de Gal4 y de esta manera sintetizar a C-120K fusionada a este dominio.

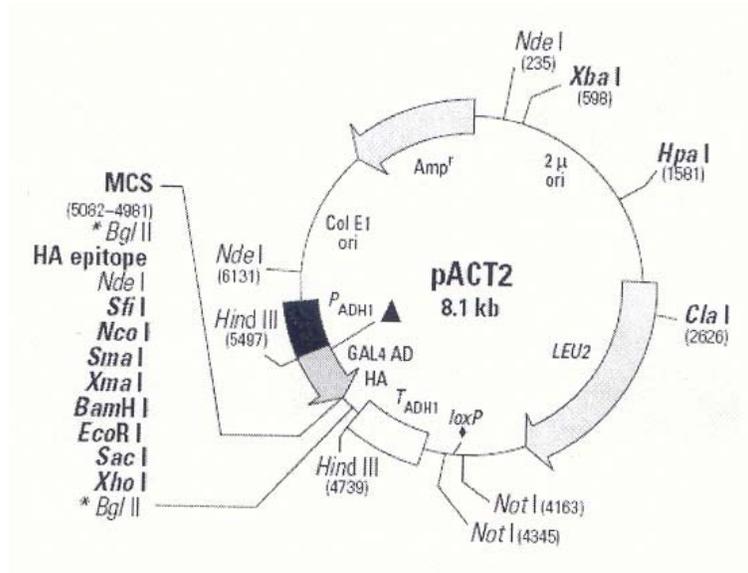


Figura 10. Vector pACT2. Este vector codifica al dominio de activación de GAL 4, tiene el gen *LEU2* que confiere prototrofia a LEU a las levaduras transformantes y un gen marcador que confiere resistencia a ampicilina (*Amp^r*). En el fue clonado el gen que codifica para la región del extremo carboxilo de 120K (C-120K) entre los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*.

Por otro lado ya se contaba con el gen que codifica para HT-B clonado en el vector pAS2-1, fusionado al dominio de unión al DNA (figura 11).

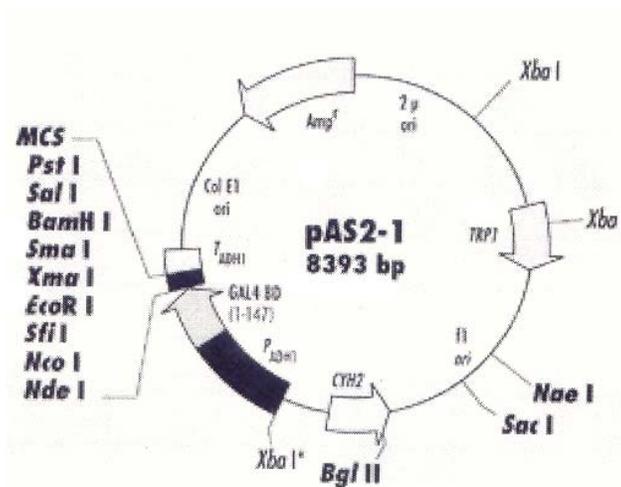


Figura 11 Vector pAS2-1. Contiene el dominio de unión al DNA, un gen marcador que confiere resistencia a ampicilina (*Amp^r*) y un gen que le da prototrofia a la levadura transformante para el TRP. En este vector ha sido clonado el gen que codifica para la proteína HT-B entre los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*.

Como control positivo se probó la interacción entre HT-B y la cinesina, cuyo gen fue clonado previamente en el vector pGADT7, el cual contiene el dominio de activación a GAL4 (figura 12).

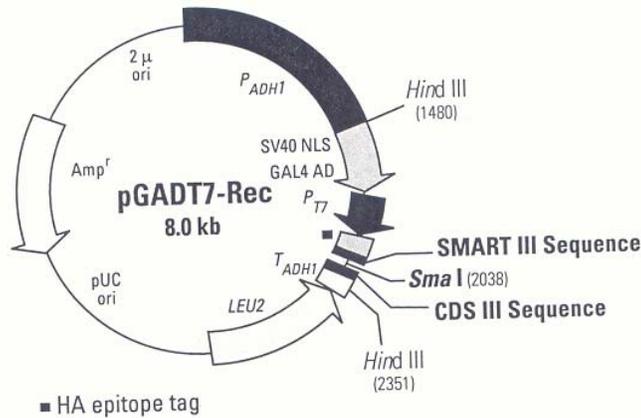


Figura 12. Vector pGADT7. Contiene el dominio de activación al DNA, un gen marcador de resistencia a ampicilina (*Amp^r*), y un gen que la da prototrofia a la levadura transformante para la LEU. En este vector ha sido clonado el gen que codifica para la cinesina (Control positivo interacción de la cinesina con HT-B).

Antes de clonar el C-120K en el vector pACT2, fue necesario clonarlo primero en el vector pGEM-T Easy (figura 13), para generarle los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*.

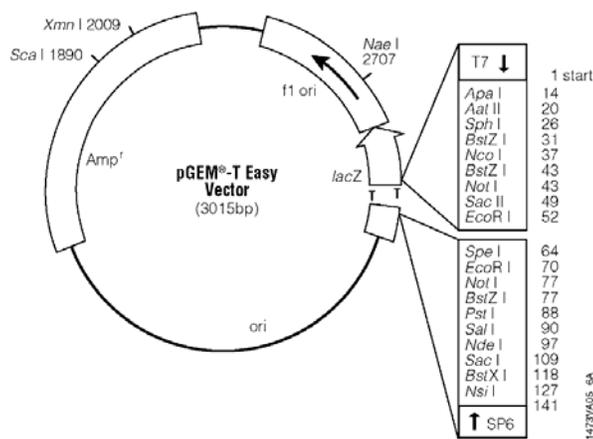


Figura 13. Vector pGEM-T Easy, donde se clonan directamente productos de PCR entre los sitios *EcoRI*. Además tiene resistencia a ampicilina.

Los oligonucleótidos que se diseñaron para amplificar por PCR al cDNA que codifica a C-120K entre los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI* fueron los siguientes.

Primers:

“FORWARD”: 5′ CATG**CCATGG**CCTCTAATCATCGTCGGCATGT 3′

“REVERSE”: 5′ CGC**GGATCC**GGTCTTTCTAATAATGAAGAGCTCG 3′

El tamaño del producto de la PCR esperado es de 469 pb.

Nota: El oligonucleótido “forward” tiene el sitio de restricción NcoI (negritas y subrayado), mientras que el oligonucleótido “reverse” incluye el sitio de restricción BamHI (negritas y subrayado). El diseño de los mismos fue parte de la realización de esta tesis, mientras que su síntesis la realizó la compañía Sigma.

El protocolo es el siguiente:

1.-Obtención de 120K en el vector pGEM.

- a) Hacer un PCR usando los oligonucleótidos diseñados anteriormente y como molde el cDNA de C-120K con el que ya se contaba. La mezcla de reacción que se utilizó se muestra en la tabla 2 y las condiciones de PCR pueden verse en la tabla 3.

Tabla 2. Volúmenes y concentraciones de cada uno de los reactivos utilizados para la amplificación del cDNA.

Reactivo	Volumen (µl)
DNA ¹	3
Oligo forward (10nM)	1
Oligo reverse (10nM)	1
Amortiguador PCR 10X	2.5
Taq polimerasa (5u/µl)	0.2
dNTP's (10mM)	0.5
MgCl ₂ (50mM)	1.25
H ₂ O	15.55

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación del cDNA de 120K.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
Desnaturalización inicial del DNA	94	1
Amplificación 40 ciclos Desnaturalización del DNA	94	0.5
Unión de oligonucleótidos al molde	56	1
Síntesis	72	1
Síntesis final	72	7

b) Fraccionar electroforéticamente el producto de PCR en un gel de agarosa, teñir con bromuro de etidio, cortar la banda y purificarla (Ver material y métodos purificación de DNA).

c) Verificar en otra electroforesis en gel de agarosa el cDNA de C-120K purificado.

d) Ligar el cDNA DE 120K puro al vector pGEM. La tabla 4 muestra los reactivos necesarios para la reacción de ligación.

Tabla 4. Condiciones para la reacción de ligado. Incubación a 37°C por 30 min.

Reactivo	Volumen (µl)
DNA (4ng/µl)	4
Vector (50ng/µl)	1
Enzima ligasa (3v/µl)	1
Buffer 2X (kit promega pGEM-T easy vector)	7.5
Agua dd	1.5
Volumen final de la reacción	15

e) Transformar *E.coli* DH5α con la reacción de ligación.

f) Sembrar en medio LB con Amp (100µg/ml), IPTG (0.5mM) y X-αgal (80µg/ml).

- g) Picar colonias blancas, sembrar en medio líquido selectivo a 37°C toda la noche y hacer extracción del plásmido a pequeña escala (minipreparaciones) (Kit Sigma) de cada una.
- h) Cortar el plásmido con la enzima de restricción *EcoRI*, separar en un gel de agarosa y verificar que el inserto cDNA liberado sea del tamaño esperado. En la tabla 5 se muestran los volúmenes de los reactivos necesarios para una reacción de digestión.

Tabla 5. Condiciones de la reacción de digestión con la enzima *EcoRI*. Incubación a 37°C por 2 h.

Reactivo	Volumen (µl)
DNA (4ng/µl)	8
Buffer 10X	1.1
BSA 10X	1.1
Enzima <i>EcoRI</i> (10u/µl)	0.3
Agua	0.5
Volumen final	11

2.-Obtención de C-120K con los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*.

- a) Liberar el cDNA de C-120K del vector pGEM por medio de una reacción de digestión. La tabla 6 muestra los volúmenes de los reactivos necesarios para la reacción de digestión.
- b) Realizar un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa para verificar que se haya liberado el cDNA de C-120K.
- b) Cortar la banda de DNA directamente del gel y purificarla. (Ver materiales y métodos purificación de DNA).

3.-Digestión del vector pACT con las enzimas *NcoI* y *BamHI*.

- a) Transformar *E.coli* DH5 α con el vector pACT.
- b) Hacer extracción de plásmido a gran escala (maxipreparaciones) (Ver materiales y métodos purificación de plásmido Maxiprep).
- c) Verificar la purificación y la cantidad obtenida de la maxipreparaciones por medio de un fraccionamiento electroforético en gel de agarosa.
- d) Cortar los sitios *NcoI* y *BamHI* en el vector, por medio de una reacción de digestión.
- e) Verificar por fraccionamiento electroforético que el plásmido se encuentre cortado en ambos sitios de restricción, para ello se realizan dos reacciones de digestión, cada una con una sola enzima.

Tabla 6. Condiciones de la reacción de digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI*

Reactivo	Volumen (μl)
DNA o vector	8
Buffer TA10X	1.5
Enzima <i>NcoI</i> (10u/ μ l)	1
Enzima <i>BamHI</i> 20u/ μ l)	1
BSA10X	1.5
Agua	2
Volumen final	15

*Nota: Para comprobar que ambas enzimas están cortando correctamente al vector, se corta con las enzimas por separado utilizando el amortiguador adecuado para cada una y los volúmenes se ajustan con agua. La BSA no es necesaria para la reacción de digestión con la enzima *NcoI*.*

4.-Clonación del cDNA de C-120K en el vector pACT.

- a) Ligar el cDNA de C-120K en el vector pACT (Ver tabla 4).
- b) Transformar *E.coli* DH5 α con la reacción de ligado y sembrar en medio LB con Amp (100 μ g/ml) para recuperar colonias transformantes.
- c) Seleccionar de 5 a 10 colonias y hacer minipreparaciones (Kit Sigma) para recuperar el DNA plasmídico.
- d) Digerir los plásmidos con las enzimas *NcoI* y *BamHI*
- e) Fraccionar electroforéticamente para verificar cuáles plásmidos liberaron un inserto del tamaño esperado.
- f) Seleccionar una clona positiva para realizar la cotransformación de las levaduras.

5.-Levaduras competentes.

- a) Estriar *Saccharomyces cerevisiae* AH109 en placa con medio YPDA (Ver apéndice).
- b) Incubar por 3 días a 30°C.
- c) Inocular una colonia en 3 ml de medio YPDA.
- d) Incubar a 30°C por 8 h con agitación.
- e) Transferir 5 μ l del cultivo en 50 ml de medio YPDA
- f) Incubar a 30°C con agitación por 16-20 hrs. (DO₆₀₀ 0.15-0.3)
- g) Centrifugar por 5 min a temperatura ambiente.
- h) Resuspender el botón celular en 100 ml de YPDA.
- i) Incubar a 30°C por 3-5 h (DO₆₀₀ 0.4-0.5).
- j) Centrifugar por 5 min a temperatura ambiente.
- k) Resuspender el botón celular en 60 ml de agua estéril desionizada.

- l) Centrifugar por 5 min a temperatura ambiente.
- m) Resuspender el botón celular en 3 ml de 1.1X TE/LiAc. (Ver apéndice).
- n) Dividir lo resuspendido en 2 tubos de 1.5 ml.
- ñ) Centrifugarlos por 15 seg a máxima velocidad en una microcentrífuga.
- o) Resuspender el botón en 600 µl de 1.1X TE/LiAc.

6.-Cotransformación.

- a) En un tubo de 105 ml mezclar:
 - 0.25-0.5 µg DNA (según el control, ya sea uno o los dos vectores)
 - 5 µl DNA acarreador (Nota: antes de mezclar, precalentar a 100°C por 5 min, pasar a hielo, repetir).
 - 50 µl de células competentes.
- b) Mezclar en un *vortex*.
- c) Agregar 0.5 ml de PEG/LiAc estéril (Ver apéndice).
- d) Mezclar en un *vortex*.
- e) Incubar a 30°C por 30 min, agitar el tubo cada 10 min.
- f) Agregar 20 µl de DMSO, mezclar.
- g) Incubar a 42°C por 15 min en baño de agua. Agitar con un *vortex* cada 5 min.
- h) Centrifugar por 15 s a velocidad máxima.
- i) Resuspender el botón celular en 1 ml de YPD plus estéril. (Ver apéndice).
- j) Incubar a 30°C por 90 min con agitación.
- k) Centrifugar por 15 s a velocidad máxima
- l) Resuspender el botón celular en 1 ml de NaCl 0.9 % estéril.
- m) Sembrar 100 µl de células en el medio apropiado para seleccionar aquellas que hayan sido transformadas.

La siguiente lista muestra los controles que se realizaron para la transformación de las levaduras y sus correspondientes medios mínimos de cultivo donde se sembraron.

<u>Vector</u>	<u>Prototrofia</u>
1.-pACT2 vacío-----	-LEU
2.-pAS2-1 vacío-----	-TRP
3.-pACT2 120K-----	-LEU
4.-pAS2-1 HT-B-----	-TRP
5.-pGADT7 cinesina -----	-LEU
6.-pACT2 – pAS2-1 vacíos-----	-LEU-TRP
7.-pACT2 120K + pAS2-1 HT-B-----	-LEU-TRP
8.-pGADT7 cinesina + pAS2-1 HT-B (control +) -----	-LEU-TRP
9.- pACT2–120K + pAS2-1 vacío-----	-LEU-TRP

Crece las levaduras transformadas en un medio mínimo (4DO): LEU -TRP -HIS –ADE para observar si existe interacción entre las proteínas HT-B y 120K, ya que si el control (número 7) crece en este medio, y los demás controles no, podemos concluir que la interacción es positiva.

4.11 Purificación de plásmido (Maxiprep)

- 1.-Precrecer la cepa en 2 ml de medio LB selectivo por 6 h aproximadamente.
- 2.-Inocular la cepa precrecida en 500 ml de medio LB empleando un matraz de 2.0 L y dejar creciendo en agitación continua por toda la noche.
- 3.-Centrifugar el cultivo a 4,000 g por 10 min a 4°C separando dos lotes de 250 ml.
- 4.-Resuspender cada pastilla con 5 ml de *solución I (GTE)* (Ver apéndice).
- 5.-Agregar 10 ml de *solución II (sol. de lisis alcalina)* (Ver apéndice) agitando suavemente hasta obtener una solución clara.
- 6.-Pasar la solución a tubos corex (50 ml) y añadir 7.5 ml de *solución III* (Ver apéndice). Mezclar por inversión.
- 7.-Incubar en hielo por 30 min.
- 8.-Centrifugar a 9,000 g por 10 min a 4°C.
- 9.-Colectar el sobrenadante en un tubo nuevo y adicionar 1 volumen de isopropanol frío
- 10.-Incubar a -20°C al menos 1 h.
- 11.-Centrifugar a 100,000 g por 15 min a 4°C.
- 12.-Descartar el sobrenadante y dejar secar la pastilla.

- 13.-Disolver la pastilla en 3 ml de H₂O.
- 14.-Adicionar 3 ml de LiCl 5M (previamente enfriado en hielo). Mezclar bien y centrifugar a 9,000 g por 10 min a 4°C.
- 15.-Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo. Adicionar un volumen igual de isopropanol absoluto (~6 ml). Mezclar bien y recuperar los ácidos nucleicos por centrifugación a 9,000 g por 10 min.
- 16.-Decantar cuidadosamente e invertir el tubo para que drene bien.
- 17.-Disolver la pastilla en 0.5 ml de H₂O que contenga 10 µl de RNasa (20 µg/ml) libre de DNasa. Transferir a un tubo de 1.5 ml e incubar a 37°C por 30 min.
- 18.-Adicionar 0.5 ml de NaCl 1.6 M que contenga PEG 8000 al 13% (w/v). Mezclar bien, recuperar el plásmido por centrifugación a 9,000 g por 5 min a 4°C en microfuga.
- 19.-Eliminar el sobrenadante y disolver la pastilla en 0.5 ml de H₂O.
- 20.-Agregar 0.5 ml de PCI (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1) y agitar con vortex.
- 21.-Centrifugar a máxima velocidad y recuperar la fase acuosa superior.
- 22.-Añadir 1/3 volumen de acetato de amonio 10 M y 2 volúmenes de etanol absoluto.
- 23.-Homogeneizar por inversión y conservar a -20°C al menos 1 h.
- 24.-Centrifugar a 14,000 g por 10 a 15 min.
- 25.-Descartar el sobrenadante y lavar 2 veces la pastilla con etanol al 70% (1 ml) frío y recuperar la pastilla en cada ocasión que se centrifugue de 2 a 5 min en microfuga.
- 26.-Secar la pastilla centrifugando con vacío (*speed back*).
- 27.-Resuspender en 200 µl cada pastilla. (Volumen final de plásmido: 400 µl).

4.12 Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.

- 1.-Preparar una columna con fibra de vidrio en un tubo de 1.5 ml.
- 2.-Introducir el pedazo de gel que contiene el cDNA en el tubo de 1.5 ml con la fibra de vidrio.
- 3.-Centrifugar por 7 min a 14,000 g.
- 4.-Recupera el filtrado.

- 5.-Dejar precipitando con 1/3 de volumen de acetato de amonio 10M, 2 volúmenes de etanol al 100% y 3 μ l de glucógeno toda la noche a -20°C .
- 6.-Centrifugar por 15 min a 14,000 g y recuperar el botón.
- 7.-Resuspender el botón en 10 μ l de agua dd.

RESULTADOS

5.1 Sobreexpresión de GST-HT-B

En nuestro laboratorio se contaba con el cDNA de HT-B clonado en marco con la proteína GST en el plásmido pGEX. La expresión de la proteína de fusión de GST-HT-B está bajo el control del promotor T7. La cepa que se utilizó fue *Escherichia coli* (*E. coli*) codon plus. Estas células contienen el gen que codifica para la T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac*, de esta forma, es posible inducir la expresión de estas proteínas utilizando al inductor IPTG (Isopropiltiogalactósido), un análogo no hidrolizable de la lactosa (Dabrowski y Kur, 1998).

El peso molecular de la proteína GST es de 26 kDa. Sin embargo, debido a los codones que se agregaron para la formación del sitio múltiple de clonación, antes del codón de término de la proteína, la GST que se obtiene es de 29 kDa y el peso de la proteína HT-B es de 7 kDa, por lo que el tamaño esperado de su fusión es de 36 kDa

Después de la transformación de células de *E.coli* BL21 con el plásmido pGEX, se seleccionaron colonias transformantes en un medio con ampicilina 100 μ M y con una de ellas se indujo la sobreexpresión de GST-HTB con IPTG.

Para la inducción se probaron diferentes tiempos de incubación, concentración de IPTG y velocidad de agitación (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de inducción de la proteína GST-HT-B.

Tiempo de incubación a 37°C (h)	Concentraciones de IPTG (mM)	Velocidad de agitación (g)
2	0.1	7
3	0.3	9
3.5	0.5	12

Después de analizar cada una de las variables, se conservaron las condiciones de 3h de incubación, a una velocidad de agitación de 9 g y con una concentración de IPTG de 0.1mM, ya que dieron los mejores rendimientos en la sobreexpresión. No se encontró diferencia entre las concentraciones de IPTG por lo que se decidió utilizar la menor concentración (Datos no mostrados).

Con las condiciones anteriores, se indujo la sobreexpresión de GST-HTB. Se recuperaron las células inducidas y con ellas se hicieron extractos protéicos que se separaron en solubles e insolubles, los cuales se separaron electroforéticamente para realizar inmunoanálisis de la proteína GST y de la quimera GST-HT-B, mediante el uso de anticuerpos específicos contra cada una de estas proteínas. Como control, se indujo la sobreexpresión de una clona que expresa a GST desde el vector pGEX.

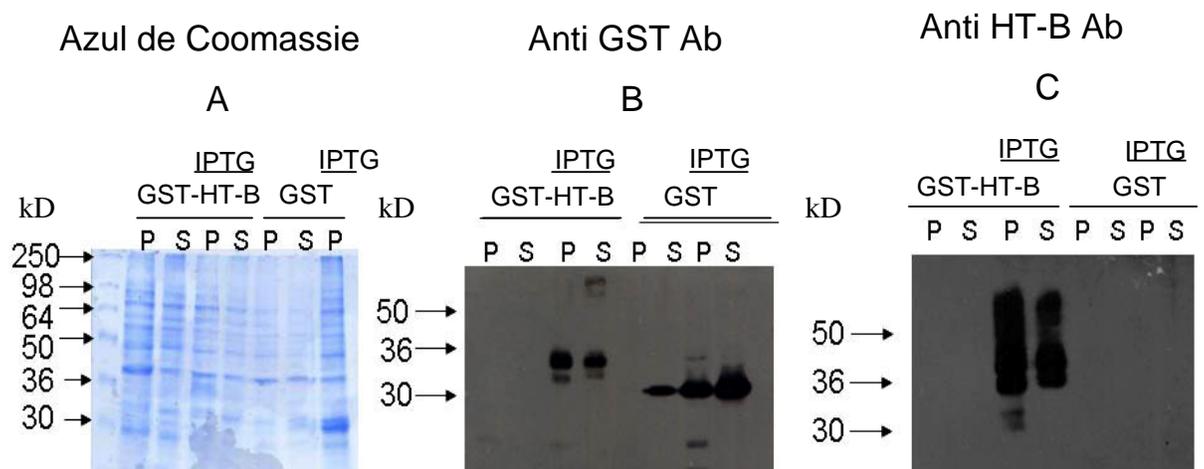


Figura 14. Sobreexpresión de GST-HT-B. Los extractos de proteína soluble e insoluble obtenidos por sonicación, fueron separados electroforéticamente en un gel de poliacrilamida desnaturalizante al 12.5 %, el cual fue teñido con azul brillante de Coomassie (A) transferidos a nitrocelulosa para inmunoanálisis con anticuerpos anti GST (B) o anti HT-B (C). P, fracción insoluble (pellet); S, fracción soluble; IPTG, proteína inducida con 0.1 mM de IPTG.

En la figura 14A se observa que en las fases protéicas soluble e insoluble hay una proteína con peso molecular aparente de 36 kDa, lo que indica que hay sobreexpresión de la proteína GST-HT-B cuando hay inducción por IPTG. En el control, también se observa la sobreexpresión de una proteína alrededor de los 29 kDa, la cual corresponde a la proteína GST. La proteína de 36 kDa es una fusión con GST, como lo indica la inmunodetección con el anticuerpo anti GST (Figura 14 B). Asimismo, en la figura 13C se confirma que la proteína que se sobreexpresó es GST-HT-B, ya que el anticuerpo anti HT-B detectó las mismas proteínas que el anticuerpo anti GST.

5.2 Sobreexpresión de GST-HT-B a gran escala

Una vez que se estandarizaron las condiciones de inducción de la sobreexpresión de la proteína GST-HT-B y del control (GST) fue necesario tener mayor cantidad de estas proteínas para llevar a cabo los experimentos posteriores. Para ello, se requirió sobreexpresar las proteínas a gran escala, manteniendo las condiciones probadas anteriormente.

En la figura 15 se muestra la inmunodetección de la proteína HT-B-GST con el anticuerpo anti GST (figura 15 A) y con el anticuerpo anti HT-B (figura 15B) después de la inducción de la sobreexpresión con IPTG de la proteína GST-HT-B.

Los resultados muestran una proteína con un peso molecular aparente de 36 kDa correspondiente a la proteína HT-B fusionada a GST.

En estos geles se puede apreciar mejor el patrón de expresión de la proteína de fusión (tres bandas alrededor de los 36 kDa) (panel B), para el caso de la proteína GST, la presencia de varias bandas se podría deber a que el anticuerpo se unió de manera inespecífica a otras proteínas de *E. coli*.

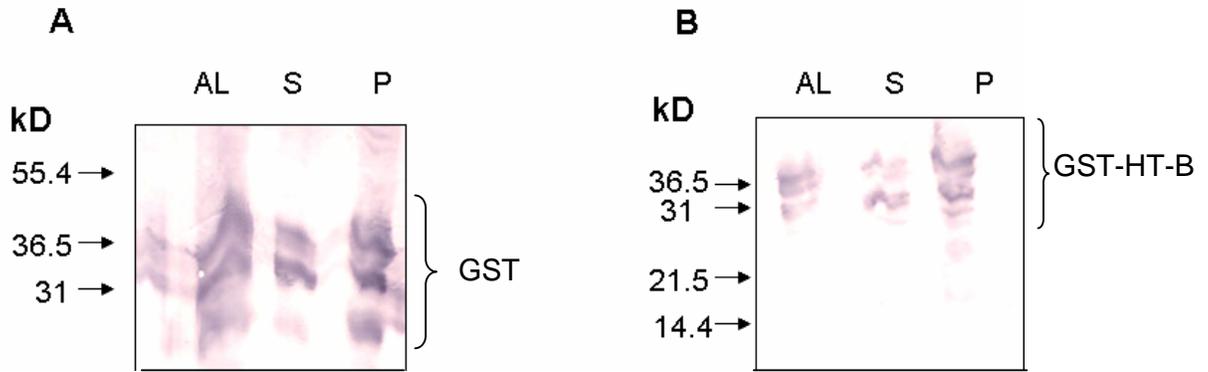


Figura 15. Sobreexpresión a gran escala de la proteína de fusión GST-HT-B. Inmunodetección de las proteínas A) GST y B) HT-B. Las proteínas de las fases solubles e insolubles fueron previamente separadas electroforéticamente, transferidas a una membrana PVDF y reveladas con un anticuerpo anti GST ó anti HT-B; AL, proteína antes de ser lisada; S, fracción soluble; P, fracción insoluble.

5.3 Purificación de la proteína de fusión

Una vez estandarizadas las condiciones de inducción de la sobreexpresión de la proteína de fusión GST-HT-B, se prosiguió a su purificación, por medio de una cromatografía de afinidad, utilizando la resina glutatión sepharosa.

La fase soluble del extracto proteico de GST-HT-B ó de GST obtenida después de inducir su sobreexpresión con IPTG, se pasó por la columna de afinidad de manera independiente, incubando ambos extractos con agitación constante. Después de la incubación, se obtuvo una fracción que se eluyó de la resina, la cual contenía a las proteínas que no se unieron (llamada fracción no unida). Para eliminar a las proteínas que se pegaron inespecíficamente a la resina, se hicieron lavados con NaCl. (Ver materiales y métodos); por último se recuperó a la proteína unida específicamente a la resina (GST-HT-B) por medio de la elusión con glutatión reducido.

Las proteínas unidas específicamente a la resina, la fracción no unida y los lavados, se analizaron en un SDS-PAGE. En la figura 16 (carriles 9 y 10) se muestra que la proteína HT-B se unió de manera mayoritaria y específica a la resina, ya que en estos carriles se observa de forma mas intensa una banda correspondiente a esta proteína en comparación a

las bandas presentes en los lavados o a las proteínas no unidas (carriles 1-8) fue necesaria una segunda purificación, debido a la presencia de proteínas de alto peso molecular (entre los 120 y 50 kDa). La proteína (GST) también se unió mayoritaria y específicamente a la resina (Figura 16 A, carriles 11 y 12), la proteína se observa por debajo de 31 kDa.

También se realizó una inmunodetección con el anticuerpo anti HT-B para corroborar que la banda observada en el SDS-PAGE fuera la GST-HT-B (Figura 16 B). Los resultados mostraron que la proteína de fusión se unió mayoritariamente a la resina (carriles 9 y 10), aunque también aparece en los lavados y en la proteína no unida a la resina, pero en menor cantidad.

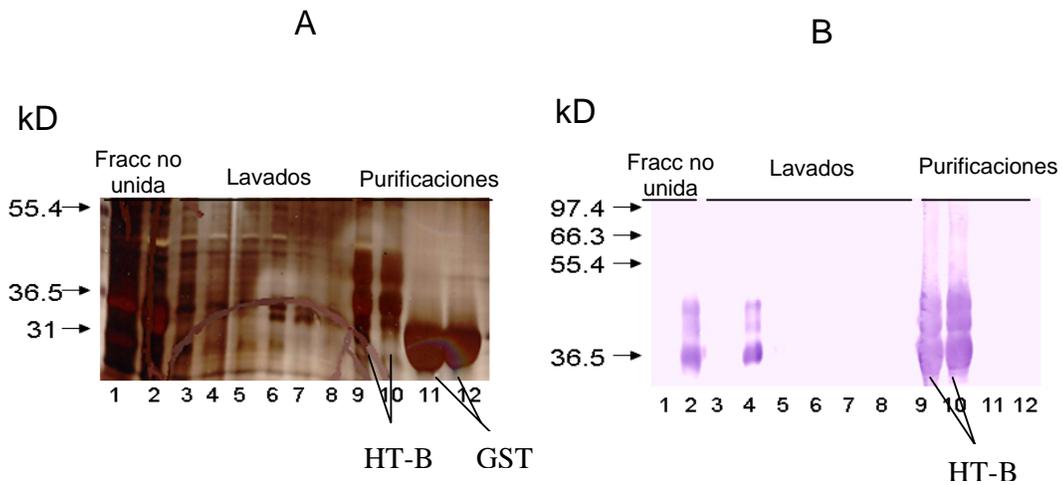


Figura 16. Purificación de la proteína de fusión GST-HT-B y de GST, por cromatografía de afinidad. A) Diferentes fracciones obtenidas en la purificación y fraccionadas por SDS-PAGE, el gel fue teñido con nitrato de plata. B) Inmunodetección de la proteína de fusión GST-HT-B y del control GST, las proteínas fueron previamente separadas electroforéticamente, transferidas a una membrana PVDF y reveladas con un anticuerpo anti HT-B. Carriles 1,3,5,7,9,10: corresponden a la proteína de fusión GST-HT-B; carriles 2,4,6,8,11,12 corresponden al control GST. Carriles 1-2, proteínas no retenidas a la resina; Carriles 3-8, lavados; Carriles 9-12, fracciones purificadas.

Para obtener a la proteína recombinante GST-HT-B con un mayor grado de pureza se realizó una segunda purificación de la proteína mediante una cromatografía de afinidad con glutatión sepharosa. En este caso se partió de las fracciones 9 y 10 mostradas en la figura 16.

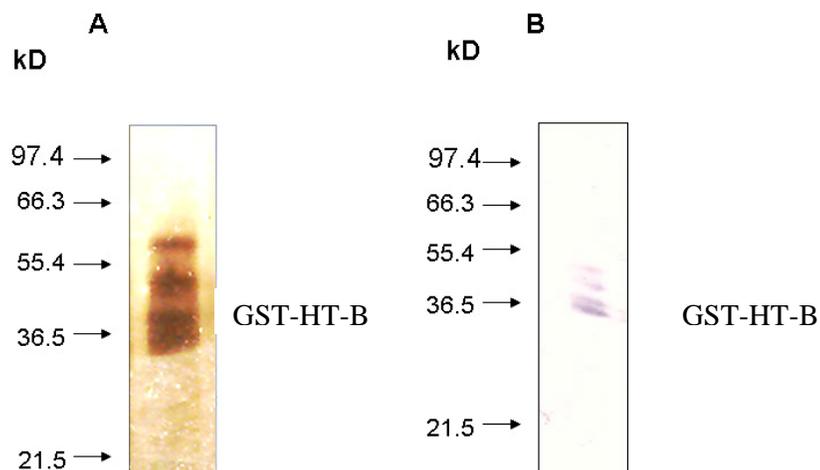


Figura 17. Segunda purificación de la proteína de fusión GST-HT-B, utilizando la resina glutatión sepharosa. A) SDS-PAGE al 15 % teñido con nitrato de plata; B) Inmunodetección de la proteína GST-HT-B, ésta fue previamente separada electroforéticamente, transferida a una membrana PVDF y revelada con anticuerpos anti HT-B.

La figura 17 muestra a la proteína HT-B con un alto grado de pureza después de una segunda purificación con la resina glutatión sepharosa. Se repitió el experimento de purificación de HT-B manteniendo las condiciones probadas en el experimento anterior.

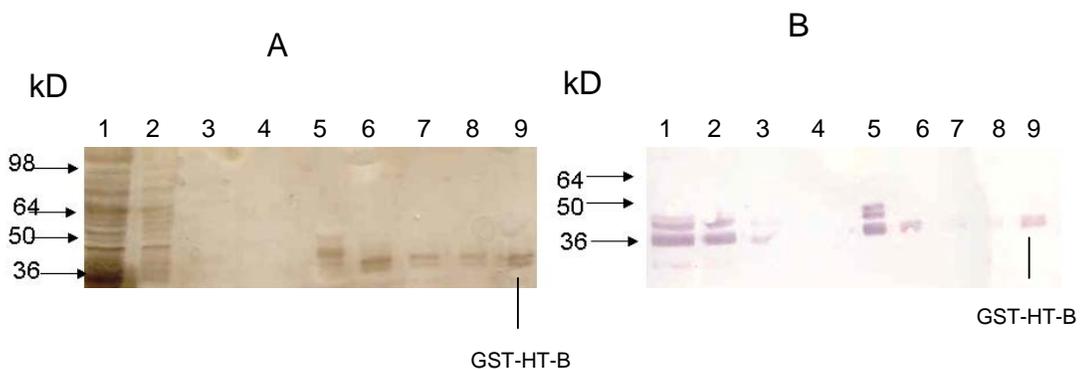


Figura 18. Reproducibilidad de la purificación de la proteína de fusión GST-HT-B; A) Diferentes fracciones de la purificación de GST-HT-B fraccionadas en un SDS-PAGE al 15 % teñido con plata B) Inmunodetección de la proteína HT-B. Las proteínas fueron previamente separadas electroforéticamente, transferidas a una membrana PVDF y reveladas con un anticuerpo anti HT-B. 1) proteína no unida a la resina; 2) lavado con PBS 1X; 3) lavado con 200 mM de NaCl; 4) lavado con PBS 1X; 5) elución con glutatión reducido; 6) proteína no unida a la resina; 7) lavado con PBS 1X; 8) elución con glutatión reducido; 9) proteína purificada y concentrada por filtración molecular.

En la figura 18 carril 9, se observa la banda que corresponde a la proteína GST-HT-B con el peso molecular de 36 kDa, después de dos purificaciones y concentración.

Se realizó el experimento a gran escala, para obtener mayor cantidad de proteína pura, el cual consistió en utilizar mayor cantidad de resina y pasar por ella también mayor cantidad de proteína, manteniendo una relación equivalente resina-proteína a la utilizada en la purificación a pequeña escala.

Los resultados de este experimento muestran una purificación casi a homogeneidad de las proteínas GST y GST-HT-B, ya que como se observa en el carril 9 de la figura 19 A y B, respectivamente, sólo existe una proteína predominantemente con un peso molecular aparente entre los 30 y 36 kDa.

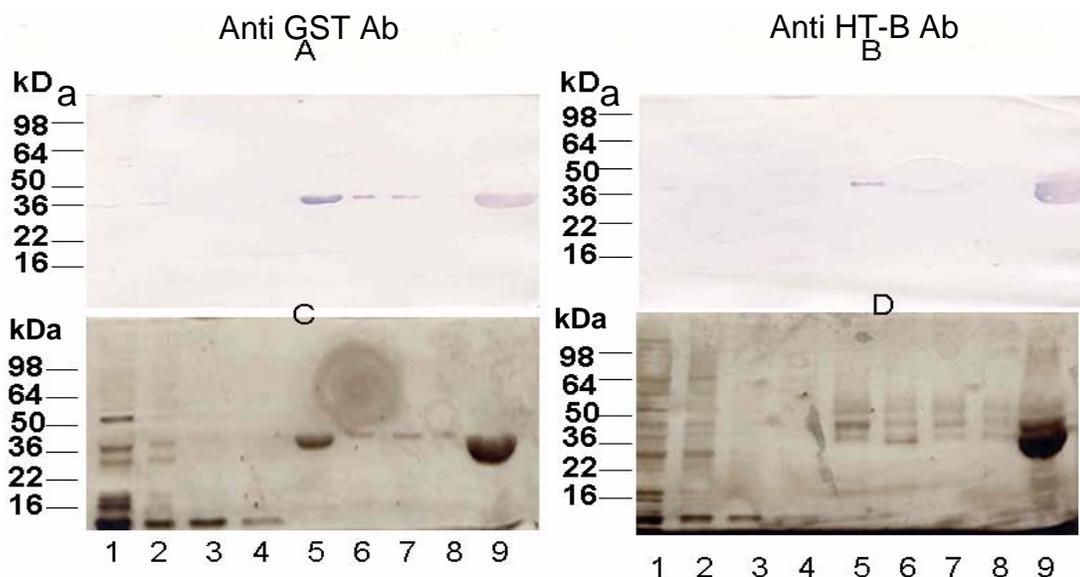


Figura 19. Purificación a gran escala de la proteína de fusión GST-HT-B y del control GST, utilizando la resina glutatión sepharosa. (A) y (B) Inmunodetección. Las proteínas fueron previamente separadas electroforéticamente, transferidas a una membrana PVDF y reveladas con el anticuerpo A) anti GST ó B) anti HT-B. (C) y (D) SDS-PAGE al 15 % teñido con nitrato de plata. 1) proteína no unida primera purificación; 2) lavado con PBS 1X primera purificación; 3) lavado con 200 mM de NaCl primera purificación; 4) lavado con PBS primera purificación; 5) glutatión reducido (GST-HT-B purificada) primera purificación; 6) proteína no unida segunda purificación; 7, lavado con PBS segunda purificación; 8; glutatión reducido (HT-B purificada) segunda purificación; 9, GST-HT-B purificada y concentrada con centrífuga de corte molecular de 10 kDa.

5.4. Ensayos de *pull down* entre las proteínas estilares HT-B y 120K

Para conocer si existe una interacción entre las proteína estilares HT-B y 120K, se llevaron a cabo ensayos de *pull down*, donde se utilizó como “anzuelo” a la proteína GST-HT-B unida a la resina de glutatión sepharosa y como proteína “presa” se utilizó a la proteína 120K semipurificada de estilos de *N. alata* (figura 20 A y B, electroforesis teñida con azul brillante de Coomassie e inmunodetección anti 120K, respectivamente) (Hernández-Navarro, no publicado). Es posible apreciar en la figura 20 D (carriles 4 y 5) que la proteína 120K se retiene específicamente en la columna de afinidad, ya que se libera el complejo GST-HT-B-120K después de la elusión con glutatión reducido, debido a que éste tiene mayor afinidad hacia el glutatión oxidado que está presente en la resina, el glutatión reducido rompe los enlaces disulfuro creados entre la GST-HT-B y el glutatión oxidado, liberando al complejo GST-HT-B-120K. Los eluatos se analizaron por SDS-PAGE (figura 20 C y D) y por inmunodetección (figura 20 E y F).

El control negativo consistió en la proteína GST unida a la resina (figura 20 C y E) para descartar que las interacciones ocurrieran con la GST y no con HT-B. En todos estos experimentos la inmunodetección se hizo con el anticuerpo anti 120K.

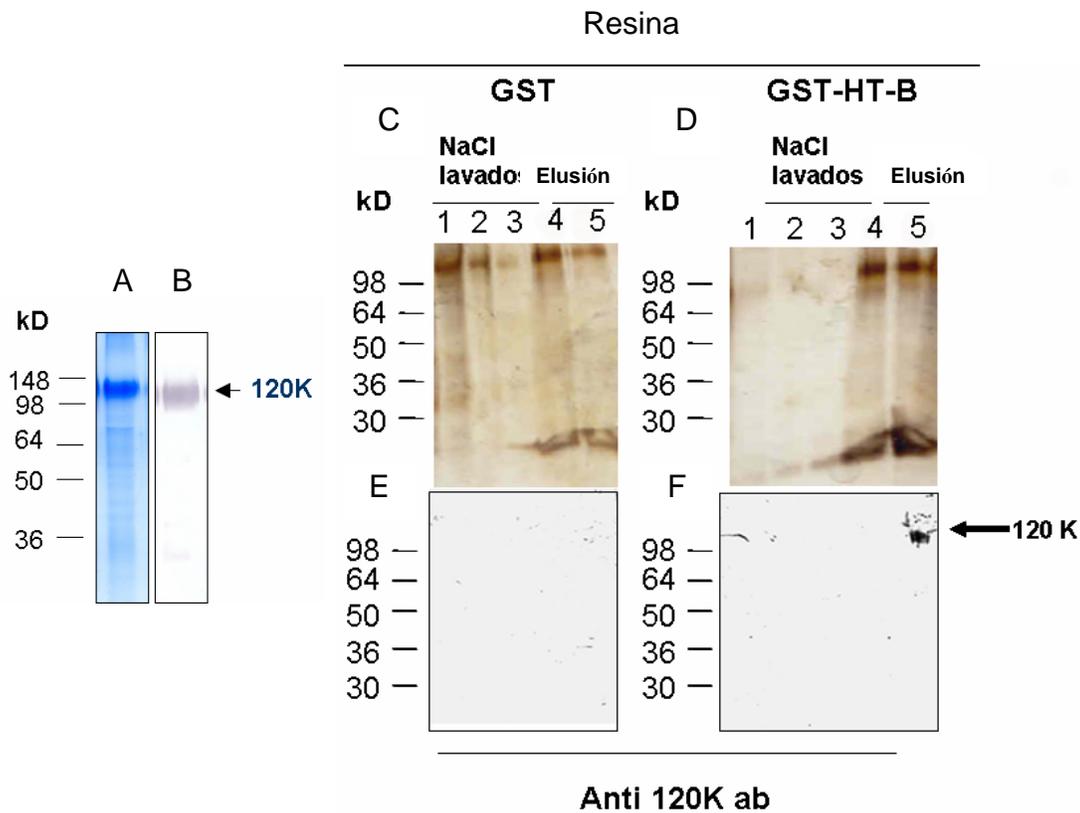


Figura 20. Ensayo de *pull down* entre las proteínas GST-HT-B y 120K. Las proteínas HT-B y 120K interaccionan *in vitro*. A) Fracción semi purificada de la proteína 120K fraccionada en un SDS-PAGE al 15 % teñido con azul brillante de Coomassie. B) Inmunodetección con un anticuerpo anti 120K. La fracción purificada de 120K fue incubada con la resina C) GST y D) GST-HT-B. Una vez recuperada la fracción no unida la columna fue lavada con diferentes concentraciones de NaCl (carriles 1, 2 y 3) y las proteínas retenidas específicamente eluidas con glutatión reducido (carriles 4 y 5). Las fracciones obtenidas fueron analizadas por SDS-PAGE al 15 % teñido con nitrato de plata y los geles transferidos a una membrana PVDF, para ser inmunoanalizados usando un anticuerpo anti 120K. En E) muestra el resultado de la inmunodetección con la resina GST y en F) la inmunodetección con la resina GST-HT-B para ver la interacción con 120K.

Los resultados anteriores muestran que por este método 120K es retenida en la columna de afinidad GST-HT-B, (Figura 20 F), sugiriendo que ésto ocurre por la interacción física de HT-B y 120K. Se puede decir de manera confiable que la interacción es específica porque el anticuerpo anti 120K no detecta ninguna proteína cuando la fracción purificada de 120K fue pasada por la columna de GST (Figura 20 E).

5.6 Estudio de las interacciones proteína-proteína entre HT-B y C-120K por el método de doble híbrido

Para este estudio se utilizó el sistema de doble híbrido en levaduras (Y2H), el cual permite detectar interacciones proteína-proteína en un sistema *in vivo* como *Saccharomyces cerevisiae*. Esencialmente, el sistema permite detectar interacciones entre una proteína “anzuelo” y una proteína “presa”. Como se mencionó en materiales y métodos, la técnica Y2H está basada en que *S. cerevisiae* cuenta con varios factores transcripcionales que tienen en proteínas diferentes sus dominios de unión al DNA y el dominio de activación (Fields y Song, 1989), los cuales deben interactuar físicamente para activar la transcripción de genes reporteros. En este caso el Y2H se basa en el factor transcripcional de *Gal 4* y el promotor *Gal 4*. La selección de las clonas de levadura donde ocurren las interacciones proteína-proteína es de tipo nutricional y se utilizó la cepa AH109 de *S. cerevisiae*, la cual no puede crecer en un medio sin leucina (LEU), adenina (ADE), histidina (HIS) y triptofano (TRP), si no hay interacciones proteína-proteína. Para este fin las levaduras se sembraron en un medio sin LEU, ADE, HIS ni TRP y con X- α -Gal, ya que la cepa AH109 codifica tres genes reporteros (*ADE*, *HIS* y *MEL1*) bajo el control del promotor de Gal4, cuya transcripción se activará si existen interacciones entre HT-B y 120K.

Para los ensayos de doble híbrido, se clonó el cDNA del extremo carboxilo de 120K en el vector pACT-2, para sintetizar a C-120K fusionada al dominio de activación de Gal4. Se utilizó el extremo carboxilo de 120K, debido a que es una proteína altamente glicosilada, excepto en el extremo carboxilo. Además, es una zona que está conservada respecto a otras proteínas estilares (TTS y PELP III) y a que Schultz *et al.* (1997) proponen esta región como posible sitio de interacción proteína-proteína, aunque con esto no se puede descartar que el resto de la proteína esté participando en las interacciones con otras proteínas.

Para este experimento se diseñaron oligonucleótidos con los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*, para su clonación en el vector pACT2.

El cDNA se amplificó por una PCR a partir de las clonas con que se contaba (C-120K en el vector pGEM) para posteriormente ligar el producto de PCR de nuevo al vector pGEM pero ahora con los sitios de restricción *NcoI* y *BamHI*. El tamaño del producto de la PCR de C-120K es de 469 pb. Al realizar la amplificación del cDNA, como se muestra en la figura 21, se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado.

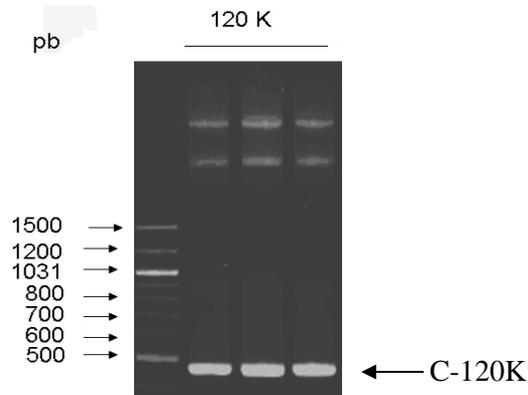


Figura 21. Amplificación por PCR del cDNA de C-120K. Fraccionamiento electroforético del producto de PCR en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

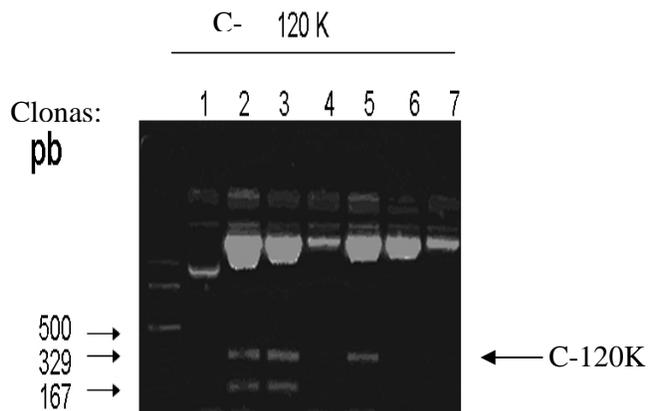


Figura 22. Reacción de digestión del cDNA de C-120K con la enzima *EcoRI*. Fraccionamiento electroforético de la reacción de digestión de las 7 clonas probadas en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

El cDNA de C-120K se clonó en el vector pGEM y su corroboración se realizó por análisis de restricción con *EcoRI*. Como se observa en la figura 22 las clonas 2 y 3 liberaron un inserto de 496 pb, el cual se observa como dos fragmentos, uno de 329 y otro de 167 pb, ya que el cDNA de 120K contiene un sitio interno *EcoRI*.

Una vez seleccionada una clona de C-120K –pGEM, se realizó una reacción de digestión de pACT-2 con las enzimas *NcoI* y *BamHI* ya que el cDNA C-120K incluye estos sitios en sus extremos. En la figura 23 se observa que después de esta digestión se liberó un cDNA de alrededor de 450 pb.

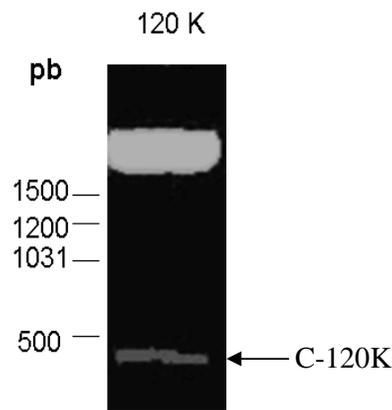


Figura 23. Reacción de digestión con las enzimas *NcoI* y *BamHI* de la clona 3 de C-120K. Fraccionamiento electroforético de la reacción de digestión en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

El cDNA C-120K con los extremos *NcoI* y *BamHI* se subclonó en el vector pACT2. En la figura 24 se muestra que la clona seleccionada libera un cDNA de alrededor de 450 pb, después de la doble digestión con *NcoI* y *BamHI*, un tamaño esperado para el cDNA C-120K.

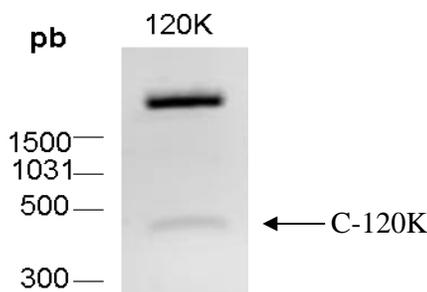


Figura 24. Reacción de digestión del vector pACT2/C-120K para liberar el inserto del cDNA de C-120K con las enzimas de restricción *NcoI* y *BamHI*. Electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % teñido con bromuro de etidio.

Una vez corroborado lo anterior, el cDNA C-120K se secuenció en el Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca Morelos para comprobar que éste se encontrara en marco de lectura con la proteína de activación de Gal4. En la figura 25 se muestra que el cDNA Gal4 se lee sin interrupciones en el marco de lectura C-120K, lo que indica que la proteína que se sintetizará será una quimera entre Gal4 y C-120K. En la figura 26 se muestra la secuencia de C-120K clonada en el vector pACT2 en lenguaje de aminoácidos.

```

120K_C-terminal -----AAGCCTCTAATCATCGT
120K pACT2      ATTTGGGCCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCCATGGCCTCTAATCATCGT
                  *****

120K_C-terminal CCGCCATGTTTCATTGCAAATCTTGCAACAGCAGAGGGCTTCCCACCTCTCT
120K pACT2      CCGCCATGTTTCATTGCAAATCTTGCAACAGCAGAGGGCTTCCCACCTCTCT
                  *****

120K_C-terminal ATAAAGCTTCCCACCTCCAGGGAGCTGTAGTGAAGCTAGTTTGTCACAAT
120K pACT2      ATAAAGCTTCCCACCTCCAGGGAGCTGTAGTGAAGCTAGTTTGTCACAAT
                  *****

120K_C-terminal AATGCAAGGAAGGCAAATGTTCAAACAGCGATGACAGACAAGAATGGTGA
120K pACT2      AATNCAAGGAAGGCAAATGTTCAAACAGCGATGACAGACAAGAATGGTGA
                  *** *****

120K_C-terminal ATTTCGTGATCATGCCCATGTCTTAACCAGAGCTGATGTTTACAAAATGCA
120K pACT2      ATTTCGTGATCATGCCCATGTCTTTAACCAGAGCAGATGTTTACAAAATGCA
                  *****

120K_C-terminal AGGTATACTTAGGGAATCACCCAAACCCATTTGCAATGTCCCAACAAC
120K pACT2      AGGTATACTTAGGGAATCACCCAAACCCATTTGCAATGTCCCAACAAC
                  *****

120K_C-terminal TTCAATGGTGAAAAATCTGGTGCTTTATTGAAACCTATCCTACCACCTAA
120K pACT2      TTCAATGGTGAAAAATCTGGTGCTTTATTGAAACCTATCCTACCACCTAA
                  *****

120K_C-terminal ACCACATGTTAACCCCTGGTCCTGGCCCTGTCCAGCCACCCATGTTTGATT
120K pACT2      ACCACCTGTTAACCCCTGGTCCTGGCCCTGTCCAGCCACCCATGTTTGATT
                  *****

```

```

120K_C-terminal      ATCATGGTGTGGACCTTTTATATTCGAAGCATCAAGCAAATTACCTTGC
120K pACT2          ATCATGGTGTGGACCTTTTATATTCGAAGCATCAAGCAAATTACCATGC
*****

120K_C-terminal      AAAAAATATTGATCGAGCTCTTCATTATTAGAAAGACCAAGTGGTAAAG
120K pACT2          AAAAAATNANTGAT-----
*****

```

Figura 25. Alineamiento de la secuencia original del extremo caboxilo de 120K y secuencia clonada en el vector pACT2. Nucleótidos sombreados con gris corresponden a los primers “forward” y “reverse” respectivamente.

```

      P L I I V G H V H C K S C N S R G L P T
1    cctctaatacatcgctcggccatggttcattgcaaatcttgcaacagcagagggttcccact 60
      L Y K A S P L Q G A V V K L V C H N N X
61  ctctataaagcttcccactccagggagctgtagtgaagctagttgtcacaataatnca 120
      R K A N V Q T A M T D K N G E F V I M P
121 aggaaggcaaatggtcacaacagcgatgacagacaagaatggtgaattcgtgatcatgccc 180
      M S L T R A D V H K C K V Y L G K S P K
181 atgtctttaaccagagcagatgttcacaaaatgcaaggtatacttagggaaatcacccaaa 240
      P I C N V P T N F N G G K S G A L L K P
241 cccatttgcaatgtcccaacaaacttcaatggtggaaaatctggtgctttattgaaacct 300
      I L P P K P P V N P G P G P V Q P P M F
301 atcctaccacctaaccacctgttaaccctggtcctggccctgtccagccaccatgttt 360
      D Y H G V G P F I F E A S S K L P C K K
361 gattatcatggtgttgaccttttatattcgaagcatcaagcaaattaccatgcaaaaaa 420

```

Figura 26. Secuencia de 120K pACT2 en lenguaje de aminoácidos.

Para realizar el ensayo de doble híbrido se requiere de una proteína “anzuelo” que en este caso fue HT-B fusionada al dominio de unión al DNA de Gal4. Esta construcción ya existía en el laboratorio en el vector pAS2-1, el cual confiere prototrofia a TRP. La proteína “presa” C-120K, se encuentra fusionada al dominio de activación de Gal4, en el vector pACT2, el cual confiere prototrofia a LEU.

Con las construcciones de Gal4-HT-B (pAS2-1) y de Gal4-120K (pACT2), se hizo una cotransformación de *S. cerevisiae* con estos vectores y/o otras construcciones como controles, tabla 7.

Tabla 7. Construcciones, medios de cultivo donde fueron sembradas y relación del crecimiento de las colonias.

Plásmido	Medio de cultivo	Crecimiento
pACT2 vacío	-LEU	SI
pAS2-1 vacío	-TRP	SI
pACT2 120K	-LEU	SI
pAS2-1 HT-B *	-TRP	SI
pGADT7 cinesina *	-LEU	SI
pACT2- pAS2-1 vacíos	-LEU-TRP	SI
pACT2 120K- pAS2-1 HT-B	-LEU-TRP	NO
pGADT7 cinesina- pAS2-1 HT-B	-LEU-TRP	SI
pACT2 120K- pAS2-1 vacío	-LEU-TRP	SI

*En el laboratorio ya se contaba con estas construcciones.

Como se observa en la tabla 7, es posible el crecimiento de colonias en los medios con el marcador prototrófico correspondiente cuando se utiliza la construcción pAS2-1-HT-B o pACT2-120K para transformar a *S. cerevisiae*, sin embargo, cuando se cotransforma con la construcción pAS2-1-HT-B/ pACT2-120K en el medio de selección TRP /LEU no hay crecimiento de colonias. Esto sugiere que podría existir un efecto tóxico debido a la coexpresión de las proteínas HT-B y C-120K. Esta citotoxicidad no ocurre cuando HT-B se cotransforma junto con pGADT7-cinesina, una proteína que sabemos interacciona específicamente (Ávila Castañeda, no publicado). Debido a estos resultados fue imposible evaluar la interacción de HT-B y 120K por el método de doble híbrido.

DISCUSIÓN

El proceso de autoincompatibilidad (AI) ha sido muy estudiado por muchos autores, y se conoce hoy en día gran información sobre el mecanismo de regulación del reconocimiento y rechazo del polen *S*- específico.

El principal objetivo de estos estudios es reconocer qué genes están involucrados en este mecanismo y cómo interaccionan entre ellos.

Se sabe que el locus *S* controla la especificidad del rechazo del polen tanto en la parte masculina como en la femenina. En él se codifica para una determinante femenina (S-RNasa) en el pistilo y una determinante masculina (SLF) en el polen. La interacción entre ambas determinantes es crucial para el rechazo del polen.

Se propone que las S-RNasas actúan como agentes citotóxicos *S*-específicos (McClure *et al.*, 1989). Esta hipótesis se basa en el hecho de que cuando se presenta la reacción de AI, el RNA del tubo polínico (TP) de *N. alata*, sobre todo el rRNA, es degradado (McClure *et al.*, 1990). Sin embargo, aún no se sabe el mecanismo preciso por cual las S-RNasas inhiben el crecimiento de los TPs autoincompatibles.

Debido a la relación de SLF con las ligasas E3, por su caja F, Qiao *et al.* (2004) propusieron que el mecanismo del rechazo del polen en *A. hispanicum*, involucraba la interacción *S*-específica entre SLF y las S-RNasas, para inducir la degradación de las ribonucleasas, vía el proteasoma 26S. Esta hipótesis fue evaluada por experimentos de interacción proteína-proteína por métodos bioquímicos y en levadura por doble híbrido. Los resultados mostraron que la proteína SLF puede interaccionar físicamente con las S-RNasas *in vitro*.

Por otro lado, se ha reportado la existencia de otros genes estilares (genes modificadores) que están involucrados en el rechazo del polen y sin los cuales este proceso no se llevaría a cabo. Entre ellos se encuentran los que codifican las proteínas HT-B, 120K, Nap11 y NaTTS, entre otros (Anderson y de Winton, 1986; Mather, 1985; Ai *et al.*, 1991; Brien *et al.*, 2001; Kao y Tsukamoto *et al.*, 2004; McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Cruz-García *et al.*, 2005).

El papel en la AI de las proteínas *HT-B* y *120K* se confirmó silenciando estos genes por técnicas de RNA antisentido y de RNAi en plantas transgénicas de *Nicotiana*. Cuando

estos genes fueron silenciados de manera independientemente, se observó que las plantas transgénicas pasaron de ser AI a AC. Además, se comprobó que el crecimiento de los TPs en los estilos de estas plantas no se afectó, lo que confirma claramente que *HT-B* y *120K* participan exclusivamente en la autoincompatibilidad sin afectar otros eventos de la polinización (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005).

La proteína 120K ingresa a los TPs no importando si son compatibles o incompatibles (Goldraij *et al.*, 2006). Asimismo, se ha observado que en cruzas compatibles y en etapas tempranas de la polinización de cruzas incompatibles, 120K se encuentra en la membrana de la vacuola donde se encuentran secuestradas las S-RNasas en el TP. Aunque en etapas tardías (36 h) de una polinización incompatible, 120K ya no se detecta en los TP's (Goldraij *et al.*, 2006). Estas evidencias hacen suponer que 120K se encuentra asociada a sistemas membranosos en el TP y que su participación en el rechazo del polen podría ser importante en la liberación de las S-RNasas de su compartimiento, mediante su asociación con algún factor del estilo o del polen que además funcione en coordinación con *HT-B*.

Un dato adicional que hace suponer la asociación de *HT-B* y 120K con sistemas membranosos, es que 120K y *HT-B* se encuentran en una fracción microsomal de tubos polínicos AI, de la cual solo pueden liberarse con NaCl la S-RNasa y 120K; mientras *HT-B* solo se solubiliza con ayuda de un detergente (McClure, comunicación personal).

No obstante, el mecanismo de acción de estos factores no ha sido esclarecido del todo, ya que el mecanismo del rechazo del polen es muy complejo. De esta manera los estudios actuales están dirigidos a responder preguntas acerca de ¿Cómo se asocian las S-RNasas, *HT-B* y 120K a los sistemas membranosos del TP?, ¿Cómo se estabiliza *HT-B* en el citoplasma de un TP incompatible?, ¿Cuál es el papel de 120K en el citoplasma de un TP incompatible?, ¿Existe alguna interacción física entre *HT-B* y 120K?

Actualmente, el grupo del Dr. Felipe Cruz está enfocado a responder estas preguntas, por lo que nos hemos dado a la tarea de estudiar los factores conocidos para establecer el mecanismo molecular por el cual estas proteínas actúan tanto en cruzas compatibles como incompatibles.

De esta manera, la pregunta abordada en la presente investigación fue responder concretamente si *HT-B* y 120K tienen la potencialidad de interactuar durante el rechazo

del polen, debido a su participación directamente en el rechazo del polen *S*-específico (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo este estudio fue necesario inducir y sobreexpresar a la proteína HT-B fusionada a la proteína GST y de esta manera contar con una gran cantidad de proteína recombinante, ya que la proteína HT-B nativa presenta fuertes problemas en su purificación a partir de estilos de *N. alata*, debido a que es una proteína muy lábil (Cruz-García, datos no publicados).

El producir a HT-B fusionada a GST nos permitió purificarla relativamente rápido, por cromatografía de afinidad utilizando una matriz de glutatión agarosa. Además, el tener una proteína de fusión facilita la solubilización de la proteína y su producción en grandes cantidades (Figuras 16, 17 y 18).

Durante el desarrollo de esta investigación se probaron varias condiciones de inducción de la proteína recombinante, y se eligieron aquellas que proporcionaron mayores rendimientos. En el caso de la concentración del inductor (IPTG), se eligió la menor, ya que en todas las concentraciones probadas se obtuvieron cantidades similares de la proteína.

En la inmunodetección con el anticuerpo anti HT-B siempre se observó un patrón de expresión similar en todos los experimentos, la aparición de tres bandas protéicas alrededor de los 36 kDa. Al principio se pensó que la proteína recombinante sufría degradación, ya que se sabe que *in vivo* ocurre su degradación en cruza compatibles, o que el anticuerpo estaba reconociendo a otras proteínas. Esta hipótesis se analizó disminuyendo el título del anticuerpo para verificar si desaparecían las bandas de mayor y menor peso molecular (Datos no mostrados).

Con respecto a la purificación, fue necesario pasar por la columna de glutatión sepharosa varias veces a la proteína de fusión, debido a que no se obtenía con un alto grado de pureza en las primeras purificaciones.

En estos experimentos también se probaron varias condiciones de purificación, se variaron las soluciones de lavado, cambiando la fuerza iónica para despegar y eliminar a la mayor cantidad de proteínas no específicas.

Uno de los principales obstáculos que se presentaron en la purificación de HT-B recombinante y en la separación electroforética de las proteínas en los geles de SDS-

PAGE fue el exceso de NaCl en los eluatos, ya que los lavados se hicieron con altas concentraciones de esta sal y al momento de la tinción de los geles se observaba un barrido en todas las muestras la cual ocasionaba una difícil identificación de la proteína de interés. El problema fue resuelto disminuyendo la concentración de NaCl y aumentando el número de lavados, además se hizo una filtración molecular para desalar y concentrar a la proteína. Ya establecido el protocolo de purificación y que se obtuvo a la proteína HT-B pura y en cantidades aceptables debido a la realización de purificaciones a gran escala, se realizaron ensayos de *pull down* entre HT-B y 120K. Aquí se utilizó como “anzuelo” a la proteína HT-B fusionada a GST, que se uniera específicamente a la resina de glutatión sepharosa y como proteína “presa” se utilizó a la proteína 120K semipurificada de estilos de *N. alata*. Se hicieron lavados con diferente fuerza iónica para eliminar las uniones no específicas y el complejo retenido específicamente en la columna se eluyó con glutatión reducido. Los eluatos se analizaron por SDS-PAGE, Western blot e inmunodetección (Figura 20).

Cabe mencionar que se utilizó a la proteína 120K semipurificada debido a que en el extracto existe otra proteína con un peso molecular muy parecido, pero no afectó su presencia en este experimento.

En la inmunodetección con el anticuerpo anti 120K, se determinó que 120K se retuvo en la columna de afinidad GST-HT-B (Figura 20 D), indicando que estas proteínas interactúan *in vitro* físicamente bajo las condiciones utilizadas.

Este resultado es muy importante en la búsqueda de la integración del modelo de rechazo del polen, debido a que no se conoce a ciencia cierta cómo los productos de los GMs estilares ayudan a la determinante femenina a la degradación del RNA de los TPs incompatibles. Si la interacción entre 120K y HT-B ocurre *in vivo* durante el rechazo del polen, podría establecerse que esta interacción es parte del mecanismo, probablemente participando en la vía de la ruptura de la vacuola donde se encuentran las S-RNasas en el TP.

La interacción entre 120K y HT-B determinado por el método de *pull down*, se trató de evaluar por otra metodología por la técnica de doble híbrido, no obstante, nuestros resultados mostraron que el crecimiento de las levaduras fue imposible en la cotransformación con pACT /120K y pAS /HT-B.

Esto sugiere que podría existir un efecto tóxico entre las proteínas HT-B y 120K

Existe información acerca de la toxicidad de algunas proteínas como las ciclinas o productos del gen *homeobox*, las cuales pueden llegar a ser tóxicas cuando son expresadas y enviadas al núcleo de las levaduras (Van Criekinge *et al.*, 1999). Zhong *et al.*, (2003) demostraron que la proteína CycEI de *Drosophila* es tóxica en levaduras y que cuando en el sistema de Y2H la proteína de unión al DNA está bajo el control del promotor ADHI, ésta resulta tóxica para la levadura, como es el caso de la proteína HT-B. Una de las formas para resolver este problema sería utilizando el promotor MAL62, el cual es reprimido por glucosa e inducido por maltosa (Finley *et al.*, 2002); sin embargo, en nuestro caso no contamos con el promotor *MAL62*.

CONCLUSIONES

- ✦ Las proteínas estilares HT-B y 120K interactúan físicamente *in vitro*.
- ✦ La coexpresión de HT-B y el extremo carboxilo de 120K fusionadas al dominio de activación al DNA de Gal4 causa la muerte de *S. cerevisiae*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ai, Y. J., E. Kron, and T. H. Kao. 1991 *S*-alleles are retained and expressed in a self compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol.Gen.Genet.* 230: 353-358.
- Anderson M.A., E. C Cornish , S. L. Mau, E. G. Williams, R. Hoggart, A. Atkinson I. Bonig, B. Grego, R. Simpson, P. J. Roche, J. D. Haley, J. D. Penschow, H. D. Niall, G. W. Tregear, J. P. Coghlan, R. J. Crawford y A. E. Clarke. 1986. Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature.* 321: 38-44.
- Athanasiou A., F. Tamari, J. S. Shore. 2001. Pollen tube growth and inhibition in distylous and homostylous *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Can.J.Bot.* 79: 578-591.
- Bai. C., Elledge S. J. Verna y Marrs McLean.1997. Gene identification using the yeast two hybrid sistem. *Methods Enzymol.* 283: 151-156.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brian, B., D. Zurek, B. McClure. 2001. Effects of RNases on rejection of pollen from *Nicotiana tabacum* and *N. plumbaginifolia*. *Sex. Plant Rep.* 14: 69-76.
- Broothaerts, W., G. A. Janssens, P. Proost y W. F. Broekaert. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Mol.Biol.* 27.3: 499-511.
- Buitink, J., O. Leprince, y F. A. Hoekstra. 2000. Dehydration-induced redistribution of amphiphilic molecules between cytoplasm and lipids is associated with desiccation tolerance in seeds. *Plant. Physiol* 124: 1413-1426.
- Carsten-Peter. 2001. Gene expression protocols. *Methods in Molecular Biology* 205: 225-234.
- Chaudhury, A. M., S. Craig, E. Dennis, W. Peacock. 1998. Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 1: 26-31.
- Cheung, A. Y., H. Wang, y H. M. Wu. 1995. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell* 82: 383-393.
- Clark, A. G. y T. H. Kao. 1991. Excess nonsynonymous substitution of shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 9823-9827.

- 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. U.S.A 76: 3358-3362.
- Cresti, M., C. J. Keijzer, A. Tiezzi, F. Ciampolini, S. Focardi. 1986. Stigma of *Nicotiana*: Ultrastructural and Biochemical Studies. American Journal of Botany. 73: 1713-1722.
- Cruz-Garcia, F., C. N. Hancock, y B. McClure. 2003. S-RNase complexes and pollen rejection. J. Exp. Bot. 54: 123-130.
- Cruz-Garcia, F., C. N. Hancock, D. Kim y B. McClure. 2005. Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. Plant J. 42: 295-304.
- Dabrowski, S. y J. Kur. 1998. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant his-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei*. Protein Expr.Purif. 14: 131-138.
- Dickinson, H. G., M. J. Crabbe, y T. Gaude. 1998. Pollen-stigma interactions in *Brassica*. Symp. Soc. Exp. Biol. 51: 51-57.
- de Nettancourt D. 2001. Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag. 322 pp. 2nd ed.
- Dominguez, E. 2004. Pollen sporopollenin: degradation and structural elucidation. Sex. Plant Rep. 12: 171-178.
- Dong, J., S. T. Kim, y E. M. Lord. 2005. Plantacyanin plays a role in reproduction in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 138: 778-89.
- Edlund, A. F., R. Swanson, y D. Preuss. 2004. Pollen and stigma structure and function: the role of diversity in pollination. Plant Cell 16 Suppl: S84-S97.
- Finley, R. L., Jr., H. Zhang, J. Zhong, C. A. Stanyon. 2002. Regulated expression of proteins in yeast using the MAL61-62 promoter and a mating scheme to increase dynamic range. Gene 285: 49-57.
- Franklin-Tong, N. V. y F. C. Franklin. 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. Trends Plant Sci. 8: 598-605.
- Franklin-Tong, V. E. 1999. Signaling in pollination. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 490-495.
- Franklin-Tong, V. E. y F. C. Franklin. 2000. Self-incompatibility in *Brassica*: the elusive pollen S gene is identified. Plant Cell 12: 305-308.
- Franklin-Tong, V. E. y F. C. Franklin. 2003. The different mechanisms of gametophytic self-incompatibility. Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol.Sci. 358: 1025-1032.

- Gaget, M., C. Said, C. Dumas y R. B. Knox. 1984. Pollen-pistil interactions in interspecific crosses of *Populus* (sections Aigeiros and Leuce): pollen adhesion, hydration and callose responses. *J. Cell Sci.* 72: 173-184.
- Galichet, A. y W. Gruissem. 2003. Protein farnesylation in plants conserved mechanisms but different targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 530-535.
- Gasser, C. S. y K. Robinson-Beers. 1993. Pistil Development. *Plant Cell* 5: 1231-1239.
- Gaude, T. y S. McCormick. 1999. Signaling in pollen-pistil interactions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 139-147.
- Goldberg, R. B., T. P. Beals, y P. M. Sanders. 1993. Anther development: basic principles and practical applications. *Plant Cell* 5: 1217-1229.
- Goldraj, A., K. Kondo, C. N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vázquez-Santana, S. Kim, T. E. Philips, F. Cruz-García y B. McClure. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805-810.
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D.D, Goring DR. 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:382-387.
- Hancock, C. N., L. Kent, y B. A. McClure. 2005. The stylar 120 kDaa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43: 716-723.
- Heizmann. D., D. T. Luu y C. Dumas. 2000. Pollen stigma adhesion in the Brassicaceae. *Annal of Botany* 85: 23-27.
- Heslop-Harrison, J. y Y. Heslop-Harrison. 1985. Surfaces and secretions in the pollen-stigma interaction: a brief review. *J. Cell Sci. Suppl* 2: 287-300.
- Hua, Z. y T. H. Kao. 2006. Identification and characterization of components of a putative *Petunia S*-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 18: 2531-2553.
- Ioerger, T. R., A. G. Clark, y T. H. Kao. 1990. Polymorphism at the self-incompatibility locus in Solanaceae predates speciation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 87: 9732-9735.
- Juarez-Diaz J.A., McClure B., Vazquez-Santana S., Guevara-Garcia A., Leon-Mejia P., Marquez-Guzman J., and Cruz-Garcia F. 2006. A novel extracellular thioredoxin *h* from *N. alata* reduces S-RNases. *J. Biol. Chem.* 281:3418-3424.
- Kao, T. H. y A. G. McCubbin. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 93: 12059-12065.

- Kao, T. H. y T. Tsukamoto. 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* 16: S72-S83.
- Karunanandaa, B., S. Huang, y T. Kao. 1994. Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *Plant Cell* 6: 1933-1940.
- Kim, S., J. C. Mollet, J. Dong, K. Zhang, S. Y. Park, y E. M. Lord. 2003. Chemocyanin, a small basic protein from the lily stigma, induces pollen tube chemotropism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100: 16125-16130.
- Kipreos, E. T. y M. Pagano. 2000. The F-box protein family. *Genome Biol.* 1: 3002-3007.
- Kusaba M, Dwyer K, Hendershot J, Vrebalov J, Nasrallah JB, Nasrallah M. 2001. Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the S locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell* 13:627-643.
- Lai, Z., W. Ma, B. Han, L. Liang, Y. Zhang, G. Hong y Y. Xue. 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.
- Lind, J. L., A. Bacic, A. E. Clarke, M.A. Anderson. 1994. A style-specific hydroxyproline-rich glycoprotein with properties of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant J.* 6: 491-502.
- Mather, N. D., 1985. Sexually localized expression of pseudo-self compatibility (PSC) in *Petunia X hybrida* Hort. *Theo Appl. Gen.* 10: 578-584.
- McClure, B. 2004. S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell* 16: 2840-2847.
- McClure, B. A., B. Mou, S. Canevascini y R. Bernatzky. 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 13548-13553.
- McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama y A. Clarke. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature* 342: 955-957.
- McClure B.A., Gray J.E., Anderson M.A., and Clarke A.E. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature* 347: 757-760.
- McCubbin AG, Kao T. H.. 2000. Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:333-364.

- Murase K, Shiba H, Iwano M, Che F-S, Watanabe M. 2004. A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* 303:1516–1519.
- Muzzurco M, Sulaman W, Elina H, Cock J. M, Goring D. R. 2001. Further analysis of the interactions between the *Brassica S* receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* 45:365–376.
- Nersissian, A. M., C. Immoos, M. G. Hill, P. J. Hart, G. Williams, R. G. Herrmann y J. S. Valentine. 1998. Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytoeyanins: plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Sci.* 7: 1915-1929.
- Nersissian, A. M., Z. B. Mehrabian, R. M. Nalbandyan, P. J. Hart, G. Fraczkiwicz, R. S. Czernuszewicz, C. J. Bender, J. Peisach, R. G. Herrmann y J. S. Valentine 1996. Cloning, expression, and spectroscopic characterization of *Cucumis sativus* stellacyanin in its nonglycosylated form. *Protein Sci.* 5: 2184-2192.
- Newbigin, E. y M. K. Uyenoyama. 2005. The evolutionary dynamics of self-incompatibility systems. *Trends Genet.* 21: 500-505.
- O'Brien, M., C. Kapfer, G. Major. M. Laurin, C. Bertrand, K. Kondo, Y. Kowyama y D. P. Matton. 2002. Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* 32: 985-996.
- Qiao, H., H. Wang, L. Zhao, J. Zhou, Z. Lai, Y. Zhang, T. P. Robbins y Y. Xue. 2004. The F-box protein AhSLF-S2 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 Embriology of flowering plants*. Editorial Cambridge University, New York, p.p. 1-14, 17-60, 181-243.
- Ryden, L. G. y L. T. Hunt. 1993. Evolution of protein complexity: the blue copper-containing oxidases and related proteins. *J. Mol. Evol.* 36: 41-66.
- Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba y H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the *Rosaceae* encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Mol. Gen. Genet.* 252: 222.
- Schopfer C. R, Nasrallah M. E, Nasrallah J. B. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* 286:1697–1700.
- Schultz, C. J., K. Hauser, J. L. Lind, A. H. Atkinson, Z.yan Pu, M. A. Anderson y A. E. Clarke 1997. Molecular characterisation of a cDNA sequence encoding the backbone of a style-specific 120 kDaa glycoprotein which has features of both extensins and arabinogalactan proteins. *Plant Mol. Biol.* 35: 833-845.

- Shiu S. H, Bleecker A. B. 2001. Receptor-like kinase from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:10763–10768.
- Sijacic, P., X. Wang, A. L. Skirpan, Y. Wang, P. E. Dowad, A. G. McCubbin, S. Huang, T. H. Kao. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature* 429: 302-05.
- Silva N. F, Goring D. R. 2001. Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1988–2007.
- Stein J. C, Howlett B, Boyes D. C, Nasrallah M. E, Nasrallah J. B. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8816–20.
- Stone SL, Arnoldo M, Goring DR. 1999. A breakDaown of *Brassica* self-incompatibility in *ARC1* antisense transgenic plants. *Science* 286:1729–1731.
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR. 2003. ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell* 15:885–898.
- Suzuki G, Kai N, Hirose T, Fukui K, Nishio T. 1999. Genomic organization of the *S* locus: identification and characterization of genes in *SLG/SRK* region of *S₉* haplotype of *Brassica campestris* (syn. *rapa*). *Genetics* 153:391–400.
- Suzuki G, Kakizaki T, Takada Y, Shiba H, Takayama S, et al. 2003. The *S* haplotypes lacking SLG in the genome of *Brassica rapa*. *Plant Cell Rep.* 21:911–915.
- Suzuki T, Kusaba M, Matsushita M, Okazaki K, Nishio T. 2000. Characterization of *Brassica* *S*-haplotypes lacking *S*-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* 482:102–108.
- Takayama, S. y A. Isogai. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56: 467-489.
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, et al. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:1920–1925.
- Taylor, L. P. y P. K. Hepler. 1997. Pollen germination and tube growth. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 48: 461-491.
- Twell, D., S. Park, R. Howden. 1998. The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation *geminipollen1* disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development.* 125: 3789-3799.

- Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Lezzoi y R. Tao. 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* 39: 573-586.
- Van, Crieking W. y R. Beyaert. 1999. Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biol. Proced. Online.* 2: 1-38.
- Woodward, J. R., A. Bacic, W. Jahnen y A. E. Clarke. 1989. N-Linked Glycan Chains on S-Allele-Associated Glycoproteins from *Nicotiana alata*. *Plant Cell* 1: 511-514.
- Wu, H. M., H. Wang. y A. Y. Cheung. 1995. A pollen tube growth stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell* 82: 395-403.
- Wu, H. M., E. Wong, J. Oghdal y A. Y. Cheung. 2000. A pollen tube growth-promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana alata* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.* 22: 165-176.
- Xue, Y., R Carpenter, H. G. Dickinson, E. S. Coen. 1996. Origin of allelic diversity in *Antirrhinum S* locus RNases. *Plant Cell* 8: 805-814.
- Yang, W. C. y V. Sundaresan. 2000. Genetics of gametophyte biogenesis in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 53-57.
- Zhong, J., H. Zhang, C. A. Stanyon, G. Tromp, R. L. Finley. 2003. A strategy for constructing large protein interaction maps using the yeast two-hybrid system: regulated expression arrays and two-phase mating. *Genome Res.* 13: 2691-2699.
- Zinkl, G. M., Zwiebel B. I., Grier D. G., y Preus 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 lisis

- MgCl₂.....0.05 g (5 mM)
- Lisozima.....0.05 g (1mg/ml)
- RNasa A.....250 µl (50µg/ml)
- Inhibidores de proteasas.....0.0774 g (Complete mini, Roche Diagnostics, 11575300)

Disolver en PBS 1X.

Amortiguador de transferencia de proteínas

- Tris.....3 g
- Glicina.....14.4 g
- SDS.....1 g
- Metanol.....200 ml

Disolver en agua dd, aforar a 1 L.

Amortiguador TA 10X para reacción de digestión

- Tris acetato.....330 mM pH 7.9
- Acetato de potasio.....660 mM
- Acetato de magnesio.....100 mM
- Espermidina.....10 mM
- DTT.....5 Mm

Doble Híbrido en *S. cerevisiae*

1.1X TE/LiAc

-Amortiguador TE 10X.....1.1 ml

-LiAc 10X (1M).....1.1 ml

Mezclar cada una de las soluciones y aforar a 10 ml con agua dd.

PEG/LiAc (Polietilenglicol 4000/ acetato de litio).

-PEG 4000 (50%).....8 ml

-Amortiguador TE 10X.....1 ml

-LiAc 10X.....1 ml

Mezclar cada una de las soluciones en el momento de realizar el experimento.

MEDIO YPDA

-Preparar medio YPD

Disolver 50g en 1L de agua dd y autoclavar.

-Agregar adenina a una concentración final 0.003% partiendo de una solución madre 0.2% esterilizada por filtración.

Para medio sólido, añadir agar a una concentración de 15 g/L

MEDIO YPD PLUS

Proporcionado por el kit de doble híbrido (Clontech Biosciences, Matchmarker Library Construction and Screening Kit).

Ensayo de *pull down*

AMORTIGUADOR DE LAVADO

- Tris HCl (2M).....400 µl (20mM)
- NaCl0.11 g (50mM), 0.23 g (100mM), 0.46 g
(200mM).
- EDTA (500mM).....80 µl (1mM)
- Nonidet p-40 (100%).....200 µl (0.5 %)

Disolver en agua dd y aforar a 40 ml.

Inmunodetección con fosfatasa alcalina

AMORTIGUADOR pH 9.5 PARA REVELAR

- Tris Base.....12.1 g
- NaCl.....5.8 g
- MgCl₂.....1 g

Disolver en agua dd, ajustar a pH 9.5 y aforar a 1L.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

- Leche.....10 g (5%)
- Tween 200.2 ml (0.1%)

Disolver en PBS1X y aforar a 200 ml.

SOLUCIÓN DE REVELADO

-nBT (.Nitro–blue tetrazolium chloride)33 mg/ml en 70 % de
DMSO

-BCIP(5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-5-Fosfato P-Toluidino).....17 mg/ml en 100 % de
DMSO

Las soluciones se preparan por separado y luego se mezclan en una proporción de 100 µl de cada una de ellas en 10 ml de amortiguador pH 9.5 para revelar.

Ya se contaba en el laboratorio con los anticuerpos utilizados en esta tesis.

Inmunodetección con quimioluminiscencia

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

-Leche.....10 g (5%)

-Tween 200.2 ml (0.1%)

Disolver en PBS1X y aforar a 200 ml.

SOLUCIÓN DE REVELADO

-Tris 0.5 M pH=8.5.....1ml

-H₂O.....4 ml

-Solución A.....12.5 µl

-Solución B.....25 µl

-H₂O₂ 10 %.....8.5 µl

Solución A

-Ácido hidroxicinámico.....0.35 g

Aforar a 25 ml con DMSO

Solución B

-Luminol.....1.1 g

Aforar a 25 ml con DMSO.

Medio SOC

-Glucosa (1M).....0.8 ml (0.02M).

Disolver la glucosa en 40 ml de medio LB.

Medio LB

-Peptona o triptona.....10 g

-NaCl.....5 g

-Extracto de levadura.....5 g

-Agar.....15 g

Disolver los reactivos en agua dd y aforar a 1 L, esterilizar por autoclave.

Medio 2XYTA

-Tryptona.....16 g

-Extracto de levadura.....10 g

-NaCl.....5 g

Disolver en 900 ml de agua dd, ajustar a pH 7 con NaOH, aforar a 1 L.

Esterilizar por autoclave.

En frío agregar Amp 100 µg/ml.

PBS 10X

-NaCl.....40.0314 g (1.37 M)

-KCl.....1.0065 g (27mM)

-Na₂HPO₄*7H₂O.....5.7635 g (43mM)

-NaH₂PO₄*H₂O.....0.9659 g (14mM)

Disolver con 300 ml de agua dd

Ajustar a pH 7.3 con NaOH

Aforar a 500 ml

Esterilizar por autoclave

El PBS-T se prepara de igual forma que el PBS, agregar al final Tween al 1%.

Purificación con GST- sepharosa

AMORTIGUADOR DE ELUSIÓN

-Tris HCl. pH 8.0 (1 M).....50 ml (50 mM)

-Glutati3n reducido.....0.154 g (10 mM)

Purificaci3n de pl3smido (Maxiprep)

SOLUCI3N I (GTE).

-Glucosa (1M).....2 ml (50 mM)

-EDTA-Na₂·H₂O (500mM).....800 µl (10 mM)
-Tris·HCl (2M) pH 8.0.....500 µl (25 mM)
Aforar a 40 ml

SOLUCIÓN II (LISIS ALCALINA)

-NaOH1 ml (10 N)
-SDS..... 5 ml (10%)
-H₂O.....44 ml

Preparar al momento de usarla

SOLUCIÓN III

-NaCH₃COO·3H₂O pH 5.0.....3 M

SDS-PAGE

ACRILAMIDA

-Acrilamida.....29 g
-Bisacrilamida.....1 g

Disolver la acrilamida en agua dd, una vez que se ha disuelto, añadir la bisacrilamida.
Aforar a 1 litro y filtrar.

AMORTIGUADOR DE ELECTROFORESIS 10 X

-Tris30.32 g
-Glicina.....144 g
-SDS.....10 g

Disolver el Tris y la Glicina en agua dd y posteriormente agregar el SDS, aforar a 1 L.

AMORTIGUADOR DE MUESTRA 6X (10ml)

-Tris pH 6.8.....3.125 ml (1M)

-Glicerol.....5 ml

-SDS0.5 g (1%)

-Azul de bromofenol 10%.....0.2 ml

-B mercaptoetanol.....1 %

Disolver todos los reactivos excepto el SDS en agua dd, posteriormente agregar el SDS y aforar a 10 ml.

GEL APILADOR

-H₂O.....1 ml

-Amortiguador apilador.....444 µl

-Acrilamida.....300 µl

-PSA 20%.....20 µl

-Temed.....5 µl

Amortiguador apilador:

-Tris-base.....6.06 g (0.5 M)

-SDS 20%.....2 ml

Disolver el Tris –base , ajustar a pH 6.8 con HCl y al final agregar el SDS y aforar a 100 ml.

GEL SEPARADOR: 12.5 %

-H₂O.....1.375 ml

-Amortiguador separador.....1 ml

-Acrilamida.....1.625 ml

-PSA 20%.....25 ml

-Temed.....2.5 ml

Buffer separador:

-Tris- base18.17 g (1.5M)

-SDS 20%.....2 ml

Disolver el Tris –base , ajustar a pH 8.8 con HCl y al final agregar el SDS y aforar a 100 ml.

Tinción con nitrato de plata

SOLUCIÓN A

-AgNO₃0.8 g

-H₂O.....4 ml

SOLUCIÓN B

-NaOH (0.36 %).....21 ml

-NH₄OH.....1.4 ml

SOLUCIÓN C

-Agregar la solución A a la B por goteo y agitación, si se observa turbia la solución agregar NH₄OH hasta la transparencia.

-Aforar a 100 ml con agua dd.

SOLUCIÓN D

-Citrato de Sodio (1%).....2.5 ml

-Formaldehido (37%).....0.25 ml

Aforar a 500 ml con agua dd.