



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CLONACIÓN Y SOBRE-EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES NAPEP II (A, B Y C) EN *ESCHERICHIA COLI*, Y
DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE PECTÍN-
METIL ESTERASA”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

GUSTAVO ROBLES ORDOÑEZ



D.F.

2013



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: Profesor: Felipe Cruz García

VOCAL: Profesor: Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

SECRETARIO: Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño

1er. SUPLENTE: Profesor: Perla Deyanira Maldonado Jiménez

2° SUPLENTE: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova

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 el apoyo de los proyectos

- **CONACYT.** Número de proyecto: 81968
- **DGAPA.** Número de proyecto: IN-210312

ASESOR DEL TEMA: Dr. Felipe Cruz García

FIRMA

SUSTENTANTE: Gustavo Robles Ordoñez

FIRMA

ÍNDICE

	Página
Índice general	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tablas	VI
Resumen	VIII
1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	4
2.1. Genética de la Autoincompatibilidad.....	5
2.1.1 AIE en Brassicaceae.....	7
2.1.2 AIG en Papaveraceae.....	8
2.1.3 AIG en Solanaceae.....	10
Genes modificadores.....	13
Modelo de compartimentalización.....	17
Modelo de degradación.....	17
<i>NaPEP II</i>	19
3. Objetivos.....	27
3.1 Objetivo general.....	27
3.2 Objetivos particulares.....	27
4. Hipótesis.....	27
5. Materiales y métodos.....	28
5.1 Síntesis química de los isogenes	
<i>NaPEP IIA, B y C</i>	28
5.2 Identificación de la proteína madura.....	28
5.3 Diseño de oligos para amplificar los isogenes	
<i>NaPEP IIA, B y C</i>	29
5.4 Transformación de las construcciones	
PUC57: <i>NaPEP II</i> en <i>E. coli</i>	29
5.5 Confirmación de las clonas transformadas con	
PUC57: <i>NaPEP II</i>	30
5.6 Clonación de los isogenes <i>NaPEP II A, B y C</i>	
en el vector pGEM-T-Easy.....	31
5.7 Clonación de <i>NaPEP II A, B y C</i> en el vector	
pGEX-4T-2.....	36

	Página
5.8 Sobreexpresión de las proteínas de fusión GST:NaPEP II (A, B y C).....	40
5.9 Purificación de lasproteínas de fusión y GST.....	42
5.10 Purificación de la proteína <i>NaPEP II</i> nativa.....	43
5.11 Purificación del IPME de kiwi.....	44
5.12 Determinación de la actividad de IPME "Ensayo de difusión en gel y tinción con rojo de Ruténio"	45
6. Resultados.....	48
6.1 Identificación de la proteína madura.....	48
6.2 Transformación de las construcciones PUC57:NaPEP II en <i>E. coli</i>	50
6.3 Clonación de los isogenes <i>NaPEP II</i> A, B y C en el vector pGEM-T-Easy.....	51
6.4 Clonación de <i>NaPEP II</i> A, B y C en el vector pGEX-4T-2.....	52
6.5 Sobreexpresión de las proteínas de fusión GST:NaPEP II (A, B y C).....	55
6.6 Purificación de lasproteínas de fusión y GST.....	60
6.7 Purificación de la proteína <i>NaPEP II</i> nativa.....	63
6.8 Purificación del IPME de kiwi.....	65
6.9 Determinación de la actividad de IPME "Ensayo de Difusión en gel y tinción con rojo de Ruténio".....	67
7. Discusión.....	78
7.1 Función de los IPME.....	79
7.2 <i>NaPEP II</i> como posible gen modificador.....	82
7.3 Participación de <i>NaPEP II</i> en la AI de <i>N. alata</i>	83
8. Conclusiones.....	85
9. Perspectivas.....	86
10. Bibliografía.....	87
11. Apendice.....	93
A. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> ...	93
B. Purificación de DNA plasmídico.....	93
C. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	94
D. Ligación de las secuencias <i>NaPEP II</i>	95
E. Transformación de células <i>E. coli</i> "DH5 α ".....	95
F. Secuencia nucleotídica de GST.....	96

	Página
G. Electroforesis (SDS-PAGE).....	96
H. Western Blot.....	98
I. Cuantificación de proteína total por Bradford.....	99
J. Purificación por "Batch"(Glutación-Agarosa).....	99
K. Ensayo difusión en gel y tinción con rojo de rutenio.....	100
L. Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias NaPEP II clonadas vs. cDNA de NaPEP II y GST....	101
M. Ensayo de efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de IPME.....	104
N. Soluciones y medios.....	105

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Modelos de rechazo del polen <i>S</i> -especifico.....	18
Figura 2: Modelo modificado de Goldraij.....	19
Figura 3. Pedigree de la población 11613 de <i>N. alata</i>	22
Figura 4. Alineamiento de los cDNAs correspondientes a las clases A, B y C de <i>NaPEP II</i>	24
Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NaPEP IIA, NaPEP IIB y NaPEP IIC.....	25
Figura 6. Esquema del vector pGEM-T-Easy.....	34
Figura 7. Mapa del vector pGEX-4T-2.....	38
Figura 8. Estructura química de la glutatión-agarosa.....	42
Figura 9. Estructura de las ramificaciones de ácido galacturónico presentes en la pectina.....	45
Figura 10. Graficas de predicción de la secuencia del péptido señal.....	49
Figura 11. PCR de colonia a transformantes de PUC57:NaPEP II....	50
Figura 12. Ensayo de restricción a transformantes pGEM:NaPEP II (A, B y C).....	52
Figura 13. Ensayo de restricción de transformantes de pGEX:NaPEP II (A, B y C).....	53
Figura 14. Ensayo de restricción con Bam HI y NotI.....	54
Figura 15. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot de la sobreexpresión de las proteínas de fusión NaPEP II A,B y C.....	57

Página

Figura 16. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot de la sobreexpresión de las proteínas de fusión NaPEP II A,B y C (fase soluble e insoluble).....	58
Figura 17. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot del ensayo de optimización de condiciones de inducción.....	59
Figura 18. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot del monitoreo de la purificación de las proteínas recombinantes y la GST.....	62
Figura 19. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot del monitoreo de la purificación parcial de <i>NaPEP II</i> de estilos de <i>N. alata</i>	64
Figura 20. Análisis electroforético por SDS-PAGE y Western blot de las fracciones posiblemente enriquecidas con <i>NaPEP II</i> de estilos de <i>N. alata</i>	64
Figura 21. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie de las fracciones con posible actividad de IPME	66
Figura 22. Estandarización del ensayo de actividad de de IPME.	68
Figura 23. Ensayo de actividad de IPME de la <i>NaPEP II</i> proveniente de estilos de <i>N. alata</i>	70
Figura 24. Ensayo de actividad de IPME de GST:: <i>NaPEP II</i> (A, B y C) y GST sola.....	71
Figura 25. Ensayo de actividad de IPME respecto a la cantidad de proteína.....	75-77

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Reactivos y concentraciones usados para llevar a cabo la reacción de amplificación.....	30
Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los isógenes <i>NaPEPII A, B y C</i>	31
Tabla 3. Reactivos y concentraciones usados para amplificar los Isogenes <i>NaPEPII A, B y C</i>	32
Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación de los isogenes <i>NaPEPII A, B y C</i>	32
Tabla 5. Ensayo de restricción con BamHI y NotI.....	35
Tabla 6. Ensayo de restricción con BamHI.....	36
Tabla 7. Ensayo de restricción con BamHI y NotI (vector pGEX-4T-2).....	37
Tabla 8. Ligación entre el vector pGEX-4T-2 y NaPEP II (A, B y C).....	38
Tabla 9. Ensayo de restricción con BamHI y NotI (pGEX:NaPEP II A, B ó C).....	39
Tabla 10. Optimización de las condiciones de inducción de las proteínas recombinantes GST:: <i>NaPEP II (A, B y C)</i>	41
Tabla 11. Mezclas realizadas para la estandarización del ensayo de “difusión en gel y tinción con rojo de rutenio”.....	46
Tabla 12. Mezclas realizadas para la determinación de la actividad de IPME.....	47
Tabla 13. Relaciones de cantidad de proteína-Resina hidratada a utilizar.....	60

Página

Tabla 14. Cantidades de proteína usadas en el ensayo de actividad de IPME.....	73
Tabla 15. Preparación de gel separador (SDS-PAGE).....	97
Tabla 16. Preparación de gel apilador (SDS-PAGE).....	97
Tabla 17. Preparación de curva patrón y muestras para cuantificación de proteína por Bradford.....	99

RESUMEN

Las angiospermas representan el grupo más importante de las plantas vasculares, su amplia distribución y su dominancia sobre cualquier otro grupo vegetal radica en gran medida en su estructura sexual reproductiva, la flor. El éxito reproductivo en las angiospermas se debe en gran parte a la evolución de varios mecanismos que limitan y previenen la autofecundación. Uno de ellos es la autoincompatibilidad (AI), la cual permite al pistilo reconocer y rechazar el polen propio o aquel genéticamente muy cercano. La AI está controlada por un solo locus multialélico (locus *S*), que en el caso de las Solanáceas codifica para una *S*-RNasa que se expresa en la parte estilar y para la proteína SLF, que se expresa en el grano de polen. Aunque se sabe que la especificidad del rechazo del polen depende de la interacción específica del haplotipo entre la *S*-RNasa y SLF; también se requiere de los productos de otros genes (genes modificadores), los cuales son genes fundamentales para llevar a cabo la respuesta de autoincompatibilidad, éstos no son codificados en el locus *S* y se expresan tanto en el polen como en el pistilo. Hasta ahora se han identificado 3 GM en *Nicotiana glauca*: HT-B, 120 K y NaStEP. A pesar de la identificación de estos, aún es confuso el mecanismo exacto por el cual se da el rechazo del polen propio o genéticamente relacionado.

Evidencia genética proveniente del análisis de una población recombinante sugieren la presencia de otros genes modificadores desconocidos, por tal motivo se realizó el escrutinio de bibliotecas de cDNA de estilos y estigmas maduros de *N. glauca* autocompatibles (AC) y AI, donde se identificó una familia de genes denominada *NaPEP II* (proteína II expresada en el pistilo de *Nicotiana glauca*), con un alto potencial de ser un gen modificador.

Las secuencias correspondientes a los isogenes *NaPEP II* tienen similitud con inhibidores de pectin-metilesterasa (IPME), por lo cual se decidió probar si los productos proteicos de estos isogenes presentan *in vitro* la actividad predicha. Para tal fin se clonaron y sobreexpresaron en *E. coli* los tres isogenes. Las proteínas recombinantes resultantes fueron purificadas usando cromatografía de afinidad y finalmente se probó su actividad de IPME usando el ensayo de "difusión en gel y tinción con rojo de ruténio".

Paralelamente se purificó parcialmente la proteína *NaPEP II* a partir de estilos de *Nicotiana alata* $S_{C10}S_{C10}$, mediante el uso de cromatografía de intercambio iónico, también se evaluó su actividad de IPME.

Mediante estos ensayos se determinó que las proteínas *NaPEP II* con y sin modificaciones post-traduccionales, no presentan una actividad de IPME, lo cual demostró que esta actividad no es con la que los isogenes *NaPEP II* participan en el sistema de AI de *N. alata*.

1. INTRODUCCIÒN

La autoincompatibilidad es un sistema genético-bioquímico encargado de evitar la auto-fecundación en angiospermas, este sistema está controlado por un solo locus multialélico denominado locus-S en un gran número de especies. En especies como *Nicotiana* que pertenece a la familia Solanaceae, el locus-S codifica para dos proteínas, una de ellas es la S-RNasa que se expresa en el pistilo y corresponde a la determinante femenina de la incompatibilidad y la otra que es la determinante masculina, codifica para SLF que es una proteína expresada en el polen y constituye el determinante masculino en la incompatibilidad.

La interacción S-alelo específica que existe entre estas dos determinantes da como resultado el fenotipo del rechazo del polen. Para que la respuesta de incompatibilidad se lleve a cabo, es necesaria la presencia de los productos proteicos de otros genes no codificados en el locus-S. Estos genes son denominados genes modificadores (GM) y a la fecha se han identificado tres en *Nicotiana glauca* (HT-B, 120 K y NaStEP). La identificación de estos genes brinda un paso más hacia el entendimiento integral del mecanismo por el cual se lleva a cabo el rechazo del polen propio o genéticamente relacionado en algunas especies de *Solanaceae*.

La evidencia genética encontrada en el análisis de una población recombinante sugiere la presencia de otros GM en *N. glauca*. Para la identificación de candidatos a GM se realizó un escrutinio en el cual se evaluaron bibliotecas de cDNA de estilos y estigmas maduros de *N. glauca* autocompatibles (AC) y autoincompatibles (AI). El resultado de este trabajo arrojó una familia de genes denominada NaPEP II con una alta probabilidad de ser GM`s, esta familia se compone de 3 miembros NaPEP II A, NaPEP II B y NaPEP II C.

Las secuencias de estos tres miembros de NaPEP II poseen un alto porcentaje de identidad a nivel de DNA: A y B- 98.2%, A y C-94.3%, B y C- 94.2%. Sus proteínas correspondientes contienen una región rica en asparagina hacia el extremo carboxilo y muestran semejanza en los aminoácidos 36 al 182 con inhibidores de pectín-metilesterasa (IPME). *NaPEP II* se expresa solamente en los estilos y estigmas maduros de especies AC y AI y su expresión se incrementa durante la maduración del pistilo. Se sabe que NaPEP II es secretada la matriz extracelular del tejido de transmisión. Como los tubos polínicos se elongan a través de esta matriz, los factores secretados incluyendo a NaPEP II, resultan necesarios en las interacciones polen-pistilo.

La similitud de NaPEP II con inhibidores de pectín-metilesterasa (IPME) es de alrededor del 30%.

Para comprobar si NaPEP II posee una actividad de inhibidor de pectín-metilesterasa se realizó la clonación de los tres miembros de la familia en un el vector de sobreexpresión pGEX 4T-2. Una vez clonados los isogenes se indujo la sobreexpresion de las proteínas recombinantes en *Escherichia coli* BL21 CodonPlus-RIL. Las proteínas se produjeron como fusiones con GST (Glutación S-transferasa) y se purificaron mediante cromatografía de afinidad usando la resina glutatión-agarosa. Paralelamente, se llevó a cabo la purificación parcial de la proteína NaPEP II nativa a partir de estilos de *Nicotiana glauca* S_{C10}S_{C10} mediante cromatografía de intercambio iónico.

Con la finalidad de determinar si la NaPEP II de estilos de *N. glauca* y las recombinantes presentaban actividad de inhibidor de PME se realizaron ensayos usando el método de "difusión en gel y tinción con rojo de rutenio" (Downie *et al.*, 1998), donde el colorante se une a los grupos carboxilo libres producidos por la actividad de la PME.

Luego de realizar los ensayos se logró determinar que tanto la NaPEP II de estilos de *N. alata* como las proteínas recombinantes no poseen la actividad de inhibidor de pectin-metilesterasa. Esto permitió identificar que NaPEP II no posee la actividad predicha.

2. MARCO TEÓRICO

La amplia dominancia de las angiospermas sobre otros grupos vegetales radica principalmente en su sistema sexual reproductivo, el cual está representado por la flor. Las flores contienen dentro de su estructura a los órganos reproductivos masculino (estambres) y femenino (pistilo). La polinización ocurre cuando se da la interacción del gametofito masculino (polen) y el pistilo de manera tal, que el reconocimiento permita la germinación del polen y el crecimiento de los tubos polínicos a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo hacia el ovario.

En una flor bisexual los órganos sexuales se encuentran muy próximos. La cercanía entre ellos favorece que el polen se deposite en el estigma de la misma flor provocando que la variabilidad genética de la especie se vea disminuida si la autopolinización ocurriese (Hernandez *et al.*, 2009). Por este motivo, las plantas con flores han desarrollado varios mecanismos genéticos-bioquímicos para evitar la autofecundación. Uno de los primeros eventos durante el reconocimiento del polen se encuentra determinado por la capacidad que tiene la planta receptora a nivel del pistilo. El pistilo juega un papel importante, ya que además de recibir al polen en la superficie de su estigma, permitir su germinación, hidratación, nutrición y conducción de los tubos polínicos al ovario. También sintetiza factores que ayudan a reconocer y discriminar el polen producido por la misma planta de aquel que proviene de individuos genéticamente relacionados y de otras especies (McClure y Frankling-Tong, 2006).

Varias especies con flores hermafroditas, desarrollaron adaptaciones morfológicas como la separación espacial del pistilo y los estambres (hercogamia), y fisiológicas como la maduración diferencial de los órganos reproductivos (dicogamia), estos mecanismos promueven la polinización cruzada y evitan el flujo génico a través del polen entre los padres con algunos individuos de la progenie.

2.1 Genética de la autoincompatibilidad (AI)

Las angiospermas presentan diferentes estrategias reproductivas que tienen su efecto en el mantenimiento de la diversidad genética. La reproducción sexual genera combinaciones nuevas de genes y alelos utilizando mecanismos como la cruce entre plantas, la meiosis y la fusión de gametos; estas combinaciones suceden siempre y cuando no se presenten eventos que las reduzcan (p.ej. cruces interespecíficas). Las cruces entre organismos poco relacionados favorecen la diversidad genética. Muchas especies de plantas han desarrollado mecanismos únicos que permiten incrementar la polinización cruzada denominados sistemas de autoincompatibilidad (AI). Los sistemas de AI controlan genéticamente aquellos mecanismos que evitan la fecundación por el polen propio o polen de plantas estrechamente relacionadas (de Nettancourt, 2001).

Los sistemas de AI se encuentran ampliamente distribuidos en las angiospermas y se han descrito en 91 de 271 familias. Una característica exclusiva de los sistemas de AI en plantas es que se basan en el reconocimiento de lo propio, a diferencia de lo que sucede en el resto de los sistemas conocidos, donde lo reconocido es lo no propio (Nasrallah, 2002).

La AI se clasifica en dos tipos: homomórfica y heteromórfica. En el tipo homomórfico las flores de la misma especie tienen el mismo tipo morfológico mientras que en el tipo heteromórfico, las flores presentan dos o tres diferentes tipos morfológicos. En la AI heteromórfica, la polinización es compatible solamente entre flores con diferentes tipos morfológicos (de Nettancourt, 1977).

El tipo homomórfico ha sido clasificado en gametofítico y esporofítico, dependiendo del genotipo que determine el comportamiento del polen

en la AI. Es gametofítico si está determinado por el genotipo del polen (determinado por su propio genoma haploide) y esporofítico si está determinado por el genotipo de la planta de la cual proviene el polen (determinado por el genoma diploide de la planta). El tipo gametofítico se presenta en más de 60 familias de plantas con flores y esporofítico se encuentra en 6 familias. Los dos tipos aparentemente evolucionaron de forma independiente. El sistema de AI gametofítico (AIG) es característico de especies con polen bicelular y estigmas húmedos, mientras que el sistema de AI esporofítico (AIE), de especies con polen tricelular y estigmas secos (Sims *et al.*, 1993). Hasta la fecha solamente han sido estudiadas a nivel molecular cinco familias con AIG (Papaveraceae, Poaceae, Rosaceae, Plantaginaceae y Solanaceae) y una sola familia con AIE (Brassicaceae) [Frankling *et al.*, 1995]. No obstante, ya han sido iniciados estudios en los sistemas de AIE en las familias Convolvulaceae, Asteraceae y Betulaceae (Hiscock y McInnis, 2003).

En el sistema de AIG los productos del alelo *S* (alelo que se encuentra dentro del locus *S*) son expresados por el gametofito (grano de polen) una vez que ha finalizado la meiosis de las células madre del polen. El rechazo del polen en este sistema se presenta cuando el alelo *S* que se encuentra en el polen es igual a uno de los dos alelos *S* presentes en el pistilo diploide de la planta receptora. Esto provoca que el crecimiento del tubo polínico (TP) se detenga generalmente a nivel del estilo. En muchas familias con sistemas de AIG como: Solanaceae, Plantaginaceae, Rosaceae y Papaveraceae, los granos de polen germinan de manera independientemente de su haplotipo *S* y producen un TP. Si la cruz es compatible porque no existe coincidencia entre el haplotipo *S* del polen con alguno de los haplotipos *S* del pistilo, el TP crecerá a lo largo del estilo hasta llegar al ovario. En las cruzas incompatibles, el TP será inhibido a nivel del estilo y no logrará alcanzar el ovario (Chen *et al.*, 2010).

En Brassicaceae la AI parece funcionar mediante un sistema en el cual las proteínas responsables de la AI son depositadas por el tapetum en la superficie del polen que interactúa con receptores en la papila estigmática y controlan si el polen es aceptado (Takayama y Isogai, 2005)

Al parecer la AI se ha desarrollado de manera independiente en los diferentes linajes de angiospermas. Se han estudiado a nivel molecular 3 mecanismos diferentes:

1. Brassicaceae
2. Papaveraceae
3. Solanaceae, Rosaceae y Plantaginaceae.

2.1.1 AIE en Brassicaceae

En *Brassicaceae* el sistema de AI es esporofítico y el locus *S* tiene un tamaño de aproximadamente 80 a 100 kb y contiene hasta 17 genes (Watanabe *et al.*, 2000) de los cuales, solo existen dos genes fuertemente ligados, altamente polimórficos y que se requieren para el reconocimiento alelo *S* específico del polen (Nasrallah, 2002). Hasta la fecha han sido identificados más de 30 haplotipos *S* en *B. rapa* y 50 en *B. oleracea* (Nou *et al.*, 1993; Ockendon, 2000). En esta familia el rechazo del polen propio tiene como finalidad la anulación de la hidratación del grano de polen o la detención rápida del crecimiento del tubo polínico en la superficie estigmática.

El producto del locus *S* en *Brassica* correspondiente al pistilo (determinante femenina) es conocido como SRK (receptor de cinasa del locus *S*) (Stein *et al.*, 1991). SRK es una proteína con un dominio extracelular denominado dominio-*S* (se extiende en la pared celular), un dominio transmembranal y uno intracelular de cinasa de serina treonina. El dominio-*S* o dominio de receptor de SRK comparte un

98% de identidad de secuencia nucleotídica con SLG (glicoproteína del locus *S*) (Stein *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 2003). Debido a contiene regiones hipervariables, se sugiere que el dominio *S* es el responsable de la *S* especificidad (Hiscock *et al.*, 2003).

Tanto SRK como SLG se producen predominantemente en las células papilares del estigma, las cuales están en contacto directo con el polen (Nasrallah, 1993; Nasrallah, 1997; Takayama e Isogai, 2005).

En el polen (determinante masculina), la especificidad de la AI está determinada por un gen que codifica para una proteína del locus *S* rica en cisteínas (SCR) (Schopfer *et al.*, 1999), también designado como SP11 (proteína 11 del locus *S*) (Shiba *et al.*, 2001; Takayama *et al.* 2001). El gen *SCR/SP11* codifica para una proteína de secreción básica de bajo peso molecular (6kDa) con 8 residuos de cisteína que forman cuatro puentes disulfuro (Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001). Su expresión se detecta específicamente en las células del *tapetum* de la antera y menormente en microsporas. La proteína SP11 se secreta desde las células del *tapetum* hacia la superficie del polen, localizándose en la exina de éstos (Iwano *et al.*, 2003).

2.1.2 AIG en Papaveraceae

Papaver rhoeas es la especie más estudiada de este género y el control genético bajo el que se encuentra es gametofítico. La reacción de rechazo del polen ocurre en la superficie estigmática del pistilo y no en el estilo (Franklin-Tong *et al.*, 1992). A diferencia de los sistemas de AIG que dependen de S-RNasas, en esta familia no se requiere ningún componente pistilar adicional no ligado al locus *S* (McClure and Franklin-Tong, 2006).

Los productos del alelo *S* del pistilo (determinante femenina) en *Papaver rhoeas* son secretados por el estigma. Debido a que estas

proteínas son pequeñas (≈ 15 kDa) y no tienen ninguna homología con proteínas de función conocida (Foote *et al.*, 1994), estas se denominaron proteínas prsS (*Papaver rhoeas* stigma S determinant). Algunas de estas proteínas se encuentran modificadas por N glicosilación (Franklin-Tong and Franklin, 2003; McCubbin and Kao, 2000). Las proteínas prsS son altamente polimórficas y comparten entre un 51.3% y un 63.7% de identidad de secuencia aminoacídica. Se ha reportado que en condiciones *in vitro*, proteínas S recombinantes producidas en *E. coli* inhiben la germinación del polen de una manera S alelo específica, con estas evidencias se concluyó que las proteínas prsS son las únicas determinantes femeninas (Franklin-Tong, 2008; Poulter *et al.*, 2011).

Con respecto a la determinante masculina (prpS) se predice que se trata de un receptor que interacciona con la determinante femenina (prsS) de una manera S alelo específica. El análisis de la secuencia de la determinante masculina predice que se trata de una proteína sumamente hidrofóbica que contiene algunos cruces transmembranales. Además existe evidencia experimental que corrobora que prpS es una proteína transmembranal que se localiza en la membrana plasmática del tubo polínico (Wheeler *et al.*, 2010).

En este sistema, el reconocimiento S alelo específico entre prsS y prpS causa un rápido incremento en el calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, y un influjo de Ca^{2+} extracelular en el tubo polínico que provoca en una primera instancia la disipación del gradiente apical de $[Ca^{2+}]_i$ y posteriormente se desencadena la inhibición del crecimiento del tubo polínico en pocos minutos (McClure and Franklin-Tong, 2006). Los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ generan varios eventos relacionados con la reacción de AI, entre ellos se encuentran la despolimerización del citoesqueleto de actina, la cual se ha asociado a la muerte celular programada (PCD) que en el contexto de la AI corresponde a una de

las estrategias mediante las cuales se puede destruir el polen no deseado (Takayama *et al.*, 2005).

2.1.3 AIG en Solanaceae

La respuesta de AI en esta familia es el principal sistema de rechazo del polen propio en las angiospermas. En Solanáceas la respuesta de AI se caracteriza por que tanto los granos de polen compatibles como los incompatibles son hidratados y tienen una germinación normal. Sin embargo, aquellos tubos polínicos incompatibles serán inhibidos a nivel del tercer segmento superior del estilo. El locus *S* codifica y expresa tanto la determinante femenina (*S*-RNasa) como a la masculina (SLF). La interacción *S* específica determina si una crucea es compatible o incompatible (McClure *et al.*, 2006).

Los productos del locus *S* en el estilo son proteínas con actividad de ribonucleasa, conocidas como *S*-RNasas (McClure *et al.*, 1989; McCubbin and Kao, 1996; Kao and Tsukamoto, 2004; de Nettancourt, 2001; McClure, 2004; McClure and Franklin-Tong, 2006). Las *S*-RNasas se encuentran en el estilo y tienen un carácter básico, son glicoproteínas de ≈ 30 kDa con un punto isoelectrico en el rango de pH de 7.6 a 9.5, que se secretan hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo. En este sitio, las *S*-RNasas acceden al citoplasma del tubo polínico donde causan degradación del RNA de los tubos polínicos incompatibles (McClure *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1991). Se cree que la actividad citotóxica afecta el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles interfiriendo con los patrones de expresión genética del polen (McClure and Franklin-Tong, 2006). Cuando las SRNasas pierden su actividad, no se observa degradación del RNA y por lo tanto las plantas no presentan el fenotipo de rechazo del polen (Huang *et al.*, 1994). Los resultados anteriores evidencian

que las S-RNasas son las determinantes genéticas de rechazo del polen S alelo específico.

Más de 30 S-RNasas de 7 especies de solanáceas han sido reportadas; las secuencias de cDNA correspondientes a estas proteínas predicen la presencia de un péptido señal, el cual se pierde en la proteína madura. Esto corresponde con la localización de las S-RNasas en el espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo (Cornish *et al.*, 1987). Las secuencias de las diferentes SRNasas son divergentes, ya que al compararlas entre ellas a nivel de aminoácidos se presenta una variación de entre un 38% y un 98%. Este nivel de variación es el esperado para los productos del alelo S (Clark and Kao, 1991).

Las S-RNasas poseen dos regiones, designadas como HVa y HVb, que exhiben un alto grado de diversidad de secuencias, estos dominios se encuentran formados por "loops" con una carga positiva, seguidos de una α -helice y una pequeña región con carga negativa. Estas dos regiones hipervariables son las más hidrofílicas de estas proteínas, incrementando la posibilidad de que éstas puedan estar involucradas en interacciones con los productos del alelo S del polen.

A pesar de toda la diversidad de secuencias de las S-RNasas, cinco regiones se encuentran altamente conservadas y se designan C1-C5 (Iorger *et al.*, 1991). Las regiones conservadas C1, C4 y C5 contienen la mayoría de los aminoácidos hidrofóbicos lo que hace pensar que están involucradas en la estructura principal de las S-RNasas. Las regiones conservadas C2 y C3 comparten un alto grado de similitud de secuencias con las correspondientes regiones de la RNasa T2 y de otras RNasas (McClure *et al.*, 1989; Green, 1994). Entre los aminoácidos conservados entre las S RNasas y otras RNasas se encuentran dos histidinas, una en la región C3 y otra en la región C2.

Respecto a la RNasa T2, estas dos histidinas son requeridas para la actividad de ribonucleasa (Woodward *et al.*, 1989). Todas las proteínas S estudiadas son glicoproteínas con *N*-glicanos asociados, pero se ha demostrado que los glicanos no son requeridos para la función de las S-RNasas, por lo que la determinante de la especificidad S alelo especificase encuentra en la secuencia aminoacídica.

SLF es la determinante masculina de locus S en los sistemas de autoincompatibilidad que se basan en S-RNasa. SLF es un gen de aproximadamente 1.4 kb, el cual se expresa en la antera y en los granos de polen. Codifica para una proteína que contiene un dominio con una caja F en su extremo amino terminal (Sijacic *et al.*, 2004; Takayama *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009).

La mayoría de las proteínas con caja F, se encuentran involucradas en la degradación mediada por ubiquitina y el proteosoma 25S. Usualmente estas proteínas sirven como adaptador que une a proteínas sustrato específico al complejo SCF E3 ligasa de ubiquitina, por tal motivo se asume que SLF pudiese estar participando en un complejo SCF y ubiquitinar a la S-RNasa para su degradación (Zhang *et al.*, 2009).

Con base en experimentos *in vitro* y doble híbrido en levaduras se encontró que las interacciones físicas entre la S-RNasa y la determinante femenina con un S haplotipo diferente son más fuertes que las interacciones entre la S-RNasa y SLF con el mismo haplotipo. También se identificaron 3 regiones específicas de SLF (FD 1-3) [Hua *et al.*, 2006]. Los resultados de estos ensayos sugieren que el dominio FD2 es suficiente para que exista una unión de alta afinidad con la S-RNasa, FD1 y FD3 podrían conferir la especificidad ya que contienen una de las dos regiones variables de SLF (Hua *et al.*, 2006).

Zhang *et al.*, 2009). Mediante el análisis de una biblioteca de cDNA de polen se encontró la interacción de SLF con un homólogo de SKP1 denominado SSK1 (SLF-interacting SKPI like 1), esta interacción sugiere que SSK1 funciona como un adaptador entre SLF y una proteína tipo CUL-1, por lo cual el complejo hipotético SCF formado pudiese ser el responsable de la ubiquitinación de las S-RNAsas (Zhang *et al.*, 2009).

SLF pudiese estar mediando la degradación de las S-RNAsas vía ubiquitinación y proteosoma 25S de manera dependiente del grado de afinidad de la interacción SLF-S-RNasa (Hua *et al.*, 2006 Zhang *et al.*, 2009).

Se ha reportado en *Petunia inflata* la existencia de varios genes tipo SLF que se encuentran ligados al locus S y cada una de estas variantes interactúa con una SRNasa de un diferente haplotipo S (Kubo *et al.*, 2010).

Estos datos llevaron a la propuesta del modelo de colaboración de SLF, el cual plantea que todas las isoformas de SLF podrían funcionar como la determinante masculina dependiendo de la interacción con un haplotipo S de S-RNasa.

Genes Modificadores

Aunque se sabe que la especificidad en el rechazo del polen depende de la interacción S haplotipo específica entre SLF y la S-RNasa, son necesarios para el rechazo del polen los productos de otros genes que no se encuentran codificados en el locus S, estos son denominados genes modificadores (GM) y son esenciales en la respuesta de incompatibilidad en varias de las especies con sistemas basados en

S-RNasa (Takayama *et al.*, 2005; Goldraij *et al.*, 2006). Los genes modificadores se clasifican en 3 grupos:

GRUPO 1: Se integra por aquellos factores que afectan directamente la expresión de los genes que determinan la especificidad de la reacción.

GRUPO 2: Se compone por aquellos factores que interactúan genética o bioquímicamente con las determinantes de la especificidad sin afectar su expresión, es decir, estos factores solo se requieren específicamente para el rechazo del polen.

GRUPO 3: Se forma de genes que participan tanto en la respuesta de incompatibilidad como en procesos generales durante la polinización e interacción polen-pistilo.

Hasta ahora se han identificado 3 genes modificadores que pertenecen al grupo 2: *120K* (Hancock *et al.*, 2005), *HT-B* (McClure *et al.*, 1999) y *NaStEP* (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013)

120K es un gen modificador que codifica para una glicoproteína de 120 KDa, se encuentra de manera abundante en la matriz extracelular (ME). Experimentos de pérdida de función mediante el uso de un RNA interferente (RNAi) que silencia a *120K* mostraron que los híbridos transgénicos producto de la cruce entre *N. plumbaginifolia* (compatible) x *N. alata* (incompatible) resultaron incapaces de rechazar el polen con el mismo haplotipo S del pistilo que recibe el polen; esto es evidencia suficiente para designar a *120K* como un gen modificador estilar (Hancock *et al.*, 2005).

NaStEP (*N. alata* Stigma Expressed Protein) es una proteína perteneciente a la familia de inhibidores de proteasas tipo Kunitz, pertenece también a la familia de inhibidores de tripsina (STI) y tiene actividad de inhibidor de proteasas (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Su

presencia fue detectada a partir de un escrutinio de bibliotecas de cDNA de plantas AC Y AI. NaStEP se expresa abundantemente en estigmas maduros de especies incompatibles de *Nicotiana* y no se expresa en plantas autocompatibles (AC) [Busot *et al.*, 2008].

NaStEP se libera de las vacuolas células estigmáticas hacia el exudado estigmático (Busot *et al.*, 2008), una vez ahí interactúa con los tubos polínicos introduciéndose a ellos sin importar su haplotipo S (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Mediante experimentos en plantas transgénicas de *Nicotiana* donde fue silenciado NaStEP, se demostró que se pierde la capacidad del reconocimiento y rechazo del polen con el mismo haplotipo S; lo que indica de manera contundente que NaStEP es un gen modificador estigmático esencial en la AI en *Nicotiana* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

HT-B codifica para una proteína de 101 aminoácidos con una región rica en residuos de asparagina y ácido aspártico en el extremo carboxilo. Después de la asparagina 24 se predice un corte de péptido señal, por lo que la proteína madura correspondiente a *HT-B* tiene un peso de 8.6 kDa, posee un punto isoeléctrico de 3.76. La expresión de este gen en antisentido en plantas transgénicas produjo cambios en el fenotipo de polinización siendo los híbridos incapaces de rechazar su propio polen. De esta forma quedó demostrada su implicación en el rechazo alelo S específico del polen (McClure *et al.*, 1999). El transcrito de este gen se expresa fuertemente en estilos de plantas AI de *N. alata*, pero no se detecta en estilos de *N. plumbaginifolia* (AC). Recientemente se halló otra evidencia del papel del producto de *HT-B* en *Lycopersicon esculentum* (ahora *Solanum lycopersicon*), una especie autocompatible (AC) que no expresa ninguna S-RNasa. En *Lycopersicon esculentum* se reportaron dos copias del gen *HT*, *LeHT-A* y *LeHT-B*, los cuales presentan mutaciones puntuales. Una mutación en la región codificante del gen *LeHT-A*

provoca un corrimiento del marco de lectura, mientras que en el gen *LeHT-B* la mutación genera un codón de término prematuro. Estos hallazgos llevaron a la conclusión de que la pérdida de la AI en *L. esculentum* se asocia con las mutaciones en los genes *HT*. Sin embargo, hasta ahora no se sabe cómo participa HT-B en la vía bioquímica del rechazo del polen. En *N. alata*, la proteína codificada por este gen ingresa a los tubos polínicos en crecimiento y sus niveles de expresión disminuyen notablemente en los tubos polínicos AC (Goldraij *et al.*, 2006).

En la Figura 1 se muestran los dos modelos utilizados para explicar el sistema de SI basado en S-RNasa. EL modelo de degradación de S-RNasa (izquierda) y el modelo de compartimentación (a la derecha). Ambos modelos implican la degradación de RNA de polen después de la polinización incompatible, lo que conduce a una inhibición general de la síntesis de proteínas del polen necesarias para el crecimiento del tubo polínico. Esta inhibición solo es clara en el modelo de compartimentalización, el cual hace hincapié en los mecanismos homeostáticos que mantienen la integridad endomembranosa y facilitan la degradación de *HT-B* en el pistilo. Cabe destacar que los mecanismos mediante los cuales se explica la evasión de la citotoxicidad de la S-RNasa por parte del polen compatible son diferentes en ambos modelos.

Modelo de compartimentalización

Fue propuesto por Goldraij *et al.* (2006) y se refiere a que tanto en cruza compatibles como en incompatibles de *Nicotiana*, las R-Nasas entran desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo hacia el tubo polínico mediante un mecanismo de endocitosis junto a *120K* independientemente de su haplotipo *S* (se obvia que *HT-B* entra en conjunto con estas proteínas, aunque no se ha probado). Se propone que *HT-B* es degradada en interacciones *S*-inespecíficas entre los determinantes masculina y femenina por una proteína desconocida proveniente del polen, esto en una cruce compatible; por otro lado en una cruce incompatible la especificidad del complejo SLF-S-RNasa promueve la estabilización ya sea directa o indirectamente de *HT-B*, lo que desencadena que la membrana vacuolar donde se encuentran las S-RNasas sea degradada y estas se liberen al citoplasma del TP para ejercer su acción citotóxica deteniendo el crecimiento del tubo polínico.

En una visión más extensa sobre el mecanismo mediante el cual *HT-B* se mantiene estable, es posible introducir a NaStEP como un gen modificador que gracias a su actividad de inhibidor de proteasas tipo Kunitz, pudiese estar ejerciendo esta actividad sobre una proteasa hipotética que tenga como función la degradación de *HT-B*; permitiendo así la ruptura de las vacuolas y finalmente la detención del crecimiento del tubo polínico debido al efecto citotóxico de las S-RNasas. Estas interacciones se ejemplifican en la figura 2.

Modelo de degradación

Este modelo está diseñado a partir de la capacidad de SLF de participar en la vía de degradación de proteínas mediante el

proteosoma 26S, ya que SLF podría formar parte de un complejo SCF (Moon *et al.*, 2004).

Principalmente el modelo señala que la interacción entre haplotipos *S* diferentes tanto de SLF como de S-RNasa es más fuerte que la interacción que se da cuando interactúan las determinantes con el mismo haplotipo *S*; lo que significa que en cruza en las cuales exista una interacción entre las determinantes masculino y femenino de diferente haplotipo *S*, dichas interacciones serán lo suficientemente estables para llevar a cabo la ubiquitinación y degradación de las S-RNasas permitiendo el crecimiento del tubo polínico hacia el ovario.

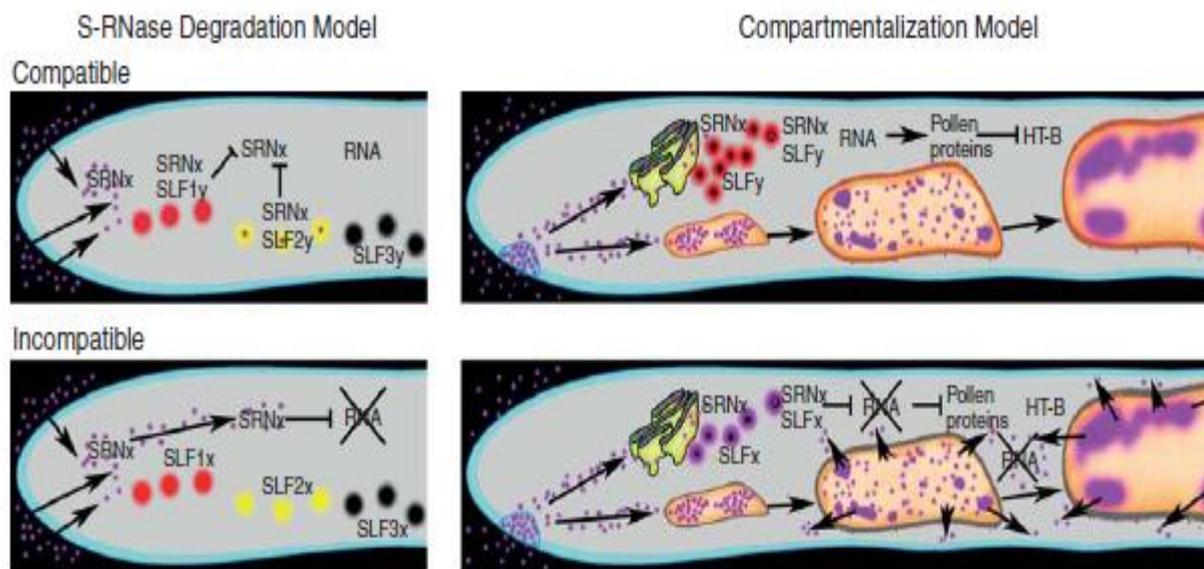


Figura 1. Modelos de rechazo de polen *S*-específico (McClure *et al.*, 2011). (Izquierda) Modelo de degradación de S-RNasas. En una cruce compatible la colaboración por parte de distintas SLF's genera complejos SLF-S-RNasas estables, estos son ubiquitinados y degradados vía el proteosoma 26S. En una cruce incompatible, las SLF's y S-RNasas forman complejos inestables que permiten que las S-RNasas escapen de la ubiquitinación y degradación y así poder ejercer su efecto citotóxico. (Derecha) Modelo de compartimentalización. En una cruce compatible las S-RNasas son absorbidas por endocitosis y almacenadas en vacuolas, debido a que la interacción entre SLF y S-RNasa es *S* haplotipo inespecífica, HT-B es degradada y las S-RNasas se mantienen contenidas en las vacuolas permitiendo el crecimiento del tubo polínico. En una cruce incompatible la interacción haplotipo *S*-específica entre SLF y S-RNasa provoca la estabilización de HT-B y finalmente la liberación de las S-RNasas contenidas en las vacuolas para ejercer su efecto citotóxico y detener el crecimiento del TP.

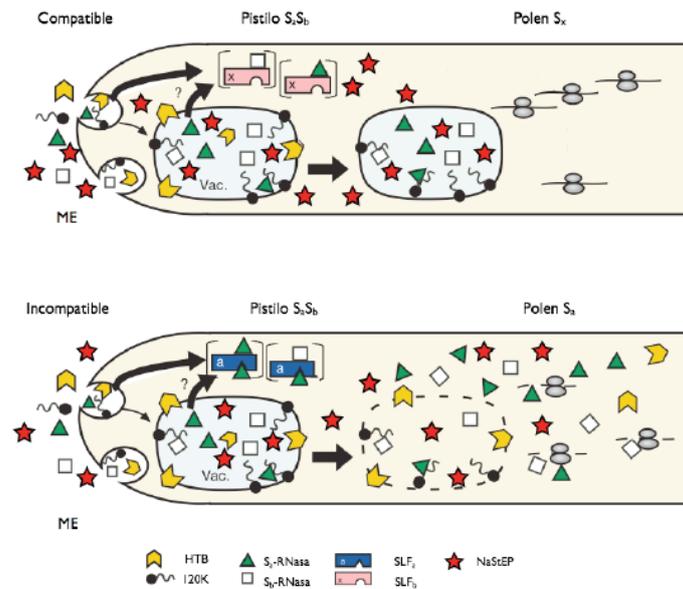


Figura 2: Modelo modificado de Goldraij *et al* (2006). (Arriba) cruce compatible. Se muestra la entrada de los factores (HT-B, 120K y NaStEP) mediante endocitosis, su almacenamiento en vacuola. La degradación de HT-B mantiene la estabilidad vacuolar y evita la liberación de S-RNasas. (Abajo) cruce incompatible. A diferencia de la cruce compatible, HT-B no es degradada (situación que puede ser mediada por NaStEP) y finalmente se liberan las S-RNasas para desencadenar la actividad citotóxica y detener el crecimiento del TP.

NaPEP II

Una fuerte evidencia de la presencia de mas genes modificadores se presentó en una población recombinante de plantas de *N. alata* que segrega con subpoblaciones que aceptan o rechazan el polen propio (figura 3).

Esta población (11613) se generó a partir de la cruce de una planta mutante de *N. alata* (acepta su propio polen a pesar de sintetizar niveles normales de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa, de HT-B y 120K) con una planta AI de *N. alata* $S_{105}S_{105}$. El análisis del fenotipo de polinización de la progenie (generación 2) indicó que todas las plantas fueron capaces de rechazar su propio polen, sugiriendo que el defecto en la mutante era recesivo. Para obtener una población segregante, una planta heterociga de la segunda generación (5279-1, con alelos $S_{A2}S_{105}$) fue retrocruzada con la mutante original y la población obtenida fue designada 4936 (generación 3). El fenotipo de

reconocimiento del polen en esta población se evaluó probando su capacidad para producir semillas obteniéndose 22 plantas AC y 58 AI. La proporción fenotípica segregante de 3:1 indicó que dos factores recesivos con funciones redundantes estaban controlando el fenotipo de las plantas AC. Como la AI requiere tanto de la función de la parte estilar como de la función del polen, una fracción de la población 4936 fue probada en su capacidad para aceptar polen de las plantas homocigas para los alelos S_{A2} , S_{C10} y S_{105} de *N. alata*.

Los homocigos *S* fueron elegidos por representar los tres alelos segregantes en la población y para determinar defectos en la parte estilar de las plantas AC. En plantas normales, se esperaría un fenotipo normal de rechazo de polen cuando se emplease polen de dos de los tres homocigos *S*. Los resultados obtenidos indicaron que las plantas son defectuosas en la parte estilar ya que aceptaron los tres tipos de polen.

Las autopolinizaciones realizadas con las plantas AC de la población 4936 y las cruza recíprocas entre ellas, produjeron descendientes AC lo que sugiere que todas las plantas AC tienen el mismo genotipo y que la mutación en las plantas defectuosas además de ser recesiva, fue heredada de manera estable. Con el objetivo de hacer más homogéneos los entornos genéticos de población recombinante, una planta AC de la tercera generación (4936-177) fue cruzada con el homocigo AI $S_{105}S_{105}$.

La población obtenida producto de la crusa fue denominada 11611 (cuarta generación). Todos los individuos de esta generación recuperaron la capacidad de rechazar el polen propio confirmándose de esta forma la naturaleza recesiva del fenotipo AC. La crusa entre una planta AI de la cuarta generación (11611-23) con una AC de la población 4936 (4936-177) permitió obtener otro estimado del número de loci involucrados en el fenotipo AC y homogenizar aun más los genomas de los individuos que la conforman. Esta quinta

generación de cruzas genéticas cuyas principales diferencias genéticas están relacionadas con la AI, segregó tanto con plantas AC como AI. La proporción fenotípica segregante de esta población denominada 11613 fue de 3:1, es decir 3 plantas AI por cada una AC.

Se propuso que dos genes con funciones redundantes controlan el rechazo del polen alelo *S* específico en las plantas AI. En la población 11613 tanto las plantas AC como las AI expresan niveles normales de las *S*-RNasas. Sin embargo, estas proteínas no inhiben el crecimiento de los tubos polínicos producto de la autopolinización en las plantas AC.

La población 11613 permitió plantear la hipótesis de que las plantas AI expresan genes modificadores que están ausentes o no son funcionales en las plantas AC. La evidencia genética sugiere que la vía bioquímica de rechazo del polen en *N. alata* involucra a otros genes modificadores a demás de los ya descritos.

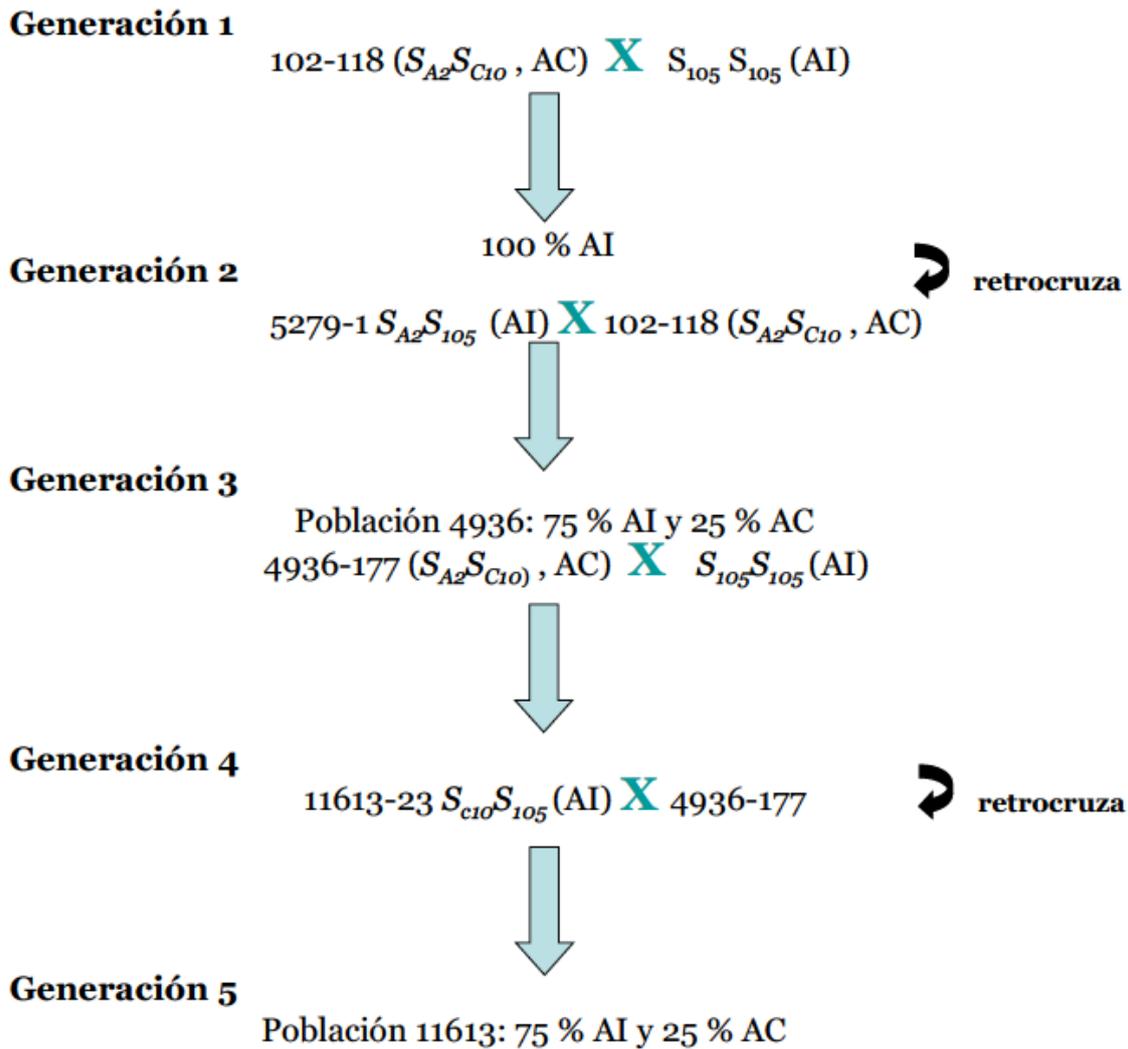


Figura 3. Pedigree de la población 11613 de *N. alata* (Busot, G. 2009). Se muestran las cruza y retrocruzas realizadas con los porcentajes fenotípicos segregantes.

Para clonar los genes modificadores que se encontraban involucrados en el fenotipo de las plantas de la población 11613, se usaron estrategias encaminadas hacia la detección de cambios en la expresión de genes a nivel de mRNA entre estilos de las plantas AI y AC de la población 11613. Las técnicas empleadas para abordar este objetivo fueron las del cDNA-AFLP (amplificación de fragmentos polimórficos) y la de SSH (hibridación supresiva sustractiva).

En los experimentos de cDNA-AFLP, el cDNA de plantas AC y AI fue utilizado para realizar un mapeo exhaustivo empleando 400 combinaciones de iniciadores; se aislaron alrededor 37 cDNAs con un

alto potencial a ser candidatos a genes de expresión diferencial entre plantas AC y AI. Mediante ensayos tipo Northern se determinó que ninguno de ellos estaba ligado al fenotipo de AI.

De forma similar y mediante el uso de la SSH, la generación de dos bibliotecas sustraídas de cDNA donde se suponía estuvieran enriquecidos los transcritos expresados diferencialmente en las plantas AI, no arrojó ningún resultado que permitiera vincular la expresión de genes con el fenotipo de rechazo del polen.

Teniendo en cuenta estos resultados, y asumiendo que tal vez el defecto de la población 11613 se debía a una mutación puntual en los genes modificadores que permitía que éstos se expresaran tanto en plantas AC como en plantas AI, la tercera estrategia consistió en secuenciar todos los cDNAs provenientes de bibliotecas de plantas AC y AI una vez que éstas quedaran enriquecidas con genes modificadores, para ello las bibliotecas fueron sustraídas para eliminar secuencias conocidas y abundantes, se usaron varias sondas de secuencias conocidas y abundantes (cDNA de S-RNasas, de HT-B y de 120 K). Para recuperar los cDNAs cuyo patrón de expresión coincidiera con el de los genes requeridos para la reacción de AI, las bibliotecas fueron también sustraídas con mRNA de estilos de *N. plumbaginifolia* (especie AC), con mRNA de botones florales inmaduros de plantas AI de *N. alata* y mRNA de estilos maduros de *N. alata* AI y AC; esperando con lo anterior que los cDNAs encontrados se expresaran preferencialmente en estilos maduros de *N. alata* (AI).

1152 cDNAs fueron seleccionados como candidatos a genes modificadores y se secuenciaron. La estrategia seguida durante el análisis de las secuencias fue buscar genes que estuviesen excluidos de la biblioteca de plantas AC y que fuesen recuperados

exclusivamente de la biblioteca de plantas AI. Se encontró una sola familia génica con estas características, la cual fue denominada como *NaPEP II* (proteína II expresada en el pistilo de *N. alata*), esta familia está representada por 3 miembros: *NaPEP II* (A, B y C)

La homología entre los cDNAs completos de cada miembro a nivel de secuencia de nucleótidos se muestra en la figura 4. Los miembros A y B tienen 6 inserciones hacia el extremo 5'. De forma general hay 33 cambios de nucleótidos, 23 de los cuales conducen a un cambio en la secuencia aminoacídica. La identidad de secuencia nucleotídica entre las clases A y B, A y C y B y C de *NaPEP II* es de 98.2 %, 94.3 % y 94.2 %, respectivamente.

```

CLASE A  AATTTCTTTTCCTCTCTTTGTGAATGACACAAATTCACATTCOAATTCCTTGTCTCTTCTGTTTCCTCTTGTTTTCTCTATATCAATTCAAATGC
CLASE B  AATTTCTTTTCCTCTCTTTGTGAATGACACAAATTCACATTCOAATTCCTTGTCTCTTCTGTTTCCTCTTGTTTTCTCTATATCAATTCAAATGC
CLASE C  AATTTCTTTTCCTCTCTTTGTGAATGACACAAATTCACATTCOAATTCCTTGTCTCTTCTGTTTCCTCTTGTTTTCTCTATATCAATTCAAATGC
*****

CLASE A  TGCTCCAATTCAAAACCCAAACAATAATAACAATAATGCCACCCGACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCCGTTTTGCAT
CLASE B  TACTCCAATTCAAAACCCAAACAATAATAACAATAATGCCACCCGACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCCGTTTTGCAT
CLASE C  TGCTCCAATTCAAAACCCAAACAATAATAACA-----GCCACCCGACTGCTTAACAAAGCTTGCTCACGGGCCAGCGACAAACCCGTTTTGCAT
* *****

CLASE A  GAACTATCTCAAAGCAATCCAAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAGACCAAGC
CLASE B  GAACTATCTCAAAGCAATCCAAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAGACCAAGC
CLASE C  GAACTATCTCAAAGCAATCCAAAGGTTATGGCAGCTACAACATCAAACCTTTAGACTTTGGTCTTGCCATTATTCAATCAGGAGCAGACCAAGC
*****

CLASE A  AAAAAATTAATCAATTCATATTTCTCCAAACCCAAAGGAATAAATCACTAGTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAATCTTTGGAATGA
CLASE B  AAAAAATTAATCAATTCATATTTCCAAACCCAAAGGAATAAATCACTAGTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATAAATGCAAAACCCATTTGGAATGA
CLASE C  AAAAAATTAATCAATTCATATTTCTCCAAACCCAAAGGAATAAATCACTAGTCCACAAGCTATTGAGGCTTATAATACTTGCAAAATCTTTGGAATGA
*****

CLASE A  GTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTATCAACAGTATAAGAGATCAACAAGGCTATGCTTATGATACAACAGATTTTGAGCTTAAGGTGCATCTTGA
CLASE B  GTTGGCTAGTGGATTGGAATGGAGTATCAACAGTATAAGAGATCAACAAGGCTATGCTTATGATACAACAGATTTTGAGCTTAAGGTGAATCTTGA
CLASE C  GTTGGCTAGCGGATTGGAAGAGTATCAACAGTATAAGAGATCAACAAGGCTATGCTTATGATACAACAGATTTTGAGCTTAAGGTGAATCTTGA
*****

CLASE A  CAAAGCAGCCAGCTGTGGAACTTGTAGAGTCGCTGCGAATTCATGATCCTGTATTGTCAGAAGCTAACAAAAGGTGTCACTGGCCGTAATGGG
CLASE B  CAAAGCAGCCAGCTGTGGAACTTGTAGAGTCGCTGCGAATTCATGATCCTGTATTGTCAGAAGCTAACAAAAGGTGTCACTGGCCGTAATGGG
CLASE C  CAAAGCAGCCAAATGTGGAAAGGCGT TAGAGTCGGTGCAGAATTCATGATCCTGTATTGTCAGAAGCTAACATAAAGGTGTCACTGGCCGTAATGGG
*****

CLASE A  TGCAACGCCATTTTGGTTGATGTAAGCCTCCTAAAAAGCTGGACTAGTACTAACTTGTGTTCTTTATA-GGGAAACA AAAAGAAATAAAGA
CLASE B  TGCAACGCCATTTTGGTTGATGTAAGCCTCCTAAAAAGCTGGACTAGTACTAACTTGTGTTCTTTATA-GG-AAACNCAAAAAGAAATAAAGA
CLASE C  TGCAACGCCATTTTGGTTGATGTAAGCCTCCTAAAAAGCTGGACTAGTACTAACTTGTGTTCTTTATA TAGGAATACCAAAAAGAAATATGT--A
*****

CLASE A  ATTATACTAAATAAGTC-AGAGGCCCTTGACCAGTG
CLASE B  ATTATACTAAATAAGTCCAGANGCAC-TTGACCAGTG
CLASE C  ATTCTACGAAATAAGTC-AGAGGCNC-TTGACCTGTG
*****

```

Figura 4. Alineamiento de los cDNAs correspondientes a las clases A, B y C de *NaPEP II*. Los codones de inicio y término de la traducción se encuentran enmarcados. Los nucleótidos conservados se indican en azul y con asterisco.

Mediante un análisis de expresión de los transcritos en estilos de *N. alata* se determinó que NaPEP II es una proteína estilar/estigmática específica y se traduce tanto en plantas AC como en plantas AI. Además, su expresión se encuentra regulada durante el desarrollo de estos órganos.

Las proteínas codificadas por las tres clases de *NaPEP II* (figura 5), contienen una región pequeña rica en asparaginas hacia el extremo N terminal. Los polipéptidos contienen 199 residuos de aminoácidos para la clase A y B y 197 para la clase C.

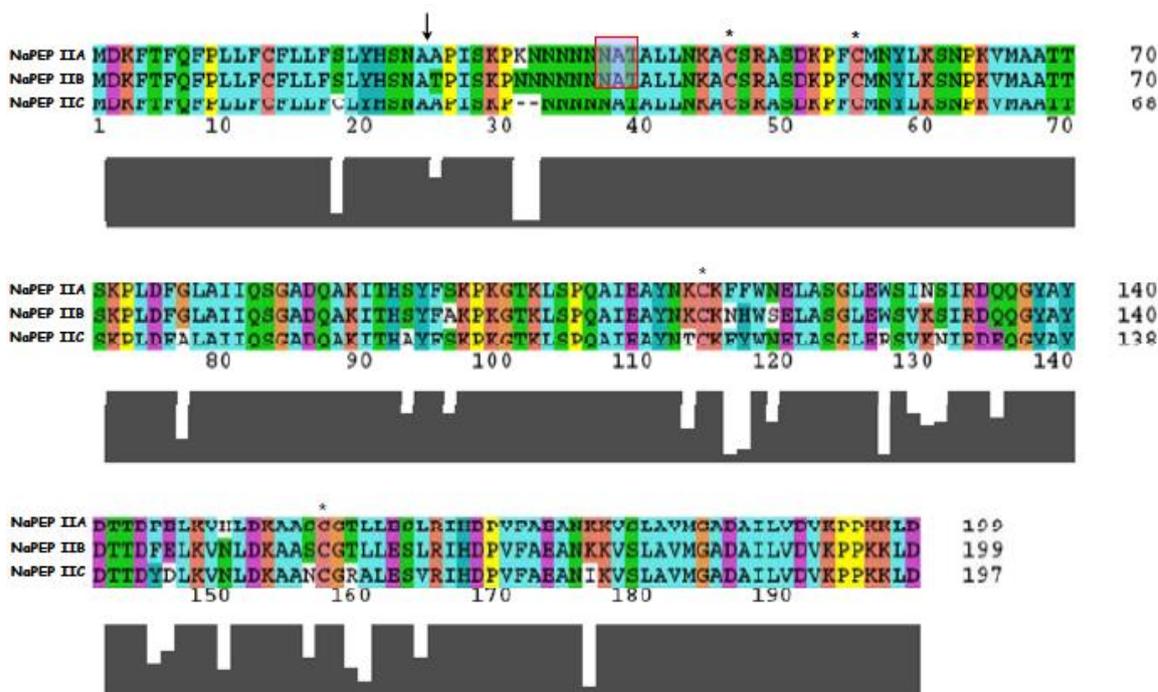


Figura 5. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de NaPEP IIA, NaPEP IIB y NaPEP IIC. Las secuencias están coloreadas asignándoles colores a residuos específicos. Las cajas negras debajo del alineamiento indican el grado de consenso de las secuencias. La flecha indica el sitio potencial de ruptura del péptido señal. Los residuos de cisteínas conservados están marcados con un asterisco. Los sitios potenciales de N-glicosilación están enmarcados.

Las identidades entre estas proteínas son de 95.5 % (NaPEP IIA y B), 89.9 % (NaPEP IIA y C) y 89.4 % (NaPEP IIB y C). NaPEP IIA, B y C son ricas en aminoácidos como alanina, lisina y leucina. Existe también un sitio potencial de N-glicosilación para NaPEP IIA y B basado en el programa NetNGlyc (www.cbs.dtu.dk/services/NetGlyc).

Las proteínas maduras de *NaPEP IIA*, B y C tienen puntos isoeléctricos (pIs) altos (9.31, 9.31 y 9.07, respectivamente). Las proteínas maduras tienen cuatro cisteínas que podrían formar dos puentes disulfuro relacionados con la estabilización de la estructura tridimensional de las proteínas y que además se sabe que se encuentran conservados en inhibidores de pectin-metilesterasa (IPME) de kiwi (*Actinidia deliciosa*) y *Arabidopsis thaliana*.

Para encontrar homólogos distantes, se realizaron búsquedas por dominios con el programa Pfam (Bateman *et al.*, 2002), encontrándose que NaPEP II (aminoácidos 36 al 182) tiene homología con inhibidores de pectín-metilesterasa (IPME) [score 27.3 y E=5.1e-05].

Los IPMEs están directamente relacionados a la modulación endógena de la actividad de las metilesterasas de pectina (PMEs) durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas. Los IPMEs inhiben a las PME de origen vegetal formando complejos estequiométricos 1:1 mediante uniones no covalentes (Mattei *et al.*, 2002; Di Matteo *et al.*, 2005). En el caso de la AI en *Nicotiana*, la presencia de un inhibidor de PME podría estar relacionada con el crecimiento y la extensión de la pared celular del tubo polínico.

La información anterior hace pensar que las proteínas de familia *NaPEP II* pudiesen estar relacionadas con la AI en *Nicotiana* mediante una posible actividad de IPME. Por tal motivo se decidió evaluar mediante este trabajo sí las proteínas de la familia NaPEP II presentan la actividad de IPME predicha.

3. OBJETIVOS

➤ 3.1 Objetivo general

Determinar la actividad de inhibidor de pectín-metilesterasa de las proteínas recombinantes GST::NaPEP II (A, B y C), así como de la proteína NaPEP II proveniente de estilos de *N. alata*.

➤ 3.2 Objetivos particulares

- a) Clonar, sobre-expresar y purificar las proteínas recombinantes GST::NaPEP II (A, B y C) en *Escherichia coli*.
- b) Purificar la proteína NaPEP II a partir de estilos de *Nicotiana alata* S_{C10}S_{C10}.
- c) Determinar la actividad de inhibidor de pectín-metilesterasa (IPME) de las proteínas recombinantes GST::NaPEP II (A, B y C), así como de la proteína NaPEP II presente en estilos de *N. alata*.

4. HIPÓTESIS

El cDNA de NaPEP II tiene similitud con Inhibidores de pectín-metilesterasa, por lo que se espera que su producto proteico sea capaz de inhibir la actividad de pectín-metilesterasa.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 SINTESIS QUÍMICA DE LOS ISOGENES *NaPEP II A*, *B* y *C*

Previo a este trabajo, se llevó a cabo la identificación del cDNA correspondiente a los 3 isogenes identificados como *NaPEP II A*, *NaPEP II B* y *NaPEP II C*. Con las secuencias obtenidas se pidió a la compañía GenScript que sintetizara de manera química los 3 isogenes. Junto con el DNA enviado por la compañía, se anexaron certificados de pureza y la secuenciación de cada isogen para avalar la calidad de la síntesis realizada. Los genes se nos enviaron clonados en el vector pUC57.

La síntesis de los isogenes permitió dar inicio a este trabajo, ya que a partir de ellos fue posible llevar a cabo la clonación y sobre-expresión de las proteínas recombinantes en *Escherichia coli*.

5.2 IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MADURA

Con la secuencia nucleotídica de los isogenes *NaPEP II A*, *B* y *C*, se obtuvo la secuencia de aminoácidos correspondiente, utilizando el programa SerialCloner 2.5. Con esta secuencia se determinó el número de aminoácidos correspondientes al péptido señal de cada proteína. Esta determinación se llevó a cabo mediante el uso del servidor SignalP 4.0 del centro para el análisis de secuencias biológicas (CBS) [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-4.0/] de la Universidad Técnica de Dinamarca, el cual se encuentra disponible en la red. La predicción de la secuencia correspondiente al péptido señal de cada isogen permitió clonar solo la secuencia correspondiente a la proteína madura.

5.3 DISEÑO DE OLIGOS PARA AMPLIFICAR LOS ISOGENES *NaPEP II* A, B y C

El diseño se llevó a cabo utilizando el programa AmplifX 1.5.4. Las secuencias son las siguientes:

➤ **NaPEPIImadFBamHI**

5' **GGATCC**GCTCCAATTTCAAACCCAACA 3'

➤ **NaPEPIIRNotI**

5' **GCGGCCGC**CTAGTCCAGCTTTTTAGGAGGCTT 3'

Estos oligonucleótidos fueron diseñados para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con la finalidad de amplificar los fragmentos correspondientes a los isogenes, además de adicionarle a estos los sitios de restricción BamHI en el extremo 5' de "NaPEPIImadFBamHI" y NotI en el extremo 3' de "NaPEPIIRNotI"¹. Por otro lado el sitio de restricción BamHI presente en el vector de expresión (pGEX 4T-2), donde fueron clonados los isogenes, permitió conservar el marco de lectura entre el último codón del extremo carboxilo terminal de la glutatión-S-transferasa (GST) y el primero del amino terminal de la proteína a fusionar (*NaPEP II* A, B ó C en este caso).

5.4 TRANSFORMACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES pUC57:NaPEP II A, B y C EN CÉLULAS DE *E. coli*.

Con la finalidad de generar un número considerable de copias de las construcciones, se utilizó la cepa de células químicamente competentes: *Escherichia coli*. "One Shot TOP10" de Invitrogen (Apendice A).

¹ Los sitios de restricción presentes en las secuencias de los oligonucleótidos se encuentran señalados en negritas y subrayados.

Luego de observar los resultados del crecimiento en las placas, se seleccionaron algunas colonias (15 aproximadamente) las cuales se re-sembraron en placas de medio LB con Ampicilina (100 μ g/mL) con la finalidad de aislarlas

5.5 CONFIRMACIÓN DE CLONAS TRANSFORMADAS CON LA CONSTRUCCIÓN pUC57:NaPEP II A, B Y C

La confirmación se llevó a cabo mediante PCR como se describe en la tabla 1.

Tabla 1. Reactivos y concentraciones usados para llevar a cabo la reacción de amplificación

<i>REACTIVO</i>	<i>CONCENTRACIÓN FINAL</i>
DNA Templado	Muestra de colonia
Mix KAPA 5X ²	1X
Primer <i>NaPEPIImadFBamHI</i> (10Mm)	0.5 μ M
Primer <i>NaPEPIIRNotI</i> (10Mm)	0.5 μ M
Volumen final de reacción ³	15μL

² Mix KAPA 5X: Contiene dNTP's: ATP, GTP,CTP, TTP (Conc. Final 0.2mM); buffer A 10X ; KAPA Taq DNA polimerasa (Conc. Final 1U); MgCl₂ (Conc. Final de 1.5mM). Todo se agrega de tal manera, que la mezcla final se encuentre a una concentración de 5X y al adicionarse a la reacción de PCR cada reactivo se encuentre a la concentración requerida (Conc. Final).

³El volumen final se logra al adicionar H₂O desionizada estéril.

Tabla 2. Condiciones de PCR para la amplificación de los isogenes *NaPEPII A, B y C*

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)
➤ Desnaturalización inicial	95°C	2
➤ Amplificación (30 ciclos)		
★ <i>Desnaturalización</i>	95°C	0.5
★ <i>Alineamiento</i>	62°C	1
★ <i>Elongación</i>	72°C	1
➤ Elongación final	72°C	5

Después de la amplificación del DNA presente en las colonias probadas, los productos fueron fraccionados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1% (p/v) y teñidos con bromuro de etidio, para comprobar mediante peso molecular que las construcciones (pUC57:NaPEP II A, B y C) efectivamente se encontraban en las clonas analizadas.

Una vez que se seleccionaron las clonas positivas, se sembraron en medio LB líquido con el antibiótico adecuado y posteriormente se purificó el de DNA plasmídico utilizando el kit "Zyppy Plasmid Miniprep Kit" (ZYMO RESEARCH) conforme a lo indicado en el apéndice B.

5.6 CLONACION DE LOS ISOGENES *NaPEPII A, B y C* EN EL VECTOR pGEM-T-Easy

Se realizó una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos descritos anteriormente, además de un sistema enzimático de amplificación de alta fidelidad (KAPA HiFi PCR Kit, KAPA BIOSYSTEMS) que consistió en una *Taq* DNA polimerasa que garantiza el tener un alto rendimiento, fidelidad y especificidad en los

productos amplificados. La mezcla para llevar a cabo la reacción de PCR es la mostrada en la siguiente tabla:

Tabla 3. Reactivos y concentraciones usados para amplificar los isogenes *NaPEPII A, B y C*

REACTIVO	CONCENTRACIÓN FINAL
DNA Templado	≈ 1ng
Amortiguador KAPA HiFi Fidelity (5X) (contiene 2.0 mM Mg ²⁺ 1X)	1X
Primer <i>NaPEPIImadFBamHI</i> (10Mm)	0.5 μM
Primer <i>NaPEPIIRNotI</i> (10Mm)	0.5 μM
Mezcla de dNTP's (10mM cada dNTP)	0.3 mM cada dNTP
DNA polimerasa KAPA HiFi (1U/μL)	0.5μL
Volumen final de reacción⁴	25μL

Tabla 4. Condiciones de PCR para la amplificación de los isogenes *NaPEPII A, B y C*

	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)
➤ Desnaturalización inicial	95°C	2
➤ Amplificación (30 ciclos)		
★ <i>Desnaturalización</i>	95°C	0.5
★ <i>Alineamiento</i>	62°C	1
★ <i>Elongación</i>	72°C	1
➤ Elongación final	72°C	5

⁴El volumen final se logra al adicionar H₂O desionizada estéril.

Los productos amplificados fueron fraccionados en un gel de agarosa al 1% (p/v) y teñidos con bromuro de etidio, para escindirlos⁵ del gel utilizando un "corta bandas" (SIGMA-ALDRICH). Los fragmentos digeridos fueron purificados utilizando el kit "Zymoclean Gel DNA Recovery" (ZYMO RESEARCH).

Luego de la purificación, se llevó a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo scientific), una vez que se determinó la concentración de DNA de cada muestra se tomaron 3 μ L de DNA de cada uno de los isogenes (*NaPEP II A*, *NaPEP II B*, *NaPEP II C*), estos se fraccionaron nuevamente en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Una vez confirmada la presencia de los fragmentos deseados, se continuó con la ligación de cada isogen al vector de clonación (previamente tratado con enzimas de restricción) "pGEM-T Easy" (Promega) de acuerdo al apéndice D.

Posterior a la ligación se realizó la transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* "DH5 α " (Invitrogen), como se especifica en el apéndice E.

Se seleccionaron las clonas positivas a la transformación, donde, aquellas de color blanco se consideraron positivas, es decir, las colonias contenían la construcción deseada. La identificación de clonas positivas fue posible gracias a que el sitio de clonación múltiple (MCS) se encuentra dentro de la secuencia del gen *lac Z*, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa.

En adición de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) se induce la transcripción del gen *lac Z* y producción de β -galactosidasa, lo cual provoca que se hidrolice el compuesto X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido). El producto de esta hidrólisis da como resultado una coloración azul. Sí la ligación del inserto deseado se

⁵ Las secuencias de los isógenes obtenidas en este paso, ya les fueron insertados los sitios de restricción *BamHI* y *NotI*.

lleva a cabo, entonces se interrumpirá la secuencia del gen *lac Z*, no habrá una producción de β -galactosidasa y en consecuencia no se presentará la coloración azul. En la figura 6 se muestra el esquema del vector pGEM-T-Easy.

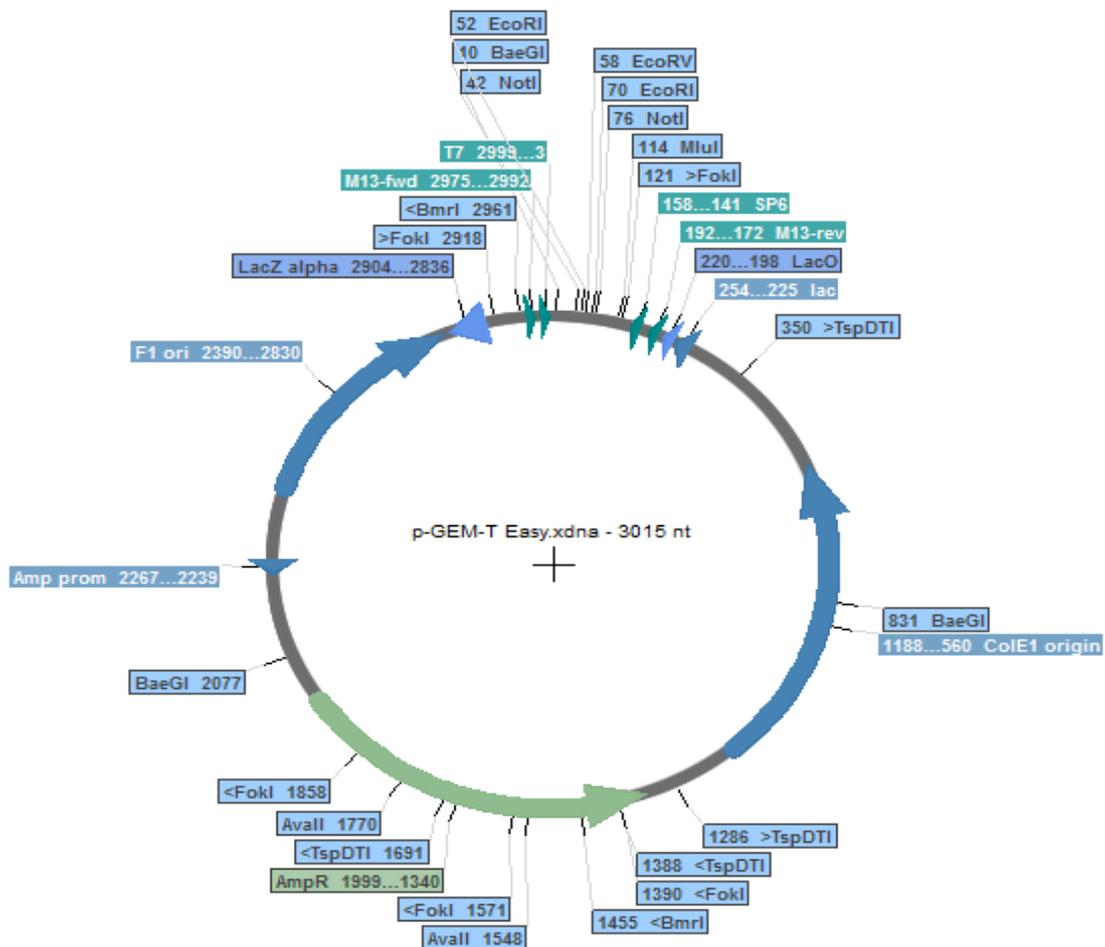


Figura 6. Esquema del vector pGEM-T-Easy. La secuencia muestra el sitio de clonación múltiple (MCS) donde se encuentran los diferentes sitios de restricción. Nótese que el vector contiene un gen marcador de resistencia a ampicilina (Amp^r). Además, el MCS se encuentra dentro de la secuencia correspondiente al gen *Lac Z*.

Después de seleccionar alrededor de 50 clones de cada isogen, se sembraron en placas con medio LB + Amp. ($100\mu\text{g}/\text{mL}$). De las clones aisladas se eligieron 5 para su posterior análisis mediante PCR (tabla 1 y 2)⁶. Luego de observar el gel de agarosa en el cual se fraccionaron los productos de la amplificación, se continuó con la siembra en medio LB líquido + Amp. ($100\mu\text{g}/\text{mL}$) de 3 clones de cada isogen (9 en total), las cuales presentaron el patrón de bandeo

⁶ Reactivos y concentraciones, así como las condiciones para llevar a cabo la reacción de PCR.

deseado. Posteriormente, se continuó con la purificación de DNA plasmídico de cada una de las 9 clonas⁷.

Una vez obtenido el DNA correspondiente a las construcciones pGEM:NaPEP II (A, B y C), se realizó un ensayo de restricción usando las enzimas BamHI y NotI, las cuales corresponden a los sitios de restricción adicionados a los isogenes y que se encuentran flanqueando dichas secuencias. Con el fin de corroborar que efectivamente éstas se encuentran completas y también contenían los dos sitios de restricción adicionados.

Los ensayos de restricción se diseñaron como se muestra en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Ensayo de restricción con BamHI y NotI.

COMPONENTE	Volumen (μL)
DNA de pGEM:NaPEP II (A, B ó C)	12 ($\approx 1\mu\text{g}$)
NE Buffer 3 (10X)	2
BSA (10X)	2
Bam HI 20,000 U/mL	2
NotI 10.000 U/mL	2
Incubar a 37°C durante 2.5 h	

⁷ Se utilizó el kit de purificación de DNA plasmidico "Zyppy Plasmid Miniprep Kit" (ZYMO RESEARCH), cuyo protocolo se describe en el apéndice B.

Tabla 6. Ensayo de restricción con BamHI.

COMPONENTE	Volumen (μL)
DNA de pGEM:NaPEP II (A, B ó C)	12 ($\approx 1\mu\text{g}$)
NE Buffer 3 (10X)	2
BSA (10X)	2
Bam HI 20,000 U/mL	1
H ₂ O	3
Incubar a 37°C durante 2.5 h	

Se comprobó mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (p/v) que los fragmentos producidos en el ensayo de restricción correspondían a los 3 isogenes.

5.7 CLONACIÓN DE *NaPEP II* (A, B Y C) EN EL VECTOR pGEX-4T-2

Se realizó un ensayo de restricción utilizando el volúmen total ($\sim 30\mu\text{L}$) de DNA de pGEM:NaPEP II A, B ó C (previamente obtenido), para ello se utilizaron las enzimas Bam HI y NotI, los fragmentos obtenidos correspondientes a las secuencias *NaPEP II* fueron purificados directamente del gel de agarosa usando el kit "Zymoclean Gel DNA Recovery" (ZYMO RESEARCH).

Paralelamente, se realizó la digestión del vector de sobreexpresión pGEX-4T-2 (Tabla 7) para llevar a cabo la ligación.

Tabla 7. Ensayo de restricción con BamHI y NotI.

COMPONENTE	Volumen (μL)
DNA de pGEX-4T-2	12 ($\approx 1\mu\text{g}$)
NE Buffer 3 (10X)	2
BSA (10X)	2
Bam HI 20,000 U/mL	2
NotI 10.000 U/mL	2
Incubar a 37°C durante 2.5 h	

El vector pGEX-4T-2 (figura 7) codifica la proteína glutatión-S-transferasa (GST), la cual se une al extremo amino terminal de la proteína a fusionar (*NaPEP II* A, B ó C). Este vector está diseñado para inducir un alto nivel de expresión intracelular del gen de interés en *E. coli*, lo que a su vez genera una alta producción de proteínas de fusión (GST::*NaPEP II*, en este caso). Es de suma importancia resaltar que el vector de sobreexpresión contiene solo un sitio de corte para las dos enzimas de restricción utilizadas (Bam HI y NotI).

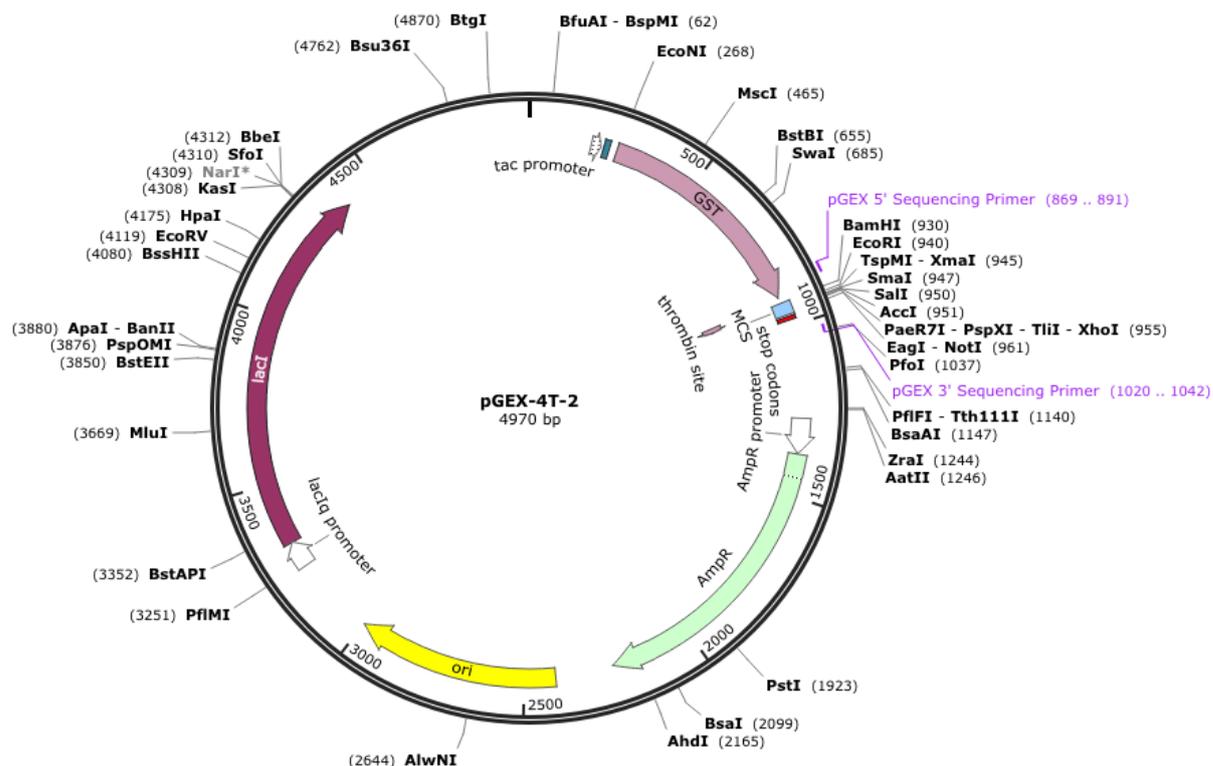


Figura 7. Mapa del vector pGEX-4T-2. La secuencia muestra el sitio de clonación múltiple, donde se encuentran los diferentes sitios de restricción. Nótese que solo se encuentra un sitio de restricción de las enzimas Bam HI y NotI. Además el sitio de reconocimiento para la trombina se encuentra al final de la secuencia codificante para GST.

Luego de los ensayos de restricción, se continuó con la ligación del vector de sobreexpresión con las secuencias *NaPEP II* (A, B y C) como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Ligación entre el vector pGEX-4T-2 y *NaPEP II* (A, B y C).

COMPONENTE	Volumen (μL)
Vector pGEX-4t-2 (Bam HI/NotI)	1 (200ng)
DNA de <i>NaPEP II</i> (A, B ó C) (Bam HI/NotI)	3 (360ng)
Amortiguador ligasa T4 Promega (2X).	5
DNA Ligasa T4 (3U/ μL)	1
Incubar toda la noche a 4°C	

Tomando 3 μ L de la reacción de ligación se transformaron células químicamente competentes (Apendice E) de *E. coli* "One Shot Mach1 T1" (Invitrogen). Posteriormente, se aislaron alrededor de 50 clonas positivas a la transformación y se evaluaron mediante PCR de colonia⁸. Una vez hecha la identificación mediante electroforesis en gel de agarosa de las clonas con el inserto deseado (pGEX:NaPEP II A, B ó C), se continuó con la purificación de DNA plasmídico, conforme a lo descrito anteriormente.

Luego de obtenerse el DNA se llevó a cabo un ensayo de restricción con las enzimas Bam HI y NotI (tabla 9).

Tabla 9. Ensayo de restricción con BamHI y NotI.

COMPONENTE	Volumen (μL)
DNA de pGEX:NaPEP II (A, B ó C)	7 (\approx 750 μ g)
NE Buffer 3 (10X)	1
BSA (10X)	1
Bam HI 20,000 U/mL	0.5
NotI10.000 U/mL	0.5
Incubar a 37°C durante 2.5 h	

Además de comprobar la presencia de los insertos correspondientes a *NaPEP II* se secuenciaron las construcciones pGEX:NaPEP II (A, B y C), utilizando los oligos "NaPEPIImadFBamHI" y "NaPEPIIRNotI". Las secuencias obtenidas con cada uno de los oligonucleótidos se compararon entre sí y con la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína GST de *Schistosoma japonicum* (Apéndice F). Para comprobar que la secuencia de los isogenes era la correcta y no

⁸ La reacción de PCR se llevó a cabo conforme a las especificaciones de las tablas 1 y 2.

contenía mutaciones, además de detectar si la proteína de fusión generada (GST::NaPEP II A, B o C) se encontraba en marco de lectura. Una vez que se comprobó que las secuencias estaban en marco de lectura, se purificó DNA plasmídico para posteriormente transformar células de *E. coli*. BL21 CodonPlus-RIL (Apéndice E). Las células BL21 están diseñadas para contener copias adicionales de genes que codifican para los tRNA's que más frecuentemente limitan la traducción de proteínas heterólogas en *E. coli*: "arg U (AGA, AGG), ile Y (AUA), leu W (CUA)". La disponibilidad de tRNA's permite un alto nivel de expresión de muchos genes heterólogos recombinantes.

5.8 SOBREEXPRESION DE LAS PROTEINAS DE FUSIÓN GST::NaPEP II (A, B y C)

Luego de comprobar mediante PCR y ensayos de restricción que las células (*E. coli*. BL21) contenían el inserto deseado, se continuó con la sobreexpresión de las proteínas recombinantes y un control que corresponde a la GST sola. Para ello, se llevó a cabo una primera inducción de las células utilizando (IPTG) a una concentración de 0.5mM. Se indujeron tres clonas de cada una de las construcciones, estas se crecieron a 37°C en agitación durante toda la noche para posteriormente inducir las durante 2h. También se realizaron controles de no inducción. Luego del crecimiento, las células se trataron para obtener una suspensión sin lisar en amortiguador salino de fosfatos PBS (Apéndice M), estas bacterias se cargaron en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) por duplicado (Apéndice G). Uno de los geles se tiñó con *azul de Coomassie* y el otro se transfirió a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) para realizar una inmunodetección de las proteínas de interés por Western blot (Apéndice H); además el Western blot permitió observar si las condiciones de inducción funcionaron para sobreexpresar las proteínas de interés. Este mismo experimento se repitió para dos clonas más de cada una de las proteínas de fusión.

Debido a la baja abundancia de proteína detectada por Western blot, se realizó una prueba para optimizar las condiciones de sobreexpresión de las proteínas quiméricas (tabla 10).

Tabla 10. Optimización de las condiciones de inducción de las proteínas recombinantes GST::NaPEP II (A, B y C).

	<i>CONDICIÓN 1</i>	<i>CONDICIÓN 2</i>
<i>TIEMPO DE INDUCCIÓN</i>	<i>2h</i>	<i>5h</i>
<i>TEMPERATURA</i>	<i>37°C</i>	<i>30°C</i>

Las células inducidas fueron tratadas con un amortiguador de lisis que contiene lisozima, el uso de esta enzima presente en el amortiguador permite liberar las proteínas solubles sin dañar su estructura (Apendice M). Posteriormente se obtuvieron las fracciones soluble e insoluble. Las proteínas de cada fracción se separaron mediante un gel SDS-PAGE. También se realizó un Western blot para observar los cambios en la producción de proteína recombinante y detectar su presencia en la fase soluble del lisado bacteriano.

5.9 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y LA GST

Una vez detectada la baja eficiencia en la producción de las proteínas de fusión y del control de la GST, se tomó la decisión de realizar varios cultivos a pequeña escala debido a que los ensayos de actividad posteriores no demandaban una cantidad abundante de proteína. Los cultivos se indujeron a 30°C durante 5h, luego fueron lisados y se obtuvieron solo las fracciones solubles. Después de obtener las fracciones solubles de cada recombinante y del control, se procedió a cuantificar la cantidad de proteína total (Apéndice I).

Después de saber cuánta proteína se tenía en las fracciones solubles, se llevo a cabo la purificación mediante cromatografía de afinidad utilizando como resina la "Glutación-Agarosa" (Sigma-Aldrich). Esta resina contiene al glutatión unido a la agarosa en su grupo sulfhidrilo central mediante un brazo espaciador de 12 átomos de carbono (figura 8).

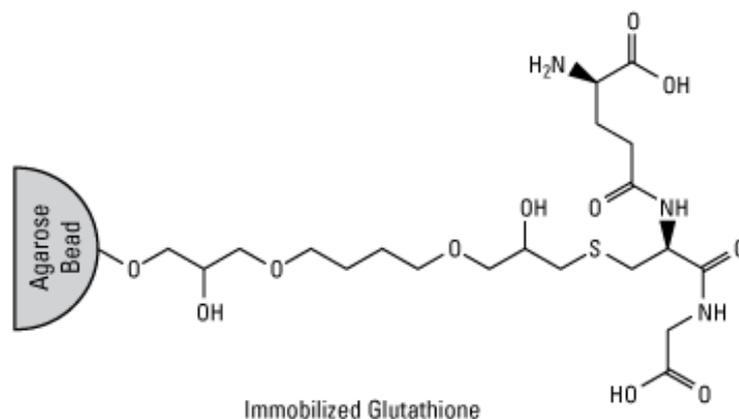


Figura 8. Estructura química del glutatión y la forma en la que éste se encuentra unido a una perla de agarosa. Nótese que el brazo espaciador de 12 átomos de carbono sirve para favorecer la unión del glutatión a la glutatión-S-transferasa (GST) evitando el impedimento estérico.

La purificación de las recombinantes y GST se realizó utilizando el método de purificación por "batch" (Apendice J), cabe destacar que la elución de las recombinantes se lleva a cabo usando glutatión

reducido (GSH). Una vez terminada la purificación se realizaron cuatro SDS-PAGE: tres para las recombinantes y uno para la GST sola; en ellos se evaluaron las siguientes fracciones: proteína sin purificar, proteína no unida a la resina, lavados de la resina y elución de la proteína de interés. Además se realizaron los Western blot que corroboran que la proteínas eluidas en cada caso corresponden a las recombinantes y al control de GST.

5.10 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA *NaPEP II* PRESENTE EN ESTILOS DE *Nicotiana glauca* Sc₁₀Sc₁₀.

Partiendo de 1.848g de estilos que fueron previamente triturados con nitrógeno líquido, se llevó a cabo la extracción de proteína total usando un amortiguador pH 5.2 de acetato de sodio 1M, NaCl 100mM y β -mercaptoetanol al 1% (v/v) (Apéndice M). Una vez teniendo el tejido en el amortiguador de extracción se maceró utilizando un "polytron" para hacer más eficiente la obtención de proteínas. La solución con las proteínas (extracto crudo) fue pasada a través de una resina de intercambio catiónico (SP-Sepharosa), ya que *NaPEP II* (nativa) tiene un punto isoeléctrico teórico de ≈ 9 . Cuando se encuentra en un pH ácido predominan en ella las cargas positivas. Esto permite que *NaPEP II* y otras proteínas con una densidad positiva se unan a la resina y puedan ser eluidas con un gradiente de NaCl, así es posible separar la proteína de interés de otras que tienen una densidad de carga diferente.

Se realizó la inmunodetección (Apéndice H) de *NaPEP II* en las diferentes fracciones de la elución por gradiente y aquellas donde se identificó en mayor proporción la proteína nativa fueron seleccionadas para probarlas posteriormente en el ensayo de actividad de inhibidor de pectín-metilesterasa (IPME).

5.11 SELECCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS CON POSIBLE ACTIVIDAD DE IPME A PARTIR DE KIWI (*Actinidia deliciosa*)

A partir de un fruto completo de Kiwi maduro se realizó un homogenado utilizando agua (1:1 masa/volumen), éste fue centrifugado y el sobrenadante resultante se ajustó a pH 7.5 utilizando NaOH. Posteriormente se llevó a cabo la precipitación fraccionada de las proteínas usando $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, el precipitado entre el 25-70% de saturación se resuspendió en un amortiguador pH 7.5 de Tris/HCl 10mM y NaCl 50mM (Apendice M), la solución proteica se dializó durante toda la noche. La solución con las proteínas (precipitado 25-70%) se cargó a una resina de intercambio aniónico (Q-Sepharosa). En la literatura se reporta la presencia de un IPME en el kiwi, éste es una glicoproteína con un punto isoeléctrico teórico menor a 3.5. Cuando se encuentra en un pH neutro predominan en él las cargas negativas. Lo anteriormente mencionado permite que el IPME y otras proteínas de carga negativa presentes en el precipitado se unan a la resina y según lo descrito en la literatura, mediante una elución con un gradiente lineal de NaCl se pueden obtener fracciones donde se encuentre el inhibidor.

Una vez que se obtuvieron las diferentes fracciones (eluciones con 150 a 400mM NaCl y las proteínas no unidas a la resina). Se seleccionaron 2 fracciones correspondientes a la elución por gradiente donde se pensó que habría presencia del inhibidor de PME reportado en la literatura. Además se seleccionó la fracción que correspondió a las proteínas no unidas a la resina, esto, bajo la consideración de que el inhibidor pudo no unirse a la resina. Cabe resaltar que las fracciones se eligieron con la finalidad de encontrar un control positivo para la actividad de Inhibidor de PME y no de obtener el IPME de kiwi puro.

5.12 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE PECTÍN-METILESTERASA (IPME) "ENSAYO DE DIFUSIÓN EN GEL Y TINCIÓN CON ROJO DE RUTÉNIO"

La determinación de la actividad de IPME (Apéndice K) de las proteínas recombinantes y *NaPEP II* nativa, se llevó a cabo en placas que contienen un gel de agarosa-pectina, estas fueron perforadas de tal manera que se pudiese colocar dentro de los pozos las mezclas "enzima (PME)-proteína a probar". Luego de una incubación de 18h a 30°C, las placas se revelaron usando una solución acuosa del colorante Rojo de rutenio.

La presencia de actividad de PME se puede observar por la formación de halos de color rojo intenso alrededor de los pozos. Los halos son producto de la reacción catalizada por la pectin-metilesterasa quien des-esterifica a los grupos metoxilo que se encuentran en los residuos de ácido galacturónico (figura 9) presentes en la pectina, esto provoca que se formen grupos carboxilo libres, los cuales atraen electrostáticamente a los cationes hexavalentes "[$(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{IV}}-\text{O}-\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5$] $^{+6}$ " presentes en la solución acuosa de rojo de rutenio. El efecto de inhibición es observable ya que si éste ocurre, el diámetro de los halos disminuye considerablemente o simplemente no aparece.

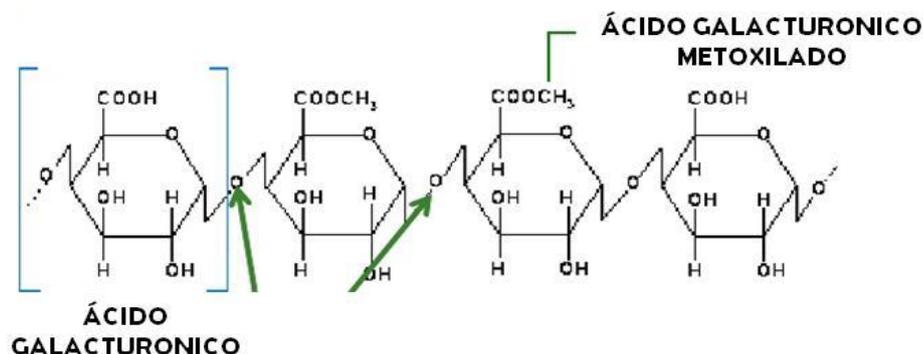


Figura 9. Estructura de las ramificaciones de ácido galacturónico presentes en la pectina. Se muestran también los residuos metoxilados de la molécula.

En la tabla 11 Y 12 se señalan las diferentes mezclas preparadas y su respectivo papel en el ensayo de actividad.

En la tabla 11 se muestran las mezclas realizadas con la finalidad de estandarizar las condiciones del ensayo de actividad, dentro de estas mezclas se probaron 3 fracciones etiquetadas como: "Lavado 1, Elución 150mM y Elución 300Mm" provenientes de la selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME, esto con la finalidad de identificar un control positivo a la actividad de IPME.

Tabla 11. Mezclas realizadas para la estandarización del ensayo de "difusión en gel y tinción con rojo de rutenio".

MEZCLA	PAPEL EN EL ENSAYO
Pectín-metilesterasa (PME)	Control (-) para la actividad de Inhibidor de pectín-metilesterasa (IPME)
PME desnaturalizada (95°C/ 5 min)	Control de la actividad de PME
PME + Lavado 1 (selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME)	Determinación de la actividad de IPME
PME + Elución 150mM (selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME)	Determinación de la actividad de IPME
PME + Elución 300mM (selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME)	Determinación de la actividad de IPME

En la tabla 12 se muestran las mezclas realizadas para llevar a cabo la determinación de la actividad de IPME de las proteínas *NaPEP II* recombinantes y *NaPEP II* de estilos de *N. alata*. Para ello se

probaron 3 diferentes fracciones correspondientes a la purificación de la proteína nativa (Elución con 100mM NaCl, Elución con 150mM NaCl, Elución con 200mM NaCl). La finalidad de evaluar estas fracciones fue la de detectar si efectivamente la *NaPEP II* de estilos de *N. alata* presentaba una actividad de IPME. Cabe destacar que se usó para este ensayo la fracción etiquetada como "Lavado 1" (proveniente de la selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME) como control positivo a la actividad de IPME.

Tabla 12. Mezclas realizadas para la determinación de la actividad de IPME.

MEZCLA	PAPEL EN EL ENSAYO
Pectín-metilesterasa (PME)	Control (-) para la actividad de Inhibidor de pectín-metilesterasa (IPME)
PME + Lavado 1 (purificación de IPME de kiwi)	Control positivo para la actividad de IPME
PME + ELUCIÓN 100mM NaCl	Prueba de actividad de IPME de NaPEP II nativa
PME + ELUCIÓN 150mM NaCl (1 y 2) ⁹	Prueba de actividad de IPME de NaPEP II nativa
PME + ELUCIÓN 200mM NaCl (1 y 2)	Prueba de actividad de IPME de NaPEP II nativa
PME + GST::NaPEPII A	Prueba de actividad de IPME
PME + GST::NaPEPII B	Prueba de actividad de IPME
PME + GST::NaPEPII C	Prueba de actividad de IPME
PME + GST	Control de ruido debido a la proteína de fusión

⁹ (1 y 2) Indica que se probaron dos fracciones diferentes que corresponden a la elución con la misma concentración de NaCl.

6. RESULTADOS

6.1 IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA MADURA

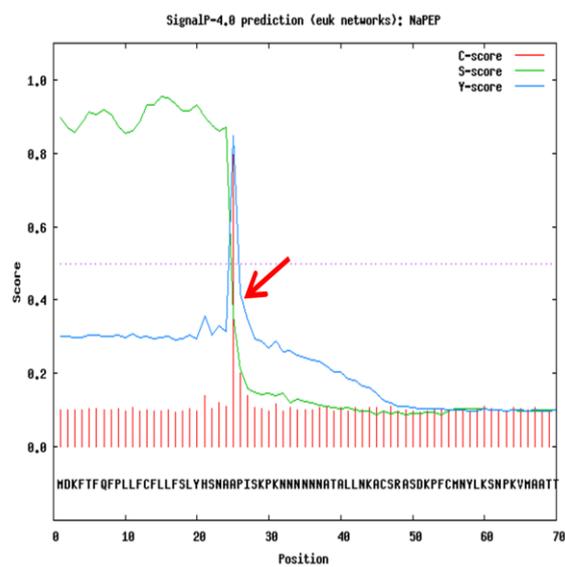
La secuencia de residuos de aminoácidos correspondientes al péptido señal de las proteínas NaPEP II (A, B y C) es predicha por el servidor SignalP 4.1 mediante la comparación de 3 diferentes bases de datos. El resultado del análisis predijo un péptido señal de 24 residuos de aminoácidos y una proteína madura de 173 residuos de aminoácidos para cada uno de los casos (figura 10 A, B, C).

Las graficas mostradas en la figura 10, corresponden a los perfiles de hidrofobicidad de cada uno de los isogenes *NaPEP II*. En las gráficas se encuentra en el eje de las ordenadas una escala de "score" y en el eje de las abscisas la posición de los residuos de aminoácidos de la proteína completa. Cada gráfica consta de la comparación de tres "scors" provenientes de tres diferentes predicciones; la primera de ellas "C-score" (línea roja) señala el o los sitios posibles de escision del péptido señal, solo es indicativo del sitio de corte del péptido señal; la segunda predicción "S-score" (línea verde) distingue, mediante el nivel de hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos, al péptido señal de la proteína madura o proteína sin péptido señal; la tercer predicción "Y-score" (línea azul) predice el sitio de corte del péptido señal mediante una combinación entre la media geométrica del "C-score" y la pendiente del "S-score", lo que resulta en una predicción mas exacta del sitio de corte.

Como se puede observar en las gráficas de la figura 10, los tres predictores coinciden en un mismo sitio (señalado con una flecha roja), el cual indica el sitio de corte del péptido señal y además distingue los residuos de aminoácidos pertenecientes a la proteína madura de los correspondientes al péptido señal.

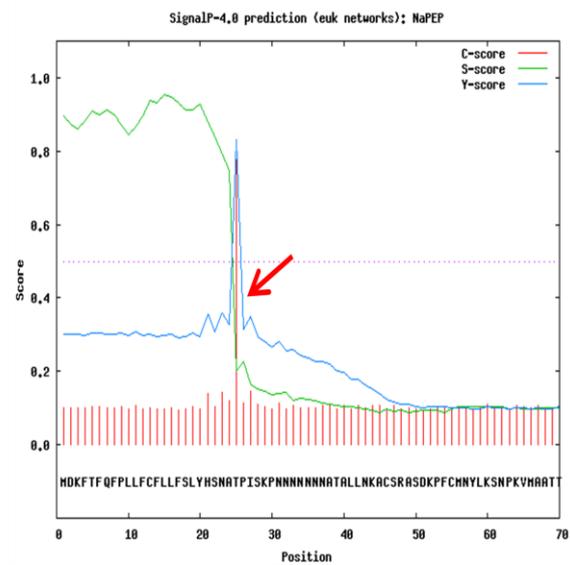
A.

>NaPEP II A sec



B.

>NaPEP II B sec



C.

>NaPEP II C sec

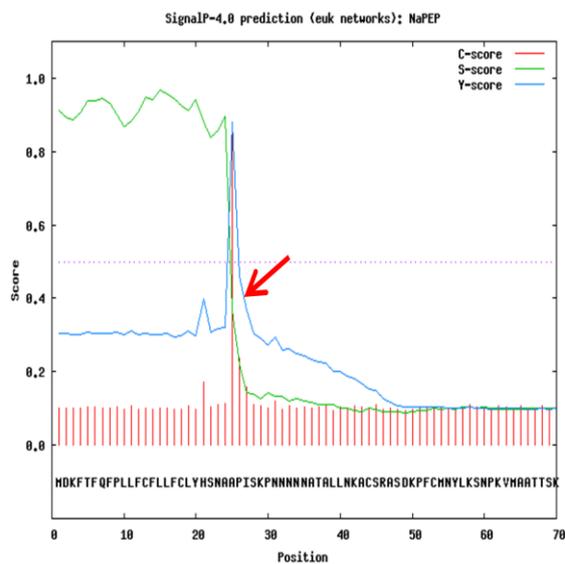


Figura 10. Graficas de predicción de la secuencia del péptido señal. A. "predicción de *NaPEP IIA*", B. "predicción de *NaPEP IIB*", C. "predicción de *NaPEP IIC*". La flecha señala los sitios donde se predice el termino del péptido señal.

6.2 TRANSFORMACIÓN DELAS CONSTRUCCIONES pUC57:NaPEP II A, B y C EN CÉLULAS DE *E.coli*.

Usando los oligonucleótidos "NaPEPIImadFBamHI" y "NaPEPIIRNotI" se comprobó la presencia de las secuencias correspondientes a los 3 isogenes *NaPEP II*.

Como se observa en la figura 11, se probaron dos clonas correspondientes a cada construcción (*NaPEP IIA*, *NaPEP IIA*, *NaPEP IIC*). Los fragmentos observados en el gel de electroforesis corresponden al tamaño esperado de 536pb. Una vez sabido esto, se comenzó con la clonación de los 3 isogenes.

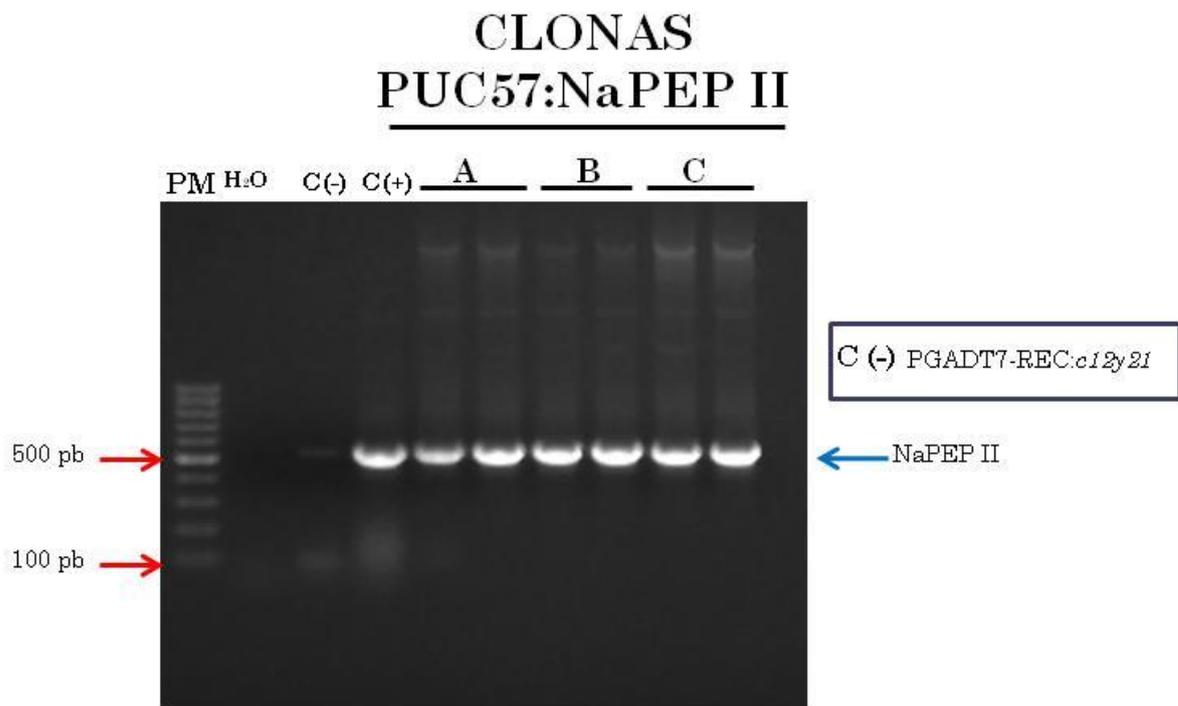


Figura 11. PCR de colonia a transformantes de PUC57:NaPEP II. De izquierda a derecha, se observa el marcador de peso molecular, un control negativo usando (H₂O), un control negativo usando la construcción PGADT7-REC:C12Y21. El control positivo se trata de una alícuota directa de una de las construcciones enviada por GenScript. A, B y C corresponden a las clonas probadas de cada isogen.

6.3 CLONACION DE LOS ISOGENES *NaPEPII* A, B y C EN EL VECTOR pGEM-T-Easy

Para introducir las secuencias de *NaPEP II* al vector de fácil clonación (pGEM-T-Easy), fue necesario utilizar una DNA Taq polimerasa de alta fidelidad que amplificara las secuencias de interés, esto asegura que los productos generados a partir del PCR serían idénticos o con un margen mínimo de error con respecto al DNA molde. Al usar este sistema enzimático se evita la generación de mutaciones que pueden desencadenar en la generación de una proteína no funcional.

Una vez que se realizó la amplificación, los productos obtenidos fueron ligados al vector y con las construcciones obtenidas se transformaron las células competentes de *E.coli*. Para probar la presencia de los isogenes en las transformantes, se seleccionó una clona de cada construcción para obtener su DNA plasmídico y a partir de él llevar a cabo un ensayo de restricción (figura 12) con el que se corroboró que las transformantes contenían la construcción deseada. Cabe destacar que en la digestión con Bam HI se esperaba solo la linearización del vector ya que el sitio de restricción correspondiente a esta enzima solo está presente en la secuencia de *NaPEP II*.

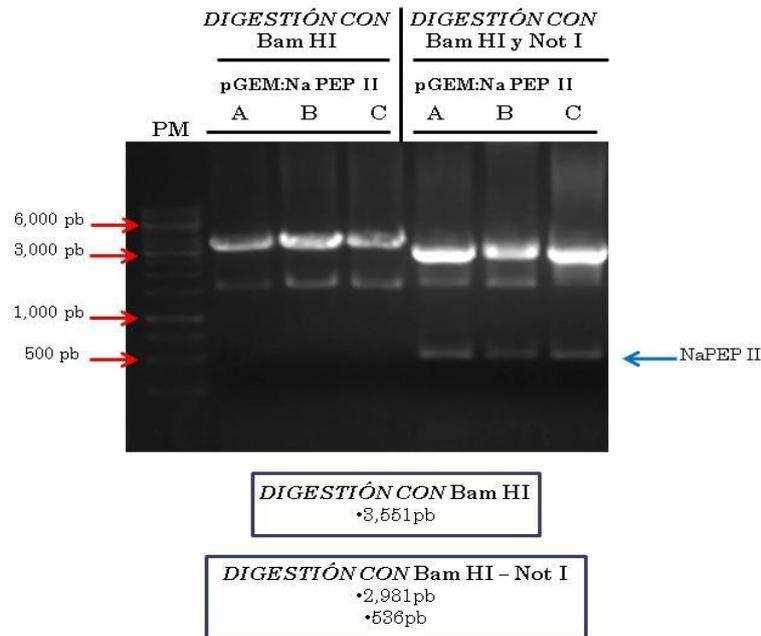


Figura 12. Ensayo de restricción a transformantes pGEM:NaPEP II (A, B y C). En el extremo izquierdo se muestra el marcador de peso molecular. Tanto en la digestión con Bam HI, como con Bam HI-NotI se usaron las mismas clonas. En la parte inferior se muestra el tamaño esperado de los fragmentos producto de los ensayos de restricción. El ensayo solo con Bam HI muestra la linearización del vector. Además en la doble digestión se observa la liberación de los insertos correspondientes a las secuencias de *NaPEP II*.

6.4 CLONACIÓN DE *NaPEP II* (A, B Y C) EN EL VECTOR pGEX-4T-2

Una vez digeridos los fragmentos correspondientes a *NaPEP II* con las dos enzimas de restricción, se ligaron al vector de sobreexpresión previamente digerido con las mismas enzimas. Una vez concluida la ligación, se transformaron las células de *E.coli* Mach1 de manera exitosa. Para comprobar que en las transformantes se encontraban las secuencias de los isogenes, se llevó a cabo un ensayo de restricción (figura 13), en el que se observa que el tamaño de los fragmentos obtenidos en la electroforesis correspondió al de 536pb esperado para las secuencias NaPEP II.

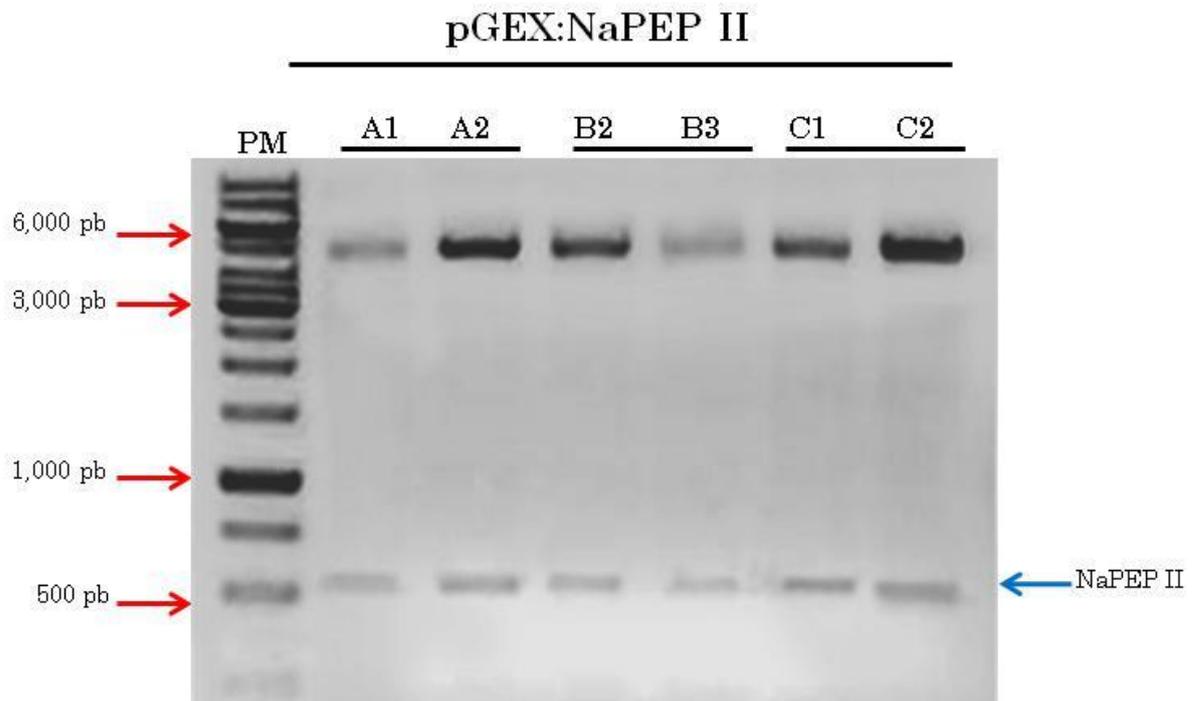


Figura 13. Ensayo de restricción de transformantes de pGEX:NaPEP II (A, B y C). Se muestra la digestión de dos clones de cada construcción. En el extremo izquierdo se encuentra el marcador de peso molecular. La flecha azul muestra la presencia de los fragmentos correspondientes a *NaPEP II*.

Para comprobar la ausencia de mutaciones en las secuencias de *NaPEP II* y observar si GST y el inserto se encuentra en marco de lectura se realizó una secuenciación utilizando los dos oligos diseñados. La información obtenida de la secuenciación se comparó mediante un alineamiento a nivel de nucleótidos (Apendice L) con los cDNA's correspondientes a los 3 isogenes y con la secuencia de GST obtenida del "Protein Data Bank" (PDB) correspondiente a *Schistosoma japonicum* (No. **P08515**).

Como se puede apreciar mediante el código de colores de los alineamientos, las secuencias de *NaPEP II* que fueron clonadas no contienen mutaciones, además de que toda la secuencia nucleotídica correspondiente a la proteína de fusión (GST::*NaPEP II*) se encuentra en marco de lectura. Esto verificó que la clonación de los isogenes fue correcta y con ello se pudo dar paso a la transformación de las

células *E. coli*. BL21 CodonPlus-RIL encargadas de sobreexpresar las proteínas recombinantes.

Una vez transformadas las células se realizó un ensayo de restricción con las enzimas Bam HI y NotI (Figura 14) para asegurar que las clonas positivas estaban listas para ser inducidas. En el gel de agarosa se observan los fragmentos correspondientes a *NaPEP II* que coinciden con el tamaño de 536pb esperado; también se digirió al vector pGEX-4T-2 vacío como control para la digestión. El vector cortado con las enzimas presentó dos fragmentos uno de 4,940pb y otro de 30pb, el fragmento más grande coincidió con el observado en el gel y el otro fue demasiado pequeño para observarlo en un gel de estas características.

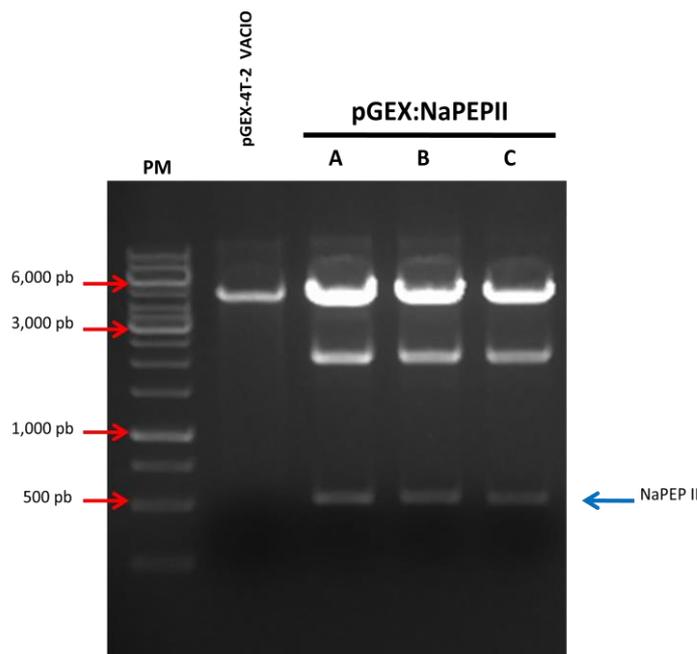


Figura 14. Ensayo de restricción con Bam HI y NotI. En el extremo izquierdo se encuentra el marcador de peso molecular. De izquierda a derecha se observa primero el vector vacío digerido y luego las muestras digeridas de cada una de las construcciones NaPEP II (A, B y C). La flecha indica la presencia de los insertos que corresponden a *NaPEP II*.

6.5 SOBREENPRESION DE LAS PROTEINAS DE FUSIÓN (GST::NaPEP II (A, B y C))

Después de transformar las células encargadas de sobreexpresar a las proteínas recombinantes, se continuó con la inducción de las mismas utilizando IPTG como molécula que activa dicha inducción. Primero se probó induciendo las células durante 2h a 37°C. Transcurrido el tiempo, las células se aislaron del medio de cultivo y se obtuvo una suspensión de ellas, la cual fue cargada directamente al gel SDS-PAGE "por duplicado" (la electroforesis duró ~1h). Se evaluaron tres clones de cada construcción positivas a la transformación. Luego, se analizaron los geles teñidos con azul de Coomassie y la inmunodetección por Western blot (figura 15A, B, C) generados en este experimento.

En la figura 15A se muestran las primeras tres clones seleccionadas, tanto en el gel teñido con azul Coomassie como en el Western blot se observa la presencia de señales intensas correspondientes a las clones inducidas con IPTG (signo +), las cuales no se observan en las clones que no fueron inducidas con IPTG. Este patrón se repite en las señales presentes en figuras 15B y 15C.

Cabe resaltar la presencia de señales tenues detectadas por el anticuerpo α -NaPEP II que se encuentran por debajo de las señales correspondientes a las proteínas de fusión, esto se puede observar en el Western blot de las figuras 15A y 15C. La presencia de estas señales tenues se debe a la degradación que las proteínas sufrieron durante los diferentes procesos realizados antes de su evaluación, esto se deduce bajo el concepto de que al descongelar las fracciones que contienen a las proteínas se puede favorecer la activación de proteasas que degraden a las proteínas.

Los resultados del análisis muestran que las clonas que fueron inducidas con IPTG produjeron una cantidad importante de proteína recombinante con respecto a las células que no fueron inducidas. Estos datos confirmaron que las proteínas se generaron de manera adecuada respondiendo correctamente a la inducción.

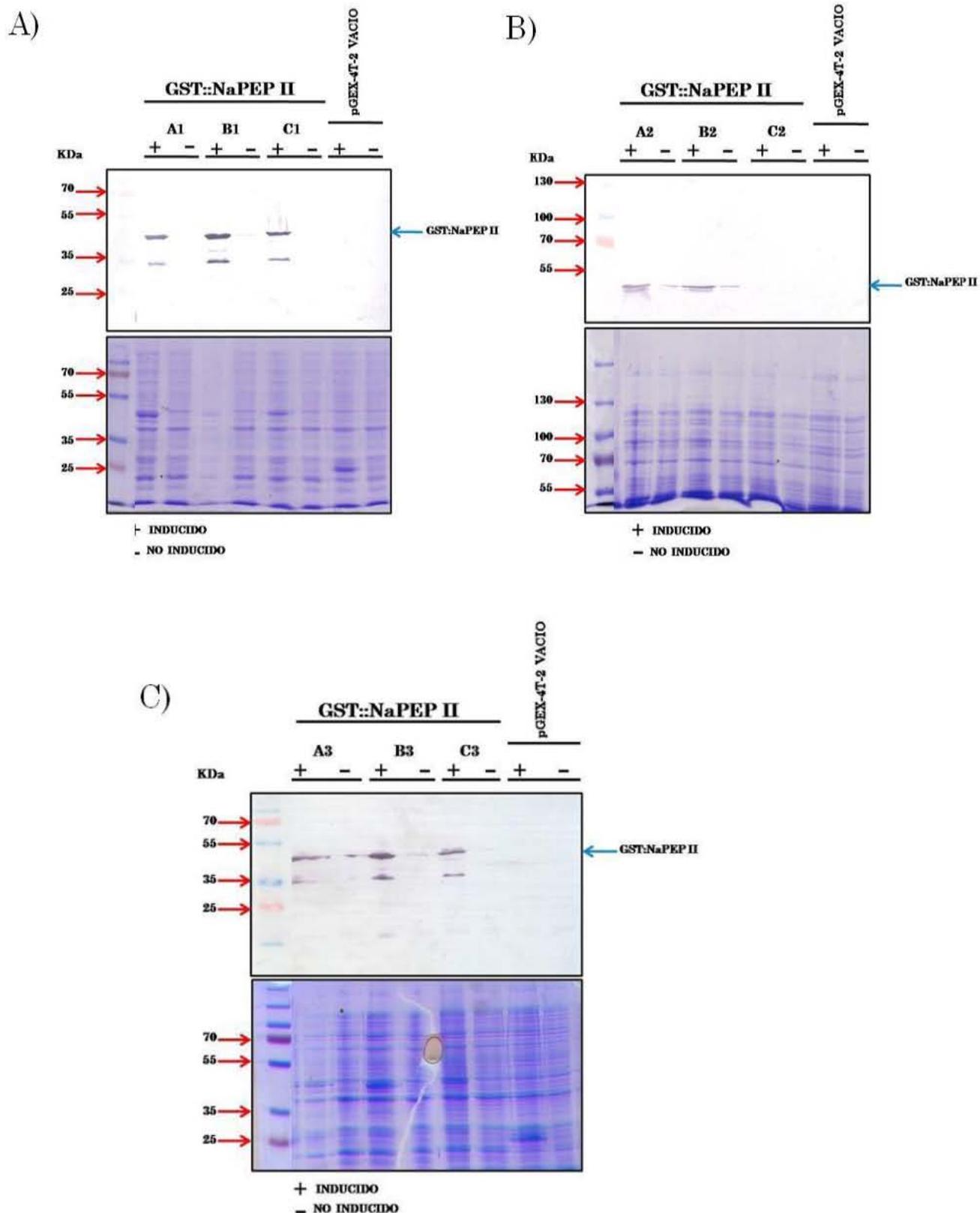


Figura 15. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (Imagen inferior) e inmunodetección por Western blot (Imagen superior) producto de la inducción de las células BL21 CodonPlus-RIL. A) Corresponde al primer conjunto de clonas probadas. B) y C) Corresponden al segundo y tercer conjunto de clonas probadas. La flecha azul señala la inmunodetección de las proteínas recombinantes. (-) Corresponde a los controles de no inducción para cada clona. (+) Corresponde a las clonas que fueron inducidas.

Una vez comprobado que la producción de proteína recombinante respondió a la inducción, se realizó la lisis celular con la finalidad de identificar si las proteínas producidas se encontraban en la fase soluble del lisado. Para ello se realizó un segundo ensayo de SDS-PAGE e inmunodetección (figura 16), donde se analizaron las 9 clonas seleccionadas previamente. Los resultados muestran que las proteínas recombinantes sí se encuentran en la fase soluble del lisado, pero en menor proporción que en la fase insoluble. Como un control en la inmunodetección de las proteínas recombinantes se analizaron también las fracciones correspondientes a las células transformadas con el vector vacío.

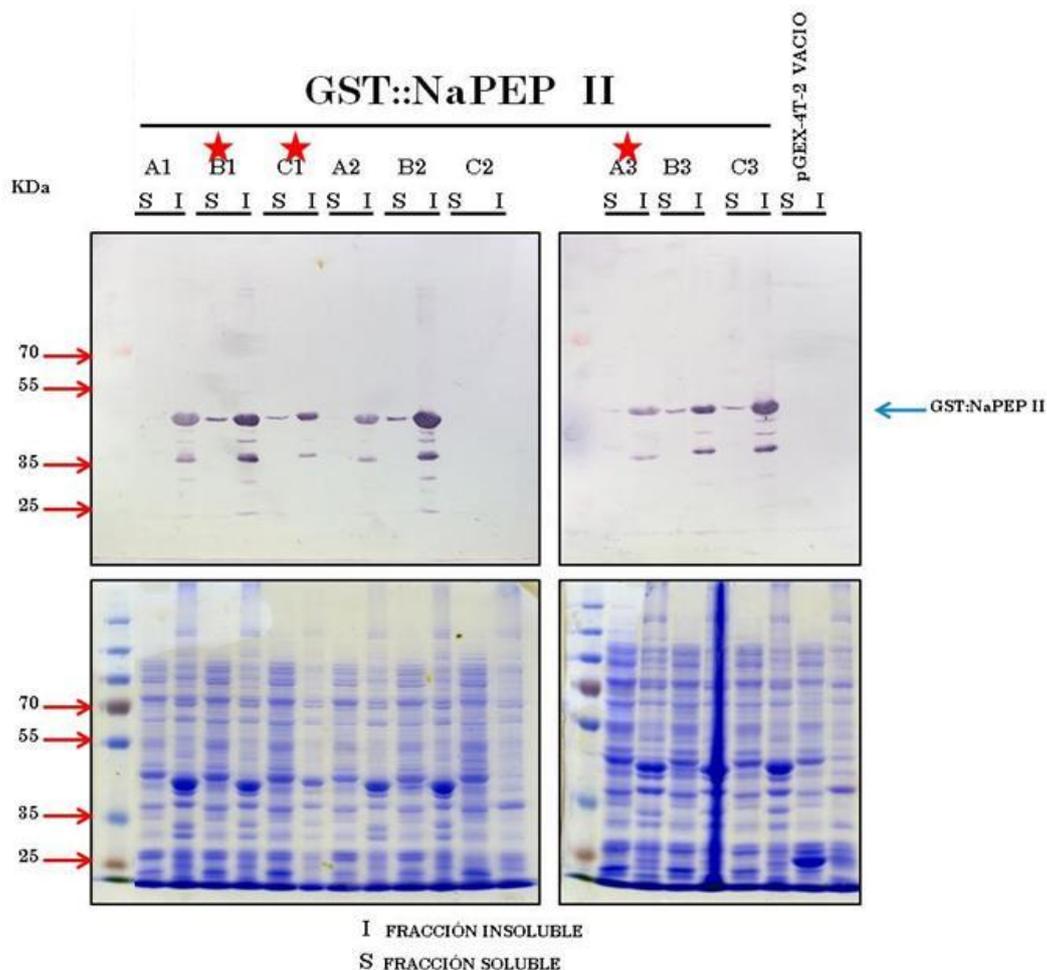


Figura 16. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (Imagen inferior) e inmunodetección por Western blot (Imagen superior) de las fases soluble e insoluble producto del lisado celular. (S) Corresponde a la fracción soluble obtenida de la lisis. (I) Corresponde a la fase insoluble obtenida de la lisis. En el extremo derecho de la imagen aparecen las fracciones correspondientes a las células transformadas con el vector vacío. La inmunodetección se llevo a cabo con el anticuerpo primario α -NaPEP II.

Con base en lo observado en el análisis por Western blot se decidió seleccionar las clonas identificadas como A3, B1 y C1 ya que éstas produjeron una mayor cantidad de proteína recombinante soluble. Estas clonas se utilizaron posteriormente en un ensayo para optimizar las condiciones de inducción y así favorecer que las proteínas recombinantes solubles se produjeran en mayor cantidad.

El ensayo de optimización (figura 17) consistió en variar la temperatura y el tiempo de inducción de las células (5h, 30°C) y luego comparar los resultados con los obtenidos previamente.

El análisis se realizó mediante un SDS-PAGE y Western blot, en el se cargaron las fracciones solubles (S) e insolubles (I) producto de la lisis de células inducidas.

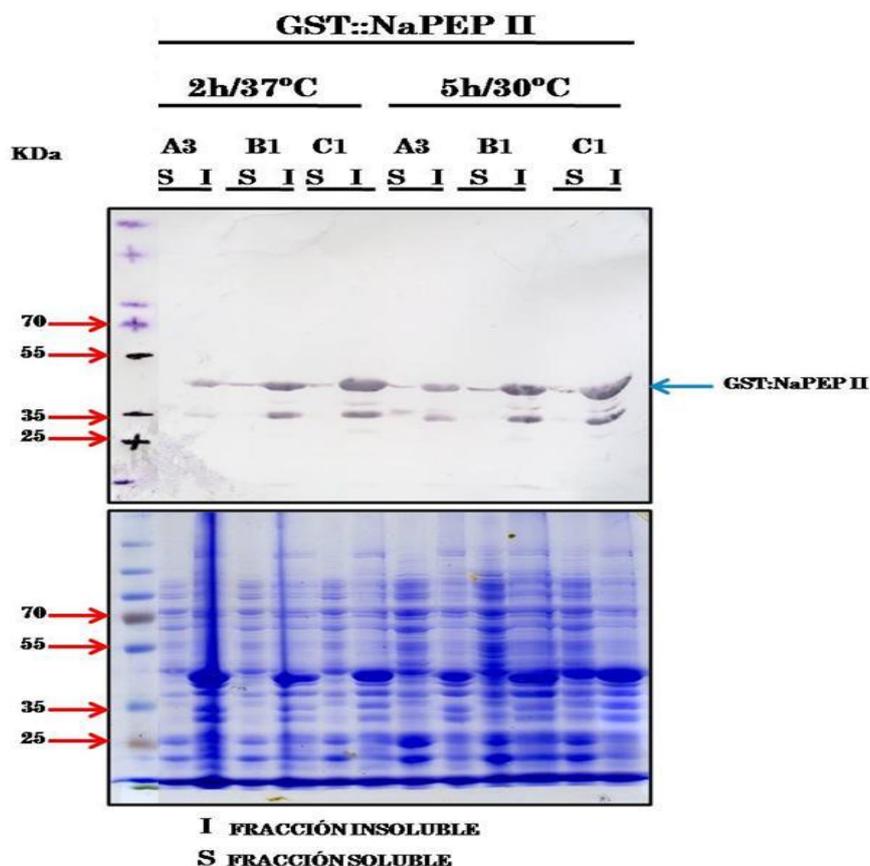


Figura 17. Gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Imagen inferior) e inmunodetección por Western blot (Imagen superior) del ensayo de optimización de condiciones de inducción. Se observan las fracciones soluble e insoluble de los lisados celulares. Se analizaron las mismas clonas (A3, B1, C1) en las dos diferentes condiciones. La inmunodetección se llevo a cabo con el anticuerpo primario α -NaPEP II.

Los resultados del ensayo mostraron que la presencia de las proteínas recombinantes en la fase soluble no se incrementó de manera importante al variar las condiciones de inducción, incluso se puede observar que existe una mayor cantidad de proteína en las fases insolubles que en las fases solubles de los lisados bacterianos. Considerando que los ensayos de actividad a realizar posteriormente requerirían una cantidad pequeña de proteína se optó por llevar a cabo varias inducciones a pequeña escala utilizando las condiciones de 5h y 30°C.

6.6 PURIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN Y LA GST

Según las especificaciones de fábrica de la resina "Glutación-Agarosa", esta une ≈ 7 mg de proteína por cada mililitro de resina hidratada; con estos datos fue posible calcular la cantidad de resina hidratada necesaria para purificar las proteínas de fusión, así como a la GST. En la tabla 13 se muestran las cantidades de resina hidratada a utilizar respecto a cada una de las muestras a purificar, considerando que alrededor del 50% de la proteína total cuantificada correspondía a la proteína de interés.

Tabla 13. Relaciones de cantidad de proteína-Resina hidratada a utilizar.

<i>MUESTRA A PURIFICAR</i>	<i>CANTIDAD DE PROTEÍNA TOTAL (μg)</i>	<i>VOLUMEN DE RESINA HIDRATADA (μL)</i>
<i>GST::NaPEP II A</i>	971	180
<i>GST::NaPEP II B</i>	1672	250
<i>GST::NaPEP II C</i>	1150	200
<i>GST sola</i>	1273	200

Después de purificarlas muestras por "batch", se realizó un análisis electroforético por SDS-PAGE e inmunoanálisis por Western blot (figura 18A, B, C, D) con los que se llevó a cabo el monitoreo de la purificación, partiendo de la fracción proteica total soluble hasta las fracciones obtenidas de la elución de la resina.

Como se observa en la figura 18, se cargaron en los geles de poliacrilamida: una fracción sin purificar, una fracción no unida, tres lavados realizados a la resina ya unida a las proteínas recombinantes, dos fracciones correspondientes a las eluciones y finalmente a manera de control positivo para la detección de *NaPEP II*, una fracción de extracto crudo de estilos (solo figuras 18A, 18B y 18C). Se puede apreciar que en los cuatro casos evaluados (proteínas recombinantes *NaPEP II* y la GST) se encuentran señales que corresponden a las proteínas a purificar en las fracciones de elución y fracción no unida, así como en las fracciones de elución, lo que significa que no toda la proteína de la cual partió la purificación se unió a la resina.

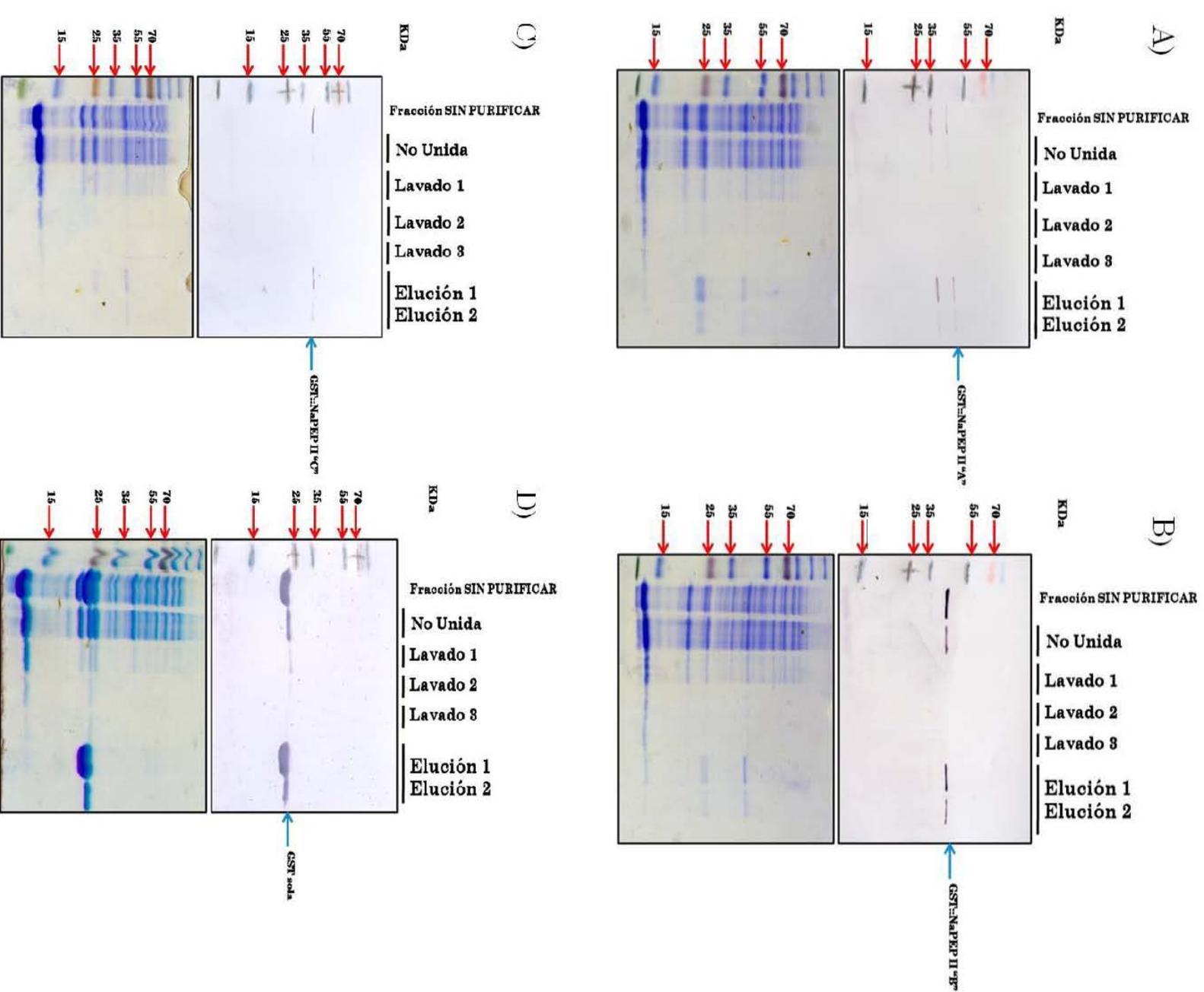


Figura 18. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie (Imagen inferior) e inmunodetección por Western blot (Imagen superior) del monitoreo de la purificación de las proteínas recombinantes y la GST. A) B) C) corresponden a las proteínas recombinantes. D) corresponde a GST sola. En cada imagen, de izquierda a derecha se encuentran los carriles correspondientes a la fracción sin purificar, los lavados de la resina, las eluciones de las proteínas unidas a la resina. En A) B) y C). Las membranas de los Western blot correspondientes a las imágenes A), B) y C) fueron reveladas con el anticuerpo primario α -NaPEP II. La membrana del Western blot correspondiente a la imagen D) se reveló con el anticuerpo primario α -GST.

Los resultados del análisis muestran qué en cada caso se logró obtener a la proteína de interés prácticamente pura. Cabe destacar que en las fracciones de elución, el anticuerpo α -NaPEP II detectó otras proteínas de bajo peso molecular, lo cual se puede atribuir a una posible degradación de la proteína durante la purificación.

6.7 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA *NaPEP II* PRESENTE EN ESTILOS *Nicotiana alata* S_{C10}S_{C10}.

Con la finalidad de comparar la actividad que presentan las proteínas recombinantes con la de la proteína nativa se llevó a cabo la purificación a partir de estilos de una especie autoincompatible de *N. alata*.

Una vez que se eluyeron las proteínas de la resina de intercambio catiónico se realizó un monitoreo de la purificación mediante un SDS-PAGE y Western blot (figura 19) para identificar las fracciones en las cuales se encuentra en mayor cantidad *NaPEP II*. Como se observa en esta figura, no hubo una correcta separación de las proteínas en general. Esto se puede observar fácilmente en el carril correspondiente al marcador de pesos moleculares, en el cual las bandas de 25 y 15 kDa se encuentran juntas. La falta de separación entre las proteínas de bajo peso molecular generó confusión debido a que no fue posible determinar en qué fracciones correspondientes a la elución se encontraba en mayor cantidad la *NaPEP II* de estilos de *N. alata*.

En consecuencia de que la resolución de las proteínas en la primera electroforesis realizada no fue adecuada, se realizó un segundo análisis solo con las fracciones que posiblemente pudieron estar enriquecidas con *NaPEP II* y que fueron seleccionadas del primer ensayo.

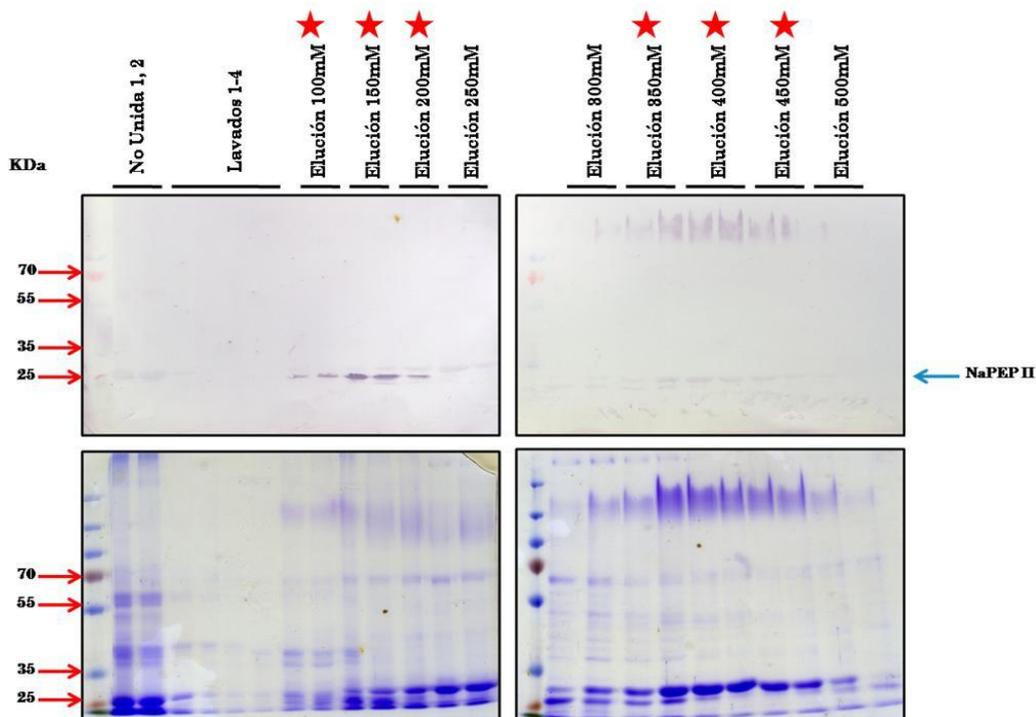


Figura 19. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie e inmunodetección por Western blot del monitoreo de la purificación parcial de *NaPEP II* de estilos de *N. alata*. (Arriba) Western blot. (Abajo) SDS-PAGE. De izquierda a derecha se cargaron las fracciones correspondientes a: extracto crudo, proteínas no unidas a la resina, lavados de la resina y las diferentes eluciones con gradiente de NaCl. Se usó un gradiente de elución de NaCl que va de 100mM hasta 500mM. La flecha azul indica la presencia de la *NaPEP II*. Las estrellas indican las fracciones que posiblemente se encuentra presente *NaPEP II*.

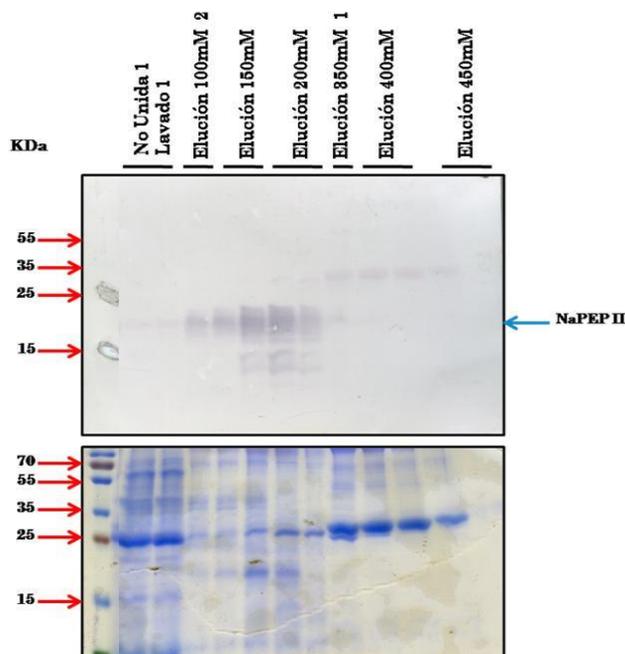


Figura 20. Análisis electroforético por SDS-PAGE y Western blot de las fracciones enriquecidas con *NaPEP II* de estilos de *N. alata*. Se analizaron las fracciones correspondientes a las eluciones de 100, 150, 200, 350, 400 y 450mM. La flecha indica la presencia de la *NaPEP II* presente en estilos de *N. alata*. Los números sobre las etiquetas se refieren a la fracción probada, correspondiente a la elución con una sola concentración de NaCl. En donde no hay números sobre las etiquetas se probaron todas las fracciones correspondientes a una sola concentración de NaCl.

Como se observa en el segundo análisis (figura 20), gracias a una mejor resolución de las proteínas se pudo determinar que las fracciones que correspondían a las eluciones con 100mM (1), 150mM (1 y 2), 200mM (1 y 2) presentaron una señal más intensa a la presencia de NaPEP II, por tal motivo se decidió utilizar éstas fracciones para probar la actividad de IPME de la NaPEP II de estilos de *N.alata*.

6.8 SELECCIÓN DE FRACCIONES PROTEICAS CON POSIBLE ACTIVIDAD DE IPME A PARTIR DE KIWI (*Actinidia deliciosa*)

Con la finalidad de encontrar un control positivo para la actividad de IPME que pudiese ser usado en los ensayos de actividad de las proteínas recombinantes *NaPEP II* y la proveniente de estilos de *N. alata*, se llevó a cabo la selección de las fracciones proteicas con posible actividad de IPME, esto, a partir de kiwi.

Las fracciones resultantes del proceso de purificación proteica se evaluaron mediante un análisis electroforético SDS-PAGE (figura 21). Para la selección de las fracciones se tomó como referencia la presencia de actividad de inhibidor de PME en el kiwi, reportado en la literatura (una actividad que se registra alrededor de los 28 kDa). Se seleccionaron aquellas fracciones que en el gel de electroforesis presentaban una banda cercana al peso molecular reportado en la literatura, además de una fracción que correspondía a las proteínas no unidas a la resina. La finalidad de la selección de estas fracciones fue encontrar al menos una que presentara la actividad de inhibición de la PME y pudiese ser usada como control positivo en los ensayos de actividad subsecuentes. Es de destacarse que no se pretendió obtener puro el IPME presente en el kiwi.

Como se observa en la figura 21, en los geles de poliacrilamida se cargaron las fracciones correspondientes al precipitado con sulfato de

amonio, la fracción no unida a la resina, los lavados de la misma y las eluciones con NaCl. Se puede apreciar que en las fracciones de elución con 150mM, 250mM y 300mM de NaCl se encontraron señales cercanas a 25 kDa, este peso se encuentra cercano al peso molecular del IPME de kiwi.

Tomando en cuenta la información anterior se decidió usar en los ensayos de actividad que determinaron al control positivo a la actividad de IPME a las fracciones de elución 150mM y 300mM de NaCl. La fracción "Lavado 1" se eligió bajo la consideración de que el inhibidor de kiwi podría no unirse a la resina debido a que el pH del amortiguador donde se resuspendió el precipitado proteico inicial no lograra que el IPME tuviese una densidad de carga negativa y por tal motivo no se favoreciera la unión a la resina.

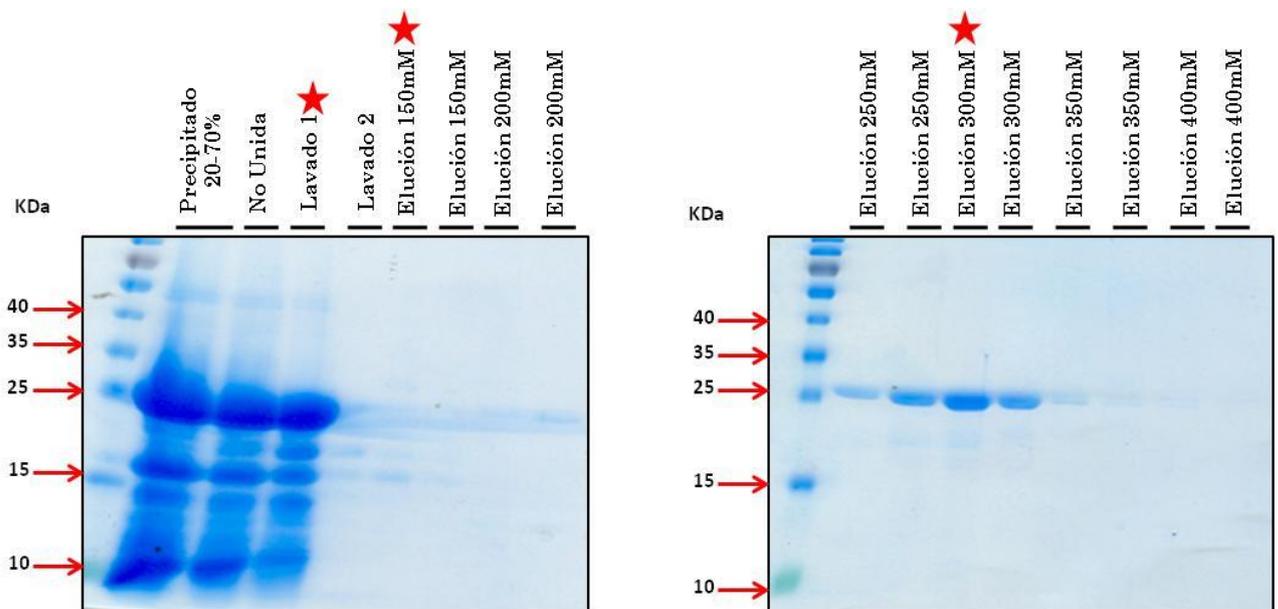


Figura 21. Geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie de las fracciones con posible actividad de IPME. Se analizaron las fracciones correspondientes al precipitado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, la fracción no unida, los lavados de la resina y las eluciones con 150, 200, 250, 300, 350 y 400mM de NaCl. Las estrellas indican las fracciones que se seleccionaron para realizar los ensayos de actividad en los cuales se determinó al control positivo para la actividad de inhibidor de PME.

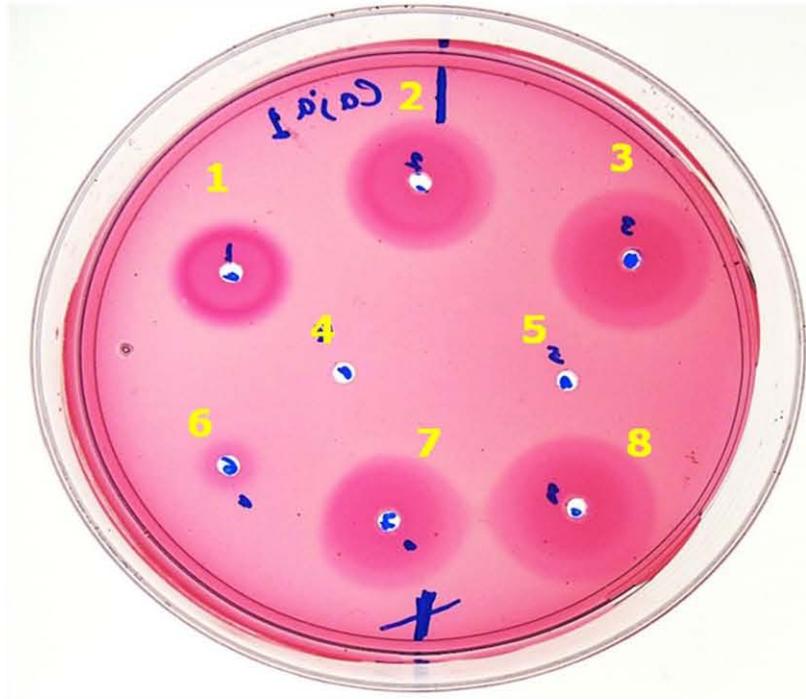
6.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE INHIBIDOR DE PECTÍN-METILESTERASA (IPME) "ENSAYO DE DIFUSIÓN EN GEL Y TINCIÓN CON ROJO DE RUTÉNIO"

Una vez que se obtuvieron las fracciones en las que presuntamente se contaba con la presencia de la NaPEP II obtenida de estilos de *N. alata*, las proteínas recombinantes, así como al control de GST, se continuó con la realización del ensayo que permitió determinar si estas proteínas presentaban o no una actividad de inhibidor de pectín-metilesterasa.

El ensayo de difusión en gel y tinción con rojo de rutenio básicamente detecta la presencia de grupos carboxilo libres producto de la actividad de PME, esta detección se evidencia mediante la presencia de halos de color rojo intenso justamente en la zona donde abundan las cargas negativas debido a los grupos carboxilo libres.

En un primer experimento se realizó la estandarización de la metodología (figura 22A y B), donde se probaron distintas cantidades de enzima (PME) y las fracciones seleccionadas a partir de la purificación proteica de kiwi con la finalidad de encontrar un control positivo para la actividad de IPME.

A)



B)

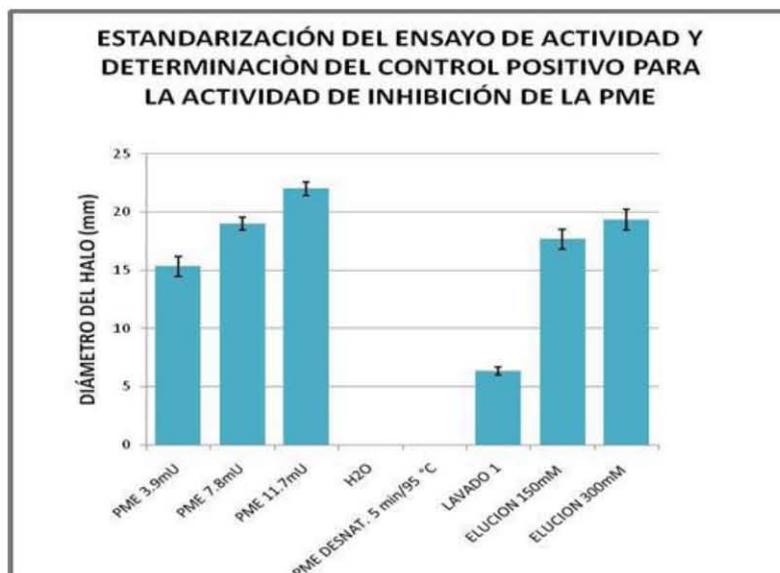
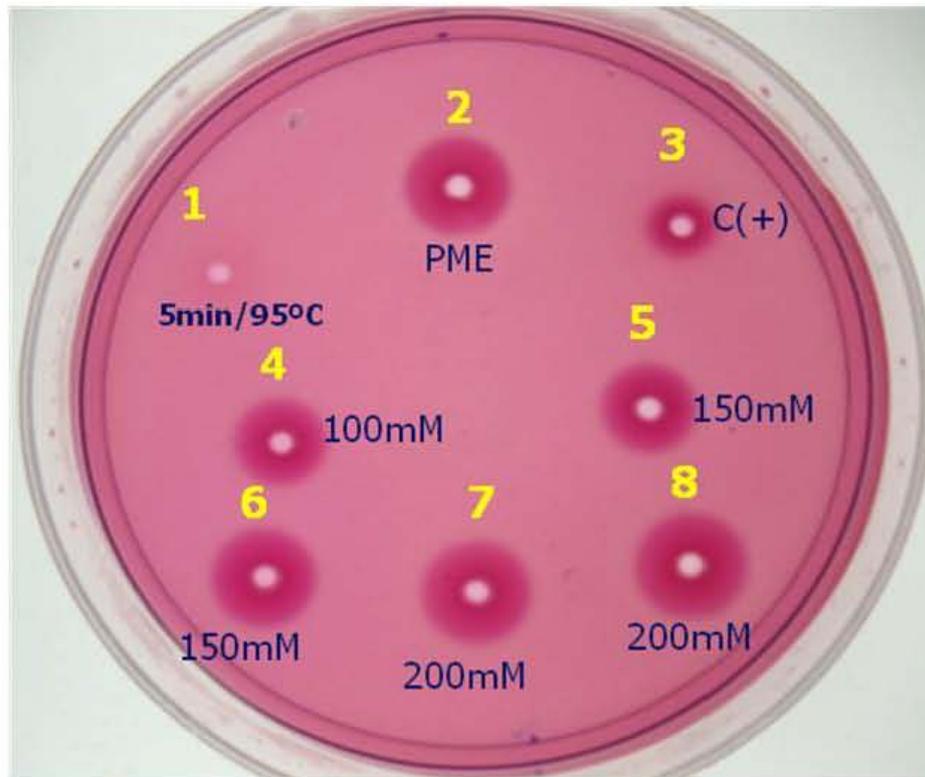


Figura 22. Estandarización del ensayo de actividad de IPME (Control +). **A)** Placa de ensayo de difusión en gel y tinción con rojo de rutenio. 1.PME 3.9mU. 2. PME 7.8mU. 3. PME 11.7mU. 4. H₂O. 5. PME desnaturalizada (5min/95°C). 6. PME 3.9mU+5µL Lavado 1 (SELECCIÓN DE FRACCIONES CON POSIBLE ACTIVIDAD DE IPME). 7. PME 7.8mU+5µL ELUCIÓN 150mM (SELECCIÓN DE FRACCIONES CON POSIBLE ACTIVIDAD DE IPME).8. PME 11.7mU+5µL ELUCIÓN 300mM (SELECCIÓN DE FRACCIONES CON POSIBLE ACTIVIDAD DE IPME). **B)** Gráfica del ensayo de actividad (Diámetro del halo vs Tratamiento), se puede observar en la parte superior de las barras el error estándar. Para la realización de las gráficas se tomaron en cuenta los resultados de las dos replicas del ensayo.

Como producto de este ensayo se determinó que con 7.8mU de enzima se obtuvo un halo del tamaño adecuado para una correcta apreciación del resultado, esto se hace evidente mediante la comparación del tamaño de halo del control positivo y del que corresponde a la cantidad de 7.8mU de PME. También se logró montar correctamente la metodología para determinar la actividad de IPME, esto se puede observar en la diferencia en los tamaños de las barras de la gráfica del ensayo, ya que es totalmente identificable el efecto de inhibición de la PME. Además, se pudo elegir la fracción "Lavado 1" como control positivo para la actividad de IPME, ya que en el ensayo, ésta fue la única que logró inhibir a la PME disminuyendo el tamaño del halo (esta fracción se etiquetó en los ensayos subsecuentes como "C+"). En el ensayo también se puede observar que no hubo formación de halo en los pozos donde se colocó agua y la PME desnaturalizada, lo que indicó que la detección de actividad fue específica ya que los halos solo aparecen si hay actividad por parte de la enzima.

Luego de tener la metodología del ensayo estandarizada se realizó la determinación de la actividad de la NaPEP II recuperada de estilos de *N. alata*, las proteínas NaPEP II recombinantes y la GST. El ensayo se realizó en dos placas de difusión distintas; una para la proteína proveniente de los estilos de la planta (figura 23) y otra para las proteínas recombinantes y la GST sola (figura 24).

A)



B)

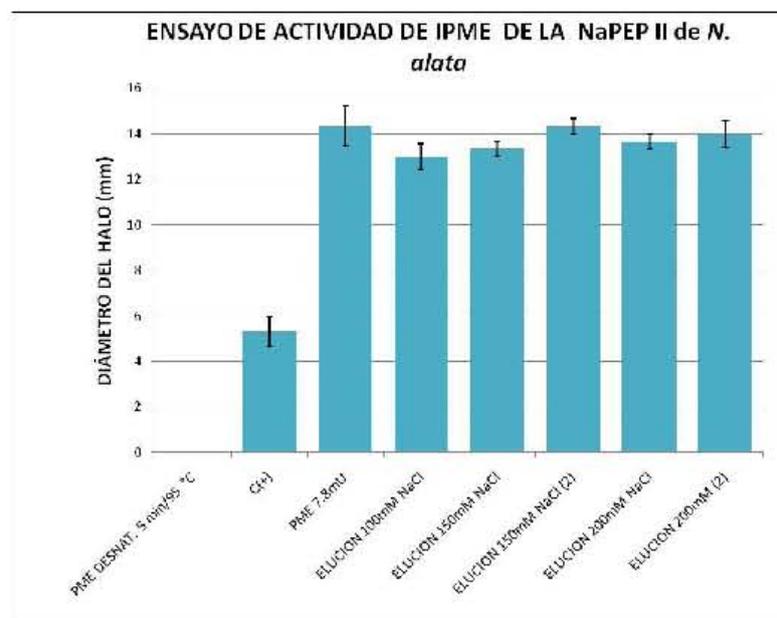
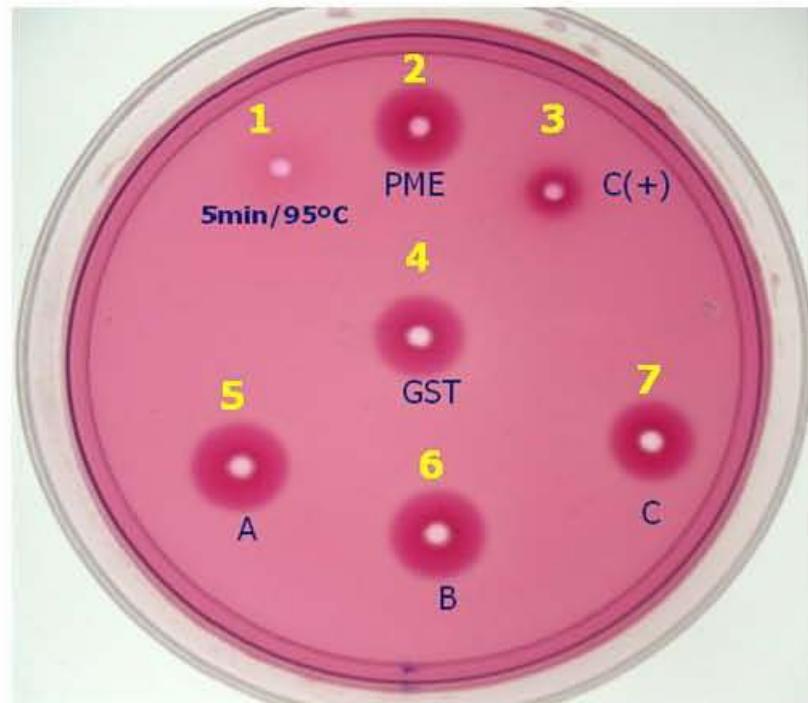


Figura 23. Ensayo de actividad de IPME de *NaPEP II* de estilos de *N. alata*. **A)** 1.PME desnaturalizada(5min/95°).2. PME 7.8mU. 3.C(+).4.PME + ELUCIÓN 100mM NaCl (2). 5.PME + ELUCIÓN 150mM NaCl (1)6.PME + ELUCIÓN 150mM NaCl (2)7.PME + ELUCIÓN 200mM NaCl (1) 8. PME + ELUCIÓN 200mM NaCl (2). **B)** Gráfica del ensayo de actividad de la proteína *NaPEP II* de estilos de *N. alata* (Diámetro del halo vs Tratamiento). Se puede observar en la parte superior de las barras el error estándar. Para la realización de las gráficas se tomaron en cuenta los resultados de las dos replicas del ensayo.

A)



B)

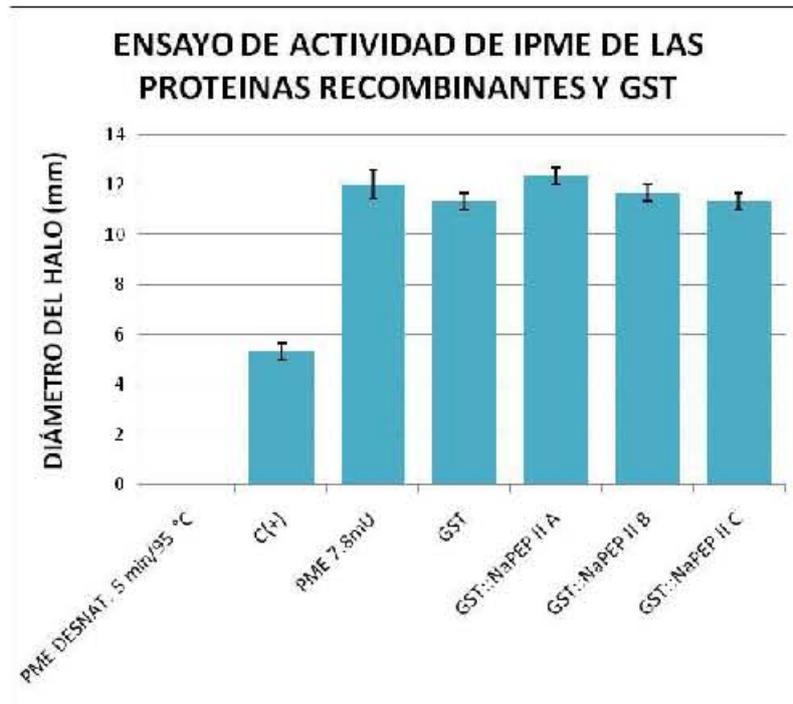


Figura 24. Ensayo de actividad de IPME de GST::NaPEP II (A, B y C) y GST sola. **A)** 1.PME desnaturalizada (5min/95°). 2. PME 7.8mU. 3.C(+). 4. PME + GST 5. PME + GST::NaPEP II A. 6. PME + GST::NaPEP II B. 7. PME + GST::NaPEP II C. **B)** Gráfica del ensayo de actividad de las proteínas recombinantes y GST (Diámetro del halo vs Tratamiento), se puede observar en la parte superior de las barras el error estándar. Para la realización de las gráficas se tomaron en cuenta los resultados de las dos replicas del ensayo.

Los resultados obtenidos de la placa de difusión donde se analizó la actividad de la proteína de estilos de *N. alata*, mostraron que las fracciones de elución 100mM (2) y 150mM (1) pudiesen tener un ligero efecto de inhibición, ya que, sí se comparan con el control positivo, se puede notar una leve similitud en el tamaño de los halos. Esta hipótesis fue descartada después de realizar el gráfico correspondiente al ensayo; ya que, al comparar los tamaños de halo del control positivo y las fracciones evaluadas, es visible que ninguna de las fracciones evaluadas presenta una actividad de inhibición de la PME. Cabe resaltar que las fracciones de elución 100mM (2) y 150mM (1) fueron las utilizadas en los ensayos posteriores de determinación del efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de IPME en representación de la NaPEP II de estilos de *N. alata*, debido a que las otras usadas en el primer ensayo correspondieron a la misma proteína.

En lo que respecta al ensayo de actividad de las proteínas NaPEP II recombinantes y GST, se observó que no existió un efecto de inhibición en ninguno de los casos. Esto puede ser corroborado en el gráfico del ensayo al comparar el tamaño de los halos formados con el tamaño del halo presente en el control positivo del ensayo.

Con la finalidad de determinar si la cantidad de proteína utilizada en los ensayos tiene un efecto en la actividad de inhibición de la PME. Se diseñó un experimento en el cual se analizó la existencia de dicho efecto, tomando en cuenta que la cantidad mínima de proteína a probar debía de ser la que se utilizó en los primeros ensayos, debido a que según los resultados, una cantidad menor no presentaría un efecto inhibitorio. Además, para este caso se esperaría que el tamaño de los halos decreciera conforme se aumentara la cantidad de proteína, sí es que las fracciones evaluadas poseen la actividad de inhibidor de la PME.

Se analizó también el efecto inhibitorio del control positivo con respecto a la cantidad de proteína, pero en este caso se evaluaron diluciones de la muestra, ya que, se considera que la cantidad de proteína usada en los primeros ensayos correspondió a la máxima que presentó el efecto de inhibición, por lo tanto, al disminuirse ésta, se observaría un aumento en el tamaño del halo, demostrando así la presencia de dicho efecto.

En la tabla 14 se muestra las cantidades de proteína de cada muestra y las diluciones del control positivo probadas en el ensayo de actividad.

Tabla 14. Cantidades de proteína (μg) usadas en el ensayo de actividad de IPME.

MUESTRA	CANTIDAD DE PROTEÍNA (μg)			
	1X	2X	3X	4X
GST::NaPEP II A	4.5	9	13.5	18
GST::NaPEP II B	3	6	9	12
GST::NaPEP II C	3	6	9	12
GST sola	8.5	17.1	25.6	34.2
Elución NaCl 100mM (2) "NaPEP II de estilos de N. alata"	1	2	3	4
Elución NaCl 150mM (1) "NaPEP II de estilos de N. alata"	1	2	3	4
	Sin Dilución	1:10	1:50	1:100
C(+) a la actividad de IPME "Lavado 1"	4	0.4	0.08	0.04

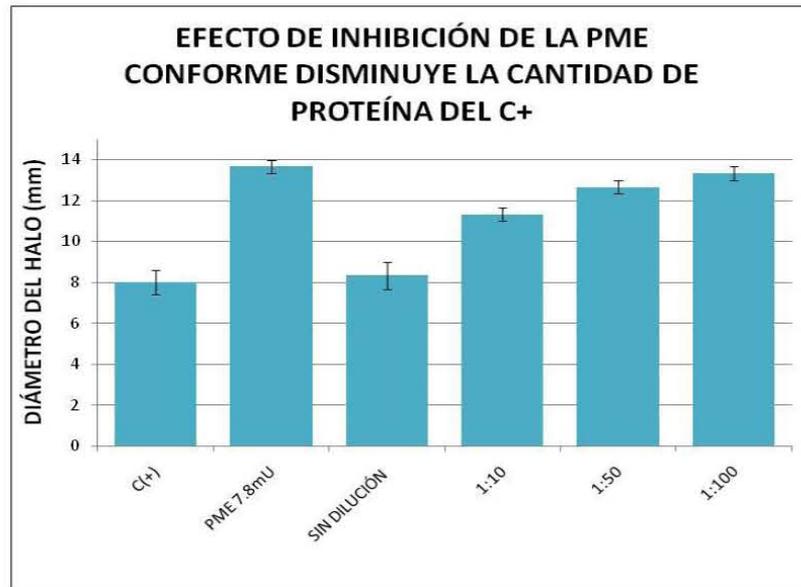
En la figura 25 se muestran los resultados del ensayo de actividad de IPME con respecto a la cantidad de proteína (las imágenes que corresponden al ensayo se encuentra en el apéndice M). En el experimento correspondiente al control positivo "Lavado 1" (figura 25 A) se observó un aumento en el tamaño del halo conforme se aumentó la dilución de la muestra, es decir, a manera que disminuyó la cantidad de proteína decreció la inhibición de la PME; este resultado concordó con lo esperado para un inhibidor de la pectin-metilesterasa.

En cuanto a la prueba de las proteínas recombinantes y GST sola (figura 25 B, C, D y E), se esperaba que el tamaño del halo de inhibición disminuyera con forme aumentara la cantidad de proteína; lo cual no ocurrió, ya que se puede apreciar que el tamaño en los halos se mantuvo constante.

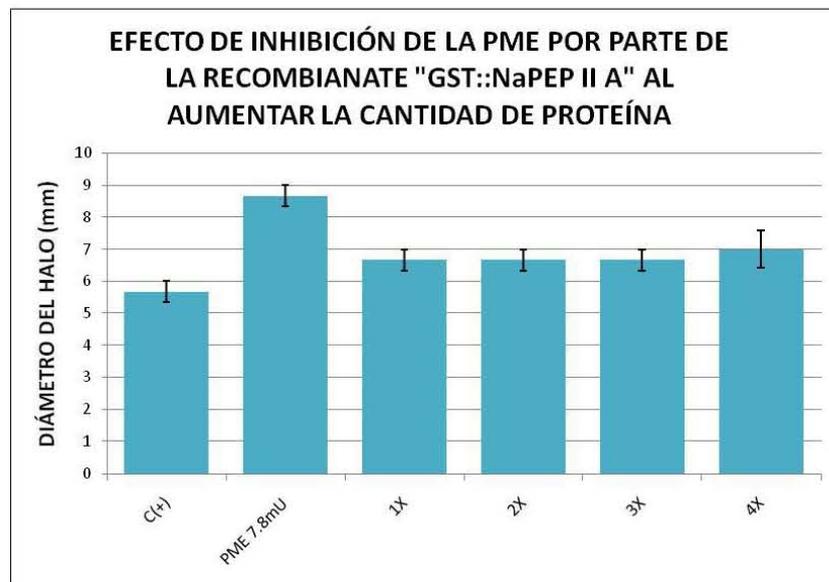
En la determinación de actividad que involucró a las dos fracciones correspondientes a *NaPEP II* de estilos de *N. alata* (eluciones 100mM "2" y 150mM "1") se determinó que no existe una correlación entre el efecto inhibitorio y la cantidad de proteína, debido a que el tamaño del halo permaneció constante conforme se aumentó la cantidad de proteína (figura 25 F y G).

Los resultados obtenidos tanto para las proteínas recombinantes como para la *NaPEP II* de *N. alata* mostraron que no existió un efecto entre la actividad de IPME y la cantidad de proteína. Estos datos corroboraron que bajo las condiciones del ensayo de "difusión en gel y tinción con rojo de rutenio" estas proteínas no presentaron actividad de IPME.

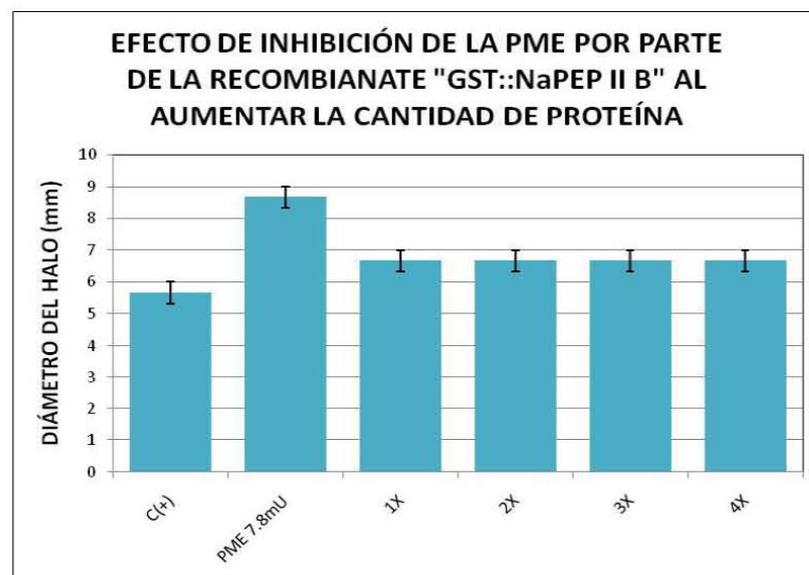
A)



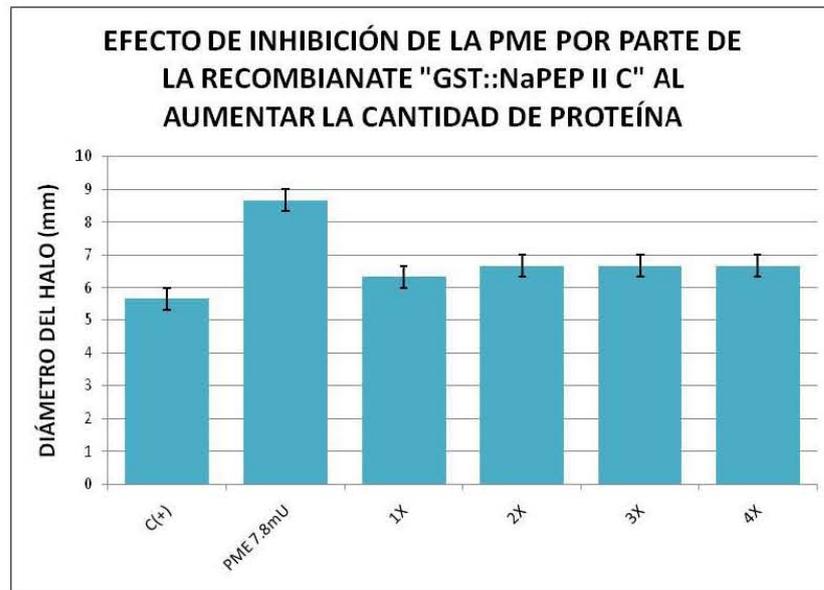
B)



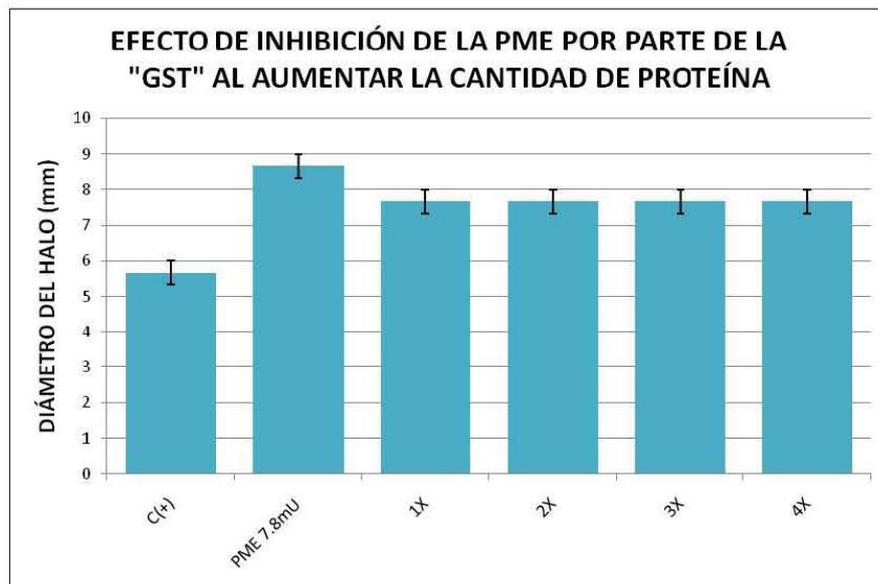
C)



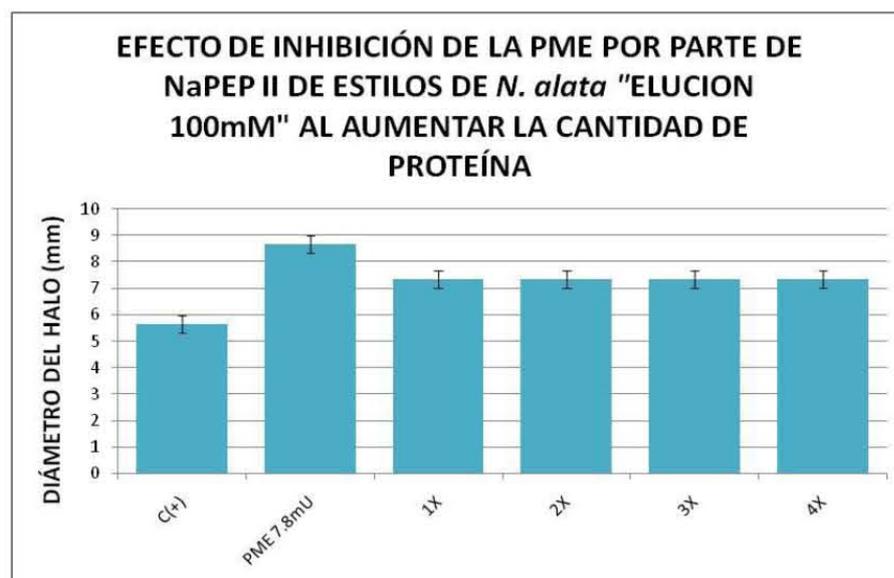
D)



E)



F)



G)

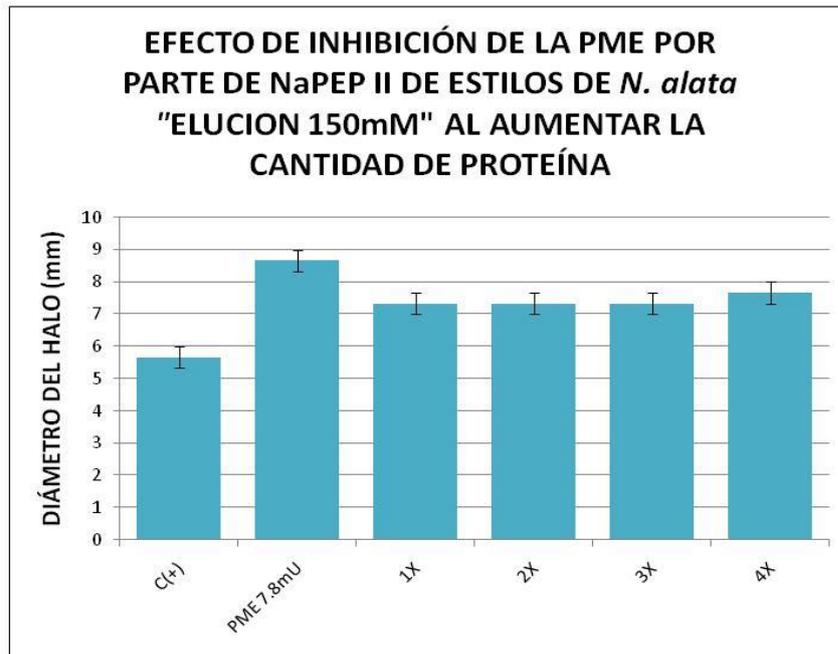


Figura 25. Ensayo de actividad de IPME respecto a la cantidad de proteína. **A)** Efecto sobre la actividad de IPME conforme disminuye la cantidad de proteína del c(+). **B, C, D y E)** Efecto sobre la actividad de IPME por parte de "NaPEP II nativa" al aumentar la cantidad de proteína. **F y G)** Efecto sobre la actividad de IPME por parte de "GST::NaPEP II (A, B y C)" y "GST sola" al aumentar la cantidad de proteína. Para la realización de las gráficas se tomaron en cuenta los resultados de las dos replicas del ensayo.

7. DISCUSIÓN

El rechazo en el polen en *N. alata*, así como en un gran número de especies de la familia *Solanaceae* está determinado por la interacción S-alelo específica entre las determinante masculina (SLF) y la determinante femenina (S-RNasa). Además de esta interacción, es necesaria la participación de los productos proteicos de algunos genes no codificados en el locus *S*, estos genes son conocidos como genes modificadores (GM). Hasta ahora se han identificado 3 GM en *N. alata*: HT-B, 120 K y NaStEP. A pesar de su identificación, aún es confuso el mecanismo exacto por el cual se da el rechazo del polen propio o genéticamente relacionado (Hancock *et al.*, 2005; McClure *et al.*, 1999; Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

La familia de genes denominados *NaPEP II* (A, B y C) posee una alta probabilidad de ser genes modificadores (GM's). Los productos proteicos de estos isogenes tienen similitud con inhibidores de pectin-metilesterasa (IPME) [Busot *et al.*, 2008].

Debido a la predicción de un sitio potencial de N-glicosilación en las secuencias aminoácidas de *NaPEP II* (Busot *et al.*, 2008), se buscó mediante la comparación de actividad entre las proteínas recombinantes de *NaPEP II* (sin modificaciones post-traduccionales) y la proteína *NaPEP II* proveniente de estilos de *N. alata* (posiblemente glicosilada), determinar si la actividad de IPME predicha se encuentra asociada a las modificaciones post-traduccionales que éstas podrían sufrir *in vivo*.

Para evaluar la actividad que posee *NaPEP II* se llevo a cabo la clonación de las secuencias correspondientes a los 3 isogenes (A, B y C) en un vector de sobreexpresión que contiene a GST, el cual genera proteínas de fusión donde la GST se une al extremo amino terminal de las secuencias de interés (figuras 13 y 15).

Paralelamente se llevaron a cabo las purificación parcial de la proteína *NaPEP II* a partir de estilos de *N. alata*. Además de la selección de fracciones proteicas con posible actividad de IPME a partir de kiwi (Giovaneet *al.*, 1995).

Una vez teniendo las proteínas puras, se estandarizaron las condiciones del ensayo de actividad, así como la determinación del control positivo a la actividad inhibitoria de la PME (figura 23).

Los ensayos de actividad (figuras 23 y 24) arrojaron datos que sugieren en primera instancian que no existe actividad inhibitoria por parte de las proteínas recombinantes, GST sola y *NaPEP II* de estilos de *N. alata*. En el caso de las recombinantes se puede asegurar que la ausencia de actividad de inhibidor no se debe a que las proteínas *NaPEP II* (A, B y C) se encuentran fusionadas a GST, ya que no existe inhibición al probarse solamente la GST. En cuanto a las fracciones que contienen a la *NaPEP II* de *N. alata*, ninguna presentó una actividad de inhibidor.

Con los resultados encontrados se puede afirmar que la actividad de inhibidor de pectin-metilesterasa tiene un efecto con respecto a la cantidad de proteína empleada en el ensayo. Esto solo es observable en con el C(+) debido a que ninguna de las proteínas *NaPEP II* (tanto recombinantes como la proveniente de estilos de *N. alata*) presentan actividad de IPME. Además, la falta de la actividad de IPME no se debe a las modificaciones post-traduccionales que *NaPEP II* pudiese sufrir de manera natural.

7.1 Función de los inhibidores de pectín-metilesterasa (IPME)

Los IPME se relacionan directamente a la modulación endógena de la actividad de las pectín-metilesterasas (PME's) durante el desarrollo y el crecimiento de las plantas. Los IPME inhiben a las PME's de origen

vegetal formando complejos estequiométricos 1:1 mediante la formación de uniones no covalentes, generalmente no inhiben a las PME's que son producidas por microorganismos patógenos vegetales. (Matteiet *al.*, 2002; D'Avinoet *al.*, 2003; Giovaneet *al.*, 2004; Di Matteoet *al.*, 2005). Las PME's son proteínas encargadas de hidrolizar los grupos metiléster presentes en las pectinas, produciendo pectinas con un bajo grado de metilación y metanol. Esta enzima tiene un papel fundamental en todos aquellos procesos que requieran remodelación de paredes celulares vegetales, por lo que están involucradas en el crecimiento y extensión celular (Nariet *al.*, 1986) y en procesos de maduración de frutos (Brady *et al.*, 1987). Ha sido demostrado que las PME's también actúan como receptores para la proteína de movimiento del virus del mosaico del tabaco, esta interacción es requerida para el movimiento viral célula-célula (Chenet *al.*, 2000). Esto sugiere un posible papel de los IPME's en los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos.

Hasta la fecha, han sido descubiertos solamente tres IPME en plantas, uno detectado en frutos de kiwi (*Actinidia chinensis*) [Balestrieriet *al.*, 1990; Giovaneet *al.*, 1995; Camardellaet *al.*, 2000] y dos en *Arabidopsis* (Wolf *et al.*, 2003; Raiolaet *al.*, 2004). EL IPME de *Actinidiachinensis* está presente en la fase acuosa del fruto maduro y probablemente es sintetizado como un precursor de mayor tamaño y que es procesado proteolíticamente durante el proceso de maduración del fruto [Giovane *et al.*, 1995]. La proteína resultante inhibe a varias PME's presentes en vegetales (PME's de kiwi, naranja, manzana, tomate, melocotón, zanahoria, papa y plátano) y no presenta actividad contra PME's fúngicas [Balestrieri *et al.*, 1990] y bacterianas (PME de *Erwinia chrysanthemi*). Estudios de modelación y fluorescencia indican que el IPME de kiwi interactúa con la PME de tomate a nivel de sitio activo y la diferencia en profundidad de los sitios activos de la PME de tomate y de *E. chrysanthemi*, es lo que

evita la interacción entre el IPME de kiwi y la bacteria [D'Avino *et al.*, 2003].

Los IPME de *Arabidopsis* se encuentran codificados por una pequeña familia que consta de 2 miembros, AtIPME-1 y AtIPME-2, localizados en diferentes cromosomas. AtIPME-1 y AtIPME-2, comparten un 47% de identidad de secuencia y tienen masas moleculares de 16.3 kDa y 15.6 kDa con pI de 7.7 y 9.0, respectivamente (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004). Estos genes se expresan fuertemente en flores y en el polen, aunque AtIPME-1, cuya expresión es mayor que AtIPME-2, también se expresa en semillas, tallos y hojas maduras (Wolf *et al.*, 2003; Raiola *et al.*, 2004). Los IPME's de *Arabidopsis* y kiwi tienen conservados 5 residuos de Cys, de los cuales 4 formarían puentes disulfuro que mantienen la estructura de la proteína (Hothorn *et al.*, 2004; Di Matteo *et al.*, 2005).

La sobreexpresión constitutiva de los genes AtIPME-1 y AtIPME-2 en plantas de *Arabidopsis* (Lionetti *et al.*, 2007), provoca una disminución de la actividad de las PME's vegetales y genera la alteración del nivel de metilesterificación de las pectinas en la pared celular. Las plantas transformadas mostraron menor susceptibilidad a la infección por *Botrytis cinerea*. Como se sabe las endopoligalacturonasas (endoPG) producidas por este hongo tienen preferencia por los poligalacturanos (PGA) y no por las pectinasmetilesterificadas (Karset *et al.*, 2005), el alto grado de metilesterificación (DM) de las pectinas de las plantas de *Arabidopsis* transformadas obstaculiza la actividad de las endopoligalacturonasas retrasando la invasión del tejido vegetal. El incremento del contenido de IPME en las plantas transformadas podría estar impidiendo la desesterificación de las pectinas causada por la PME, evitando el acceso de las PG de hongos a su sustrato.

El papel que desempeñan las pectinas con un alto grado de metilesterificación en la resistencia a enfermedades en plantas ha sido reportado en varios sistemas. Por ejemplo, la resistencia de algunos cultivares de *Solanum tuberosum* se ha relacionado con las pectinas altamente metilesterificadas (McMillan *et al.*, 1993; Marty *et al.*, 1997).

Desafortunadamente en nuestro caso los productos de los isogenes *NaPEPII* no tienen actividad de IPME's, al menos por el método evaluado aquí.

7.2 NaPEP II como un posible gen modificador

La presencia de un péptido señal y el patrón de expresión específico mostrado por el mRNA de *NaPEP II* (específico del pistilo), sugiere que estas proteínas podrían ser secretadas desde las células del tejido de transmisión del estilo hacia el espacio extracelular (MEC) [Busot *et al.*, 2008]. Mediante la realización de extracciones secuenciales de proteínas para aislar las proteínas solubles e insolubles presentes en los estilos maduros de *N. alata*, se demostró que *NaPEP II* es una proteína asociada a la matriz extracelular que comparte las mismas características de solubilidad que presentan los productos de genes modificadores de los grupos III y II (NaTTS, 120K) y las determinantes femeninas de la AI (S-RNasas) [Wuet *al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2005; Anderson *et al.*, 1986;]. La localización de *NaPEP II* en la MEC del tejido de transmisión del estilo la hace sumamente relevante, ya que hacia este sitio son secretadas las proteínas que hasta la fecha se sabe están involucradas en el rechazo del polen y una vez allí son tomadas por los tubos polínicos que se elongan en esta matriz secretora, en su camino hacia el ovario. Es por esto que los factores secretados a la MEC como lo es *NaPEP II*,

podrían ser necesarios para llevar a cabo las interacciones polen-pistilo.

7.3 Participación de *NaPEP II* en la AI de *N. alata*

A pesar de que, bajo las condiciones establecidas en este trabajo, se llegó a la determinación de que las proteínas recombinantes de la familia *NaPEP II*, así como la proteína nativa, no poseen una actividad de IPME; esta evidencia no es suficiente para aseverar que *NaPEP II* no participa en la AI en *Nicotiana alata*.

NaPEP II es una proteína estilar/estigmática específica que se traduce tanto en plantas AC como en plantas AI (Busot *et al.*, 2008). Esto se determinó mediante la comparación de los patrones de expresión de *NaPEP II* a nivel de mRNA y de proteína usando extractos crudos de especies AC y AI, de órganos vegetativos y sexuales de *N. alata* BT. La presencia de esta proteína en todas las especies probadas, independientemente de la capacidad de éstas para rechazar o no su propio polen, no descarta la posibilidad de que este gen pudiese estar involucrado en la respuesta de AI. Por ejemplo, 120K es una proteína que aunque participa directamente en la respuesta de AI (Hancock *et al.*, 2005), está presente en especies que no rechazan su propio polen.

En el pistilo, el patrón de expresión de los transcritos de *NaPEP II* muestra que estos genes podrían ser requeridos para las interacciones polen-pistilo ya que se expresan solamente en estilos maduros y estigmas. Además, su expresión se incrementa dramáticamente en el estilo maduro (Busot *et al.*, 2008).

El patrón de expresión de *NaPEP II* coincide con aquel de algunos genes que hasta la fecha se conoce participan en la respuesta de AI

en *N. alata* (la S-RNasa y el gen modificador *HT-B*) [Busot *et al.*, 2008].

Actualmente está en curso experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas, los cuales pretenden suprimir por RNAi a *NaPEP II*, lo cual permitirá determinar si *NaPEP II* es un gen modificador esencial en la respuesta del rechazo el polen en *Nicotiana*. Además, experimentos recientes de inmunolocalización indican que *NaPEP II* es tomado por los tubos polínicos independientemente de si la crusa es compatible o incompatible (Bravo-Alberto y F.C.G., no publicado), lo cual sugiere que la función de *NaPEP II* ocurre en el interior del tubo polínico; sin embargo, debido a que *NaPEP II* no presenta actividad de IPME's, se desconoce cómo participaría bioquímicamente en el rechazo del polen.

8. CONCLUSIONES

Se establecieron las condiciones para determinar la actividad de IPME.

Se logró sobre-expresar y purificar proteínas que son reconocidas por los anticuerpos α -NaPEP II.

Las fracciones parcialmente purificadas en donde se identifica una proteína reconocida por el anticuerpo α -NaPEP II, no poseen la actividad de IPME bajo las condiciones utilizadas en este trabajo.

Las proteínas recombinantes GST::NaPEPII (A, B y C), bajo las condiciones utilizadas en este trabajo, no presentan actividad de IPME.

9. PERSPECTIVAS

Para corroborar los datos obtenidos en este trabajo es necesario verificar que efectivamente las proteínas de la familia *NaPEP II* no poseen actividad de IPME. Esto se puede realizar mediante el uso de un método enzimático en el cual se pueda cuantificar la disminución en la actividad de PME y relacionarla con el efecto inhibitorio.

Revisar mediante herramientas bioinformáticas que otra actividad asociada a la familia *NaPEP II* pudiese estar relacionada con el rechazo del polen en *N. alata*.

Determinar mediante el silenciamiento de plantas transgénicas si la familia de genes *NaPEP II* es necesaria para el rechazo del polen en *N. alata*, lo cual confirmaría que en efecto se trata de una familia de genes modificadores.

10. BIBLIOGRAFÍA

Anderson, M.A., Cornish, E.C., Mau, S-L., Williams, E.G., Hoggart, R., Atkinson, A., Boning, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Nial, H.D., Tregear, G.W., Coghlan, J.P., Crawford, R.J. y Clarke, A.E. (1986) Cloning of cDNA for astylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, **321**, 38–44.

Bateman, A., Birney, E., Cerruti, L., Durbin, R., Eddy, S.R., Griffiths-Jones, S., Howe, K.L., Marshall, M. and Sonnhammer, E.L.L. (2002). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 276–280.

Balestrieri, C., Castaldo, D., Giovane, A., Quagliuolo, L. y Servillo, L. (1990) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit (*Actinidia chinensis*). *Eur. J. Biochem.*, **193**, 183–187.

Busot, G. (2009). Genes modificadores requeridos en el rechazo del polen en *Nicotiana*. Tesis de Doctorado. P: 41-96.

Busot, G., McClure, B., Ibarra, C., Jimenez, D., Santana, S. y Cruz-Garcia, F. (2008). Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP , a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *JExpBot* **59** (11): 3187-3201.

Brady, C.J., McGlasson, W.B. y Speirs, J. (1987). The biochemistry of fruit ripening. In *Tomato Biotechnology* (Nevins, D. & Jones, R., eds), pp. 288–289. Alan R. Liss, New York.

Camardella, L., Vito, C., Ciardiello, M.A., Servillo, L., Balestrieri, C. y Giovane, A. (2000) Kiwi protein inhibitor of pectin methylesterase Amino-acid sequence and structural importance of twodisulfide bridges. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 4561–4565.

Chen, G., Zhang, B., Zhao, Z., Sui, Z., Hang, H. y Xue, Y. (2010). A life or death decision for pollen tubes in S-RNase-based self-incompatibility. *JExpBot* **61**(7): 2027-2037.

Chen, M.H., Sheng, J., Hind, J., Handa, A.K. y Citovsky, V. (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and the host cell pectin methylesterase is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.*, **19**, 913–920.

Clark, A. G., y Kao, T.-h. (1991). Excess nonsynonymous substitution at shared polymorphic sites among self-incompatibility alleles of Solanaceae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9823-9827.

Cornish, E.C., Pettitt, J.M. Böning, I., and Clarke, A.E. (1987) Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, **326**, 99–102.

D'Avino, R., Camardella, L., Christensen, T.M.I.E., Giovane, A. y Servillo, L. (2003) Tomato pectin methylesterase: modeling, fluorescence, and inhibitor interaction studies—Comparison with the bacterial (*Erwinia chrysanthemi*) enzyme. *Proteins*, 53, 830–839.

de Nettancourt, D. (1997) Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod.*, 10, 185–199.

de Nettancourt, D. (2001) Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. 2nd (eds). Berlin: Springer.

Di Matteo, A., Giovane, A., Raiola, A., Camardella, L., Bonivento, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Bellincampi, D. and Tsernoglou, D. (2005) Structural basis for the interaction between pectin methylesterase and a specific inhibitor protein. *Plant Cell*, 17, 849–858.

Downie B., Dirk L., Hadfield K., Wilkins T., Bennett A and Bradford K. (1998) A Gel Diffusion Assay for Quantification of Pectin Methylesterase Activity. *Analytical Biochemistry* 264, 149–157

Foote, H.C.C., Ride, J.P., Franklin-Tong, V.E., Walker, E.A., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.H.(1994) Cloning and expression of a novel self incompatibility (S-) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 2265–2269.

Franklin, F.C.H., Lawrence, M.J. and Franklin-Tong, V.E.(1995) Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol*, 158, 1–64.

Franklin-Tong (2008). Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity and mechanism. Springer, Berlin Heidelberg.

Franklin-Tong, V.E., Thorlby, G.J., Lawrence, M.J. and Franklin, F.C.(1992) Recognition signals and pollen responses in the incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. In: *Angiosperm Pollen and Ovules: Basic and applied aspects*, pp. 84–93, Mulcahy D.L., Bergamini-Mulcahy G, Ottaviano E. (eds), Springer, New York.

Giovane, A., Balestrieri, C., Quagliuolo, L., Castaldo, D. y Servillo, L. (1995) A glycoprotein inhibitor of pectin methylesterase in kiwi fruit. Purification by affinity chromatography and evidence of a ripening-related precursor. *Eur. J. Biochem.* 233, 926–929.

Giovane, A. Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'Avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, M.A. y Camardella, L. (2004) Pectin methylesterase inhibitor. *Biochim Biophys Acta*, 1696, 245–252.

Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, N., Sivaguru, M., Vazquez-Santana, S., Kim, S., Phillip, T., Cruz-Garcia, F. y McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self compatible *Nicotiana*. *Nature* 439: 805–810.

Gray, J.E., McClure, B.A., Bönig, I., Anderson, M.A., y Clarke, A.E. (1991) Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on *in vitro*-grown pollen tubes. *Plant Cell*, 3, 271–283.

Green, P.J.(1994) The ribonucleases of higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 421–445.

Hancock, C., Kent, L., McClure, B. (2005). The stylar 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43:716-723.

Hernandez, A., Cruz, Y., Ibarra, C., Cruz-Garcia, F. (2009). Molecular mechanisms on plant self-incompatibility. *Functional Diversity of Plant Reproduction*. p: 1-4, 15-20.

Hiscock, S.J. and McInnis, A.M.(2003) Pollen recognition and rejection during the sporophytic self-incompatibility response: *Brassica* and beyond. *Trends Plant Sci.*, 8, 606–613.

Hua, Z., Kao, T. (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.

Huang, S., Lee, H.-S., Karunanandaa, B., and Kao, T.-h. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *Plant Cell*, 6, 1021–1028.

Jorger, T.R., Gohlke, J.R., Xu, B. and Kao, T-h. (1991) Primary structural features of the self-incompatibility proteins in the Solanaceae. *Sex Plant Reprod.*, 4, 81–87.

Iwano, M., Shiba, H., Funato, M., Shimosato, H., Takayama, S. and Isogai, A.(2003) Immunohistochemical studies on translocation of pollen S-haplotype determinant in self-incompatibility of *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.*, 44, 428–436.

Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., Cruz-García, F. (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol.*, 161: 97-107.

Kao, T-h. and Tsukamoto, T.(2004) The molecular and genetic bases of SRNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*, 16, 72–83.

Kars, I., Krooshof, G.H., Wagemakers, L., Joosten, R., Benen, J.A. y Van Kan, J.A. (2005) Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*. *Plant J.*, 43, 213–225.

Kubo, K., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S., Ando, T., Isogai, A., Kao, T., Takayama, S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-Based Self incompatibility. *Science* 330: 796-799.

Lionetti, V., Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Obel, N. Pauly, M., Favaron, F., Cervone, F. y Bellincampi, D. (2007) Overexpression of pectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis* restricts fungal infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.*, **143**, 1871–1880.

Marty, P., Jouan, B., Bertheau, Y., Vian, B. y Goldberg, R. (1997) Charge density in stem cellwalls of *Solanum tuberosum* genotypes and susceptibility to blackleg. *Phytochemistry*, 44, 1435–1441.

Mattei, B., Raiola, A., Caprari, C., Federici, L., Bellincampi, D., De Lorenzo, G., Cervone, F., Giovane, A., y Camardella, L. (2002). Studies on plant inhibitors of pectin modifying enzymes: polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) and pectin methylesterase inhibitor (PMEI), in: T.T. Teeri, B. Svensson, H.J. Gilbert, T. Feizi (Eds.), *Carbohydrate Bioengineering interdisciplinary Approaches*, The Royal Society of Chemistry MPG Books, Bodmin, Cornwall, UK. pp. 160–167.

McClure, B. y Franklin-Tong, V. (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanism involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224, 233–45.

McClure, B., Cruz-García, F. y Romero, C. (2011) Review: part of a special issue on sexual plant reproduction “Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems”. *Annals of Botany* 108: 647–658.

McClure, B.A. (2004) S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell*, 16, 2840–2847.

McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A. y Clarke, A.E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347, 757–760.

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

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

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

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

McMillan, G.P., Hedley, D., Fyle, L. y Perombelon, M.C.M. (1993) Potato resistance to soft-rot erwinias is related to cell wall pectin esterification. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 42, 279–289.

Michael, H., Sebastian, W., Patrick, A., Steffen, G., y Klaus S. (2004) Structural Insights into the Target Specificity of Plant Invertase and Pectin Methylesterase Inhibitory Proteins. *The Plant Cell*, Vol. 16, 3437–3447.

Moon, J., Parry, G. y Estelle, M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *PlantCell* 16: 3181-3195.

Nari, J., Noat, G., Diamantidis, G., Woudstra, M. y Ricard, J. (1986) Electrostatic effects and the dynamics of the enzyme reactions at the surface of plant cells. 3. Interplay between limited cellwall autolysis, pectin methylesterase activity and electrostatic effects in soybean cell walls. *Eur. J.Biochem.*, 155, 199–202.

Nasrallah, J.B.(1997) Signal perception and response in the interactions of self-incompatibility in *Brassica*. *Essays Biochem.*,32, 143–160.

Nasrallah, J.B.(2002) Recognition and rejection of self in plant reproduction. *Science*, 296, 305-308.

Nasrallah, J.B. y Nasrallah, M.E.(1993) Pollen-Stigma Signaling in the Sporophytic Self- Incompatibility Response. *Plant Cell*, 5, 1325–1335.

Nou, I.S.,Watanabe, M., Isogai, A. y Hinata. K. (1993) Comparison of S-alleles and Sglycoproteins between two wild populations of *Brassica campestris* in Turkey and Japan. *Sex. PlantReprod.*, 6, 79–86.

Ockendon, D.J.(2000) The S-allele collection of *Brassica oleracea*. *Acta Hort.*, 539, 25–30.

Poulter, N., Bosch, M. y Franklin-Tong, V. (2011).Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of *Papaver* pollen. *AnnalsofBot.*108(4):659-675

Raiola, A., Camardella, L., Giovane, A., Mattei, B., De Lorenzo, G., Cervone, F. y Bellincampi, D. (2004) Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesteraseinhibitors. *FEBS Lett.*, 557, 199–203.

Schopfer, C.R., Nasrallah, M.E. y Nasrallah, J.B. (1999) The male determinant of selfincompatibility in *Brassica*. *Science*, 286, 1697–1700.

Shiba H, Takayama S, Iwano M, Shimosato H, Funato M, Nakagawa, T., Che, F-S., Suzuki, G., Watanabe, M. e Isogai, A.(2001) A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.*, 125, 2095–2103.

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

Stein, J.C., Howlett, B., Boyes, D.C., Nasrallah, M.E., y Nasrallah, J.B. (1991) Molecular cloning of a putative receptor kinase gene encoded by the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 8816–8820.

Takayama, S. e Isogai, A. Self-incompatibility in plants. *Annual Review of Plant Biology*.2005; 56:467–489.

Takayama, S., Shimosato, H., Shiba, H., Funato, M. y Che, F-S.(2001) Direct ligand-receptor complex interaction controls *Brassica* self incompatibility. *Nature*, 413, 534–538.

Watanabe, M., Suzuki, G., Takayama, S., Isogai, A. y Hinata, K.(2000) Genomic organization of the SLG/SRK region of the *S* locus in *Brassica* species.*Ann. Bot.*, 85, 155–160.

Wheeler, M., Vatovecv, S. y Franklin-Tong, V. (2010). The pollen *S*-determinant in *Papaver*: comparisons with know plant receptor and protein ligand partners. *JExpBot* 61: 2015-2025.

Wolf, S., Grsic-Rausch, S., Rausch, T. y Greiner, S. (2003) Identification of pollen-expressedpectin methylesterase inhibitors in *Arabidopsis*.*FEBS Lett.*, **555**, 551–555.

Woodward, J., Basic, A., Jahnen, W. y Clarke, A.(1989) N-linked glycan chains on *S*-alleleassociated glycoproteins from *Nicotiana alata*. *Plant Cell*, 1, 511–514.

Wu, H-M., Wong, E., Ogdahl, J., y Cheung, A.Y. (2000) A pollen tube growth-promotingarabinogalactan protein from *Nicotiana alata* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.*, **22**, 165–176.

Zhang, Y., Zhao, Z. y Xue, Y. (2009). Roles of proteolysis in plant self incompatibility. *AnnuRevPlantBiol* 60: 21-42.

11. APENDICE

A. Transformación de células químicamente competentes *Escherichia coli*. "One Shot TOP10"

- Descongelar alícuotas de células (una por cada construcción), colocándolas en hielo durante 5min.
- Se agregaron a cada alícuota de células 2 μ L de DNA correspondiente a las diferentes construcciones (una construcción por cada alícuota).
- Incubar las células competentes con las construcciones durante 20min. En hielo.
- Dar un choque térmico a las células durante 30 seg. A 42°C y colocar inmediatamente las en hielo.
- Agregar 250 μ L de medio SOC, e incubar 1hora a 37°C.
- Centrifugar las células 7 min a 5,000 rpm para obtener el pellet, descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 200 μ L de medio SOC.
- Sembrar 100 μ L de la suspensión de bacterias en placas con medio LB+Ampicilina (100 μ g/mL), utilizando el método de diseminación en superficie con asa Digrafsky.
- Incubar O/N a 37°C.

B. Purificación de DNA plasmídico "Zyppy Plasmid Miniprep Kit"

- En un tubo eppendorff de 1.5mL agregar 600 μ L del cultivo de bacterias, centrifugar durante 3 min a 13,000 rpm. Descartar sobrenadante (repetir este paso una vez más).
- Adicionar 100 μ L de "Amortiguador de lisis 7X"¹⁰ y mezclar por inversión de 4 a 6 veces e incubar a temperatura ambiente 2 min.

¹⁰ Después de la adición del buffer de lisis 7X, la solución cambia de color azul opaco a claro, indicando que la lisis se ha completado.

- Adicionar 350 μ L de buffer de neutralización y mezclar vigorosamente. Cuando la neutralización es completa se forma un precipitado de color amarillo.
- Centrifugar a 13.000 rpm por 2-4 min.
- Transferir el sobrenadante (\sim 900 μ L) en una columna "ZYMO-Spin IIN" teniendo cuidado de no arrastrar parte del pellet. Colocar en un tubo recolector y centrifugar durante 15 s a 13,000 rpm.
- Agregar 200 μ L de "Amortiguador de lavado ENDO" a la columna y centrifugar por 1 min/13,000 rpm.
- Agregar 400 μ L de "Amortiguador de lavado Zyppy" a la columna y centrifugar durante 1 min.
- Transferir la columna dentro de un tubo eppendorf de 1.5mL y agregar 30 μ L de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna e incubar a temperatura ambiente durante 1 min.
- Centrifugar durante 30 s a 13,000 rpm para eluir el DNA plasmídico.

C. Purificación de DNA a partir de gel de agarosa "Zymoclean Gel DNA Recovery"

- Separar el fragmento de DNA deseado del gel de agarosa y transferir a un tubo eppendorf de 1.5mL.
- Pesar el fragmento de gel y adicionar 3 volúmenes de Amortiguador ABD por cada volumen de gel escindido (ej. 100 μ L (mg) de gel de agarosa, adicionar 300 μ L de buffer ADB).
- Incubar a 50°C por 10 min o hasta lograr que el gel se disuelva completamente.
- Transferir la solución de agarosa fundida a una columna (Zymo-Spin) dentro de un tubo colector.
- Centrifugar 30-60 segundos y descartar el sobrenadante.

- Adicionar 200 μ L de amortiguador de lavado a la columna y centrifugar durante 30 segundos, descartar el sobrenadante. Repetir este paso.
- Adicionar 15 μ L de H₂O desionizada estéril directamente a la matriz de la columna e incubar 1min. Posteriormente transferir la columna a un tubo limpio de 1.5mL y centrifugar por 30-60 segundos para eluir el DNA.

D. Ligación de las secuencias de los isogenes NaPEP II al vector "pGEM-T Easy"

- En un tubo eppendorf de 0.5mL agregar 5 μ L de amortiguador de la DNA T4 Ligasa (2X Rapid Ligation Buffer).
- Agregar 1 μ L (50ng/ μ L) de vector pGEM-T Easy.
- Agregar 1 μ L (\approx 50ng) de producto de PCR.
- Agregar 2 μ L de H₂O desionizada estéril libre de nucleasas.
- Agregar 1 μ L (3U) de T4 DNA Ligasa.
- Incubar toda la noche a 4°C, durante toda la noche.

E. Transformación de células químicamente competentes E. coli. "DH5 α " , "One Shot Mach1 T1" y "BL21 CodonPlus-RIL"

- Descongelar alícuotas de células (una por cada isogen), colocándolas en hielo durante 5min.
- Agregar 2 μ L del producto de una sola ligación por cada alícuota de células.
- Mezclar por inversión e incubar durante 20 min en hielo.
- Dar un choque térmico a la mezcla (45s/ 42°C) y transferir la mezcla inmediatamente a hielo e incubar durante 2 min.
- Agregar 950 μ L de medio de cultivo SOC ó LB e incubar durante 1.5 h a 37°C.
- Centrifugar la mezcla a 4,500 rpm, durante 7 min.

- Resuspender el paquete celular en 200 μ L de medio de cultivo SOC ó LB.
- Sembrar los 200 μ L de suspensión de células, en 2 placas con medio LB + Amp. (100 μ g/mL) + IPTG(0.5mM) + X-Gal(80 μ g/mL) (100 μ L por placa). Utilizando el método de diseminación en superficie con asa Digrafsky. "En el caso de las células Mach1 y BL21 se usan placas con medio LB+ Amp. (100 μ g/mL)".
- Incubar durante toda la noche a 37°C.

F. Secuencia nucleotídica de GST de Schistosoma japonicum (No.PDBP08515)

ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTGTGCAACCCACTCGACT
TCTTTTGGAAATATCTTGAAGAAAATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGG
TGATAAATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCCCAATCTTCCTT
ATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACACAGTCTATGGCCATCATAACGTTATATAG
CTGACAAGCACAACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGCAGAGATTTCAAT
GCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGTGTTCGAGAATTGCATATAGTA
AAGACTTTGAAACTCTCAAAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAA
ATGTTCGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGTGATCATGTAACCCAT
CCTGACTTCATGTTGTATGACGCTCTTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTG
CCTGGATGCGTTCCCAAATTAGTTTGTTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCCAC
AAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTG
GCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCCTCCAAAA.

G. Electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Preparación del gel al 12.5% de acrilamida/bisacrilamida

- Separador (1 gel)

Tabla 15. Preparación de gel separador (SDS-PAGE).

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua	1.375mL
Amortiguador separador	1mL
Acrilamida	1.625mL
PSA 1%	25 μ L (Agregar justo antes de vaciar)
Temed	2.5 μ L (Agregar justo antes de vaciar)
Mezclar todo y vaciar rápidamente dentro de los vidrios. Agregar isopropanol para mantener un nivel adecuado en la parte superior del gel.	

- Apilador (1 gel)

Tabla 16. Preparación de gel apilador (SDS-PAGE).

COMPONENTE	VOLUMEN
Agua	1mL
Amortiguador apilador	444 μ L
Acrilamida	300 μ L
PSA 1%	20 μ L (Agregar justo antes de vaciar)
Temed	5 μ L (Agregar justo antes de vaciar)
Mezclar todo, vaciar inmediatamente dentro de los vidrios y rápidamente colocar el peine que realiza los pozos al gel.	

Una vez polimerizado el gel, se realizar la electroforesis durante ~1.5h

H. Western Blot

- Cortar 6 papeles filtro y una membrana de PVDF de 6.5x8.5cm.
- Colocar la membrana de PVDF ~30s en metanol para activarla, pasarla por agua ~3min y colocarla en amortiguador de transferencia.
- Preparar leche para bloqueo (Svelty 0% grasa) 2.5g en 50 mL de PBS1X.
- Transferir las proteínas del gel SDS-PAGE a la membrana de PVDF.
- Lavar la membrana ligeramente con agua.
- Colocar la solución de bloqueo a la membrana durante 30-40min en agitación continua.
- Desechar solución de bloqueo y colocar en el recipiente con la membrana la dilución de anticuerpo α -NaPEP II (1:15,000). Incubar durante toda la noche con agitación a 4°C.
- Recuperar dilución de anticuerpo y lavar 3 veces con PBS1X (6min cada lavado)
- Colocar el anticuerpo secundario (α -Conejo) con una dilución de 1:15,000, incubar durante 2h a temperatura ambiente y con agitación continua.
- Lavar 3 veces con PBS1X (6min cada lavado).
- Colocar Amortiguador revelador de Fosfatasa alcalina pH9.5 durante 10 min en agitación.
- Agregar reactivos reveladores nBT y BCIP hasta que aparezcan las bandas.
- Lavar la membrana con agua y agregar ~300 μ L de EDTA 0.5M durante 30s para detener la reacción de revelado.

I. Cuantificación de proteína total por Bradford

Tabla 17. Preparación de curva patrón y muestras para cuantificación de proteína por Bradford.

<i>Punto de la curva [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]</i>	<i>Volumen de BSA (μL)</i>	<i>Volumen de H₂O (μL)</i>	<i>Volumen de reactivo de Bradford (μL)</i>
0	-	10	990
1	1	9	990
2	2	8	990
4	4	6	990
6	6	4	990
8	8	2	990
10	10	-	990
<i>MUESTRA</i>	<i>Volumen de muestra (μL)</i>	<i>Volumen de H₂O (μL)</i>	<i>Volumen de reactivo de Bradford (μL)</i>
	1	9	990

Las reacciones preparadas se leen en el espectrofotómetro a 595nm.

J. Purificación por "Batch" usando la Glutación-Agarosa

- Agregar Triton X100 a las fracciones solubles producto de los lisados bacterianos de tal manera que la concentración final sea 1% v/v.
- En un tubo eppendorf hidratar la cantidad de resina a utilizar durante toda la noche a 4°C.
- Lavar 3 veces con 1mL de H₂O desionizada estéril para retirar la lactosa.

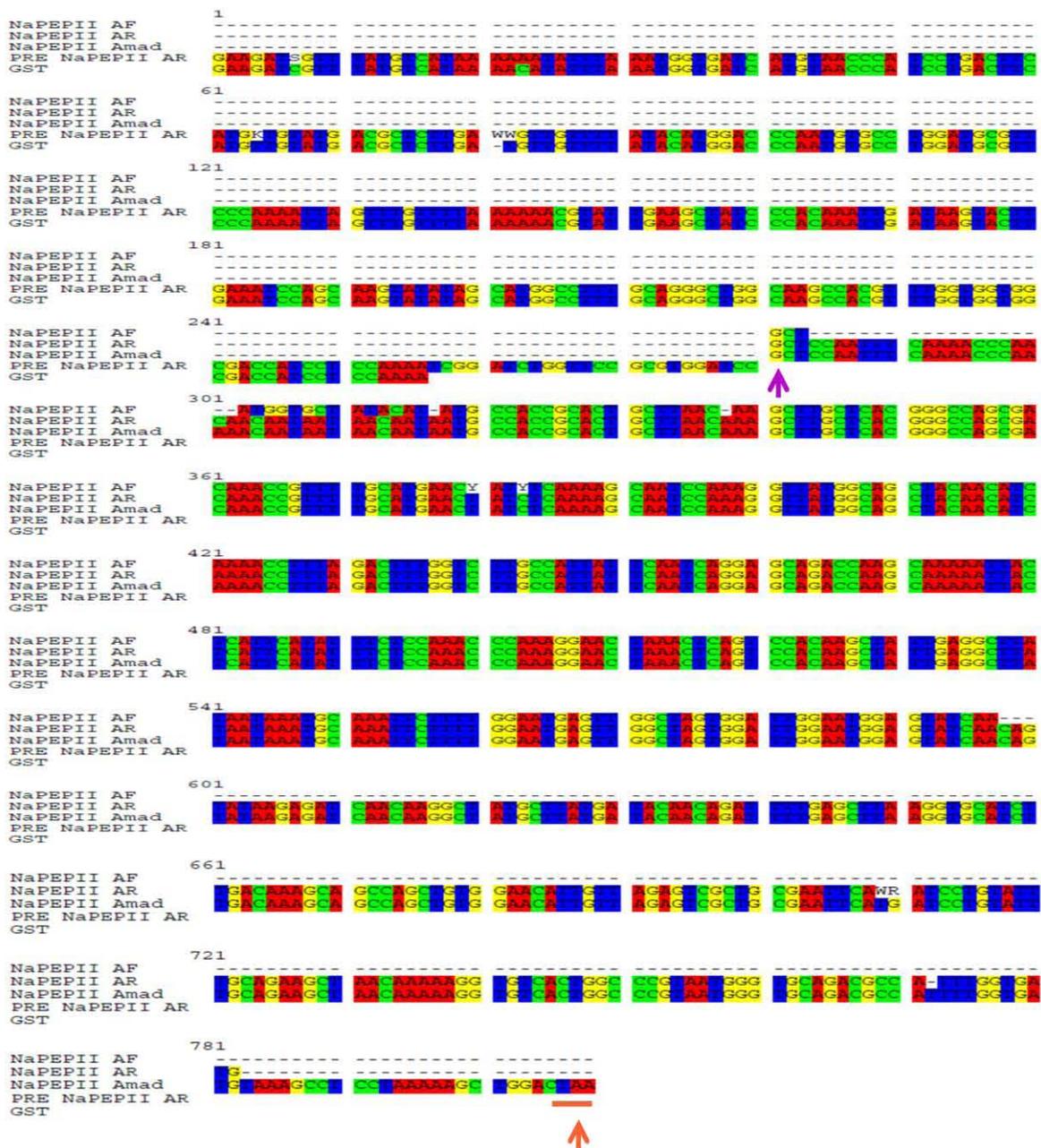
- Equilibrar la columna con PBS1X+Inhibidores de proteasas, 2 veces con un volumen de 1mL.
- Al terminar de equilibrar la columna, retirar solo la cantidad de volumen de amortiguador de equilibrio necesario para que la resina se mantenga en un 50% v/v.
- Agregar la fracción soluble (con Triton X100) donde se encuentra la proteína de interés.
- Incubar a temperatura ambiente durante 45-60min con rotación continua.
- Lavar 3 veces con 10 volúmenes cama una solución de PBS1X-Triton X100 1% v/v.
- Eluir 3 veces con 2 volúmenes cama de la solución de GSH-Tris pH9.5. Juntar solo los eluatos 2 y3 en un mismo tubo.

K. Ensayo de difusión en gel y tinción con rojo de rutenio

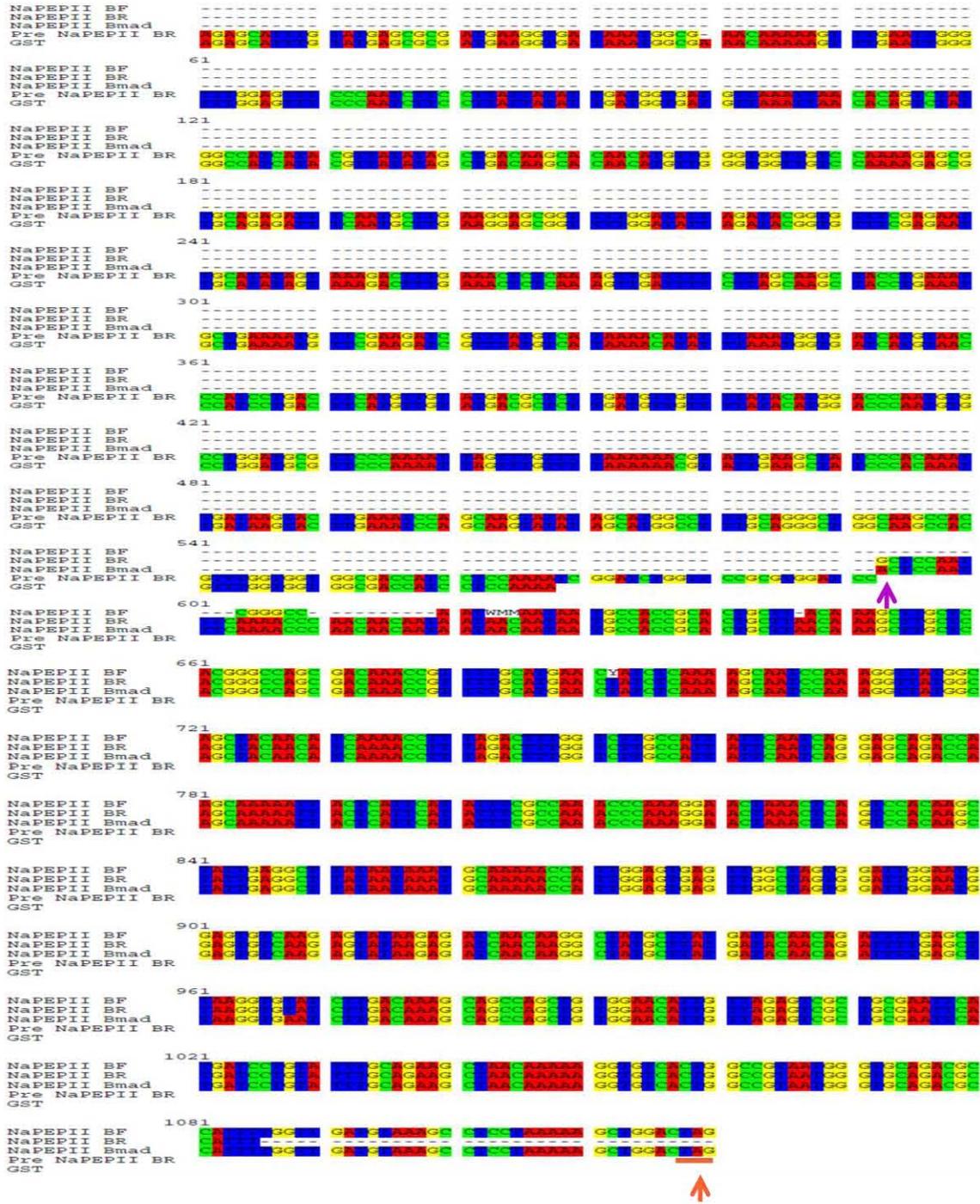
- Preparar placas de agarosa al 2% p/v que contengan pectina al 0.1% p/v y azida de sodio 0.05% v/v (30mL de solución por placa)
- Se hacen pozos de 2mm de diámetro en el gel; los necesarios para cada evaluación.
- Colocar dentro de los pozos las reacciones correspondientes a cada determinación de actividad.
- Incubar las placas con las reacciones durante 18h a 30°C dentro de un recipiente sellado que contiene papel húmedo para evitar la deshidratación del gel.
- Lavar ligeramente las placas con H₂O desionizada.
- Colocar sobre la superficie de las placas la solución de rojo de rutenio 0.05% v/v e incubar durante 45min en agitación continua.
- Retirar el colorante y lavar ligeramente con H₂O desionizada la superficie de las placas.
- Fotografiar el resultado.

L. Alineamiento a nivel de nucleótidos de las secuencias NaPEP II clonadas vs. cDNA de NaPEP II y GST

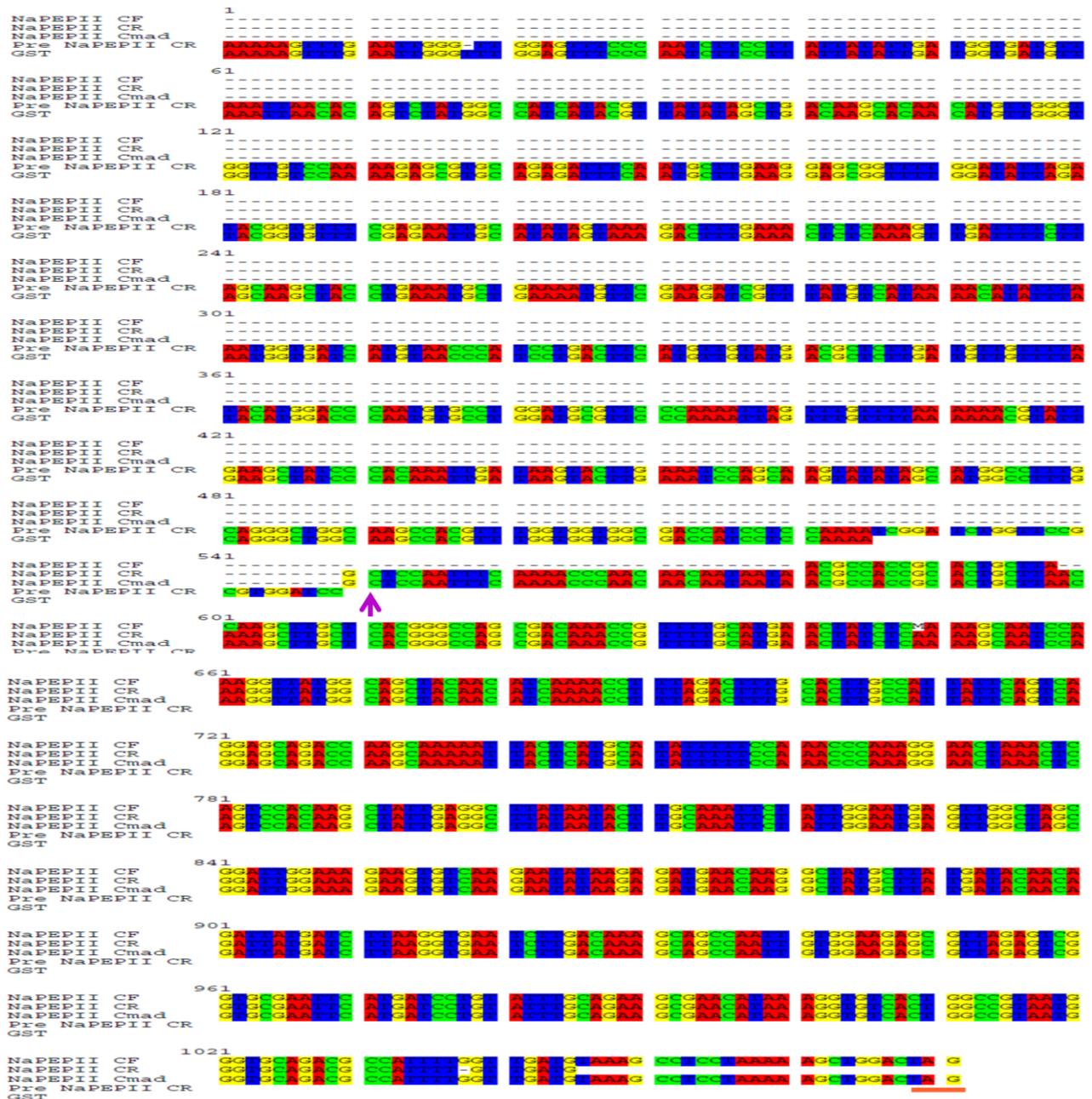
NaPEP IIA



NaPEP IIB



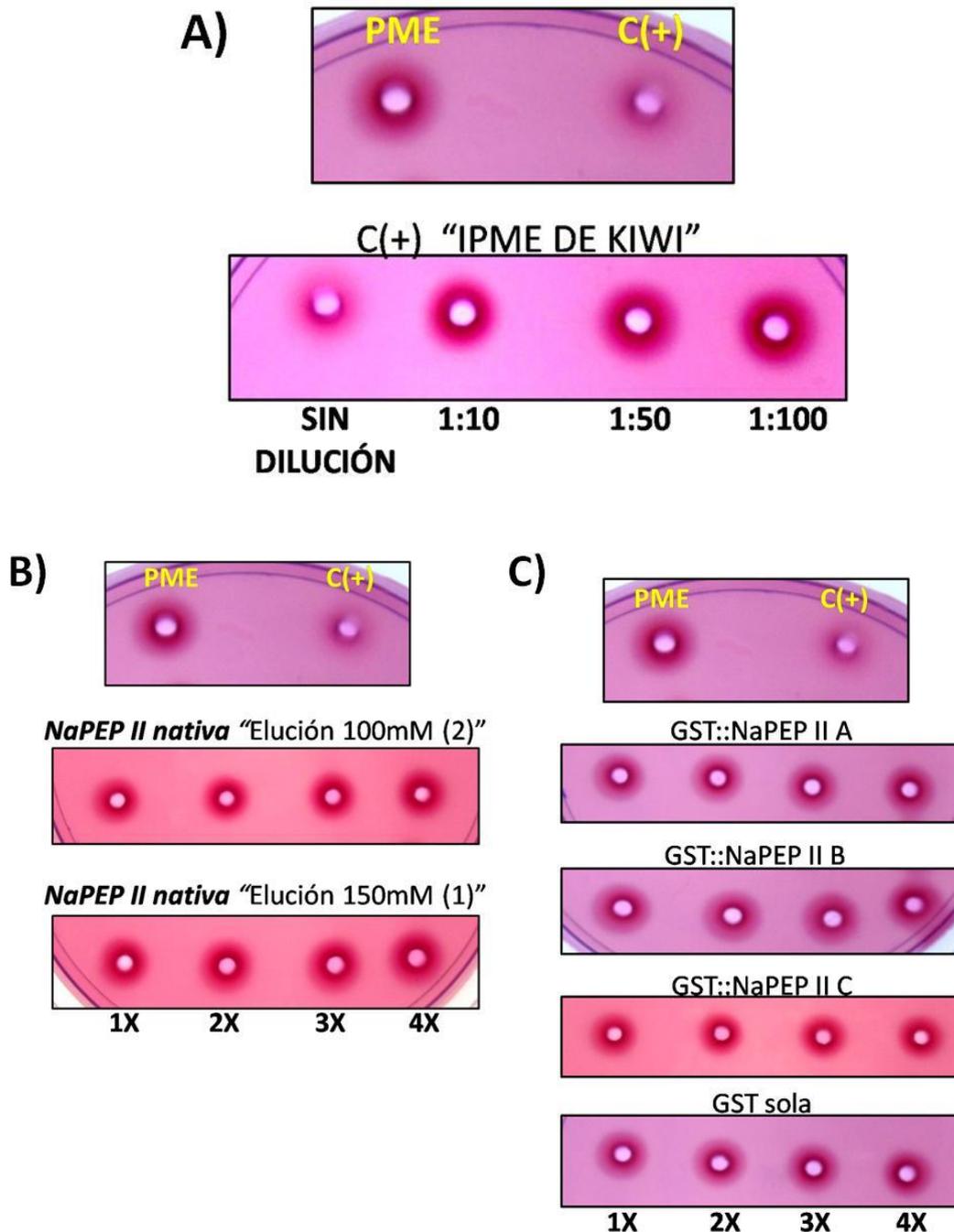
NaPEP IIC



En cada caso, la flecha color morado indica el final de la secuencia de GST y el inicio de la correspondiente a *NaPEP II*. La flecha color naranja señala el codón de termino correspondiente a la proteína de fusión. En cada alineamiento se muestra (de arriba abajo) la secuencia obtenida con el primer Fwd., luego la secuencia con el primer Rev., posteriormente el cDNA correspondiente a la proteína

madura, debajo de ella la secuencia obtenida de con el primer Rev. que se extiende hasta la secuencia de GST (fusión entre GST y NaPEP II) y finalmente la secuencia de la GST de *Schistosoma japonicum* (No.PDBP08515).

M. Ensayo de efecto de la cantidad de proteína sobre la actividad de IPME



A) Efecto sobre la actividad de IPME conforme disminuye la cantidad de proteína.

B) Efecto sobre la actividad de IPME por parte de "NaPEP II de estilos de *N. alata*" al aumentar la cantidad de proteína.

C) Efecto sobre la actividad de IPME por parte de "GST:.NaPEP II (A, B y C)" y "GST sola" al aumentar la cantidad de proteína.

N. Soluciones y medios

- *Medio LB*

10g de Peptona
5g de Extractode levadura
10g NaCl
15g de agar
Aforar a 1 L con H₂O destilada

- Medio SOC

Medio LB
Glucosa 0.02 M (Concentración final)

- TAE 50X

242g Tris-HCl
57.1ml Ácido acético glacial
100ml EDTA 0.5 M pH8
Aforar a 1L con agua destilada

- Gel de agarosa 1X

300mg de agarosa
30ml de amortiguador TAE 1X
Calentar hasta disolver y agregar 10µl de bromuro de etidio (0.5 mg/ml)

- PBS 10X

80.06g de NaCl

2.02g de KCl

11.52g de Na₂HPO₄:7H₂O

1.93g de NaH₂PO₄:H₂O

Ajustar a pH7.3 con HCl y aforar a 1L con agua destilada

- Amortiguador de extracción de proteínas (*NaPEP II* nativa)

41.02g de NaCH₃COO

2.92g de NaCl

5mL de β-mercaptoetanol

Ajustar a PH5.2 con ácido acético y aforar a 500mL con agua destilada

- Amortiguador de resuspensión de proteínas (IPME de kiwi)

0.6057g de Tris

1.46g de NaCl

Ajustar a PH7.5 con HCl y aforar a 500mL con agua destilada

- Amortiguador de lisis de células *E. coli* BL21 CodonPlus-RIL

48mg de MgCl₂

100mg de Lisozima

5g de RNasa

Aforar A 100mL con PBS1X

- "NE Buffer 3 10X" (pH7.9 a 25°C)

100mM NaCl

50mM Tris-HCl

10mM MgCl₂

1mM Ditiotreitól