



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA FUNCIÓN DE LA MAYEHUELINA,
UNA PROTEÍNA RIP TIPO I DE *Agave tequilana*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
JESÚS EDGARDO GUTIÉRREZ CRUZ

TUTOR PRINCIPAL
DR. JORGE NIETO SOTELO
Instituto de Biología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA
Facultad de Química
DRA ADELA RODRÍGUEZ ROMERO
Instituto de Química

Ciudad de México. Noviembre, 2018



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.

PMDCB/2325/2018

Gutiérrez Cruz José Edgardo
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
P r e s e n t e

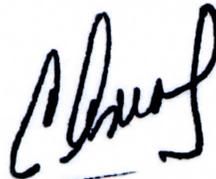
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 17 de septiembre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS**, con la réplica de la tesis "**Análisis de la relación estructura-función de la mayehuelina, una proteína RIP tipo I, de Agave tequilana**", dirigida por el/la Dr(a). **Nieto Sotelo Jorge**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Muñoz Clares Rosario Adelaida
VOCAL	Bernal Lugo Irma Ofelia
VOCAL	Cristians Niizawa Sol
VOCAL	Bustos Jaimes Ismael
SECRETARIO	Martínez Barajas Eleazar

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 17 de septiembre de 2018.
COORDINADORA



Dra. ANA BRÍGIDA CLORINDA ARIAS ÁLVAREZ

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al posgrado en Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional Autónoma de México que fomenta la formación de nuevos investigadores altamente preparados y actualizados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que me brindo el apoyo financiero para poder realizar esta tesis de maestría con la beca número 609246.

Al Dr. Jorge Nieto Sotelo jefe del Laboratorio de Fisiología Molecular, Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme integrarme en su equipo de trabajo dentro de este importante proyecto. ¡Por su tiempo, sus enseñanzas y su confianza, gracias!

A la Dra Adela Rodríguez Romero integrante de mi comité tutorial que además de guiarme durante estos dos años me brindo su ayuda y enseñanza para poder llevar a cabo la purificación de las proteínas.

A la Tzvetanka Dimitrova Dinkova por ser integrante de mi comité tutorial y por toda la ayuda otorgada para trabajar en su laboratorio del Edificio E de la Facultad de Química.

A los miembros del jurado de examen, la Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares, la Dra. Irma Ofelia Bernal Lugo, el Dr. Sol Cristians Niizawa, el Dr. Ismael Bustos Jaimes y el Dr. Eleazar Martínez Barajas por sus revisiones y sus valiosas aportaciones para mejorar este escrito.

Al Dr. José Fernando Lledías Martínez del departamento de Biología molecular de plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por aceptarme a trabajar de estancia en su laboratorio y ser mi maestro en toda la parte experimental relacionada con la extracción, purificación y detección de la proteína mayehuelina. Con sus enseñanzas y guía se convirtió en una parte fundamental de este trabajo.

Al Dr. Arnaud Jacques Marcel Ronceret y a la Dra. Gladys Iliana Cassab López por las facilidades prestadas para trabajar en sus respectivos laboratorios del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Dr. Abisaí Josué García Mendoza, del Jardín Botánico del IB-UNAM por su valiosa colaboración proporcionando muestras de algunas especies de agaves y su ayuda en la identificación de especies.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al pasante de Biólogo Eric Fernando Sosa Jiménez que trabajó junto a mí en la misma línea de investigación. Su ayuda en la parte experimental e intelectual durante este proyecto fue de lo más enriquecedora.

A la Bióloga Viridiana Rivas Rodríguez por toda la enseñanza y ayuda para la parte experimental realizada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Al Químico en alimentos Allan Camacho por toda su ayuda prestada para trabajar en el laboratorio 103 del conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Al M. en C. Leopoldo Vázquez por toda su ayuda y consejos para mejorar la discusión y la calidad de este escrito.

Al Dr. Miguel Angel Vallejo, al Dr. Sol Cristians y a la M. en C. Yajima Osorno por todas las asesorías y enseñanzas que me ayudaron a realizar mi trabajo durante mi estancia en el laboratorio de Fisiología Molecular del Jardín Botánico.

A todos mis compañeros y personal del Laboratorio de Fisiología Molecular del Jardín Botánico: las Biólogas Alejandra Figueroa y Lucy Rangel, los pasantes de Biólogo Alejandro Martínez y Raymundo Alonso que me han ayudado de alguna u otra manera resolviendo dudas, dándome consejos y sugerencias. ¡Gracias a todos ustedes!

Finalmente quiero agradecer a mi familia que me han apoyado incondicionalmente y en todos los aspectos para poder alcanzar este importante logro. Sin la ayuda de ellos no estaría aquí.

ÍNDICE

SIGLAS Y ACRÓNIMOS	1
GLOSARIO	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
I.- INTRODUCCIÓN.....	5
1.1.- Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs)	5
1.2.- El sitio activo y el mecanismo de depurinación del SRL por parte de las RIPs	7
1.3.- Las mutaciones en el sitio activo de las RIPs	9
1.4.- Otros sustratos de las RIPs	10
1.5.- La acción antiviral de las RIPs	11
1.6.- La expresión de las RIPs en condiciones de estrés	12
1.7.- La función biológica de las RIPs	13
II.- ANTECEDENTES	13
2.1.- La mayehuelina: una nueva RIP del género <i>Agave</i>	13
2.2.- La mayehuelina presenta una sustitución en su sitio catalítico	15
2.3.- La mayehuelina presenta dos isoformas en otras especies del género <i>Agave</i>	16
2.4.- La posible función biológico de la mayehuelina	17
III.- OBJETIVO	19
3.1.- Objetivos particulares	19
3.2.- Hipótesis	19
IV.- METODOLOGÍA	20
4.1.- Clonación y expresión del gen <i>Mayehuelina</i> de <i>Agave tequilana</i> en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4.1.1.- Vectores de expresión pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i>	20
4.1.2.- Transformación de la cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i> , con el vector pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i>	21
4.1.3.- Inducción de la expresión del gen <i>Mayehuelina</i> en <i>S. cerevisiae</i>	23

4.1.4.- Detección de la mayehuelina recombinante producida en <i>S. cerevisiae</i>	23
4.2. Evaluación del efecto de la mayehuelina recombinante sobre la termotolerancia en células transformantes R1-1, R2-2 y pYES	25
4.3.- Purificación de la mayehuelina nativa de <i>A. tequilana</i>	26
4.3.1.- Obtención del extracto crudo, ultra centrifugado y concentrado	26
4.3.2.- Cromatografía FPLC y análisis de las fracciones	26
4.3.3.- Secuenciación del gen <i>Mayehuelina</i> de <i>A. tequilana</i>	27
4.4.- Evaluación del efecto de la mayehuelina de <i>A. tequilana</i> sobre la traducción <i>in vitro</i> de la luciferasa	28
V.- RESULTADOS	30
5.1.- Expresión de la mayehuelina de <i>A. tequilana</i> en <i>S. cerevisiae</i>	30
5.1.1.- Transformación de la cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i> con pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i>	30
5.1.2.- Inducción y detección de la mayehuelina en <i>S. cerevisiae</i>	31
5.2.- Evaluación del efecto de la mayehuelina sobre la termotolerancia en levaduras transformantes R1-1, R2-2 y pYES	35
5.3.- Purificación de la mayehuelina nativa de <i>A. tequilana</i>	38
5.3.1.- Secuenciación del gen <i>Mayehuelina</i> de <i>A. tequilana</i>	40
5.4.- Efecto de la mayehuelina sobre la traducción <i>in vitro</i> de la luciferasa	41
V.- DISCUSIÓN	44
6.1.- Expresión de la mayehuelina recombinante en <i>S. cerevisiae</i>	44
6.2.- Evaluación del efecto de la mayehuelina sobre la termotolerancia de <i>S. cerevisiae</i>	46
6.3.- Purificación de la mayehuelina nativa de <i>A. tequilana</i> y su efecto sobre la traducción de la luciferasa en un sistema de traducción <i>in vitro</i>	49
VI.- CONCLUSIONES	54
VII.- PERSPECTIVAS	55
VIII.- LITERATURA CITADA	57
IX.- SUPLEMENTARIAS	62
S1.- Protocolo de extracción de DNA de <i>A. tequilana</i> por el método de CTAB	62
S2.- Secuenciación de los vectores R1 (pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i>) y R2 (pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i> :: <i>V5</i> :: <i>6his</i>)	63

S3.- Transferencia a membrana de nitrocelulosa de las fracciones proteicas provenientes de la inducción con galactosa de las cepas R1-1, R2-2 y pYES	64
S4.- Análisis estadístico de los ensayos de termotolerancia	65
S5.- Cromatogramas de la purificación de la mayehuelina de <i>A. tequilana</i>	68
S6.- DNA de <i>A. tequilana</i> y amplificación mediante PCR del gen <i>Mayehuelina</i>	69
S7.- Cuentas de luciferasa y su expresión relativa	70
S8.- Análisis ANOVA del efecto de la mayehuelina sobre la inhibición de la traducción de la luciferasa.....	70
S9.- Cálculo de IC ₅₀ de la mayehuelina sobre la traducción <i>in vitro</i> de la luciferasa	71
S10.- Modelamiento por homología de la mayehuelina conteniendo histidina en su sitio catalítico	72
S11.- Validación de los modelos por homología de la mayehuelina D78 y la mayehuelina H78	73
S12.-Análisis de interacción proteína-ligando de la mayehuelina D78 y la mayehuelina H78 con la adenina monofosfato	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Depurinación del lazo α -sarcina-ricina	5
Figura 1.2: Representación de los tres tipos conocidos de RIPS	6
Figura 1.3: Mecanismo enzimático propuesto para la des-adenilación del SRL mediante la ricina	8
Figura 2.1: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la mayehuelina	14
Figura 2.2: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la mayehuelina con otras RIPS	16
Figura 4.1: Vector de expresión para levadura pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i> y pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i> ::V5::6his	20
Figura 5.1: Cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i> transformada con el vector pYES-DEST52:: <i>Mayehuelina</i>	30
Figura 5.2: PCR de colonia de la cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i> transformada con el plásmido R1-1	31
Figura 5.3: Cinética de crecimiento de la cepa W303 de <i>S. cerevisiae</i> transformada con los vectores R1-1, R2-2 y pYES en medio inductor SD-galactosa Ura-	32
Figura 5.4: Perfil proteico de las muestras provenientes de la inducción con galactosa en las cepas transformadas con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES	33
Figura 5.5: Inmunodetección de la mayehuelina recombinante en muestras de proteínas totales provenientes de la inducción con galactosa en cepas de <i>S. cerevisiae</i> transformadas con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES	34
Figura 5.6: Expresión relativa de la mayehuelina en <i>S. cerevisiae</i> transformada con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES	34
Figura 5.7: Crecimiento de cultivos de <i>S. cerevisiae</i> transformados con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES sometidos a tratamientos de termotolerancia basal e inducida	35
Figura 5.8: Unidades formadoras de colonia en el tratamiento control de las transformantes R1-1, R2-2 y pYES	37
Figura 5.9: Crecimiento de unidades formadoras de colonia en cepas transformantes R1-1, R2-2 y pYES de <i>S. cerevisiae</i> sometidas al tratamiento de termotolerancia basal	37
Figura 5.10: Crecimiento de unidades formadoras de colonia en transformantes R1-1, R2-2 y pYES de <i>S. cerevisiae</i> sometidas al tratamiento de termotolerancia inducida	38
Figura 5.11: Purificación de la mayehuelina nativa de <i>A. tequilana</i>	39
Figura 5.12: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la mayehuelina obtenida del ejemplar <i>A. tequilana</i> a partir del cual se purificó la mayehuelina	41

Figura 5.13: Efecto de la mayehuelina purificada de <i>A. tequilana</i> sobre la traducción <i>in vitro</i> de la luciferasa	42
Figura 5.14: Curva de dosis-respuesta de la mayehuelina sobre la inhibición de la traducción de la luciferasa en el sistema de traducción libre de células de germen de trigo	43
Figura 6.1: Comparación de los sitios activos de la ricina, la charybdina y de la mayehuelina	46
Figura 6.2: Comparación de los sitios activos de la ricina, la mayehuelina H78 y la mayehuelina D78.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1: Sitio activo de diferentes RIPs tipo I y II	7
Cuadro 4.1: Mezcla de transformación para <i>S. cerevisiae</i>	21
Cuadro 4.2: Mezcla para realizar el PCR de colonia de <i>S. cerevisiae</i>	22
Cuadro 4.3: Reacciones para los ensayos de traducción <i>in vitro</i> de la luciferasa en el extracto de germen de trigo (WGE)	28
Cuadro 5.1: Unidades formadoras de colonia por mililitro resultantes de los ensayos de termotolerancia en cepas de <i>S. cerevisiae</i> R1-1, R2-2 y pYES	36
Cuadro 5.2: Rendimientos generales en el proceso de purificación de la mayehuelina obtenida de <i>A. tequilana</i>	40
Cuadro 6.1: Comparación de la concentración inhibitoria media de diferentes RIPs	52

SIGLAS Y ACRÓNIMOS

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario, del inglés “complementary Deoxyribonucleic Acid”.

AMCV: Virus de la arruga moteada de la alcachofa, del inglés: *Artichoke Mottled Crinkle Virus*.

AMV: Virus del mosaico de la alfalfa, del inglés: *Alfalfa Mosaic Virus*.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero, del inglés “messenger Ribonucleic Acid”.

rRNA: Ácido ribonucleico ribosomal, del inglés “ribosomal Ribonucleic Acid”.

tRNA: Ácido ribonucleico de transferencia del inglés “transfer Ribonucleic Acid”.

BSA: Albúmina de suero bovino, del inglés: *Bovine Serum Albumin*.

CAM: Metabolismo ácido de las crasuláceas, del inglés: *Crasulacean Acid Metabolism*.

EST's: Secuencias parciales de genes expresados, del inglés *Expressed Sequence Tags*.

IC₅₀: Concentración inhibitoria media. Medida cuantitativa que indica la cantidad necesaria de un determinado fármaco u otra sustancia para inhibir en un 50 % un proceso biológico.

IRES: Sitio de Entrada Interna al Ribosoma, del inglés: *Internal Ribosome Entry Site*. Mecanismo de traducción independiente del 5'-cap en el que el ribosoma se une a una región interna del mRNA cercana al sitio de inicio de la traducción y que es muy común en los RNA virales.

RIPs: Proteínas inactivadoras de los ribosomas. del inglés: *Ribosome Inactivating Proteins*.

SPMV: Virus del mosaico Satélite Panicum, del inglés: *Satellite Panicum Mosaic Virus*.

SRL: lazo de la sarcina y la ricina, del inglés: *Sarcin-ricin Loop* Estructura de asa universalmente conservada en el RNA ribosomal que es reconocida por estas dos RIP's.

TBSV: Virus del enanismo ramificado del Jitomate, del inglés: *Tomato bushy stunt virus*.

TMV: Virus del mosaico del tabaco, del inglés: *Tobacco Mosaic Virus*.

UTR: Región no traducida de los RNA mensajeros, del inglés: *Untranslated Region*.

5'-Cap: Tapa 5'. Grupo 7-metilguanosina-trifosfato que se adiciona al extremo 5' del mRNA durante al proceso de maduración. *Capped* y *uncapped* se refieren a la presencia o ausencia de dicha estructura.

GLOSARIO

Heterólogo: En biología hace referencia a todo lo derivado o procedente de una especie distinta de la especie de procedencia

N-glicosidasas: Enzimas que catalizan la ruptura entre la ribosa o desoxirribosa de un ácido nucleico y su base nitrogenada.

Overnight: (Inglés) durante la noche. En microbiología el término hace referencia a cultivos que se dejan crecer de un día para otro.

Forward: (Inglés) hacia adelante. Hace referencia a la cadena codificante o con sentido del DNA.

Reverse: (inglés) marcha atrás. Hace referencia a la cadena no codificante o sin sentido del DNA.

RESUMEN

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs) son una familia de proteínas que abundan principalmente en plantas y actúan removiendo una adenina de la estructura asa de la sarcina-ricina universalmente conservada en el rRNA con el consiguiente arresto de la síntesis proteica. Actualmente se sabe que las RIPs pueden actuar degradando otros sustratos, principalmente transcritos de RNA, aunque se conoce poco sobre su mecanismo regulatorio. El conocimiento sobre su rol biológico dentro de la planta todavía no es muy claro, pues su expresión aumenta considerablemente en condiciones de estrés biótico y abiótico, lo cual concuerda con una función reguladora de la traducción, además de la clásica función de defensa que se les atribuyó en un principio. La mayehuelina es una RIP tipo I que fue identificada en *A. tequilana* y que tiene una sustitución de aspartato por la tirosina 78 del sitio catalítico (Y78D). La mayehuelina se expresa únicamente en las hojas del cogollo, que es la parte más termorresistente de la planta, lo que permitió postular la hipótesis de que esta proteína ayuda a proteger al cogollo de los efectos del calor. En este trabajo se evaluó la expresión de la mayehuelina, portando su sustitución natural de aspartato, en la cepa W303 de *S. cerevisiae* y sus efectos sobre la termotolerancia basal e inducida. La expresión de la mayehuelina en la levadura no tuvo efectos citotóxicos, aunque tampoco se pudo observar un aumento significativo en la termotolerancia de las células. La mayehuelina purificada de *A. tequilana* en su forma silvestre mostró una IC₅₀ de 10.97 nM en un sistema de traducción *in vitro* a partir de extractos de germen de trigo. El ejemplar que se empleó para purificar la mayehuelina era heterócigo, presentando la versión con aspartato y una segunda isoforma con histidina en el sitio catalítico (Y78H), que no había sido descrita antes. El análisis *in silico* predice que la H78 restituye parcialmente la conformación del sitio catalítico afectada fuertemente por la sustitución con aspartato, lo que podría explicar el ligero aumento en la inhibición de la síntesis de proteínas de la mezcla de isoformas evaluada relativo a la charybdina, que tiene una substitución Y79V ya descrita. Queda por evaluar por separado a las diferentes versiones de la mayehuelina para estudiar sus efectos sobre la actividad depurinadora de los ribosomas, su capacidad para degradar transcritos de RNA y su grado de citotoxicidad.

ABSTRACT

*The ribosome inactivating proteins (RIPs) are a family of proteins found mainly in plants that act by removing an adenine from the universally conserved sarcin-ricin loop structure from the rRNA with the consequent arrest of protein synthesis. It is known that RIPs can act by degrading other substrates, mainly RNA transcripts, although little is known about their regulatory mechanism. The knowledge of the biological role of the RIPs within the plant is unclear, since their expression increases considerably under conditions of biotic and abiotic stress, which is consistent with a regulatory function of translation in addition to the classical defense function that was initially attributed to them. Mayehuelin is a type I RIP found in *A. tequilana* that has an aspartate at the position of tyrosine 78 in the catalytic site (Y78D). Mayehuelin accumulates only in the spike leaves, which is the most thermo-resistant part of the whole plant. This allowed to postulate the hypothesis that this protein helps to protect the spike leaves from the damage caused by high temperatures. In this work I evaluated the expression of mayehuelin bearing a natural aspartate substitution in the yeast strain W303 of *S. cerevisiae* and its effects over both basal and induced thermotolerance. The expression of mayehuelin in yeast caused no cytotoxic effects; however, there was no significant increase in yeast thermo-tolerance either. A wild type mayehuelin preparation obtained from *A. tequilana* showed an IC_{50} of 10.97 nM on an *in vitro* translation system using wheat germ extract. The plant from which mayehuelin was purified was heterozygous presenting the aspartate version and a second isoform with histidine at the catalytic site (Y78H), described for the first time. *In silico* analysis predicts that H78 can partially restore the conformation of the catalytic site that was strongly effected by the aspartate substitution and this could explain the slight increase observed in the inhibition of protein synthesis using this isoform mix relative to charybdin, a previously reported RIP containing a Y79V substitution. It remains to be evaluated separately each of the two mayehuelin versions in order to study their effects on ribosome depuration activity, their ability to degrade RNA transcripts, and their degree of cytotoxicity.*

I.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs)

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas, comúnmente conocidas como “RIPs” por sus siglas en inglés, son una familia de polipéptidos citotóxicos que adquieren su nombre debido a que se unen a la subunidad mayor del ribosoma de varias especies, bloqueando irreversiblemente la síntesis de las proteínas (De Virgilio *et al.*, 2010). Estos péptidos se encuentran en las bacterias, los hongos y las plantas, siendo este último reino en donde más abundan y en donde mayormente se han estudiado. Se han encontrado RIPs en más de 50 especies vegetales pertenecientes a 14 familias y el número va en aumento (Puri *et al.*, 2012).

Todas las RIPs estudiadas tienen función de N-glicosidasas [EC. 3.2.2.22] y actúan quitando una adenina de la estructura de tallo-asa denominada lazo de la sarcin-ricina [SRL] que está altamente conservada en el rRNA. Dicha estructura es importante para la interacción del ribosoma con el Factor de Elongación II [EFII]. Adquirió su nombre debido a que la ricina, una RIP proveniente de las semillas de *Ricinus communis*, cataliza la depurinación de la A4324 del rRNA 28S de las ratas [A2660 en el rRNA 23S], mientras que la α -sarcina, una RNasa aislada de *Aspergillus giganteus*, corta el enlace fosfodiéster entre los residuos G4325-A4326 del rRNA 28S [G2661-A2662 en el rRNA 23S], [ver Figura 1.1] (Nielsen y Boston, 2001; Puri *et al.*, 2012; Spackova y Sponer, 2006; Szewczak y Moore, 1995).

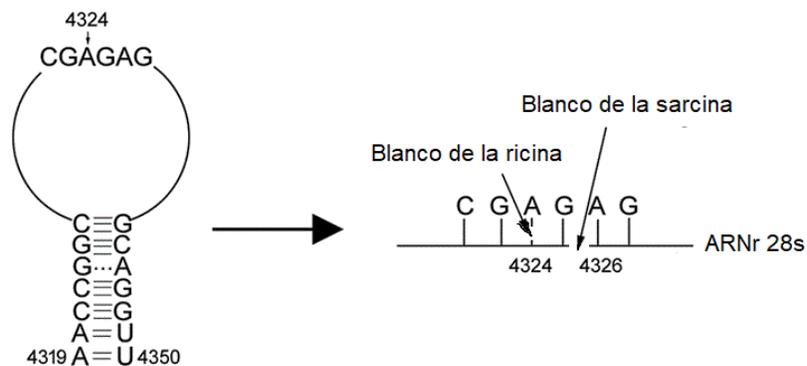


Figura 1.1: Depurinación del lazo α -sarcina-ricina. Se muestra el sitio de ataque de la ricina y la sarcina (tomado de Wang, *et al.*, 2016).

Inicialmente las RIPs fueron clasificadas en dos tipos (ver Figura 1.2): a) las de tipo I que son proteínas de una sola cadena, denominada comúnmente cadena A, con pesos promedio de 30 kDa; b) las de tipo II, que son heterodímeros que consisten en una cadena A muy similar a las del tipo I unida a una cadena B con propiedades de lectina. Ambas cadenas tienen pesos promedio de 56 a 65 kDa (Stirpe y Battelli, 2006). Posteriormente se identificaron RIPs hasta de 60 kDa con un dominio amino-terminal similar al tipo I y un dominio carboxi-terminal con funciones desconocidas que, se piensa, son precursores inactivos que requieren de un procesamiento para formar una RIP funcional a las que se les denominó tipo III o pro-RIPs (Puri *et al.*, 2012). Generalmente las RIPs tipo I muestran una toxicidad más baja *in vivo* respecto al tipo II debido a que carecen de la cadena B y no pueden entrar a la célula. Sin embargo, si son unidas mediante ingeniería genética a moléculas que les permitan entrar a la célula pueden ser muy tóxicas (Stirpe, 2013) En la actualidad se han descrito una mayor cantidad de RIPs tipo I que de tipo II, y solamente unas pocas de estas últimas son altamente tóxicas.

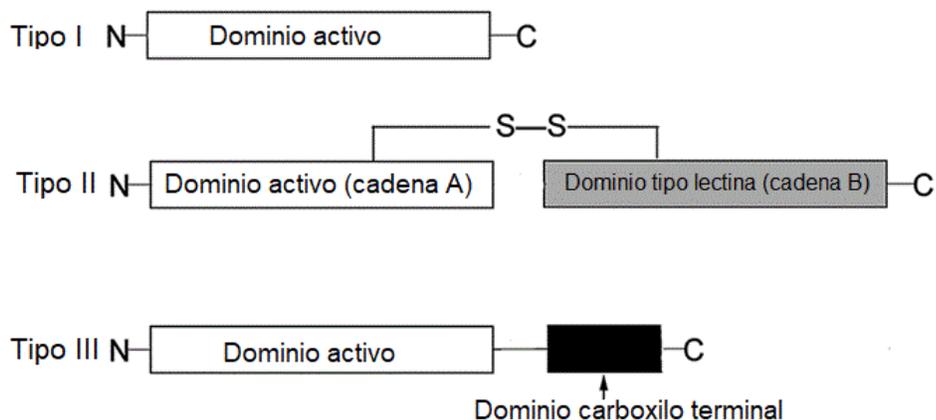


Figura 1.2: Representación de los tres tipos conocidos de RIPs (tomado de Wang, *et al.*, 2016).

Las RIPs se encuentran localizadas en diferentes tejidos de la planta; por ejemplo, la saporina, una RIP tipo I de la jabonera [*Saponaria officinalis*] se encuentra tanto en las hojas como en las raíces y semillas. También pueden ser tejido-específicas, como en el caso de la ricina, una RIP tipo II, que solo se localiza en las semillas de

R. communis. En otros casos, las RIPs tipo I y II pueden ser encontradas en la misma planta (Polito *et al.*, 2013; Stirpe, 2013).

1.2.- El sitio activo y el mecanismo de depurinación del SRL por parte de las RIPs

Los estudios que determinaron el mecanismo enzimático de las RIPs fueron llevados a cabo con la cadena A de la ricina. Las mutaciones en aminoácidos específicos, la comparación con cadenas homólogas y la elucidación de la estructura cristalina de la ricina permitieron identificar a las tirosinas 80 y 123, así como al glutamato 177 y a la arginina 180 como los aminoácidos que componen el sitio catalítico implicado en la depurinación del SRL (Kim y Robertus, 1992). A la fecha ya se han resuelto las estructuras de varias RIPs y en ellas se observa una alta conservación de estos aminoácidos catalíticos [cuadro 1.1], así como una bien conservada estructura secundaria (Peumans *et al.*, 2001).

Cuadro 1.1: Sitio activo de diferentes RIPs tipo I y II

Proteína	Tipo	Organismo	Sitio activo			
			Residuo	Residuo	Residuo	Residuo
Ricina A	II	<i>Ricinus communis</i>	Y (80)	Y (123)	E (177)	R (180)
Abrina	II	<i>Abrus precatorius</i>	Y (74)	Y (113)	E (164)	R (167)
Ebulina	II	<i>Sambucus ebulus</i>	Y (77)	Y (116)	E (163)	R (166)
Viscumina	II	<i>Sambucus ebulus</i>	Y (76)	Y (115)	E (165)	R (168)
Saporina	I	<i>Saponaria officinalis</i>	Y (72)	Y (120)	E (176)	R (169)
Pokeweed	I	<i>Phytolacca americana</i>	Y (72)	Y (122)	E (175)	R (178)
Curcina	I	<i>Jatropha curcas</i>	Y (118)	Y (159)	E (209)	R (212)

Los aminoácidos catalíticos con su respectiva numeración fueron identificados mediante alineamiento Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) usando secuencias FASTA obtenidas del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El análisis de un cristal de la ricina a una resolución de 2.5 Å y de la formicina-mono fosfato como análogo de su sustrato permitió a Monzingo y Robertus (1992) encontrar que, en la conformación nativa de la ricina, la Tyr80 está unida mediante un puente de hidrógeno con la Gly121. Cuando la adenina sustrato entra en contacto

con la ricina, se rompe este puente de hidrógeno y entonces el carbonilo liberado de la Gly121 se une con el N-6 de la adenina que queda situada paralelamente en medio de la Tyr80 y la Tyr123. La Arg180 juega un papel crucial en la catálisis, ya que protona al N-3 de la adenina lo que facilita la ruptura del enlace N-9 de la adenina con el C-1 de la ribosa (Figura 1.3a). Tras la ruptura, la ribosa queda momentáneamente con carga positiva y es estabilizada por la carga negativa de la Glu177. Por su parte, la protonación del N-3 de la adenina le permite a la Arg180 capturar un H⁺ de una molécula de agua formando así un ion hidroxilo (Figura 1.3b). El hidroxilo recién formado se une al C-1 de la ribosa neutralizando la carga y estabilizándolo completamente (Figura 1.3c) (Pita *et al.*, 2004).

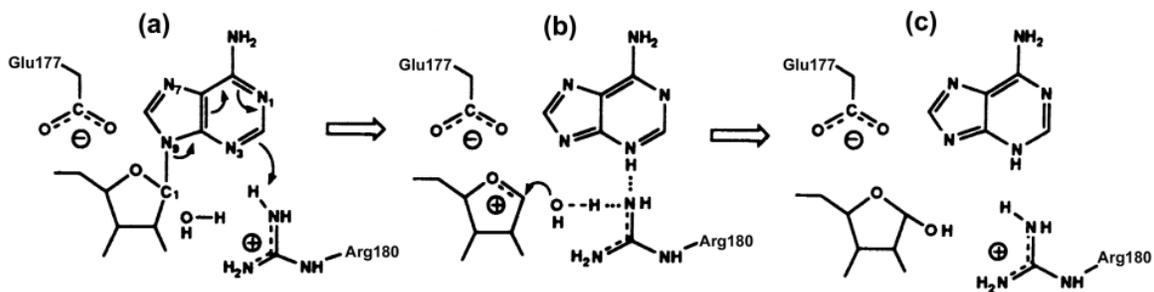


Figura 1.3: Mecanismo enzimático propuesto para la des-adenilación del SRL mediante la ricina. a) protonación de la adenina y ruptura del enlace glicosídico. b) estado de transición donde la ribosa es estabilizada por el Glu177 y una molécula de agua unida a la Arg180. c) un ion hidroxilo se libera de la molécula de agua y estabiliza a la ribosa quedando libre la adenina y restituido el protón cedido por la arginina (adaptado de Pita *et al.*, 2004).

Aunque el SRL está universalmente conservado y ha sido descrito como sustrato común a todas las RIPs, la especificidad de estas proteínas hacia los ribosomas muestra diferencias marcadas (May *et al.*, 2013). Estudios hechos a finales de los años 80 del siglo pasado mostraron que la ricina daña a los ribosomas eucariotas, principalmente los de los mamíferos y los de la levadura, pero actúa muy pobremente contra los ribosomas de las plantas y no daña a los ribosomas de *E. coli* (Peumans *et al.*, 2001). Por el contrario, la proteína PAP una RIP tipo I proveniente de la *Phytolacca americana*, depurina con la misma fuerza a los ribosomas de plantas, bacterias y animales (Peumans *et al.*, 2001). Una década después, el grupo de Monzingo y Robertus probaron quimeras de la ricina A y de la PAP en contra de

ribosomas procariotas y eucariotas y determinaron que la diferencia estructural entre estas proteínas no era la causante de la variabilidad en la especificidad hacia los ribosomas (Chaddock *et al.*, 1996). Lo anterior sugirió a los investigadores que la estructura del ribosoma, más específicamente la de las proteínas ribosomales, podrían determinar la especificidad necesaria para la unión de las RIPs (Chiou *et al.*, 2008).

A la fecha ya se conoce cómo algunas RIPs pueden unirse a los ribosomas a través de las proteínas ribosomales. Se ha demostrado que la proteína PAP se une a la proteína ribosomal L3, la cual es una de las tres proteínas requeridas para la actividad peptidil-transferasa y está altamente conservada en los tres reinos biológicos, explicándose así la efectividad de PAP hacia los ribosomas de diferentes organismos (Petrov *et al.*, 2004; Peumans *et al.*, 2001). En el caso de la ricina, ésta se une a las proteínas P1 y P2 del tallo ribosomal, estructura que constituye junto con el SRL parte del centro de activación GTPasa, involucrado en la unión de factores de elongación y en la hidrólisis del GTP (Choi *et al.*, 2015). A diferencia de L3, el tallo ribosomal no está conservado entre procariotas y eucariotas; en bacterias se conforma de una proteína de andamio L10 a la cual se unen dos o tres copias del homodímero L12, mientras que en eucariotas la proteína P0 forma el andamiaje al cual se unen dos heterodímeros de las proteínas ácidas P1/P2 en el siguiente arreglo: [P2/P1]-P0-[P1/P2] (Bautista-Santos y Zinker, 2014). La unión de la ricina con las proteínas P1/P2 explica su especificidad hacia los ribosomas eucariotas (Chiou *et al.*, 2008). La Tricosantina, una RIP tipo I proveniente de las raíces de *Trichosanthes kirilowi*, se une a las proteínas del tallo ribosomal y al igual que la ricina no actúa sobre los ribosomas procariotas (Choi *et al.*, 2015; Zhang y Liu, 1992).

1.3.- Las mutaciones en el sitio activo de las RIPs

Las sustituciones en alguno de los cuatro aminoácidos catalíticos de las RIPs reducen, algunas veces de manera drástica, su actividad enzimática. Day y colaboradores (1996), trabajando con la cadena A de la ricina, cambiaron la arginina

180 por la histidina (R180H) y observaron que la IC₅₀ en contra de los ribosomas de *Artemia salina* aumentó 500 veces. El análisis de los cristales de la proteína mutante demostró cambios estructurales importantes; a diferencia de la proteína nativa donde Y80 se une mediante un puente de hidrógeno con Gly121, el cambio de R180H causa una rotación de 60 °C en Y80 y su grupo hidroxilo forma un puente de hidrógeno muy fuerte con E177 lo que hace más difícil que la adenina rompa este enlace y entre al sitio catalítico.

Las tirosinas del sitio activo son muy importantes en la catálisis, ya que estabilizan a la adenina-sustrato. Los cambios en estos aminoácidos también reducen de manera sustancial la capacidad de depuración. Kim y Robertus (1992) sustituyeron las tirosinas del sitio activo de la ricina A por serinas (Y80S y Y123S) encontrando que la actividad enzimática de las mutantes disminuye respecto a las proteínas nativas. Ready y su equipo (1991) mutaron ambas tirosinas por fenilalaninas Y80F y Y123F encontrando también un aumento de la IC₅₀ en contra de ribosomas de *Artemia salina*. En la proteína mutante con el cambio Y80F la fenilalanina no puede formar el puente de hidrógeno con Gly121, por lo que una molécula de agua se une a la Gly121 y la F80 se desplaza hacia fuera, perdiéndose la orientación paralela que mantenía Y80 con la adenina, lo que resulta en una débil interacción proteína-sustrato (Kim y Robertus, 1992).

1.4.- Otros sustratos de las RIPs

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas tienen diferente grado de toxicidad hacia los ribosomas eucariotas y procariotas, aunque también pueden depurar otros polinucleótidos. La saporina fue una de las primeras RIPs en donde se demostró actividad multi-enzimática pues es capaz de remover adeninas de sustratos como el DNA del esperma de salmón, los tRNA y el RNA del virus TMV (Peumans *et al.*, 2001). Uno de los estudios de referencia es el de Barbieri y colaboradores quienes probaron 52 RIPs tipo I y II en contra del DNA del esperma de salmón, polinucleótidos de adenina, rRNA de *E. coli* y los RNA virales del TMV, del AMCV y del fago MS2, encontrando que muchas de las proteínas probadas eran

capaces de actuar sobre varios o todos los sustratos usados por lo que sugirieron cambiar el nombre de “Proteínas Inactivadoras de los Ribosomas” por el de “Polinucleótido-adenosín Glicosidasas”, asunto que ha quedado pendiente (Barbieri *et al.*, 1997).

1.5.- La acción antiviral de las RIPs

Las RIPs pueden actuar sobre el RNA viral, siendo este mecanismo de acción una de las actividades más estudiadas de estas proteínas. Desde los años 20 del siglo XX se conocía que los extractos crudos de las hojas de la planta *Phytolacca americana* podían inhibir las infecciones virales de las plantas. Posteriormente se aisló el componente activo y la proteína responsable fue llamada “*pokeweed antiviral protein*” [PAP] (Peumans *et al.*, 2001). En un principio la actividad antiviral fue atribuida a la inhibición de la síntesis proteica; la RIP actuaría como un agente suicida en la célula infectada, depurinando a los ribosomas y, por ende, deteniendo la proliferación del virus. Posteriormente esta idea se desechó cuando una mutante de PAP, a la cual se le modificó el extremo C-terminal, demostró que todavía podía reducir la infección del virus X de la papa en plantas de tabaco, aun cuando su actividad de depurinar el rRNA se había perdido, lo que hizo suponer que la PAP podría interaccionar directamente con el transcrito dentro de la célula (Zhabokritsky *et al.*, 2011).

Primeramente, se demostró que la PAP era capaz de unirse al 5' *cap* del mRNA eucariota y depurarlo en múltiples sitios río abajo del *cap* (Hudak *et al.*, 2002). En un estudio posterior, se evaluaron tres RIPs: la PAP, la RIP de *Mirabilis expansa* (ME1) y la saporina en contra de RNA virales tanto con *cap* como sin *cap*. Las tres proteínas fueron capaces de depurinar el virus con *cap* del TMV, pero no depuraron el virus con *cap* del AMV ni a un RNA sin *cap* de la luciferasa construido para tal ensayo. La PAP depurinó los mRNA virales sin *cap* del TBSV, del SPMV y un RNAm sin *cap* de la luciferasa fusionado en el extremo 5' al sitio IRES del virus de la Polio. Estos resultados demuestran que algunas RIPs son capaces de distinguir entre los

RNA virales con y sin *cap*, y como en el caso de la PAP, también pueden inhibir la traducción por IRES (Vivanco y Tumer, 2003).

1.6.- La expresión de las RIPs en condiciones de estrés

Se ha observado que la expresión de las RIPs dentro de la planta se incrementa por tres mecanismos: senescencia de la planta, condiciones de estrés e invasión por microorganismos y virus (Stirpe y Batelli, 2006), lo que sugiere que las RIPs además de tener la función de defensa contra herbívoros, pudieran actuar protegiendo a la planta en condiciones de estrés. Stirpe y su equipo (1996) evaluaron las RIPs de las hojas de *Hura crepitans* y de la *Phytolacca americana*, encontrando que su actividad inhibitoria de la traducción y de deadenilación se incrementaba al someter las hojas a estrés osmótico y estrés por calor.

Jiang y su equipo expresaron el gen *OSRIP18* que codifica una RIP de arroz [*Oriza sativa*] en plantas de arroz bajo el control del promotor *CaMV 35S* para evaluar las respuestas a la salinidad y la sequía. La sobreexpresión del gen en las plantas transgénicas aumentó la tolerancia a la sequía y a la salinidad. Se atribuyó el aumento en la tolerancia a un reordenamiento del metabolismo a través de la inhibición de la síntesis proteica por parte de *OSRIP18* y a la reducción de especies reactivas de oxígeno por el efecto antioxidante que han mostrado algunas RIPs (Jiang *et al.*, 2012).

Más recientemente Zhu y colaboradores evaluaron la resistencia sistémica del tabaco [*Nicotiana benthamiana*] al ser pre-inoculado con la proteína PAP purificada e inoculado posteriormente con el TMV. Encontraron que la aplicación exógena de la RIP disminuyó la infección y aumentó la actividad de las enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa “SOD”, la catalasa “CAT” y la peroxidasa “POD” disminuyendo las especies reactivas de oxígeno “ROS”, lo que sugiere que la PAP puede actuar como antioxidante durante la infección viral y refuerza la idea de las RIPs como agentes protectores contra el estrés (Zhu *et al.*, 2016).

1.7.- La función biológica de las RIPs

A pesar de que las RIPs han sido objeto de estudio desde varios enfoques experimentales, lo cierto es que su rol biológico dentro de la planta aún debe ser esclarecido. La forma en que algunas RIPs interactúan contra los ribosomas eucariotas y procariotas sugiere que su función podría ser la defensa de la planta, las RIPs tipo II con su cadena B con propiedad de lectina probablemente jueguen un papel en la defensa contra la herbivoría; por su parte, las del tipo I al carecer de la cadena B que les permite ingresar a otras células podrían ser relevantes para la defensa contra microorganismos, virus y la respuesta a estrés (Fermani *et al.*, 2009; Peumans *et al.*, 2001).

II.- ANTECEDENTES

2.1.- La mayehuelina: una nueva RIP del género *Agave*

Los agaves son un género de plantas que pertenecen a la familia Asparagaceae y a la subfamilia Agavoideae (Stevens, 2001). Son plantas suculentas cuyas hojas se arreglan en espiral y forman una roseta donde las hojas emergen del tallo que presenta internodos sumamente cortos. Los magueyes -nombre común de los agaves- presentan adaptaciones como raíces someras, cutícula gruesa en la epidermis de la hoja, baja densidad estomática y metabolismo CAM entre otras, que les permiten sobrevivir en condiciones climáticas desfavorables como las altas temperaturas y muy baja humedad (García-Mendoza, 2007).

La resistencia a las altas temperaturas por parte de las plantas está relacionada con la expresión de proteínas de choque de calor (HSPs) de vital importancia, ya que actúan como chaperonas que ayudan a re-naturalizar, desagregar y re-solubilizar a otras proteínas dañadas por la temperatura, así como a estabilizar la cromatina y membranas durante la exposición al calor (Luján *et al.*, 2009). Un estudio realizado para evaluar la expresión de las HSPs a diferentes temperaturas y en diferentes hojas de la roseta de *Agave tequilana* permitió identificar una proteína con un peso de 27 kDa que se expresaba abundantemente en el centro de la roseta que tiene

hojas aún no desplegadas, estructura denominada comúnmente como cogollo. La proteína se purificó por electro-elución a partir de un gel de poli-acrilamida y se secuenció por espectrometría de masas. Los péptidos obtenidos se alinearon con una biblioteca de secuencias de ESTs de *A. tequilana* (Figura 2.1). El análisis bioinformático permitió identificar a esta proteína como una RIP tipo I, lo que además permitió inferir que se sintetiza como un precursor al que le son retirados los extremos N- y C-terminales. La proteína madura consta de 245 aminoácidos, el análisis del extremo N-terminal indica que éste probablemente sea un péptido que señalice su transporte al retículo endoplásmico (Martínez, Lledías, Nieto-Sotelo, datos no publicados).

```

CTTCTTTCAAGTCCAGTATCTTCGGAATATTGACGTTAGTTCTGATCTTCATTGCTGCAGCT
  S F K S S I F G I L T L V L I F I A A A
GCTGCTGACGGCTACACTAGCAGCGAGCAACATTTGAAGGTGAAATTTGAGGTCAACCTC
  A A D G Y T S S E Q H L K V K F E V N I
GATGTACGAAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGAGCCTTCCAGGACGATCTCCGCAAAGG
  D V R T L D A A G Y R A F Q D D L R K R
TTGGCAGACAAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGCGGTGCTGCCCCACGACAAC
  L A D K Y I G P A G N N V A V L P H D N
GAAGGAGCCCCGCAATGGTTCGACCTGAGACTAACAGGCGCCGGAGGAGCACAGACCACA
  E G A P Q W F D L R L T G A G G A Q T T
GTGAGGTTTTCGCGTCGGCAACCTCGACGTGGTTCGGTTATCAGATGGGGACGACCTGGTAC
  V R F R V G N L D V V G Y Q M G T T W Y
GAGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATTCCCAACTCAGTTCTTGGGCTCAGA
  E F G K N G D K Q W I P N S Q F L G F R
GGCGACTACGGGGCACTGGCAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTAAT
  G D Y G A L A N A A G K K V T E I N L N
GTATACGGTTTTCGAAGCAGCTGTGAAAACACTCGCCACGTCACAAAAGGCAACGAGGGG
  V Y G F E A A V V K T L A T S T K G N E G
GCAGAGGCACTGATAGTCGTGGCTCAGTTGGTCTCCGAAGCCTGCAGATTCCTCATGCTC
  A E A L I V V A Q L V S E A C R F L I I
TCCAACGCTCTCTCAACCAGGATAAACGACCCAACGCTCTCTATCTCAGCAATGGATG
  S N A L S T R I N D P T P L Y L K Q W M
CTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTACTCTGAGATTTTGATGTGCTACAATAAC
  L D D L E E E W G T Y S E I L M C Y N N
TTTCCCGGCACTTACAACCTTCCCAAACCGATCATAAACCAAAAATGTAATCGCGACGGCT
  F P G T Y N F P K F I I N Q N V I A T A
AACGAACTGCGAAAATACTTGGTATCCTGCTCAACGTTGAGTTAACTACCAAGTGTGC
  N E L R K I L G I L L N V E V N Y Q V C
AAAATCACTGCGAATGATGTTGAGCTGCCAGATGTTATTGCTTTTCTAGCAAAGTGCAG
  K I T A N D V E L P D V I A F L A K V Q
AATCCTGTGAGCTCGCGGGAGTTGAAGCTTGAAGTACTCCGTCATCTCGTCCGCTGTAGCTG
  N P V E L A G V E A *
CTGGTGGTGTGTTTATATATCTACTTGGGCTTGTATAATAGTAATAAAACAACCGGCA
  G T T T G T A T C G T T G A T G T T A T A T A C T G G T T C T G T G T A C G G A A C T C C T A A G T A T T A A T A
ATAATATTTTCATGTTGTGTTACAAAAA

```

Figura 2.1: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la mayehuelina. La secuencia obtenida de la biblioteca de cDNA de *Agave tequilana* se muestra sin color. En verde se resaltan las secuencias cubiertas por la espectrometría de masas. Fuente: (Martínez, Lledías, Nieto-Sotelo, datos no publicados).

Esta proteína se denominó mayehuelina en honor a la diosa “Mayehuel”, la deidad azteca de los magueyes. Usando anticuerpos generados contra la mayehuelina se corroboró, mediante *western blot*, que esta proteína se expresa en el cogollo del agave en temperaturas que varían desde los 28 hasta los 54 °C, además de que su abundancia desaparece abruptamente cuando las hojas de la roseta se despliegan (Martínez, Lledías, Nieto-Sotelo, datos no publicados).

2.2.- La mayehuelina presenta una sustitución en su sitio catalítico

El alineamiento con otras RIPs demuestra que la mayehuelina presenta una sustitución en uno de los aminoácidos del sitio activo; un aspartato reemplaza a una de las tirosinas altamente conservadas (Figura 2.2) y este cambio es generado por un solo cambio de base (TAC→GAC) al inicio del codón correspondiente (Martínez, Lledías, Nieto-Sotelo, datos no publicados). Solo existe un reporte similar en la literatura, el de la charybdina, una RIP tipo I, de 29 kDa y 257 aminoácidos que se aisló a partir de *Charybdis maritima*. La charybdina presenta una sustitución natural de valina en vez de una de las tirosinas del sitio activo (Figura 2.2). Esta sustitución redujo de manera considerable su toxicidad al ser evaluada en un sistema de traducción *in vitro* de reticulocitos de ratón y comparada contra RIPs como la saporina (Touloupakis *et al.*, 2006). Sin embargo, no se tienen datos sobre la existencia de isoformas de la charybdina que contengan la tirosina en vez de valina o estudios de mutagénesis como en el caso de la ricina, que permitan comparar si la restitución del sitio activo aumenta su citotoxicidad.

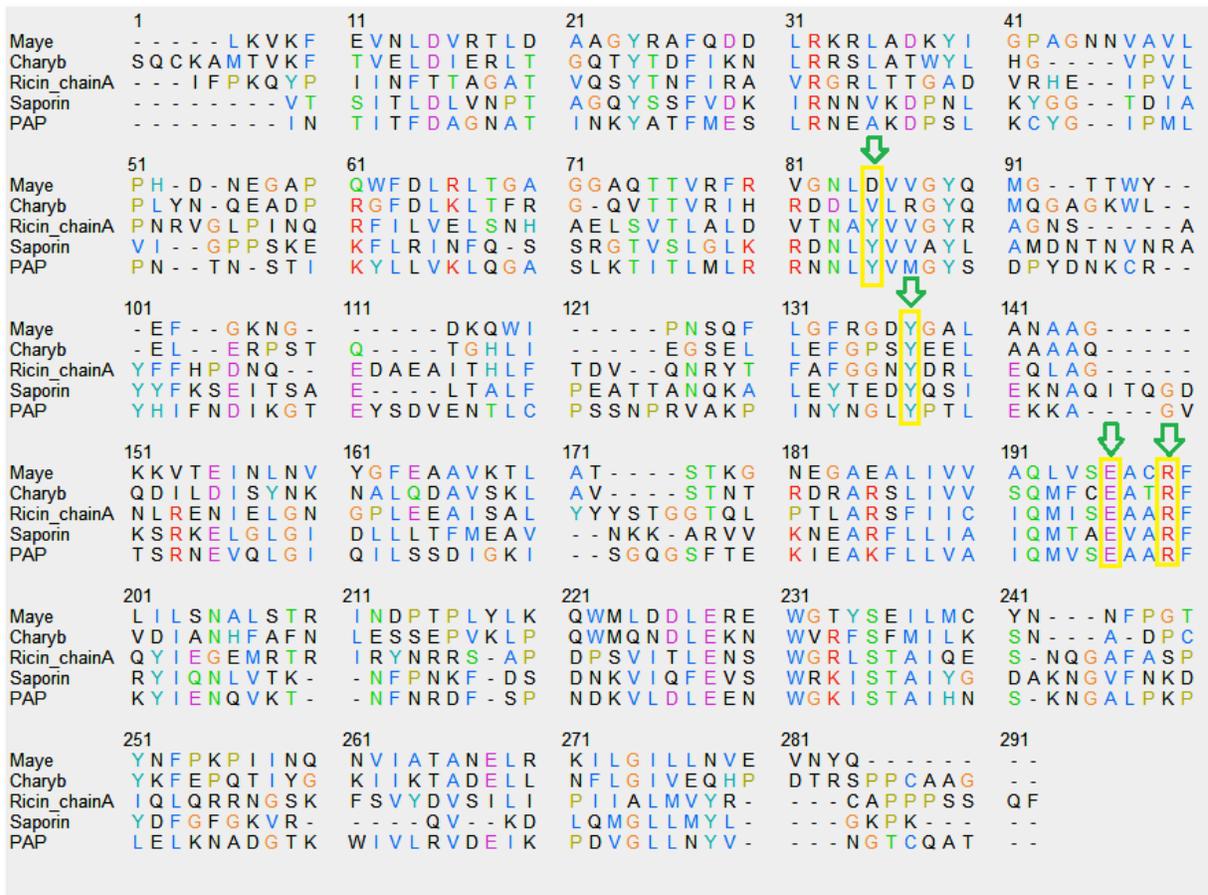


Figura 2.2: Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la mayehuelina con otras RIPs. Se señalan con flechas verdes y recuadros amarillos los aminoácidos que componen el sitio catalítico. Alineamiento hecho con el algoritmo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) usando secuencias FASTA obtenidas del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.3.- La mayehuelina presenta dos isoformas en otras especies del género *Agave*

La caracterización molecular de la mayehuelina y el descubrimiento del cambio de un aminoácido en su sitio activo permitió formular la pregunta sobre si esta sustitución de Tyr por Asp se mantiene en diferentes especies del género *Agave*, y si esta mutación en una especie domesticada como *A. tequilana* pudo haber surgido por selección natural o por la domesticación de los agaves. En un estudio preliminar se secuenciaron los genes de *Mayehuelina* de siete especies de agave y se encontró que *A. isthmensis*, especie silvestre originaria de los estados de Oaxaca y Chiapas y lejana de *A. tequilana*, también presenta aspartato en vez de tirosina en el sitio

activo, lo que de momento parece descartar la idea de un cambio de aminoácidos debido a la domesticación. Más aun, las secuencias de mayehuelina de *A. isthmensis* y de *A. angustifolia*, esta última especie filogenéticamente cercana a *A. tequilana*, revelaron que ambas especies presentan dos variantes alélicas en el sitio activo de la proteína; una que codifica para la forma con tirosina y otra para la variante con aspartato (García-Mendoza, Ávila, Rojas, Nieto-Sotelo, datos no publicados).

2.4.- La posible función biológica de la mayehuelina

Luján y colaboradores (2009) realizaron un estudio para evaluar la tolerancia al calor por parte de *A. tequilana*. Evaluando primero el nivel de transcritos de HSPs de todos los sectores de la roseta de la planta a diferentes temperaturas, no encontraron una clara correlación entre los niveles de transcritos de HSPs que alcanzaron su máximo nivel a 44 °C en todas las zonas de la roseta del agave y la termotolerancia del cogollo a 54 °C. Por otra parte, encontraron que los niveles de proteínas Hsp101, Hsp90 y Hsp70 solo podían detectarse en el cogollo hasta los 54 °C, mientras que en las partes media y externa de la roseta presentaron valores altos en todas las temperaturas probadas. Lo anterior se atribuyó al hecho de que las hojas desplegadas son tejidos maduros con una mayor cantidad de proteínas en condiciones no óptimas que requieren la presencia de estas chaperonas. Observaron, también, que la expresión de las pequeñas proteínas de choque de calor HSP-CI y sHSP-CII era muy alta en el cogollo a todas las temperaturas (temperatura óptima o después de someter a las plantas a choques de calor) y era nula en las hojas desplegadas en respuesta a choques de calor. La presencia de Hsp101 y los elevados niveles de sHSPs en el cogollo a altas temperaturas ayudarían a proteger esta estructura del daño a la exposición al calor y quizás a otras fuentes de estrés, no ocurriendo lo mismo con las hojas externas que mueren después de la exposición al choque de calor. Lo anterior sugiere un mecanismo regulado por el desarrollo de las hojas a medida que se van desplegando (Luján *et al.*, 2009).

En eucariotas se ha observado que durante la exposición a estrés calórico se activa una respuesta donde la síntesis proteica en general es fuertemente inhibida y se favorece la traducción de HSPs (Cuesta *et al.*, 2000). Dinkova y colaboradores obtuvieron evidencia que en estos casos la traducción de mRNA de HSPs es favorecida por un sitio de entrada interna del ribosoma [IRES] durante la traducción ubicado en el extremo 5'-UTR del mRNA que codifica a la proteína Hsp101 de maíz, lo que le permite ser traducido de manera independiente de la estructura *cap* bajo condiciones de estrés calórico (Dinkova *et al.*, 2005). Estudios previos han mostrado que las RIPs pueden actuar sobre otros sustratos, principalmente mRNA (Barbieri *et al.*, 2007); además se ha visto que su expresión aumenta en condiciones de estrés (Stirpe y Batelli, 2006). Lo anterior, sumado al hecho de que algunas RIPs como la PAP pueden inhibir la traducción dependiente de elementos IRES (Vivanco y Tumer, 2003) permite sugerir que estas proteínas pudieran estar involucradas en la regulación pos-transcripcional en condiciones de estrés.

La variación alélica que la mayehuelina presenta en su sitio activo sugiere que su rol en *A. tequilana* es diferente a la defensa contra la herbivoría. En un primer acercamiento para evaluar su función, la secuencia de la mayehuelina madura de *A. tequilana* portando la sustitución original de Asp, fusionada a una cola de histidinas y al epítipo V5, se introdujo en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y su expresión no tuvo efectos citotóxicos (Reyes, 2014). La observación anterior aunada a la gran abundancia de la mayehuelina en el cogollo y a su ausencia en las hojas externas da pie a postular la hipótesis de que esta proteína pueda tener un rol en la regulación postranscripcional de la síntesis de proteínas HSPs.

III.- OBJETIVO

Evaluar el efecto de la mayehuelina, una proteína RIP tipo I en la respuesta al choque de calor en un sistema heterólogo y conocer su efecto sobre la traducción en un sistema *in vitro*.

3.1.- Objetivos particulares

- a) Clonar la secuencia del gen *Mayehuelina* de *A. tequilana* con modificaciones que permitan la expresión de la proteína madura en *S. cerevisiae* e inducir su expresión mediante el promotor *GALI-1*.
- b) Evaluar la termotolerancia en células de *S. cerevisiae* que expresan la mayehuelina de *A. tequilana*.
- c) Purificar la mayehuelina nativa de *A. tequilana*.
- d) Evaluar el efecto de la mayehuelina de *A. tequilana* sobre la traducción de la luciferasa en un sistema de traducción *in vitro*.

3.2.- Hipótesis

La mayehuelina de *A. tequilana* que tiene sustitución natural de aspartato en su sitio activo favorecerá la termotolerancia de *S. cerevisiae* y no inhibirá la traducción *in vitro* de la luciferasa.

IV.- METODOLOGÍA

4.1.- Clonación y expresión del gen *Mayehuelina* de *Agave tequilana* en *Saccharomyces cerevisiae*.

4.1.1.- Vectores de expresión pYES-DEST52::*Mayehuelina*

En un trabajo previo, la secuencia de DNA que codifica para la mayehuelina madura fue introducida en el vector de expresión para levadura pYES-DEST52 de *Invitrogen* en dos versiones: la construcción denominada R1 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*) codifica a la mayehuelina sola, mientras que la construcción R2 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*::V5::6his) codifica a la mayehuelina fusionada al epítipo V5 y a una cola de histidinas (Reyes, 2014). Ambos vectores agregaron un codón de inicio de la traducción y una secuencia consenso para levadura río arriba del mismo para dirigir la expresión de la mayehuelina, siendo clonada la construcción río abajo del promotor inducible *GAL-1* (Figura 4.1).

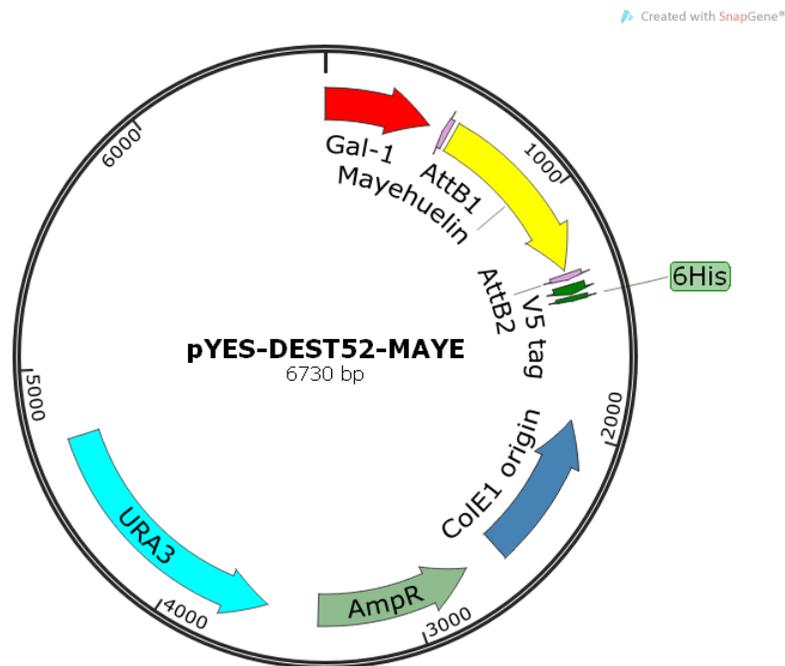


Figura 4.1: Vector de expresión para levadura pYES-DEST52::*Mayehuelina* y pYES-DEST52::*Mayehuelina*::V5::6his. Imagen creada con el software Snap Gene v4.1.7.

Los plásmidos R1 y R2 se secuenciaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM usando los oligonucleótidos *forward* T7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3' y *reverse* 5' CTC CTT CCT TTT CGG TTA GA 3'. El vector R2 ya había sido introducido en levadura en un trabajo previo (Sosa, 2018), por lo que solo se re-secuenció para confirmar el inserto y usar la cepa transformada R2-2 como control. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software *DNA STAR Lasergene v15*.

4.1.2.- Transformación de la cepa W303 de *S. cerevisiae*, con el vector pYES-DEST52::*Mayahuelina*

El vector R1 fue introducido en la cepa W303-1a de *S. cerevisiae* (*leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, ade2-1, his3-11,15*) usando el método de Gietz y Woods (2002). Brevemente; se creció un cultivo *overnight* de una colonia de la cepa W303 en medio YPDA 2X (extracto de levadura al 2 %, peptona al 4 %, glucosa al 4 % y adenina hemisulfatada a 100 mg L⁻¹) a 30 °C, posteriormente se pasó a medio fresco y se creció hasta alcanzar la fase logarítmica. Se tomaron 2.0 mL de este cultivo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 30 s, se recuperó la pastilla y se le añadió la mezcla de transformación (Cuadro 4.1). La reacción se incubó a 42 °C durante 60 min, pasado el tiempo se centrifugó a 13,000 rpm durante 30 s y se retiró el sobrenadante.

Cuadro 4.1: Mezcla de transformación para *S. cerevisiae*

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
PEG 3350	50 %	240
LiAc	1 M	36
ssDNA acarreador (previamente hervido)	2 mg mL ⁻¹	50
Plásmido	1 µg	34
Volumen total		360

La pastilla se re-suspendió en 1.0 mL de dH₂O estéril y se inoculó (100 µL por placa) en cajas de medio SD glucosa Ura⁻ (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0.67 %, glucosa al 2 %, adenina hemisulfatada a 40 mg L⁻¹, histidina a 20 mg L⁻¹, triptófano a 20 mg L⁻¹ y leucina 90 a mg L⁻¹) y se incubaron a 30 °C durante 72 h usando la auxotrofia de uracilo como marcador de selección.

En las placas donde hubo crecimiento se seleccionaron colonias al azar y se trataron con 20 µL de NaOH a 20 mM a 95 °C durante 45 min. Se tomaron 2.0 µL de este lisado para comprobar mediante PCR la presencia del gen *Mayehuelina* usando los oligonucleótidos *forward* F1 5' CACC TAA AAA ATG TCT TTG AAG GTG AAA TTT GAG GT 3' y *reverse* R1 5' TCA TTG GTA GTT AAC TTC AAC GTT 3' (ver Cuadro 4.2 para conocer la mezcla de reacción). Se utilizó un termociclador *Eppendorf [Mastercycler gradient]* con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 98 °C durante 2 min, 25 ciclos de desnaturalización a 98 °C durante 10 s, 30 s de alineamiento a 57.5 °C y 45 s de polimerización a 72 °C seguidos de 7 min de extensión final a 72 °C. Se tomaron 2 µL de cada producto de PCR y se cargaron en un gel de agarosa al 1 % teñido con *GelRed 1X Biotium*. Para verificar la amplificación del producto de tamaño correcto, se usó 1 µL de 1 kb *Plus DNA Ladder* de *Thermo Fisher Scientific* como marcador de peso molecular. El gel se corrió a 90 V durante 1 h en amortiguador TAE (Tris a 40 mM, ácido acético a 20 mM y EDTA a 1 mM). Para visualizar el gel se usó un foto-documentador *Gel Doc EZ* con el programa *Image Lab Software v5.0* ambos de la compañía *Bio-Rad*.

Cuadro 4.2: Mezcla para realizar el PCR de colonia de *S. cerevisiae*

Reactivo	Concentración	Volumen (µL)
H ₂ O libre de nucleasas	--	11.8
<i>Phusion HF Buffer Thermo Scientific™</i>	5X	4.0
dNTP's	10 mM	0.4
Oligonucleótido <i>Forward</i>	10 µM	0.8
Oligonucleótido <i>Reverse</i>	10 µM	0.8
<i>Phusion High-Fidelity DNA Polymerase Thermo Scientific™</i>	2 U µL ⁻¹	0.2
DNA (producto de lisis alcalina)	--	2.0

4.1.3.- Inducción de la expresión del gen *Mayehuelina* en *S. cerevisiae*.

Las cepas conteniendo los vectores R1-1, R2-2 y pYES se crecieron durante toda la noche en medio SD glucosa Ura⁻, a partir de estos cultivos iniciales se inocularon 120 mL de cultivos frescos a una O.D.₆₀₀ inicial de 0.05 y se incubaron a 25 °C a 130 rpm hasta alcanzar una O.D.₆₀₀ de 0.4 e inmediatamente después se centrifugaron a 1,500 g a 4 °C durante 4 minutos, se recuperaron las pastillas lavándose (dos veces) con 1.0 mL de dH₂O estéril y se centrifugaron en las mismas condiciones. Las pastillas ya lavadas se re-suspendieron en 1.0 mL de medio SD galactosa Ura⁻ (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos al 0.67 %, galactosa al 2 %, adenina hemisulfatada a 40 mg L⁻¹, histidina a 20 mg L⁻¹, triptófano a 20 mg L⁻¹ y leucina a 90 mg L⁻¹), se inocularon en 119 mL del mismo medio fresco y se incubaron a 25 °C a 130 rpm durante 24 h. Para el muestreo se tomaron alícuotas de 15.0 mL a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 h de iniciado el cultivo y se centrifugaron a 1,500 g a 4 °C durante 4 min, las pastillas se lavaron con 1.0 mL de dH₂O estéril y se transfirieron a viales de 1.5 mL. Se centrifugaron en las mismas condiciones, finalmente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C.

4.1.4.- Detección de la mayehuelina recombinante producida en *S. cerevisiae*.

Para analizar la expresión de la mayehuelina en las levaduras transformadas e inducidas, se extrajeron las proteínas totales mediante el método rápido de Horvath (1994). Cada pastilla fue re-suspendida en 100 µL de amortiguador Laemmli (Tris-HCl a 60 mM pH 6.8, SDS al 10 % v/v glicerol al 2 % v/v y 2-β-mercaptoethanol al 5 % v/v) y se calentaron en un *termo block* a 95 °C 1,400 rpm durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron a máxima velocidad durante 5 min y se recuperaron los sobrenadantes. Para cuantificar a las proteínas se mezclaron 400 µL de dH₂O, 200 µL de reactivo de Bradford de *Sigma-Aldrich* (cat B6916) y 1 µL de extracto de proteínas, se homogenizaron y se leyeron en espectrofotómetro a 595 nm usando como referencia una curva de calibración de *BSA*.

Para verificar la integridad de las muestras proteicas, se tomaron 20 µg de proteína de cada muestra y se les adicionó 0.0025 % w/v de azul de bromofenol como frente

de corrida y se cargaron en un gel SDS-PAGE al 12 % usando 2.5 μ L de *Pink Prestained Protein Marker* de *Nippon Genetics* como marcador de peso molecular. El gel se ensambló en una cámara de electroforesis vertical *Bio-Rad* y se corrió a 200 V durante 45 min con amortiguador Tris-glicina (Tris a 25 mM, glicina a 192 mM y SDS al 0.1 %) usando una fuente de poder *Bio-Rad PowerPack Basic*. Para la visualización de las bandas se usó el método de tinción y des-tinción rápida con azul de Coomassie-etanol: se colocó el gel en la solución teñidora (azul de Coomassie R-250 de *Bio-Rad* al 0.1 % m/v, ácido acético al 40 % v/v y etanol al 40 % v/v) se calentó en un horno de microondas a máxima potencia durante 40 s y se colocó en un agitador orbital durante 20 min. Para desteñir se cambió la solución teñidora por agua destilada y se calentó en microondas durante 4 min y se mantuvo en agitación repitiendo el proceso dos veces.

Para la inmunodetección de la mayehuelina se cargaron 20 μ g de proteínas de cada muestra y 1 μ g de proteínas totales de *A. tequilana* como control positivo en un gel SDS-PAGE al 12 % que se corrió en las condiciones descritas. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ m de la marca *Millipore* usando una cámara *Mini Trans-Blot* de *Bio-Rad* a 360 mA durante 60 min con el amortiguador Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e iso-propanol al 20 % v/v. Al término de la corrida, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau al 0.1 % para verificar la transferencia, después se lavó en amortiguador TBST (Tris a 20 mM, NaCl a 5 mM y *Tween 20* al 0.5 % v/v) hasta retirar el colorante y se colocó en solución de bloqueo (leche “*Svelty*” al 5 % en amortiguador TBST) durante 90 min en agitación media. Se usó el anticuerpo primario anti-mayehuelina en solución de bloqueo a una dilución 1:2500 y se incubó durante 90 min con agitación media a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se realizaron 3 lavados intensos de un min y 3 lavados suaves de 5 min con amortiguador TBST; la membrana se cambió al anticuerpo secundario anti-conejo IgG Sc-2004 de *Santa Cruz Biotechnology* en solución de bloqueo a una dilución 1:5000 durante otros 90 min, tras lo cual se repitieron los lavados. Para el revelado se agregó a la membrana el sustrato químico luminiscente *SuperSignal West Femto* de la marca *Thermo Scientific* en diluciones 1:7 a 1:10 durante dos min y se expuso a la película *MXB* de la marca Kodak (cat 822 5526) durante un lapso de 2 a

10 min. Para cuantificar la expresión de la mayehuelina, la película se digitalizó con un escáner *Cannon LIDE 100* y se realizó una densitometría relativa con la función *Analyze Gels* del software *ImageJ v1.50i*.

4.2. Evaluación del efecto de la mayehuelina recombinante sobre la termotolerancia en células transformantes R1-1, R2-2 y pYES

Las cepas R1-1, R2-2 y pYES se crecieron en 75 mL de medio SD galactosa Ura^r durante 24 h, como se describió en la sección 4.1.3, para inducir la expresión de la mayehuelina recombinante. Inmediatamente después de la inducción, los cultivos se dividieron en tres matraces de 25 mL cada uno para realizar los siguientes tratamientos: termotolerancia basal, que consistió en someter los cultivos a un choque de calor de 50 °C durante 30 min con agitación a 130 rpm, termotolerancia inducida, que consistió en un pre tratamiento a 37 °C durante 30 min a 130 rpm y en seguida un choque de calor a 50 °C durante 60 min a 130 rpm y el tratamiento control, que consistió en incubar los cultivos a 25 °C durante 30 min a 130 rpm. Todos los ensayos se llevaron a cabo en baños con agitación de la marca *New Brunswick Scientific* [modelo G76D]. Se hicieron diluciones 10^{-1} a 10^{-6} de todos los tratamientos, se plaquearon 50 μ L de cada dilución en cajas petri con medio SD galactosa Ura^r y se incubaron a 30 °C. Tras 72 h de incubación se contaron las colonias tomando como significativas solo aquellas cajas que contuvieran entre 30 y 300 colonias. Para el cálculo de unidades de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹) las colonias contadas se dividieron entre los mililitros inoculados por placa y se multiplicaron por la dilución utilizada. El análisis estadístico para evaluar diferencias entre los tratamientos se hizo con la prueba ANOVA mediante el software *GraphPad Prism v6*.

4.3.- Purificación de la mayahuelina nativa de *A. tequilana*.

4.3.1.- Obtención del extracto crudo, ultra centrifugado y concentrado

Se tomaron 50 g de tejido fresco del cogollo de una planta de *A. tequilana* proveniente del vivero Pueblo Viejo (ubicado en Cuautla, Edo de Morelos) y se cortaron en pequeños trozos, inmediatamente se agregaron 100 mL de amortiguador de extracción frío (Tris a 200 mM y pH 7.2, NaCl a 20 mM, EDTA a 2 mM y pH 8.0, β -mercaptoetanol al 0.5 % v/v e inhibidor de proteasas *Complete Protease Inhibitor Cocktail* de Roche 1X) y los tejidos se molieron en una licuadora hasta obtener una mezcla homogénea, la cual se filtró usando una gasa. El extracto obtenido se sometió a dos ciclos de ultra centrifugación: primero a 30,000 g durante 15 min y 4 °C en una centrífuga *Beckman J2-HS* con el rotor JA 30-50, recuperándose el sobrenadante el cual se filtró con gasa y se sometió al segundo ciclo de centrifugación a 130,000 g a 4 °C durante 60 min en la centrífuga *Beckman Coulter Optima L-100XP* con el rotor 55.2 Ti. El sobrenadante se concentró en un cuarto frío hasta llevarlo a $\sim 10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de proteína usando la celda de ultrafiltración *Amicon* [modelo 8050] y una membrana de 10 kDa de la marca *Millipore*. La muestra resultante se almacenó en un tubo *Falcon* estéril a 4 °C.

4.3.2.- Cromatografía FPLC y análisis de las fracciones

Se tomó 1.0 mL del ultra centrifugado concentrado y se separó por exclusión molecular usando la columna *SUPEROSE 6 10-300 GL* acoplada al aparato FPLC *Biologic Duo Flow* de la marca *Bio-Rad* usando amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.0 a un flujo de 0.25 mL min^{-1} y se colectaron fracciones de 1.0 mL. Para el análisis electroforético se colocaron 200 μL de cada fracción en tubos de 1.5 mL y se precipitaron las proteínas por el método de metanol cloroformo, que a continuación se describe brevemente: se agregó a cada tubo 400 μL de H_2O , 342 μL de metanol y 114 μL de cloroformo, se mezcló con vortex y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de la marca *Eppendorf* [modelo 5424R], se recuperaron las fases acuosas en tubos limpios, a cada tubo se le agregó 214 μL de metanol, se homogenizó y se centrifugó a las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante y

se dejaron secar los tubos a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez terminado el secado, se les agregó a cada tubo 20 μ L de amortiguador Laemmli, se calentaron en un *thermo block* a 95 °C a 1,400 rpm durante 5 min y finalmente se cargaron 10 μ L de la mezcla en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 % que se corrió como se describió en la sección 4.1.4. La identificación de la fracción que contenía a la mayehuelina se realizó mediante *western blot* (ver sección 4.1.4 para descripción de la técnica).

Una vez identificadas las fracciones enriquecidas en mayehuelina, se fraccionaron por intercambio iónico en una columna de hidroxapatita de la marca *Sigma Aldrich* acoplada a un FPLC usando un flujo de 2.0 mL min⁻¹, la elución se realizó con un gradiente lineal de 10 a 500 mM de amortiguador de fosfatos pH 7.0 y se colectaron fracciones de 2.0 mL. Un volumen de 400 μ L de cada fracción se precipitó con metanol-cloroformo y se analizó mediante SDS-PAGE e inmunodetección. Las fracciones en donde se localizó la mayehuelina se cambiaron a amortiguador Tris a 20 mM pH 7.0 mediante ultrafiltración con una celda *Amicon* y una membrana de 10 kDa; finalmente se inyectó a una columna *UNO Q1* de la marca *Bio-Rad* acoplada al equipo FPLC para fraccionarla por intercambio aniónico, la elución se realizó con un gradiente lineal de amortiguador Tris 20 mM/NaCl 50 a 1000 mM a un flujo de 2.0 mL min⁻¹; se colectaron fracciones de 1.0 mL mismas que se analizaron como ya se describió. La fracción donde se localizó la mayehuelina se dividió en alícuotas de 50 μ L con glicerol al 15 %, se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4.3.3.- Secuenciación del gen *Mayehuelina* de *A. tequilana*

El gen Mayehuelina se amplificó mediante PCR usando como templado 200 ng de DNA del mismo ejemplar vivo de *A. tequilana* que se empleó la purificación de la mayehuelina (Ver anexo S1 para protocolo de extracción). Se usaron los oligonucleótidos forward 5' AGG ACG ATC TCC GCA AAA GG 3' y reverse R2 5'TTG GTA GTT AAC TTC AAC GTT 3' y el programa descrito en la sección 4.1.2. El producto de PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa como se

describió anteriormente, se purificó con el kit *Gel DNA Recovery* de *Zymo Research* de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se secuenció en el Laboratorio de Biología Molecular de la Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología de la UNAM. Las secuencias se analizaron con el programa *Unipro UGENE v 1.30*.

4.4.- Evaluación del efecto de la mayehuelina de *A. tequilana* sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa

En tubos de 0.2 mL se agregó el extracto de germen de trigo de la marca *Promega* [cat L4380], mezcla de aminoácidos, KAc e inhibidor de RNAsas *RNasin* [cat N2111] de la marca *Promega* de acuerdo con el Cuadro 4.3. Se evaluaron cinco concentraciones de mayehuelina: 0, 15.4, 30.8, 61.6 y 123.2 nM, y 13.3 nM de saporina [cat. S9896) de la marca *Sigma Aldrich*, como control positivo. Se agregó la proteína a los tubos de reacción (amortiguador Tris 20 mM y glicerol al 15 % para la muestra sin mayehuelina) y se incubaron a 25 °C durante 30 min en un termociclador de la marca *Applied Biosystems* [modelo *Veriti 96-well*]; posteriormente se adicionaron 50 ng de RNA codificante de la luciferasa a cada tubo y se incubaron a 25 °C durante otros 90 min.

Cuadro 4.3: Reacciones para los ensayos de traducción *in vitro* de la luciferasa en el extracto de germen de trigo (WGE)

	(-)	Saporina (+)	Mayehuelina				
			0	1	2	3	4
WGE Promega	6.0 µL	6.0 µL	6.0 µL	6.0 µL	6.0 µL	6.0 µL	6.0 µL
aa Met- Promega	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
aa Leu- Promega	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL	0.5 µL
KAc	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL	0.4 µL
RNasin Promega	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL	0.1 µL
Proteína	N/A	13.3 nM	0.0 nM	15.4 nM	30.8 nM	61.6 nM	123.2 nM
mRNA luc	N/A	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng	50 ng
H ₂ O	a 12 µL	a 12 µL	a 12 µL	a 12 µL	a 12 µL	a 12 µL	a 12 µL

Se adicionó a cada tubo 10 μ L de *Passive lysis buffer* 1X de la marca *Promega* [cat. E1941], se tomaron 10 μ L de la mezcla, se vaciaron en una placa de 96 pozos e inmediatamente se les adicionó 50 μ L de reactivo de luciferasa de *Promega* [cat. E1483] la placa se leyó en un luminómetro *Varioskan LUX 3020-176* de *Thermo Scientific*. Se hizo una reacción sin proteína y sin RNAm como control negativo. Las cuentas de luciferasa obtenidas se convirtieron a expresión relativa y se realizó un ANOVA de una vía con el software *GraphPad Prism v6*. Los datos anteriores se normalizaron como porcentaje de inhibición de 0 a 100, estos datos se ajustaron de manera no lineal a una curva dosis-respuesta para poder calcular la concentración inhibitoria media (IC_{50}) con la función *log(inhibitor) vs normalized response Variable slope* de *GraphPad Prism v6*.

V.- RESULTADOS

5.1.- Expresión de la mayehuelina de *A. tequilana* en *S. cerevisiae*.

5.1.1.- Transformación de la cepa W303 de *S. cerevisiae* con pYES-DEST52::*Mayehuelina*

Tras la secuenciación se identificó que los vectores R1-1 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*) y R2-2 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*::V5::6his) contenían las secuencias correctas con la orientación y marco de lectura adecuados (Figura suplementaria S2). El plásmido R1-1 se introdujo en la levadura, usando el método de acetato de litio. Las células sometidas al protocolo de transformación se crecieron en placas de medio SD glucosa Ura⁻ durante 72 h (Figura 5.1) y se obtuvo una eficiencia de 2×10^5 unidades formadoras de colonia por microgramo de plásmido usado.

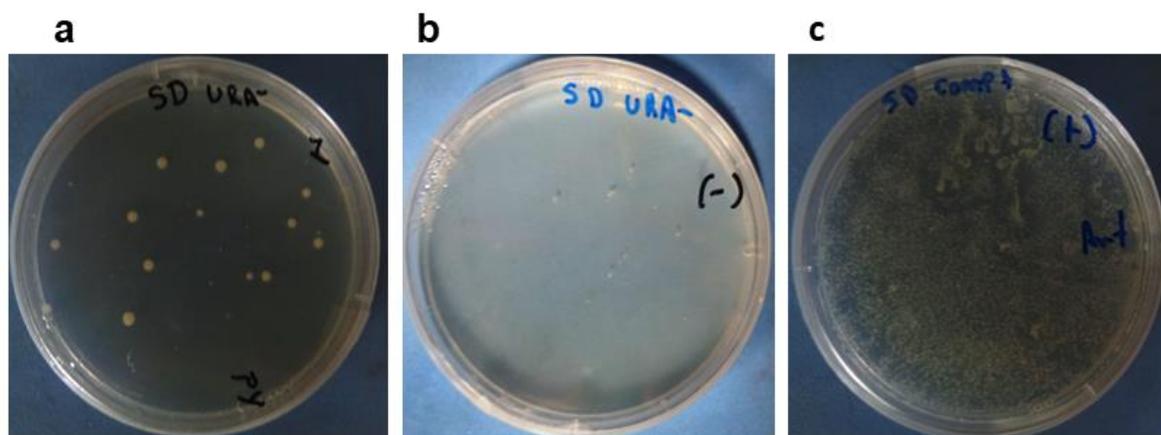


Figura 5.1: Cepa W303 de *S. cerevisiae* transformada con el vector pYES-DEST52::*Mayehuelina*. a) Células con el vector R1-1 en medio SD-glucosa Ura⁻; b) células sometidas al mismo tratamiento de transformación, pero sin el vector en medio SD-glucosa Ura⁻; c) células con R1-1 en medio SD-glucosa Ura⁺.

De las transformantes, se seleccionaron colonias al azar para verificar la presencia del inserto del gen *Mayehuelina* mediante PCR usando oligonucleótidos que delimitan la secuencia que codifica a la proteína madura. Las cuatro colonias

analizadas dieron positivo, amplificando una banda de ~ 750 pares de bases acorde al tamaño de la secuencia de mayehuelina, ver Figura 5.2.

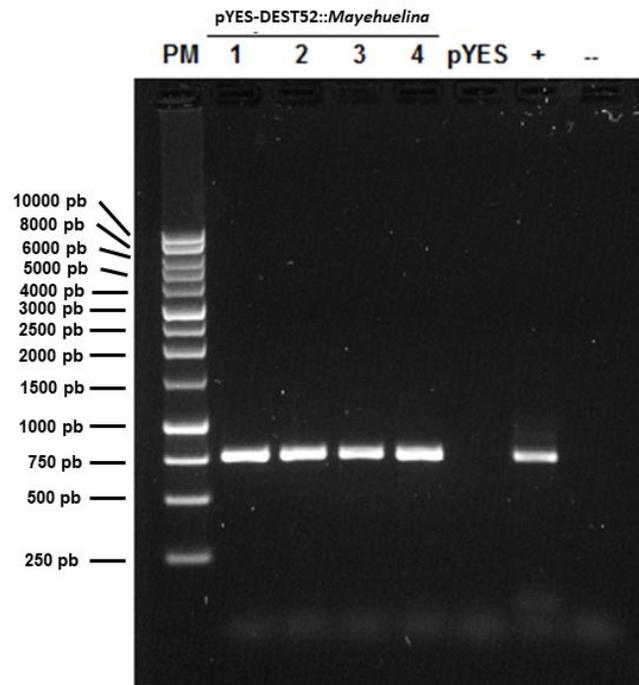


Figura 5.2: PCR de colonia de la cepa W303 de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido R1-1. PM es el marcador molecular, pYES es *S. cerevisiae* transformada con el vector vacío, (+) es el DNA de *A. tequilana* y - es la cepa W303 sin transformar. Los productos del PCR fueron separados mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con *GelRed* de *Biotium*.

5.1.2.- Inducción y detección de la mayehuelina en *S. cerevisiae*.

Una clona positiva, resultado de la transformación con cada uno de los vectores R1-1, R2-2 y pYES-DEST [plásmido sin inserto] se sembró en medio inductor SD-galactosa Ura⁻ y se incubó durante 24 h. En las primeras horas del cultivo se observó un patrón de crecimiento similar en las tres cepas, iniciando los tres cultivos su fase exponencial alrededor de las 12 h misma que se mantuvo a las 16 y 20 h. A las 24 h de iniciada la inducción, la cepa pYES sostuvo su crecimiento exponencial, mientras que R1-1 y R2-2 mostraron un ligero decaimiento en el crecimiento que podría indicar la tendencia de estos cultivos a entrar hacia la fase estacionaria (Figura 5.3).

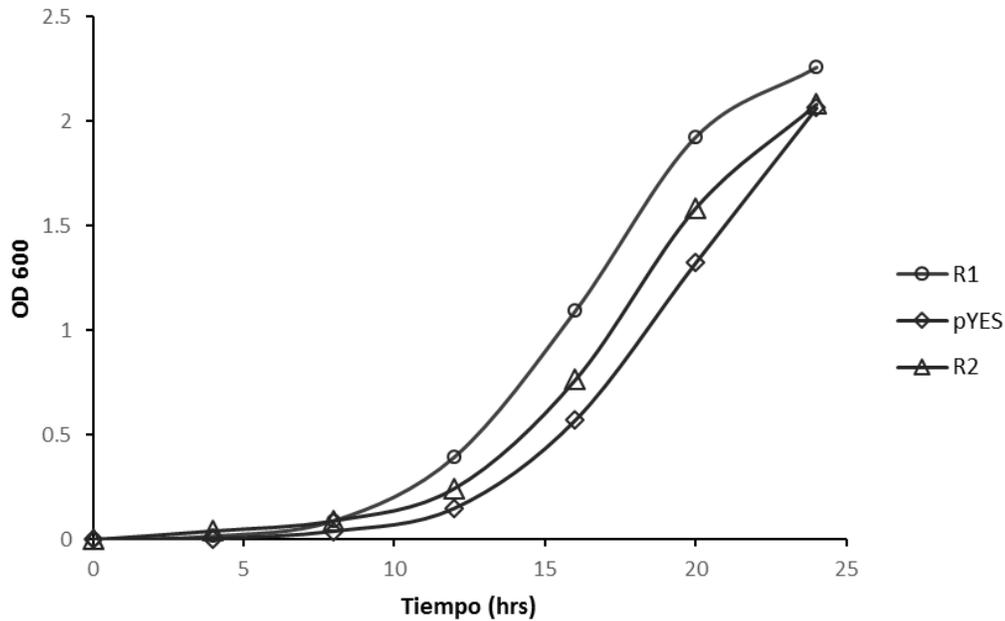


Figura 5.3: Cinética de crecimiento de la cepa W303 de *S. cerevisiae* transformada con los vectores R1-1, R2-2 y pYES en medio inductor SD-galactosa Ura⁻. La inducción se realizó durante 24 h a 25 °C a 130 rpm. Las etiquetas indican la curva correspondiente a cada cepa.

Para detectar la expresión de la mayehuelina recombinante, se extrajeron las proteínas totales a muestras provenientes de diferentes tiempos del tratamiento de inducción. Las fracciones proteicas extraídas se analizaron por *SDS-PAGE*. Después de la corrida electroforética, todas las fracciones proteicas mostraron un buen patrón de bandeo característico de extractos con buena integridad proteica (Figura 5.4). Dichas fracciones se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (ver Figura S3) y se sometieron a inmuno-detección con anticuerpos anti-mayehuelina.

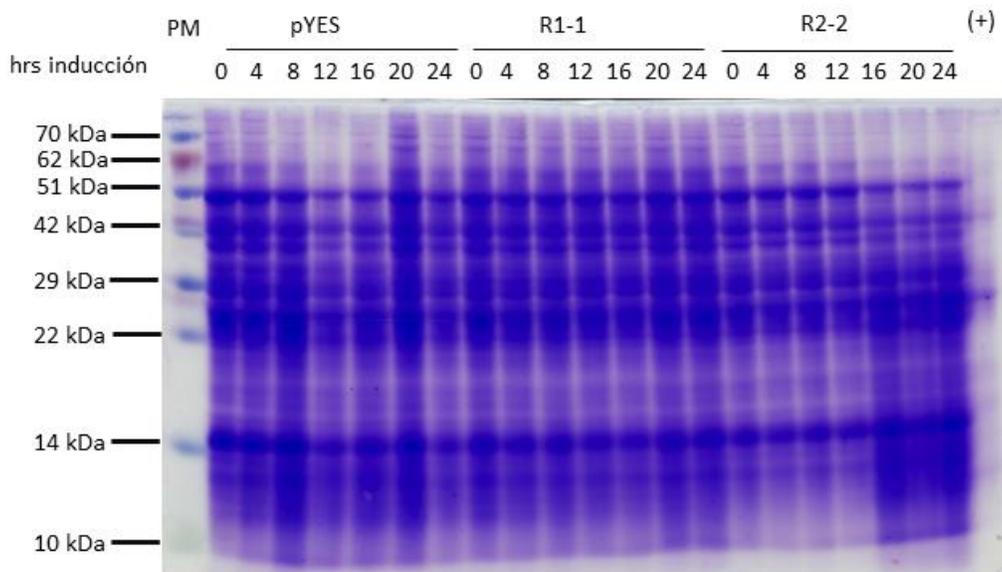


Figura 5.4: Perfil proteico de las muestras provenientes de la inducción con galactosa en las cepas transformadas con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES. + son proteínas totales de *A. tequilana*. Los extractos fueron separados mediante electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de coomassie.

En la cepa R1-1 se detectó una banda definida de alrededor de 27 kDa a partir de las 16 h de iniciada la inducción (Figura 5.5). Esta banda mostró el tamaño esperado para la mayehuelina madura; a las 20 y 24 h la banda aumentó su intensidad en 2.7 y 3.2 veces respectivamente (Figura 5.6). En R2-2 se detectó una banda por arriba de los 32 kDa, que es lo esperado para la fusión *Mayehuelina::V5::6his*; a las 20 y 24 h de inducción. La expresión de estas bandas de R2-2 fue de 1.3 y 1.9 veces mayor relativo a la banda de 16 h de R1-1 (Figuras 5.5 y 5.6). En ambas cepas la expresión de la mayehuelina se detectó en su nivel más alto a las 24 h de inducción, lo cual sirvió para determinar el tiempo óptimo de inducción de los ensayos de termotolerancia posteriores.

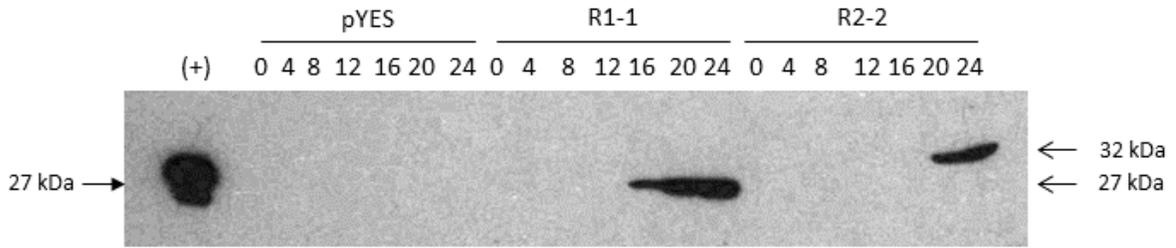


Figura 5.5: Inmunodetección de la mayhuelina recombinante en muestras de proteínas totales provenientes de la inducción con galactosa en cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES. Arriba se indica el tratamiento donde + es el control positivo. A la derecha se indica el peso de las proteínas.

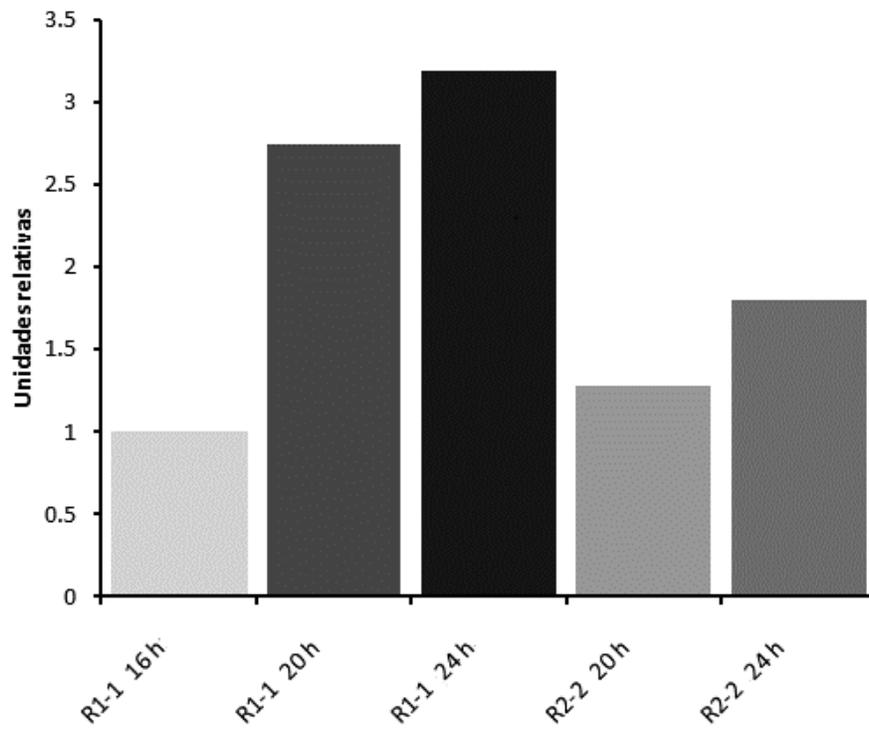


Figura 5.6: Expresión relativa de la mayhuelina en *S. cerevisiae* transformada con los plásmidos R1-1, R2-2. En el eje x se indican los tratamientos y en el eje y las unidades relativas.

5.2.- Evaluación del efecto de la mayehuelina sobre la termotolerancia en levaduras transformantes R1-1, R2-2 y pYES.

Después de haber sido inducidas en medio SD-galactosa Ura⁻ durante 24 h, las cepas R1-1, R2-2 y pYES fueron sometidas a choques de calor para evaluar sus niveles de termotolerancia basal e inducida. Posterior a cada tratamiento, se hicieron diluciones seriadas y se plaquearon en cajas de medio selectivo SD-glucosa Ura⁻. Tras incubarse a 37 °C durante 72 h, sólo las diluciones 10⁻² a 10⁻⁵ presentaron crecimiento de colonias con números significativos; en la Figura 5.7 se muestra una imagen representativa de una réplica del experimento.

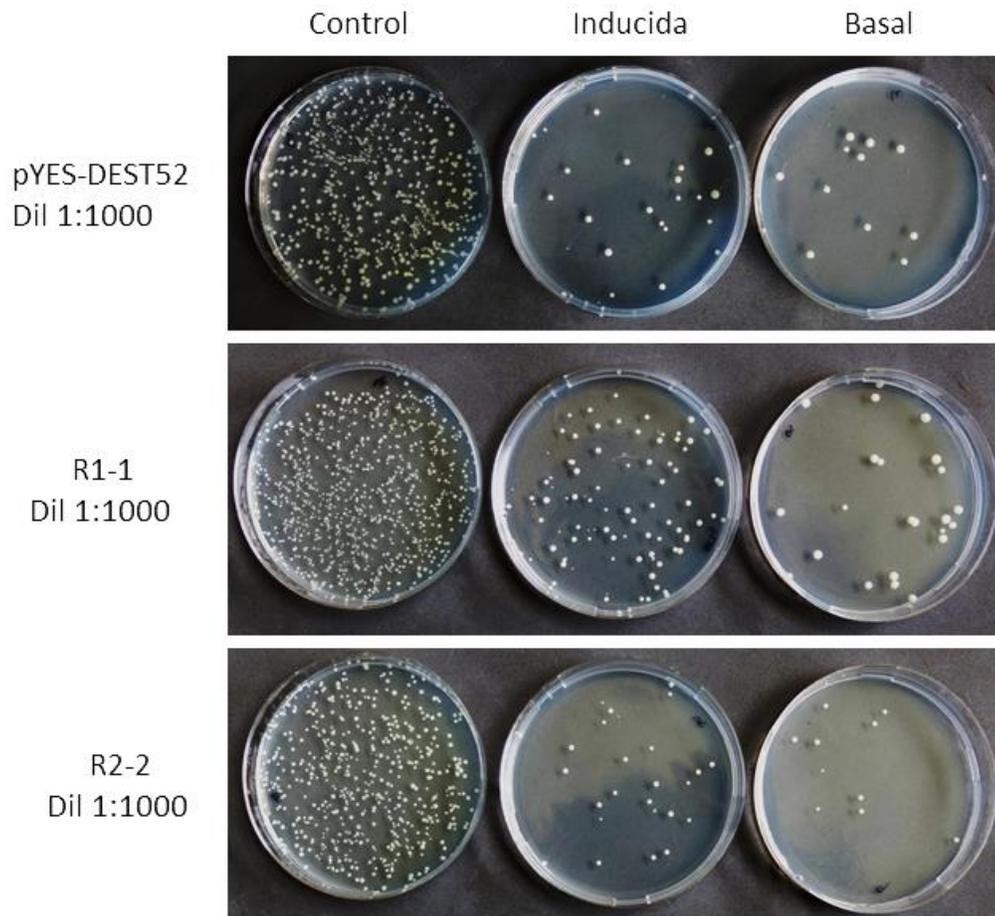


Figura 5.7: Crecimiento de cultivos de *S. cerevisiae* transformados con los plásmidos R1-1, R2-2 y pYES sometidos a tratamientos de termotolerancia basal e inducida. Colonias crecidas en medio SD-glucosa Ura⁻ a 30 °C durante 72 h. Arriba se indica el tratamiento al que fueron sometidas. A la izquierda se indica la cepa y la dilución utilizada.

En el tratamiento control se obtuvieron crecimientos con magnitudes de 10^8 UFC mL⁻¹ para las tres cepas, el tratamiento de termotolerancia basal disminuyó el crecimiento en dos órdenes de magnitud y se obtuvieron cuentas de 10^6 UFC mL⁻¹ en los tres tratamientos. En cambio, la termotolerancia inducida produjo un decremento menos marcado con magnitudes de entre 10^6 para el caso de pYES y R2-2, mientras que para R1-1 fue de 10^7 UFC mL⁻¹. El Cuadro 5.1 muestra los resultados obtenidos de tres experimentos independientes.

Cuadro 5.1: Unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹) resultantes de los ensayos de termotolerancia en cepas de *S. cerevisiae* R1-1 (mayehuelina), R2-2 (mayehuelina fusionada) y pYES (silvestre).

Tratamiento	Cepa	UFC / mL			Promedio de 3 ensayos	Desviación estándar	Crecimiento respecto al control pYES
		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3			
Control 25 °C 30 min	pYES	2.22E+08	2.74E+08	2.34E+08	2.43E+08	2.72E+07	1.00
	R1-1	1.86E+08	1.66E+08	2.76E+08	2.09E+08	5.86E+07	0.86
	R2-2	1.48E+08	1.02E+08	1.22E+08	1.24E+08	2.31E+07	0.51
Termotolerancia basal 50 °C 30 min	pYES	3.08E+06	2.56E+06	1.54E+06	2.39E+06	7.83E+05	1.00
	R1-1	3.54E+06	3.72E+06	3.70E+06	3.65E+06	9.87E+04	1.53
	R2-2	5.44E+06	1.86E+06	2.18E+06	3.16E+06	1.98E+06	1.32
Termotolerancia inducida 37 °C 30 min -> 50°C 60 min	pYES	4.80E+06	6.48E+06	7.40E+06	7.29E+06	7.66E+05	1.00
	R1-1	5.48E+07	1.70E+07	1.80E+07	2.66E+07	1.58E+07	3.65
	R2-2	8.00E+06	2.56E+06	4.44E+06	5.00E+06	2.76E+06	0.69

Se realizó un ANOVA de una vía con la post-prueba de Tukey para encontrar diferencias entre los tratamientos. En el tratamiento control (Figura 5.8) los cultivos R1-1 y R2-2 tuvieron un decremento en el crecimiento relativo a pYES de 0.14 y 0.49 veces respectivamente, aunque únicamente la diferencia de R2-2 fue estadísticamente significativa ($P < 0.05$) a pYES. En termotolerancia basal (Figura 5.9) R1-1 y R2-2 aumentaron ligeramente el número de unidades formadoras de colonia en 0.53 y 0.32 veces respectivamente, relativo al control pYES pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P > 0.05$). Para el tratamiento de termotolerancia inducida (Figura 5.10), el cultivo R2-2 registró un decremento de 0.31 veces relativo a pYES que no fue significativo ($P > 0.05$). En el caso del cultivo

R1-1, su crecimiento fue de 2.65 veces relativo a pYES; sin embargo, al igual que el caso anterior, el análisis estadístico indicó que no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$).

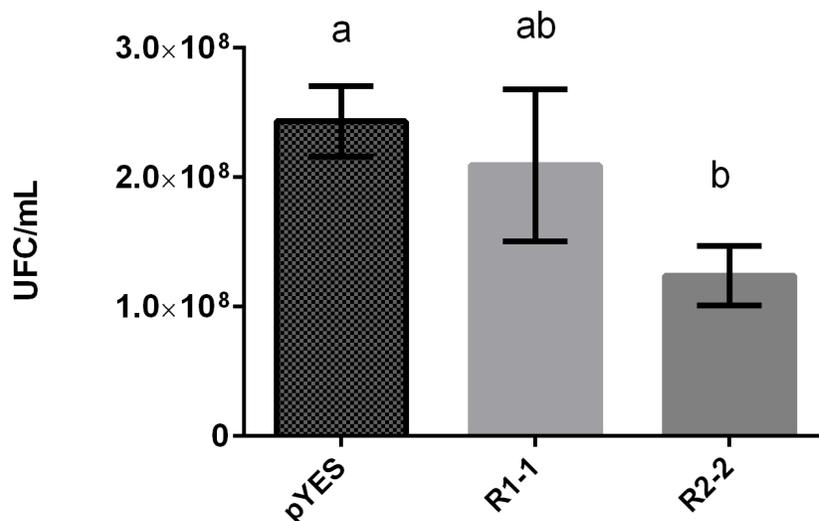


Figura 5.8: Unidades formadoras de colonia en el tratamiento control de las transformantes R1-1, R2-2 y pYES. Las células se crecieron durante 24 h en medio con galactosa a 25 °C a 130 rpm para inducir la expresión de la mayahuelina. Pasado el tiempo de inducción se mantuvieron a 25 °C durante otros 30 min a 130 rpm.

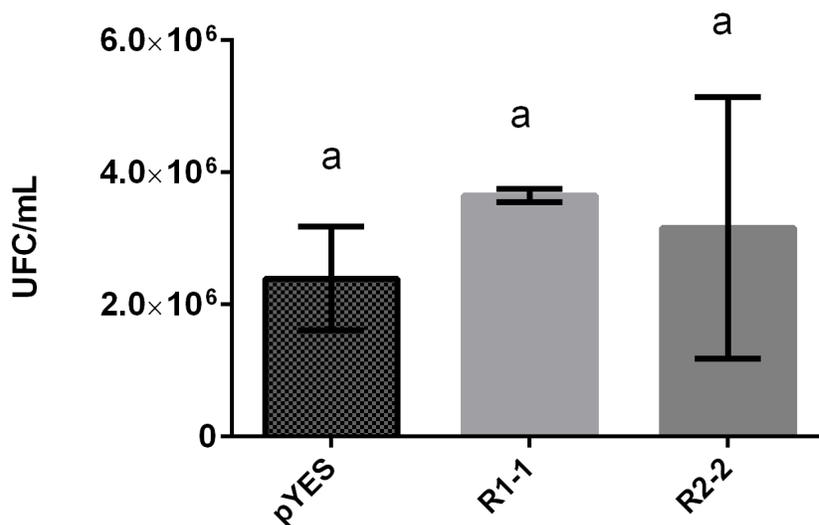


Figura 5.9: Crecimiento de unidades formadoras de colonia en cepas transformantes R1-1, R2-2 y pYES de *S. cerevisiae* sometidas al tratamiento de termotolerancia basal. Las células se crecieron en medio inductor con galactosa durante 24 h a 25 °C a 130 rpm e inmediatamente se les dio un choque de calor de 50 °C durante 30 min a 130 rpm.

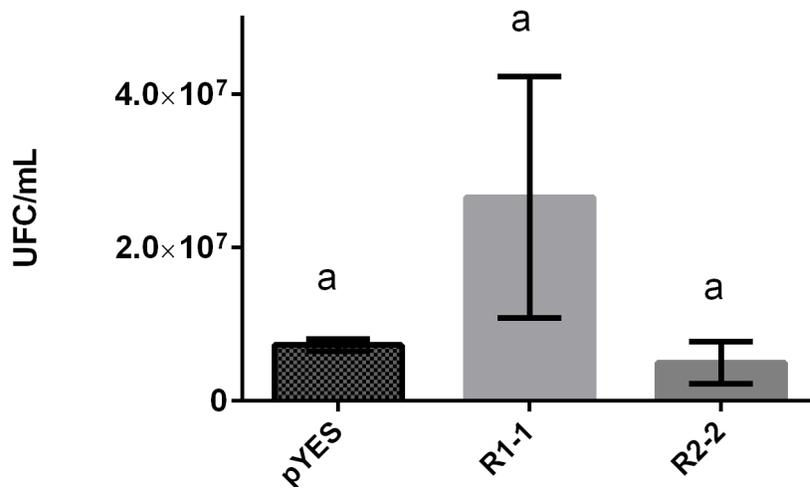


Figura 5.10: Crecimiento de unidades formadoras de colonia en transformantes R1-1, R2-2 y pYES de *S. cerevisiae* sometidas al tratamiento de termotolerancia inducida. Las células se cultivaron en medio inductor con galactosa durante 24 h a 25 °C y 130 rpm. Pasado el tiempo de inducción se les dio un pretratamiento de 37 °C durante 30 min a 130 rpm e inmediatamente se les pasó a 50 °C durante 30 min a 130 rpm.

5.3.- Purificación de la mayehuelina nativa de *A. tequilana*.

La mayehuelina fue purificada a partir de 50 g de tejido fresco de cogollo de *A. tequilana* usando un protocolo que combinó la ultra-centrifugación y las cromatografías de exclusión molecular e intercambio iónico. El extracto crudo inicial proveniente de la molienda del tejido junto al amortiguador de extracción frío se ultra centrifugó y posteriormente se concentró mediante ultra-filtración. El extracto resultante se sometió a cromatografía de exclusión molecular; en esta primera separación cromatográfica, la mayehuelina se recuperó en la fracción 19 (Figura S5a); el análisis por SDS-PAGE e inmuno detección de dicha fracción mostró que en este primer paso se logró eliminar a la mayoría de las proteínas de alto peso molecular. A su vez, el anticuerpo anti-mayehuelina reconoció pequeñas bandas por debajo de los 27 kDa que posiblemente correspondan a formas degradadas de la mayehuelina (Figuras 5.11a y 5.11b carril Em).

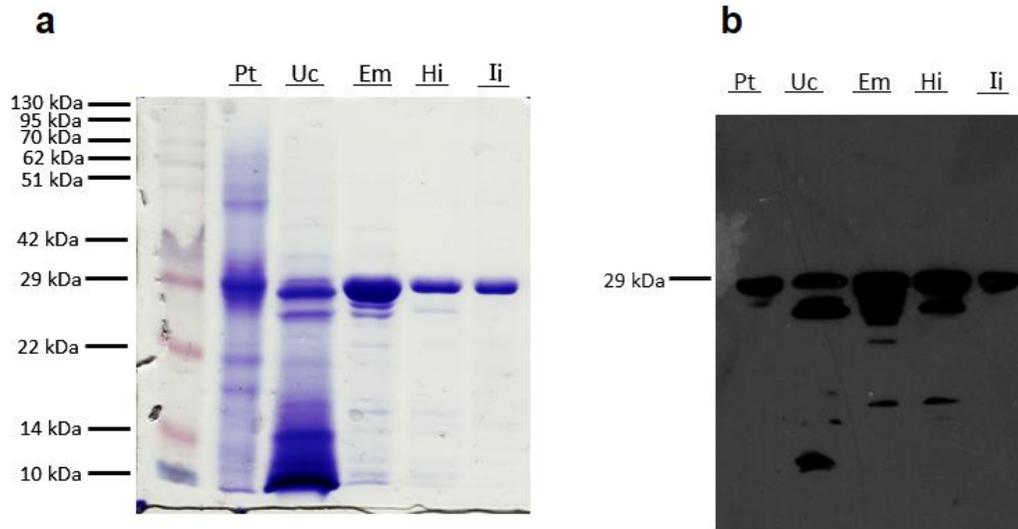


Figura 5.11: Purificación de la mayahuella nativa de *A. tequilana*. a) Perfil proteico de las fases de purificación de la mayahuella. b) Inmunodetección de la mayahuella durante las diferentes fases de purificación. Abreviaturas: Pt proteínas totales; Uc, ultra centrifugado; Em, exclusión molecular; Hi; hidroxiapatita; Ii, intercambio aniónico.

La fracción 19 proveniente de la exclusión molecular se inyectó a una columna de hidroxiapatita. En esta segunda cromatografía, la mayahuella se detectó en las fracciones 19, 20 y 21 (Figura S5b) mismas que eluyeron de la columna en un intervalo de 140 a 150 mM de amortiguador de fosfatos y presentaron un mayor grado de pureza. Sin embargo, en la inmuno-detección aún se lograron detectar formas degradadas de la mayahuella (Figuras 5.11a y b carril Hi). Las fracciones 19, 20 y 21 se cambiaron a amortiguador Tris 20 mM mediante ultrafiltración quedando a un volumen final de 1.0 mL, el cual se resolvió por cromatografía de intercambio aniónico. En este último paso, la mayahuella se detectó de forma pura y sin degradación en la fracción inicial 2 (Figuras 5.11a carril Ii, 5.11b carril Ii y S5c). El Cuadro 5.2 resume los rendimientos obtenidos durante el proceso de purificación.

Cuadro 5.2: Rendimientos generales en el proceso de purificación de la mayehuelina obtenida de *A. tequilana*.

Paso de purificación	Volumen (mL)	[] proteína (mg mL ⁻¹)	Proteína total (mg)
Extracto crudo	120	3.12	374.40
Ultra centrifugación	105	2.95	309.75
Ultrafiltración	17	9.48	161.16
Exclusión molecular	17	2.14	36.38
Hidroxiapatita	68	0.22	14.96
Intercambio aniónico	17	0.01	0.17

5.3.1.- Secuenciación del gen *Mayehuelina* de *A. tequilana*

El gen *Mayehuelina* se secuenció a partir de DNA proveniente de la misma planta de *A. tequilana* de la cual se purificó la mayehuelina usando oligonucleótidos que delimitan el sitio catalítico de la proteína. Tras la amplificación por PCR, se obtuvo una banda con un tamaño aproximado de 680 pb (Figura S6), misma que se secuenció por el método de Sanger. El análisis de la secuencia no sólo mostró que este ejemplar tiene la sustitución de la primera tirosina (Y78) del sitio catalítico por ácido aspártico, sino que el ejemplar secuenciado además presenta dos variantes alélicas para este codón; la que codifica para el aspartato y otra que codifica para histidina, mientras que los tres aminoácidos restantes del sitio catalítico son mantenidos invariablemente (Figura 5.12)

```

GGTTTCGACCTGAATCGAACAGGCGCCGGAGGAGCAAGCACCACAGTGAGGTTTCGCGTGGGC
  F D L N R T G A G G A S T T V R F R V G
AACCTCG CA TGTTGTTCGGTTATCAGATGGGGACGACCTGGTTTTGAGTTTGGGAAAAACGGC
  N L D/H V V G Y Q M G T T W F E F G K N G
GACAAGCAATGGATTCCCAACTCTCAGTTCTTGGGCTTCAGAGGCGACTACGGGGCACTG
  D K Q W I P N S Q F L G F R G D Y G A L
GAAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTAATGTATACGGTTTCGAAGCA
  E N A A G K K V T E I N L N V Y G F E A
GCTGTGAAAAACTCGCCACGTCCACAAAAGGCAACGAGGGGGCGGCGGCACTGATAGTC
  A V K T L A T S T K G N E G A A A L I V
GTGGCTCAGTTGGTCTCCGAAGCCTGCAGATTTCCTCATCCTCTCCAACGCTCTCTCAACC
  V A Q L V S E A C R F L I L S N A L S T
AGGATAAACGACCCAACG
  R I N D P T

```

Figura 5.12: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la mayehuelina obtenida del ejemplar de *A. tequilana* a partir del cual se purificó la mayehuelina. Se resalta en amarillo a los aminoácidos correspondientes al sitio catalítico.

5.4.- Efecto de la mayehuelina sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa

Se utilizaron diferentes concentraciones de la mayehuelina purificada para medir su efecto inhibitorio en un sistema de traducción *in vitro* de plantas, como lo es el extracto de germen de trigo. La mayehuelina inhibió de manera dependiente de su concentración la traducción del RNAm de la luciferasa: en la concentración inicial de 15.4 nM, el nivel de la traducción de la luciferasa se redujo a un 35 % del control. A la concentración de 30.8 nM, el nivel de la traducción fue solo del 17 % respecto al control, muy similar al 15 % que se obtuvo con los 13.3 nM de saporina usada como control positivo. A los 61.6 nM de mayehuelina, solo se logró alcanzar el 5 % de la traducción del control. Finalmente, a 123.2 nM de mayehuelina usados se inhibió por completo la traducción de la luciferasa (Figura 5.13). A nivel estadístico, de 0 hasta los 61.6 nM de mayehuelina hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$), mientras que a las concentraciones de 61.6 y 123.2 nM no hubo diferencias estadísticamente significativas. A su vez, en las concentraciones de 30.8 y 61.6 nM de mayehuelina, la inhibición de la traducción de la luciferasa no fue estadísticamente diferente a la obtenida con los 13.3 nM de la saporina usada como control (Figura 5.13 y Cuadro suplementario S8).

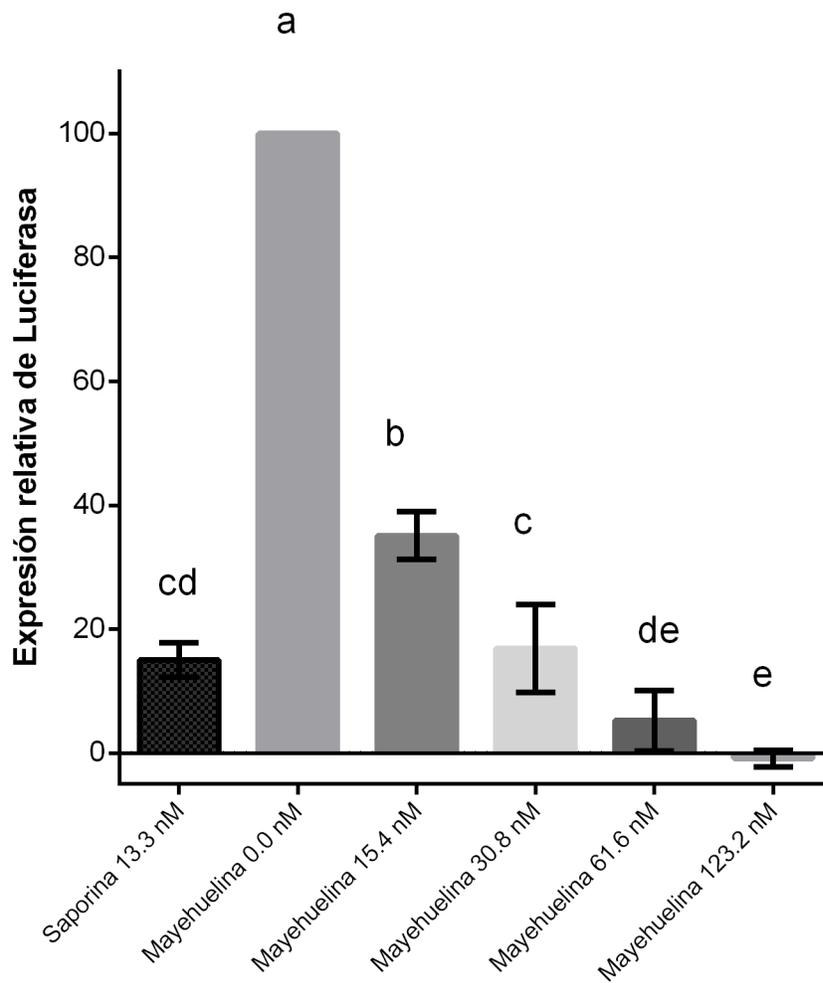


Figura 5.13: Efecto de la mayehuelina purificada de *A. tequilana* sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa. De izquierda a derecha: la saporina como control positivo, seguida de diferentes concentraciones de la mayehuelina. Las barras representan las mediciones de tres experimentos independientes con sus respectivas desviaciones estándar. Gráfico generado con el software *GraphPad Prism v6*.

Los valores de expresión relativa de la luciferasa se transformaron a porcentaje de inhibición y se ajustaron a una curva dosis-respuesta. Con este método la mayehuelina tuvo una IC_{50} de 10.97 nM con un $R^2 = 0.989$ sobre la traducción de la luciferasa en el sistema de traducción *in vitro* de extracto libre de células de germen de trigo (Figura 5.14, cuadro S9).

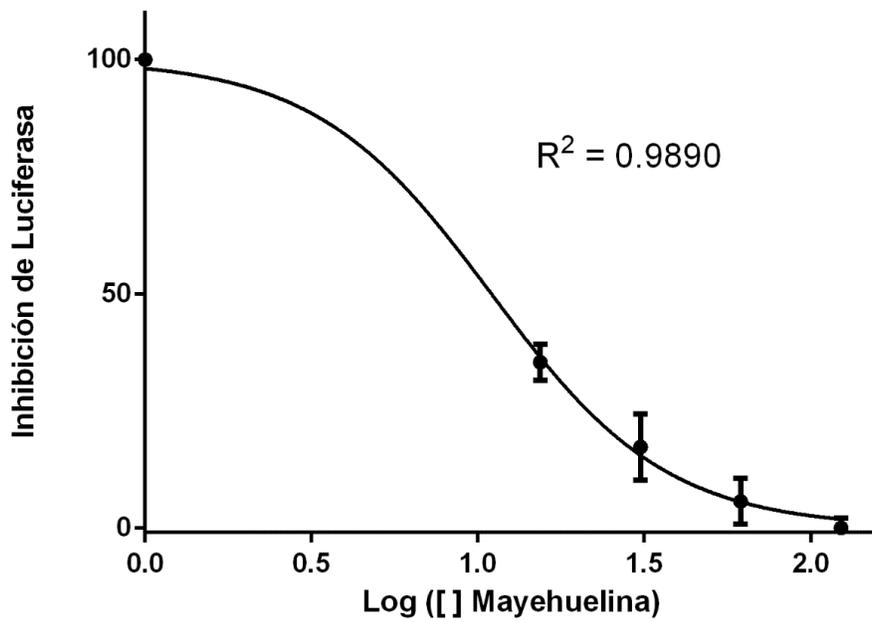


Figura 5.14: Curva de dosis-respuesta de la mayhuelina sobre la inhibición de la traducción de la luciferasa en el sistema de traducción libre de células de germen de trigo. Se muestran los datos de tres réplicas con sus respectivas desviaciones estándar. En el eje x se muestra el logaritmo de las concentraciones de la mayhuelina usadas. En el eje y se muestra el porcentaje de inhibición de la traducción de la luciferasa. Gráfico generado con el software *GraphPad Prism v6*.

VI.- DISCUSIÓN

6.1.- Expresión de la mayehuelina recombinante en *S. cerevisiae*

La secuencia de DNA que codifica para la mayehuelina madura se introdujo en *S. cerevisiae* mediante el vector de expresión pYES-DEST52 en dos construcciones: R1-1 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*) que expresa la proteína sola y R2-2 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*::V5::6his) que fusiona la mayehuelina a una cola de histidinas y al epítipo V5. La mayehuelina recombinante pudo ser inmuno-detectada como una banda de 27 KDa para la cepa R1-1 a partir de las 16 h y como una banda por arriba de los 32 kDa para la cepa R2-2 a partir de las 20 h. En un trabajo previo, Reyes (2014) introdujo el vector R2-2 en la cepa W303 y logró inmuno-detectar a la mayehuelina fusionada como dos bandas con pesos de 33 y 27 kDa a partir de las 8 h de inducción. El reconocimiento de estas dos bandas por parte del anticuerpo anti-mayehuelina, fue atribuido a la acción de una proteasa de *S. cerevisiae* que pudo reconocer y cortar en un sitio específico entre la mayehuelina y la fusión, generando de ese modo las dos versiones de la proteína. En el presente trabajo no se inmuno-detectó alguna otra banda, aparte de la correspondiente a la mayehuelina fusionada, que sugiera un corte proteolítico. El método de extracción rápida de proteínas de levadura aquí utilizado ayudó a evitar la proteólisis al colocar la muestra a la que se le va a realizar la extracción en el mismo amortiguador de carga e inmediatamente ser sometida a 95 °C para romper las células (Horvath *et al.*, 1994), este protocolo pudo tener ventaja sobre el método de ruptura mecánica usado por Reyes (2014).

Otros estudios han demostrado que la expresión heteróloga en levadura de RIPs tipo I y II, que portan intacto su sitio catalítico, es letal para la célula. Hur y colaboradores (1995) clonaron la secuencia que codifica la RIP tipo I PAP en su versión silvestre en la cepa W303 de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor *GAL-1*. La inducción de la proteína resultó letal para la levadura debido a la depurinación de los ribosomas. Otro caso similar se observó al estudiar los efectos de la cadena A de la ricina (RIP tipo II) que al ser expresada en la cepa W303 de *S. cerevisiae* causó letalidad (Li *et al.*, 2007). La sustitución natural del aspartato por tirosina en el sitio activo de la mayehuelina (Y78D) parece abolir el efecto citotóxico en levadura. Anteriormente se

había demostrado que la expresión inducida de la mayehuelina fusionada a la cola de histidinas y al epítotope V5 tenía efectos negativos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* (Reyes, 2014; Sosa, 2018). En este trabajo se logró demostrar, que la expresión de la mayehuelina madura sin fusión tampoco tiene efectos citotóxicos sobre la levadura (Figura 5.3).

El análisis de los cristales de RIPs disponibles, demuestra que las tirosinas que forman parte del sitio catalítico quedan acomodadas estructuralmente una frente a otra de manera que puedan ejercer su función de sostener entre ellas a la adenina sustrato (Monzingo y Robertus, 1992; Savino *et al.*, 2000). La mutación de la primera tirosina del sitio catalítico, aún por un aminoácido del mismo tipo como lo es la fenilalanina, redujo drásticamente la actividad enzimática de la ricina (Ready *et al.*, 1991) y abolió totalmente la actividad depurinadora de la saporina (Bagga *et al.*, 2003) La charybdina fue la primer RIP reportada con una sustitución natural en el sitio activo, al ser probada *in vitro*, inhibió muy poco la traducción de la luciferasa en el sistema de reticulocitos de ratón (Toloupakis *et al.*, 2006). El análisis del cristal de la charybdina muestra que la valina 79 que sustituye a la primera tirosina del sitio activo (Y79V) no puede alinearse con la tirosina 117 promoviendo una conformación más abierta del sitio catalítico respecto a otras RIPs (Toloupakis *et al.*, 2006) El modelamiento por homología de la estructura tridimensional de la mayehuelina, creado con el programa *Swiss-Model* de *ExpPASy* [<https://swissmodel.expasy.org>], muestra que el aspartato 78 que reemplaza a la primer tirosina del sitio activo (Y78D) tampoco es capaz de alinearse con la segunda tirosina del sitio catalítico (Y112) lo que resulta en una conformación abierta del sitio activo como en el caso de la charybdina (Figura 6.1). En sitios activos con una conformación más abierta como los de la charybdina y de la mayehuelina es posible que la adenina sustrato del lazo sarcina-ricina del ribosoma no pueda alinearse correctamente disminuyendo por tanto su depuración.

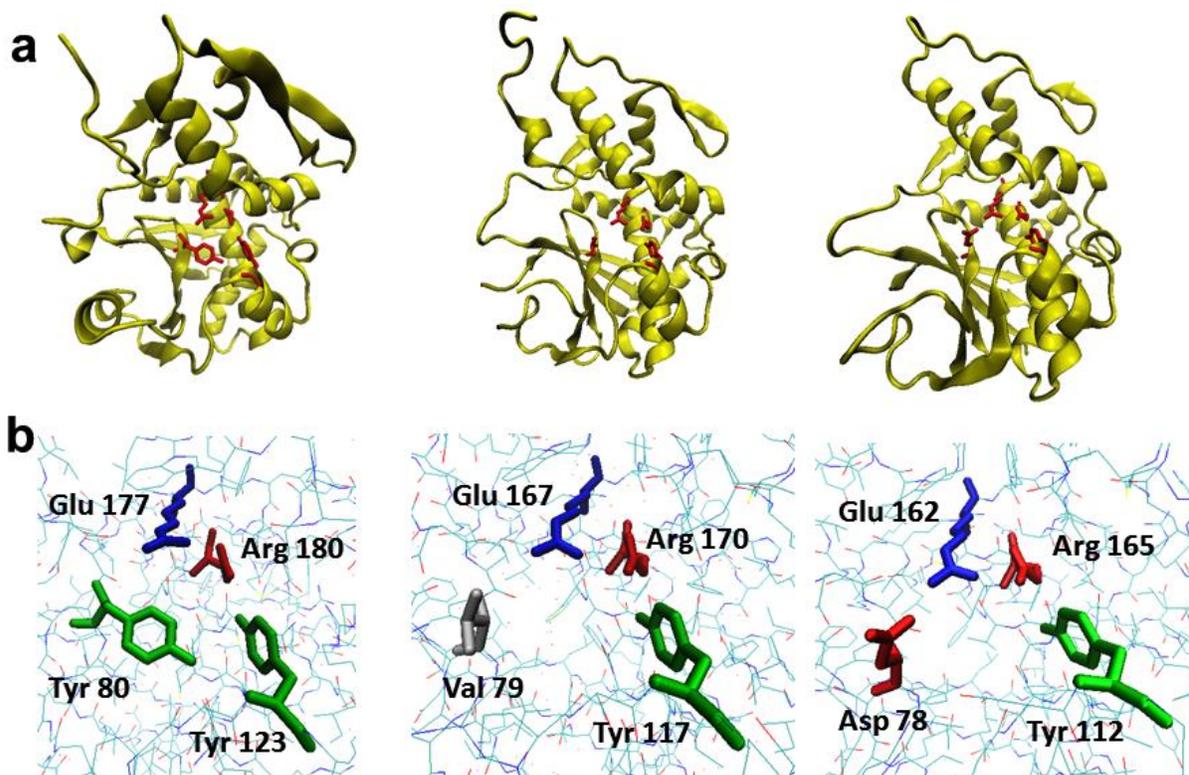


Figura 6.1: Comparación de los sitios activos de la ricina, la charybdina y de la mayehuelina. a) De izquierda a derecha, cristal de la cadena A de la ricina a 1.8 °A [PDB 1IFT], cristal de la charybdina a 1.6 °A [PDB 2B7U] y modelado por homología de la mayehuelina. Se resaltan en rojo los aminoácidos del sitio catalítico. b) De izquierda a derecha, ampliación del sitio activo de la ricina, charybdina y de la mayehuelina. Se muestran el nombre y numeración de los residuos que componen el sitio catalítico. Archivos .pdb obtenidos del *Protein Data Bank* [<https://www.rcsb.org>]. Modelo por homología construido en el servidor *Swiss-Model* [<https://swissmodel.expasy.org>] Imágenes editadas con el visor molecular “VMD” v1.9.3.

6.2.- Evaluación del efecto de la mayehuelina sobre la termotolerancia de *S. cerevisiae*

Tras una inducción de 24 h con galactosa, las células transformantes R1-1, R2-2 y pYES fueron sometidas a tratamientos de termotolerancia basal e inducida. Los aumentos de 0.53 y 0.32 veces registrados en la termotolerancia basal para las cepas R1-1 y R2-2 respectivamente, no fueron estadísticamente significativos. Esto contrasta con lo previamente obtenido por Sosa (2018) que encontró un aumento estadísticamente significativo de 3.7 veces para la cepa R2-2 tras una inducción con galactosa de 16 h. Los tiempos de inducción previos a los ensayos de

termotolerancia parecen ser la clave para estas discrepancias. En este trabajo, la inducción de 24 h fue con el objetivo de lograr la máxima expresión de la mayehuelina recombinante, pero también trajo como resultado cultivos entrando en la fase estacionaria de crecimiento (Figura 5.3), mientras que, en el trabajo de Sosa, la inducción de 16 h mantuvo a los cultivos en su fase exponencial.

En la fase estacionaria de crecimiento, las levaduras presentan de manera natural una resistencia a altas temperaturas y a otros tipos de estrés (Werner-Whashburne *et al.*, 1993). La resistencia al calor en esta etapa resulta de un mecanismo sinérgico entre la trehalosa, (sintetizada como fuente de reserva de energía) que actúa como termoprotector al incrementar la viscosidad del medio intracelular para reducir la inactivación de proteínas, y la inducción de la proteína Hsp104 que actúa reparando proteínas dañadas por calor y re-solubilizando agregados (Sanchez, *et al.*, 1992; Elliott *et al.*, 1996; Böls, *et al.*, 2006). El aumento de los niveles de trehalosa y de Hsp104 en la fase estacionaria de crecimiento podría haber enmascarado el efecto positivo de la mayehuelina sobre la termotolerancia de *S. cerevisiae* en los ensayos aquí realizados.

En este trabajo se hipotetizó que la mayehuelina pudiera estar implicada en la regulación de la termotolerancia de *A. tequilana*. Estudios previos han mostrado que la expresión de las RIPs se ve favorecida tras la exposición a estrés abiótico (Rippmann *et al.*, 1997; Stirpe *et al.*, 2006). También se ha visto que la sobreexpresión dentro de la misma planta, de genes que codifican RIPs aumenta la resistencia a la sequía y a la salinidad (Jiang *et al.*, 2012) El ácido jasmónico, que es inducido también en condiciones de estrés, puede ser una de las moléculas señalizadoras para la síntesis de las RIPs en estas condiciones (Reinbothe *et al.*, 1994), aunque este mecanismo aún debe ser estudiado. La degradación de los propios ribosomas debido a la sobre expresión de las RIPs no parece ser una estrategia idónea de las plantas como respuesta al estrés abiótico En tales casos, una regulación a nivel postranscripcional mediada por RIPs pareciera ser más conveniente.

En *A. tequilana* se observó que la expresión de las proteínas Hsp101, Hsp90 y Hsp70 es nula en el cogollo en temperaturas de 28 a 48 °C y su presencia se induce solo después de someter a la planta a 54 °C (Luján *et al.*, 2009). El estrés por calor es una condición donde la traducción dependiente de *cap* se ve disminuida de manera general mientras que la traducción de mensajeros que codifican para proteínas Hsp se ve favorecida (Gallie *et al.*, 1995). Dinkova y colaboradores (2005) demostraron que la proteína Hsp101 de maíz, que es esencial para la termotolerancia al promover la renaturalización de agregados de proteínas (Nieto-Sotelo *et al.*, 2002), puede ser traducida de manera independiente del *cap* a través de su extremo 5'-UTR que actúa como un elemento IRES, pudiendo ser ésta una de las estrategias por las cuales la traducción de proteínas Hsps se ve favorecida en condiciones de estrés (Dinkova *et al.*, 2005).

La mayehuelina con su sustitución de aspartato en el sitio activo podría actuar sobre algunos transcritos de RNA y ejercer una función reguladora postranscripcional. Varios estudios han demostrado que algunas RIPs tipo I como la PAP, pueden actuar *in vitro* sobre mensajeros que son traducidos de manera canónica al unirse al *cap* y depurarlos río abajo y también sobre algunos mensajeros virales con elementos IRES que se traducen de manera independiente del *cap* (Barbieri *et al.*, 1997; Hudak *et al.*, 2002; Vivanco y Tumer, 2003). En el caso de la charybdina, no se evaluó la depuración de los ribosomas (Toloupakis *et al.*, 2006) y, por lo tanto, no se puede descartar que la inhibición de la traducción que se registró haya sido ocasionada por la inhibición del transcrito de la luciferasa.

A diferencia de lo que sucede con las proteínas Hsps en el cogollo de *A. tequilana* (Luján *et al.*, 2009), la mayehuelina se expresa en el cogollo desde los 28 hasta los 54 °C y no se expresa en las hojas desplegadas de la roseta (Martínez, Lledías, Nieto-Sotelo, datos no publicados). Es posible entonces que la mayehuelina realice su actividad reguladora en el cogollo mediante dos mecanismos. Por un lado, es probable que la mayehuelina ejerza una actividad represora de la traducción al unirse al extremo 5'-UTR de los mensajeros de Hsps a temperaturas por debajo de los 54 °C. Al llegar a dicha temperatura, la mayehuelina puede ser inactivada por el calor y

permitir la traducción de Hsps. En otro escenario, la mayehuelina podría favorecer la termotolerancia al unirse al *cap* de algunos mensajeros para degradarlos y así favorecer la traducción independiente de *cap* de los transcritos de Hsps a altas temperaturas. La familia de proteínas Hsp90 y Hsp70 son un tipo de chaperonas que se expresan a un nivel basal en *S. cerevisiae* y su expresión se ve aumentada tras la exposición a estrés calórico (Böls, *et al.*, 2006; Craig, 1992) La expresión heteróloga de la mayehuelina en *S. cerevisiae* podría favorecer la expresión diferencial de Hsp90, Hsp70 y Hsp104 en la termotolerancia basal.

El someter a las levaduras a un moderado aumento de temperatura por algunos minutos (37 °C durante 15-30 min) provoca en las células el aumento de la síntesis de proteínas de choque de calor, principalmente Hsp104 y les permite sobrevivir posteriores choques de calor de hasta 50 °C (McAlister y Finkelstein 1980; Elliott *et al.*, 1996; Böls, *et al.*, 2006). El mecanismo regulador propio de la levadura que favorece la síntesis de Hsp104 en la termotolerancia inducida podría haber enmascarado el posible efecto regulador de la mayehuelina en estos tratamientos.

6.3.- Purificación de la mayehuelina nativa de *A. tequilana* y su efecto sobre la traducción de la luciferasa en un sistema de traducción *in vitro*

La mayehuelina nativa de *A. tequilana* fue purificada a partir de tejido fresco de cogollo mediante el fraccionamiento escalonado de cromatografías en gel, cromatografía en hidroxapatita e intercambio aniónico. El proceso utilizado permitió obtener un alto grado de pureza respecto a la separación de otras proteínas. Sin embargo, la sensibilidad de estas técnicas no permite fraccionar isoformas de una misma proteína y no se pudo obtener por separado las dos versiones de la mayehuelina que presentó el ejemplar a partir del cual se purificó la proteína. Esta nueva versión de la mayehuelina con un cambio de histidina en vez de la conservada tirosina (Y78H), o del aspartato hasta ahora observado en todos los ejemplares de *A. tequilana* analizados fue sorprendente. A la fecha, solo las especies de *A. isthmensis* y de *A. angustifolia* habían presentado dos variantes de la mayehuelina; una con

tirosina y otra con aspartato (García-Mendoza, Ávila, Rojas, Nieto-Sotelo, datos no publicados).

Los reportes de los fuertes efectos negativos sobre la actividad catalítica las RIPs, causada por la mutagénesis de la primera tirosina, (Ready *et al.*, 1991; Kim y Robertus, 1992; Bagga *et al.*, 2003) y la nula toxicidad de la expresión de la mayehuelina con la versión de aspartato (D78) en *S. cerevisiae*, hacían factible esperar una muy baja o nula actividad inhibitoria de la mayehuelina purificada de *A. tequilana* sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa en el sistema de extracto de germen de trigo. El modelamiento por homología de la recién descubierta versión de la mayehuelina con histidina reveló interesantemente que, el sitio catalítico adopta una conformación más cerrada y parecida a la que se observa en RIPs con los cuatro aminoácidos catalíticos intactos (Figuras S10, 6.2a y 6.2b). En el modelo creado, el anillo de imidazol de la histidina 78 se sitúa frente a la tirosina 112 alineándose de manera similar a como lo hacen las dos tirosinas del sitio activo de la ricina (Figuras 6.2a y 6.2b), lo que podría permitir un mejor acoplamiento de la adenina sustrato. Ready y colaboradores (1991) encontraron una reducción de hasta 15 veces en la capacidad depurinadora al cambiar la tirosina 80 de la cadena A de la ricina por fenilalanina [Y80F] (Cuadro 6.1). En la proteína nativa, el fenol de la tirosina 80 de la ricina forma un puente de hidrógeno entre su grupo hidroxilo y la glicina 121 (Figura 6.2d). Este puente de hidrógeno es muy importante ya que mantiene alineada a la tirosina 80 con la tirosina 123 (Kim y Robertus, 1992). En la mutante Y80F de la ricina, a pesar de que la fenilalanina se sitúa frente a la tirosina 123, su benceno no es capaz de formar el puente de hidrógeno con la glicina 121 y no se logra la alineación correcta (Kim y Robertus, 1992). El imidazol es un compuesto heterocíclico muy propenso a formar puentes de hidrógeno debido a la presencia de dos nitrógenos en su anillo (McMurry, 2008). El imidazol de la histidina 78 podría ser capaz entonces de formar un puente de hidrógeno con la glicina 110 de la mayehuelina y de esta manera mantenerse alineada con la tirosina 112 (Figura 6.2e) dando estabilidad al sitio activo de la mayehuelina y aumentando así su capacidad inhibitoria. El análisis *in silico* de la interacción proteína-ligando “*Docking*” entre las dos versiones de mayehuelina D78 y H78 y la adenina monofosfato (AMP),

usada como análogo de sustrato del lazo sarcina-ricina (Suplementaria S11), muestra una mayor afinidad [medida en términos de ΔG] de la mayehuelina H78 con el AMP dando soporte a la hipótesis que la histidina en el sitio catalítico puede ayudar a recuperar la actividad inhibidora de ribosomas a la mayehuelina.

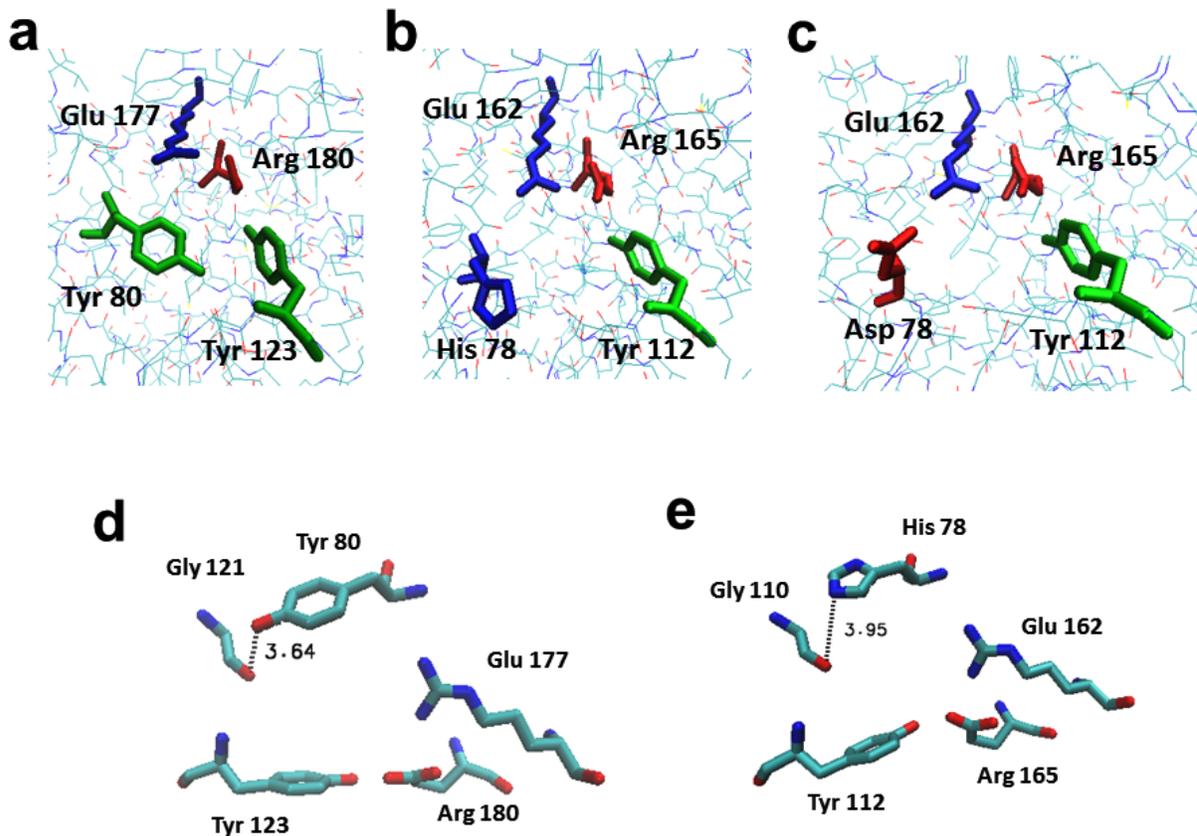


Figura 6.2: Comparación de los sitios activos de la ricina, la mayehuelina H78 y la mayehuelina D78. a) amplificación del sitio activo del cristal de la cadena A de la ricina a 1.8 °A [PDB 1IFT]. b) amplificación del sitio activo del modelo de la mayehuelina con histidina en el sitio catalítico. c) amplificación del sitio activo del modelo de la mayehuelina con aspartato en el sitio catalítico. d) puente de hidrógeno reportado por Kim y Robertus (1992) entre la glicina 121 y la tirosina 80 en el cristal de la cadena A de la ricina [PDB 1IFT]. e) puente de hidrógeno propuesto entre la glicina 110 y la histidina 78 en el modelo de la mayehuelina H78. En cada caso se muestran el nombre y numeración de los residuos. Archivos .pdb obtenidos del *Protein Data Bank* [https://www.rcsb.org]. Modelos por homología construidos en el servidor Swiss-Model [https://swissmodel.expasy.org]. Los puentes de hidrógeno y las imágenes fueron medidos y editadas con el visor molecular “VMD” v1.9.3.

No se conocen reportes a la fecha que evalúen la inhibición de la traducción por parte de las RIPs en un sistema de plantas como lo es el extracto de germen de trigo. Por lo que de momento no se puede comparar directamente la actividad enzimática de la mayehuelina respecto a otras RIPs. Guardando la debida proporción, se puede ver que la concentración inhibitoria media de 10.97 nM obtenida por la mayehuelina sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa en el sistema de germen de trigo, es casi dos órdenes de magnitud más alta que las IC₅₀ reportadas para las RIPs más toxicas, la ricina, la saporina y la PAP en el sistema de traducción de reticulocitos de conejo (Cuadro 6.1), y 1.5 veces más baja que los 27.2 nM de IC₅₀ reportados para la charybdina sobre la traducción de la luciferasa en el sistema de reticulocitos de conejo (Toloupakis *et al.*, 2006).

Cuadro 6.1: Comparación de la concentración inhibitoria media de diferentes RIPs

RIP	Tipo	IC50	Sistema de traducción	Referencia
Charybdina	I	27.2 nM	Reticulocitos de conejo	(Touloupakis et al, 2006)
Saporina	I	0.25 nM	Reticulocitos de conejo	(Touloupakis et al, 2006)
PAP	I	0.29 nM	Reticulocitos de conejo	(Schrot et al, 2015)
Ricina	II	0.14 nM	Reticulocitos de conejo	(Schrot et al, 2015)
Ricina	II	0.30 nM	Ribosomas libres de <i>A. salina</i>	(Ready et al, 1991)
RicinaY80F	II	4.5 nM	Ribosomas libres de <i>A. salina</i>	(Ready et al, 1991)
Mayehuelina	II	10.97 nM	Extracto de germen de trigo	

Es posible que la inhibición de la traducción, que registró la mezcla de isoformas de la mayehuelina empleada, haya sido causada por la depuración de los ribosomas debido a la restitución de la conformación del sitio catalítico en la versión de la mayehuelina con histidina. Sin embargo, no debe descartarse que esta inhibición fuese debido a la degradación del mensajero de la luciferasa por parte de la mayehuelina D78 y/o la mayehuelina H78. Wang y Hudak (2006) demostraron que la proteína PAP tiene mayor afinidad para actuar sobre los transcritos de RNA que sobre los ribosomas en el sistema de extracto de germen de trigo. Posteriormente se identificó que esta degradación diferencial está regulada por los factores de inicio de

la traducción eIF4G y eIFiso4G que se encargan de presentar a la PAP al mensajero (Domashevskiy *et al.*, 2017). Un mecanismo similar pudiera operar en el caso

de la mayehuelina, por lo que se requiere comprobar si la inhibición de la traducción registrada en este trabajo se debió a la depurinación de los ribosomas, a la degradación del transcrito o a ambas. Se requieren también hacer estudios, donde se evalúen por separado los efectos inhibitorios de las versiones con aspartato e histidina de la mayehuelina para discernir si efectivamente la histidina es capaz de restaurar la actividad inhibidora y evaluar su grado de citotoxicidad. También será importante llevar a cabo ensayos en el sistema de reticulocitos de conejo, que permitan comparar el efecto de la mayehuelina con otras RIPs.

Algunas plantas sintetizan diferentes isoformas de RIPs que difieren en toxicidad, pero tienen la particularidad de que conservan intactos los cuatro aminoácidos del sitio activo, por ejemplo; la *Saponaria officinalis* produce más de nueve isoformas de la saporina (Polito *et al.*, 2013). La presencia de dos versiones de la mayehuelina con cambios en el sitio activo D78 y H78 dentro de una misma planta resulta un caso muy particular que requiere de un mayor estudio. Es posible que estas dos versiones de la mayehuelina ejerzan funciones diferentes dentro de la planta; por un lado, la versión con aspartato pudiera estar actuando a nivel transcrito regulando la traducción diferencial de mensajeros necesarios para la respuesta al estrés como ya se discutió, mientras que la versión con histidina podría actuar como mecanismo de defensa como se ha planteado con otras RIPs.

VI.- CONCLUSIONES

La expresión inducida de la mayehuelina madura, sola o fusionada, con su sustitución natural de aspartato (Y78D) en el sitio catalítico no tuvo efectos citotóxicos sobre el crecimiento de *S. cerevisiae*, y tampoco se pudieron observar efectos positivos significativamente estadísticos sobre la termotolerancia basal o inducida de la levadura *S. cerevisiae*.

La mayehuelina tuvo un efecto relativamente fuerte sobre la inhibición de la traducción *in vitro* de la luciferasa en el sistema de extracto de germen de trigo. Esta inhibición pudo haber sido causada por la presencia de la isoforma con histidina en el sitio catalítico (Y78H) que presentó el ejemplar de *A. tequilana* a partir del cual se purificó la mayehuelina. El análisis *in silico* mostró que la histidina 78 puede ejercer una función estructural similar a la canónica tirosina del sitio catalítico y de esta manera recuperar la función depuradora de los ribosomas en la mayehuelina.

Esta es el primer reporte de una RIP que presenta una sustitución natural en el mismo residuo del sitio catalítico con dos aminoácidos diferentes. Se requieren más estudios que evalúen por separado los efectos citotóxicos, la degradación de los transcritos y la depuración de los ribosomas de las dos versiones de la mayehuelina para poder conocer si ambas proteínas son funcionales y tienen mecanismos de acción diferentes.

VII.- PERSPECTIVAS

Los resultados aquí obtenidos y la existencia de tres isoformas de la mayehuelina presentan la gran oportunidad de avanzar en el conocimiento que se tiene sobre la función biológica y reguladora de las RIPs. Son varios los enfoques experimentales que deben adoptarse para estudiar de una manera más completa a la mayehuelina.

Se deben identificar ejemplares de *A. tequilana* homócigos para las versiones de la mayehuelina con aspartato e histidina en la posición 78, así como ejemplares de *A. angustifolia* que solo presenten la versión con tirosina para obtener las isoformas de la mayehuelina por separado y realizar con ellas ensayos de inhibición de la síntesis de proteínas en otros sistemas de traducción, evaluando además, su capacidad para depurar a los ribosomas y degradar a los transcritos de RNA, con el objetivo de poder identificar diferencias en función y toxicidad. El proceso de purificación empleado en este trabajo requiere ligeras modificaciones para su escalamiento y que permita obtener mayores cantidades de la mayehuelina purificada para su cristalización. Esto ayudará a conocer la estructura real de las diferentes versiones de la mayehuelina.

Los ensayos de termotolerancia aquí realizados deben repetirse en diferentes condiciones, para evaluar el efecto de la expresión de la mayehuelina en la etapa exponencial del crecimiento de *S. cerevisiae*. Asimismo, las versiones con histidina y tirosina de la mayehuelina en la posición 78 deben ser expresadas en la levadura *S. cerevisiae* para evaluar sus efectos citotóxicos. Se pueden realizar ensayos de doble híbrido en levadura, y técnicas de co-purificación “*pulldown*” y de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia “*FRET*” para evaluar la interacción *in vitro* e *in vivo* de la mayehuelina con algunos factores de inicio de la traducción y avanzar en el conocimiento de su mecanismo regulatorio.

Se requiere identificar al gen *Mayehuelina* completo mediante técnicas como la amplificación rápida de extremos de DNA complementarios “*RACE*” para tal propósito. También se puede hacer uso de técnicas inmunocitogenéticas para identificar la localización de la mayehuelina dentro de la célula.

En el campo de la ciencia aplicada, algunas RIPs han sido utilizadas y otras están siendo probadas como inmunotoxinas para combatir enfermedades como el cáncer y en la investigación neurológica. Muchas de estas RIPs tienen que ser modificadas genéticamente para reducir su toxicidad y poder ser empleadas. La baja citotoxicidad de la mayehuelina con aspartato o histidina puede resultar idónea y ser aprovechada para este propósito.

Finalmente, no se debe descartar totalmente la idea de que la sustitución de tirosina por aspartato o histidina en la mayehuelina se deba a la domesticación de los agaves. Estudios genéticos y poblacionales pueden ser empleados para resolver esto.

VIII.- LITERATURA CITADA

Bagga, S; Seth, D; Batra, J. (2003). *The Cytotoxic Activity of Ribosome-inactivating Protein Saporin-6 Is Attributed to Its rRNA N-Glycosidase and Internucleosomal DNA Fragmentation Activities. The Journal of Biological Chemistry*, 278 (7), 4813-4820.

Barbieri, L.; Valbonesi, P.; Bonora, E.; Gorini, P.; Bolognesi, A.; Stirpe, F. (1997). *Polynucleotide: adenosine glycosidase activity of ribosome-inactivating proteins: effect on DNA, RNA and poly(A). Nucleic Acids Research*, 25(3), 518-522.

Bautista-santos, A.; Zinker, S. (2014). *The P1/P2 Protein Heterodimers Assemble to the Ribosomal Stalk at the Moment When the Ribosome Is Committed to Translation but Not to the Native 60S Subunit in Saccharomyces cerevisiae. Biochemistry*, 53, 4105-4112.

Böls, B; Grimminger, V; Walter, S. (2006). *The molecular chaperone Hsp104. A molecular machine for protein disaggregation. Journal of Structural Biology*, 156, 139-148.

Chaddock, J.; Monzingo, A.; Robertus, J.; Lord, J.; Roberts, L. (1996). *Major structural differences between pokeweed antiviral protein and ricin A-chain do not account for their differing ribosome specificity. European Journal of Biochemistry*, 235, 169-166.

Chiou, J.; Li, X; Remacha, M.; Ballesta, J.; Tumer, N. (2008). *The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in Saccharomyces cerevisiae. Molecular Microbiology*, 70(6), 1441-1452.

Choi, A.K.H.; Wong, E.C.K.; Lee, K.-M.; Wong, K. (2015). *Structures of Eucaryotic Ribosomal Stalk Proteins and Its Complex with Trichosanthin, and Their Implications in Recruiting Ribosome-Inactivating Proteins to the Ribosomes. Toxins*, 7, 638-647.

Craig, E. (1992). *Heat-shock Response*. En *The molecular and celular Biology of the yeast Saccharomyces volume 2: Gene expresión*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 501-529.

Cuesta, R.; Gaurav, L.; Schneider, J. (2000). *Chaperone Hsp27 inhibits translation during heat shock by binding eIF4G and facilitating dissociation of cap-initiation complexes. Genes and Development*, 14, 1469-1470.

Day, P.; Ernst, S.; Frankel, A.; Mozingo, A.; Pascal, M., Robertus, J. (1996). *Structure and Activity of an Active Site Substitution of Ricin A Chain. Biochemistry*, 35, 11098-11103.

De Virgilio, M.; Lombardi, A.; Caliandro, R.; Fabbrini, M. (2010). *Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack. Toxins*, 2, 2699-2737.

Dinkova, T.; Zepeda, H.; Martínez-Salas, E.; Martínez, L.; Nieto-Sotelo, J.; Sánchez de Jiménez, E. (2005). *Cap-independent translation of maize Hsp101. The Plant Journal*, 41, 722-731.

- Domashevskiy, A; Williams, S; Kluge, C; Cheng, S. (2017). *Plant Translation Initiation Complex eIFiso4F Directs Pokeweed Antiviral Protein to Selectively Depurinate Uncapped Tobacco Etch Virus RNA*. *Biochemistry*, 56 (45), 5980–5990.
- Elliot, B; Haltiwanger, R; Futcher, B. (1996). *Synergy Between Trehalose and Hsp104 for Thermotolerance in Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 144, 923-933.
- Fermani, S.; Tosi, G.; Farini, V.; Polito, L. F. (2009). *Structure/function studies on two type 1 ribosome inactivating proteins: Bouganin and lychnin*. *Journal of Structural Biology*, 168, 278-287.
- Gallie, D; Caldwell, C; Pitto, L. (1995). *Heat shock disrupts cap and poly (a) tail function during translation and increases mRNA stability of introduced reporter mRNA*. *Plant Physiology*, 108, 1703–1713.
- García-Mendoza, A.J. (2007). *Los Agaves de México*. *Ciencias*, 087, 14-23.
- Gietz, R.D.; Woods, R. (2002). *Transformation of Yeast by Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol Method*. In *Methods In Enzymology*, 350, 87-96.
- Horvath, A; Riezman, H. (1994). *Rapid Protein Extraction from Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10 1305-1310.
- Hudak, K.; Bauman, J.; Nilgun, T. (2002). *Pokeweed antiviral protein binds to the cap structure of eukaryotic mRNA and depurinates the mRNA downstream of the cap*. *RNA*, 8, 1148-1159.
- Hur, Y; Hwang, D; Zoubenko, O; Coetzer, C; Uckun, F. (1995). *Isolation and characterization of pokeweed antiviral protein mutations in Saccharomyces cerevisiae: Identification of residues important for toxicity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United of America*, 92, 8448-8452.
- Jiang, S.; Bhalla, R.; Ramamoorthy, R.; Luan, H.; Venkatesh, P.; Cai, M.; Ramachandran, S. (2012). *Over-expression of OSRIP18 increases drought and salt tolerance in transgenic rice plants*. *Transgenic Res.*, 21, 785-795.
- Kim, Y.; Robertus, J. (1992). *Analysis of several key active site residues of ricin A chain by mutagenesis and X ray crystallography*. *Protein Engineering*, 5(8), 775-779.
- Li, X; Baricevic, M; Saidasan, H; Tumer, N. (2007). *Ribosome Depurination Is not Sufficient for Ricin-Mediated Cell Death in Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and Immunity*, 75 (1), 417-428.
- Luján, R.; Lledías, F.; Martínez, L.; Barreto, R., Cassab, G.; Nieto-Sotelo, J. (2009). *Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in Agave tequilana var. Weber*. *Plant, Cell & Environment*, 32, 1791-1803.
- May, K.; Yan, Q.; Nilgun, E.T (2013). *Targetin ricin to the ribosome*. *Toxicon*, 69, 143-151.

- McAlister, L; Finkelstein, D. (1980). *Heat Shock Proteins and Thermal Resistance in Yeast. Biochemical and Biophysical Research Communications*, 93, (3), 819-824.
- McMurry, (2008). Benceno y Aromaticidad. En *Química Orgánica*. Cengage Learning, 7ª ed, 546-550.
- Monzingo, A.; Robertus, J. (1992). *X-ray analysis of substrate analogs in the ricin A-chain active site. J Mol. Biol*, 227, 1136-1145.
- Nielsen, K.; Boston, R. (2001). *Ribosome-Inactivating Proteins: A plant Perspective. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 785-816.
- Nieto-Sotelo, J; Martínez, L; Ponce, G; Cassab, G; Alagon, A; Meeley, R; Ribaut, J; Yang, R. (2002). *Maize HSP101 Plays Important Roles in Both Induced and Basal Thermotolerance and primary Root Growth. The Plant Cell*, 14, 1621-1633
- Parikh, B; Baykal, U; Di, R; Tumer, N. (2005). *Evidence for Retro-Translocation of Pokeweed Antiviral Protein from Endoplasmic Reticulum into Cytosol and Separation of Its Activity on Ribosomes from Its Activity on Capped RNA. Biochemistry*, 44 (7), 2478–2490
- Petrov, A.; Meskukas, A.; Dinman, J. (2004). *Ribosomal protein L3: influence on ribosome structure and function. RNA Biol*, 1(1), 59-65.
- Peumans, W.; Hao, Q.; Van Damme, J. (2001). *Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases. The FASEB Journal*, 15, 1493-1506.
- Pita, R.; Anadón, A.; Martínez Larrañaga, M.R (2004). Ricina: una fitotoxina de uso potencial como arma. *Rev. Toxicol*, 21, 51-63.
- Polito, L.; Bortolotti, M.; Mercatelli, D.; Battelli, D.; Bolognesi, A. (2013). *Saporin-S6: A useful Tool in Cancer Therapy. Toxins*, 5, 1698-1722
- Puri, M.; Kaur, I.; Perugini, A.; Gupta, R. (2012). *Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. Drug Discovery Today*, 17(13/14), 774-783.
- Ready, M.; Kim, Y.; Robertus, J. (1991). *Site-Directed Mutagenesis of Ricin A-Chain and Implications for the Mechanism of Action. PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 10, 270-278.
- Reinbothe, S; Reinbothe, C; Lehmann, J; Becker, W; Apel, K; Parthier, B. (1994). *JIP60, a methyl jasmonate-induced ribosome-inactivating protein involved in plant stress reactions. Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 7012-7016
- Reyes Hernández, Sandi Julissa. (2014). "Expresión de la Mayahuelina de *Agave tequilana*, proteína similar a las RIP tipo 1, en células de *Saccharomyces cerevisiae*". Tesis de Licenciatura en Ingeniero Biotecnólogo, Centro de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chis.
- Rippmann, J; Michalowski, C; Nelson, D; Bohnert, H. (1997). *Induction of a ribosome-inactivating protein upon environmental stress. Plant Molecular Biology*, 35, 701-709.

- Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. (1992) *Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. EMBO J*, 11(6), 2357-64
- Savino, C; Federici, L; Ippoliti, R; Lendaro, E; Tsernoglou, D. (2000). *The cristal structure of saporin SO6 from Saponaria officinalis and its interaction with the ribosome. FEBS Letters*, 470, 239-243
- Sosa Jimenez, Eric Fernando (2018). "La respuesta tolerancia al calor en células de *Saccharomyces cerevisiae* que expresan la mayahuelina de *Agave tequilana*". Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias de la UNAM.
- Spackova, N.; Sponer, J. (2006). *Molecular dynamics simulations of sarcin-ricin rRNA motif. Nucleic Acids Research*, 34(2), 697-708.
- Stirpe, F. (2013). *Ribosome-inactivating proteins: From toxins to useful proteins. Toxicon*, 67, 12-16.
- Stirpe, F.; Batelli, M. (2006). *Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. Cell. Mol. Life Sci*, 66, 1850-1866.
- Stirpe, F.; Barbieri, L.; Gorini, P.; Valbonesi, P.; Bolognesi, A.; & Polito, L. (1996). *Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. FEBS Letters*, 382, 309-312.
- Stevens, P. F. (2001 onwards). *Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017 [and more or less continuously updated since]*. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Szewcsak, A.; Moore, P. (1995). *The Sarcin/Ricin Loop, a Modular RNA. J. Mol. Biol.*, 247, 81-98.
- Touloupakis, E.; Gessmann, R.; Kavelaki, K.; Christofakis, E.; Petratos, K. (2006). *Isolation, characterization, sequencing and cristal structure of charybdis, a type 1 ribosome-inactivating protein from Charybdis maritima agg. The FEBS Journal*, 273, 2684-2692.
- Vivanco, J.; Tumer, N. (2003). *Translation Inhibition of Capped and Uncapped Viral RNAs Mediated by Ribosome-Inactivating Proteins. Virology*, 3(5), 588-595.
- Wang, M; Hudak, K. (2006). *A novel interaction of pokeweed antiviral protein with translation initiation factors 4G and iso4G: a potential indirect mechanism to access viral RNAs. Nucleic Acids Research*, 34, 1174-1181
- Wang, S.; Li, Z.; Di, S; Chi-Tang, H.; Yang, G. (2016). *Ribosome-inactivating proteins (RIPs) and their important health promoting property. Royal Society of Chemistry*, 6, 46794-46805.
- Werner-Washburne, M; Braun, E; Johnston, G; Singer, R. (1993). *Stationary Phase in the Yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiological Reviews*, 57 (2), 383-401.
- Zhabokritsky, A.; Kutky, M.; Burns, L.; Karran, R.; Hudak, A. (2011). *RNA toxins: mediators of stress adaptation and pathogen defense. WIREs RNA*, 2(6), 890-903.

Zhang, J.; & Liu, W. (1992). *The mechanism of action of trichosanthin on eukaryotic ribosomes-RNA N-glycosidase activity of the cytotoxin. Nucleic Acid Research*, 20(6), 1271-1275.

Zhu, F.; Yuan, S.; Zhang, Z.; Qian, K.; Feng, J.; Yang, Y. (2016). *Pokeweed antiviral protein (PAP) increases plant systemic resistance to Tobacco mosaic virus infection in Nicotiana bethamiana. Eur. J. Plant. Pathol.*, 146, 541-54.

IX.- SUPLEMENTARIAS

S1.- Protocolo de extracción de DNA de *A. tequilana* por el método de CTAB

Se tomó tejido fresco de *A. tequilana* desinfectado con etanol al 70 % y se le retiró la cutícula y las fibras. Se molió en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se vaciaron 0.2 g de este polvo en un tubo de 2.0 mL y se le agregó 1.5 mL de amortiguador de extracción (CTAB al 2 %, NaCl 1.4 M, Tris-HCl pH 8 100 mM y EDTA pH 8) previamente calentado a 60 °C y se colocó en un termo block a 60 °C y 800 rpm durante 30 min. Posteriormente se centrifugó el tubo a 5,000 rpm durante 5 minutos, se recuperó el sobrenadante y se vació a un tubo nuevo, se le agregó un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y se centrifugó a 6,000 rpm durante 5 minutos y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo. Para precipitar el DNA se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol frío y se incubó a -20 °C durante dos horas, pasado este tiempo se centrifugó a máxima velocidad y 4 °C durante 10 minutos y se decantó el sobrenadante. Para limpiar la pastilla de DNA se agregaron 500 µL de amortiguador de solución de lavado (etanol al 76 %, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{CO}_2$ 10 mM) fría y se dejó a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se centrifugó a 7,500 rpm y 4 °C durante 1 minuto y se decantó el sobrenadante. Finalmente, se dió un lavado con etanol al 70 % frío, se centrifugó y la pastilla se re-suspendió en 50 µL de amortiguador TE (Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH 8) y se almacenó a -20 °C.

La integridad del DNA se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa y se cuantificó con el *Nanodrop 2000 de Thermo Fischer*.

S2.- Secuenciación de los vectores R1 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*) y R2 (pYES-DEST52::*Mayehuelina*::*V5*::*6his*)

```

maye -----GTGAAATTTGAGGTCAAC 18
R2-2 AGTTTGTAC-AAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTT CACCTAAATAATGTCT GTGAAATTTGAGGTCAAC 72
R1-1 ----GTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTT CACCTAAATAATGTCT GTGAAATTTGAGGTCAAC 67
R2-1 ---TTGTACAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTT CACCTAAATAATGTCT GTGAAATTTGAGGTCAAC 69
*****

maye CTCGATGTACGAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGAGCCTTCCAGGACGATCTCCGCAAAAGTTGGCAGAC 90
R2-2 CTCGATGTACGAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGAGCCTTCCAGGACGATCTCCGCAAAAGTTGGCAGAC 144
R1-1 CTCGATGTACGAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGAGCCTTCCAGGACGATCTCCGCAAAAGTTGGCAGAC 139
R2-1 CTCGATGTACGAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGAGCCTTCCAGGACGATCTCCGCAAAAGTTGGCAGAC 141
*****

maye AAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGCGGTGCTGCCACGACAACGAAGGAGCCCCGCAATGGTTC 162
R2-2 AAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGCGGTGCTGCCACGACAACGAAGGAGCCCCGCAATGGTTC 216
R1-1 AAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGCGGTGCTGCCACGACAACGAAGGAGCCCCGCAATGGTTC 211
R2-1 AAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGCGGTGCTGCCACGACAACGAAGGAGCCCCGCAATGGTTC 213
*****

maye GACCTGAGACTAACAGGCGCCGGAGGAGCACAGACCACAGTGAGGTTTCGCGTCGGCAACCTC GACGTGGTC 234
R2-2 GACCTGAGACTAACAGGCGCCGGAGGAGCACAGACCACAGTGAGGTTTCGCGTCGGCAACCTC GACGTGGTC 288
R1-1 GACCTGAGACTAACAGGCGCCGGAGGAGCACAGACCACAGTGAGGTTTCGCGTCGGCAACCTC GACGTGGTC 283
R2-1 GACCTGAGACTAACAGGCGCCGGAGGAGCACAGACCACAGTGAGGTTTCGCGTCGGCAACCTC GACGTGGTC 285
*****

maye GGTATCAGATGGGGACGACCTGGTACGAGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATTCCTCAACTCTCAG 306
R2-2 GGTATCAGATGGGGACGACCTGGTACGAGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATTCCTCAACTCTCAG 360
R1-1 GGTATCAGATGGGGACGACCTGGTACGAGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATTCCTCAACTCTCAG 355
R2-1 GGTATCAGATGGGGACGACCTGGTACGAGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATTCCTCAACTCTCAG 357
*****

maye TTCTTGGGCTTCAGAGGCGACTAC GGGGCACTGGCAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTA 379
R2-2 TTCTTGGGCTTCAGAGGCGACTAC GGGGCACTGGCAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTA 433
R1-1 TTCTTGGGCTTCAGAGGCGACTAC GGGGCACTGGCAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTA 428
R2-1 TTCTTGGGCTTCAGAGGCGACTAC GGGGCACTGGCAAACGCAGCAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAACCTTA 430
*****

maye ATGTATACGGTTTCGAAGCAGCTGTGAAAACACTCGCCACGTCCACAAAAGGCAACGAGGGGGCAGAGGCACT 452
R2-2 ATGTATACGGTTTCGAAGCAGCTGTGAAAACACTCGCCACGTCCACAAAAGGCAACGAGGGGGCAGAGGCACT 506
R1-1 ATGTATACGGTTTCGAAGCAGCTGTGAAAACACTCGCCACGTCCACAAAAGGCAACGAGGGGGCAGAGGCACT 501
R2-1 ATGTATACGGTTTCGAAGCAGCTGTGAAAACACTCGCCACGTCCACAAAAGGCAACGAGGGGGCAGAGGCACT 503
*****

maye GATAGTCGTGGCTCAGTTGGTCTCC GAAGCCTGC AGATTTCCTCATCTCTCCAACGCTCTCTCAACCAGGATA 525
R2-2 GATAGTCGTGGCTCAGTTGGTCTCC GAAGCCTGC AGATTTCCTCATCTCTCCAACGCTCTCTCAACCAGGATA 579
R1-1 GATAGTCGTGGCTCAGTTGGTCTCC GAAGCCTGC AGATTTCCTCATCTCTCCAACGCTCTCTCAACCAGGATA 574
R2-1 GATAGTCGTGGCTCAGTTGGTCTCC GAAGCCTGC AGATTTCCTCATCTCTCCAACGCTCTCTCAACCAGGATA 576
*****

maye AACGACCCAACGCTCTCTATCTCAAGCAATGGATGCTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTACTCTG 598
R2-2 AACGACCCAACGCTCTCTATCTCAAGCAATGGATGCTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTACTCTG 652
R1-1 AACGACCCAACGCTCTCTATCTCAAGCAATGGATGCTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTACTCTG 647
R2-1 AACGACCCAACGCTCTCTATCTCAAGCAATGGATGCTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTACTCTG 649
*****

maye AGATTTTGTATGTGCTACAATAACTTTCCCGGCACTTACAACCTCCCAAACCGATCATAAACCAAAATGTAAT 671
R2-2 AGATTTTGTATGTGCTACAATAACTTTCCCGGCACTTACAACCTCCCAAACCGATCATAAACCAAAATGTAAT 725
R1-1 AGATTTTGTATGTGCTACAATAACTTTCCCGGCACTTACAACCTCCCAAACCGATCATAAACCAAAATGTAAT 720
R2-1 AGATTTTGTATGTGCTACAATAACTTTCCCGGCACTTACAACCTCCCAAACCGATCATAAACCAAAATGTAAT 723
*****

```

```

maye  CGCGACGGCTAACGAACTGCGCAAATACTTGGTATCCTGCTCAACGTTGAAGTTAACTACCAA----- 735
R2-2  CGCGACGGCTAACGAACTGCGCAAATACTTGGTATCCTGCTCAACGTTGAAGTTAACTACCAA---AAGGGT 795
R1-1  CGCGACGGCTAACGAACTGCGCAAATACTTGGTATCCTGCTCAACGTTGAAGTTAACTACCAA TGA AAGGGT 793
R2-1  CGCGACGGCTAACGAACTGCGCAAATACTTGGTATCCTGCTCAACGTTGAAGTTAACTACCAA---AAGGGT 793
*****

maye  -----
R2-2  GGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTCGATCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTA 868
R1-1  GGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTCGATCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTA 866
R2-1  GGGCGCGCCGACCCAGCTTCTTGTACAAAGTGGTTCGATCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTA 866

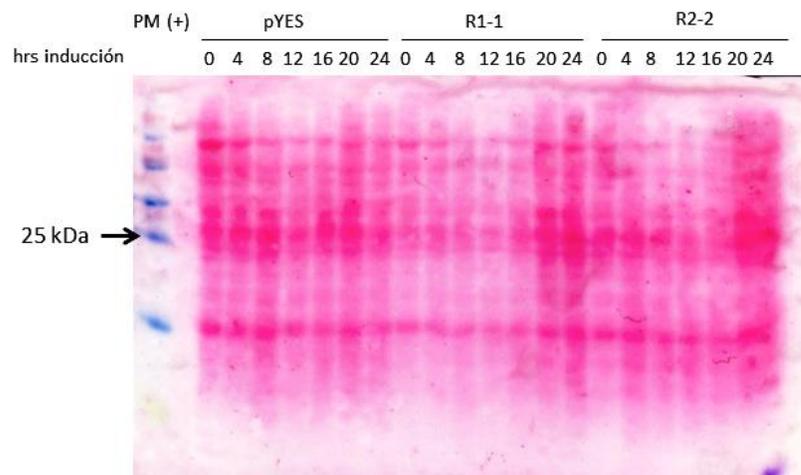
maye  -----
R2-2  ACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGT CATCATCACCATCACCAT TGA GTTTAAACCCGCTGATC 941
R1-1  ACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGT CATCATCACCATCACCAT TGA GTTTAAACCCGCTGATC 939
R2-1  ACCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGT CATCATCACCATCACCAT TGA GTTTAAACCCGCTGATC 939

maye  -----
R2-2  CTAGAGGGCCGCATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATCACG--- 987
R1-1  CTAGAGGGCCGCATCATGTAATTAGTTATGTCACG----- 901
R2-1  CTAGAGGGCCGCATCATGTAATTAGTTATGTCACGCTA-CATCACGCCT 987

```

Secuencias obtenidas de los vectores R1 y R2: alineamiento hecho con el programa *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Para el ensamble se usó la secuencia de la mayehuelina madura como referencia. Se resalta en verde el codón de inicio de la traducción que se encuentra dentro de la secuencia Kozak consenso (amarillo), en azul se indican los codones correspondientes a los aminoácidos del sitio catalítico, en gris el epítipo V5 y la cola de histidinas y en rojo el codón de paro.

S3.- Transferencia a membrana de nitrocelulosa de las fracciones proteicas provenientes de la inducción con galactosa de las cepas R1-1, R2-2 y pYES



Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau al 1 %. Imagen obtenida con escáner *Cannon LIDE 100*

S4.- Análisis estadístico de los ensayos de termotolerancia

Tratamiento control

Table Analyzed		Data 1			
ANOVA summary					
F	0.7978				
P value	0.4929				
P value summary		ns			
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)			No		
R square	0.2101				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.8375 (2, 6)				
P value	0.4778				
P value summary		ns			
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)			No		
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2.419E+12	2	1.209E+12	F (2, 6) = 0.7978	P = 0.4929
Residual (within columns)	9.096E+12	6	1.516E+12		
Total	1.151E+13	8			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	9				

Number of families		1						
Number of comparisons per family		3						
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary			
pYES vs. R1-1		-1260000	-4.345e+006 to 1.825e+006	No	ns			
pYES vs. R1-2		-766667	-3.851e+006 to 2.318e+006	No	ns			
pYES vs. R1-3		493333	-2.591e+006 to 3.578e+006	No	ns			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
pYES vs. R1-1	2393000	3653000	-1260000	1005000	3	3	1.773	6
pYES vs. R2-2	2393000	3160000	-766667	1005000	3	3	1.079	6
R1-1 vs. R2-2	3653000	3160000	493333	1005000	3	3	0.694	6

Termotolerancia basal

Table Analyzed	Data 1				
ANOVA summary					
F	3.62				
P value	0.0931				
P value summary	ns				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)			No		
R square	0.5468				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.8952 (2, 6)				
P value	0.4568				
P value summary	ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)			No		
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	1.14E+15	2	5.698E+14	F (2, 6) = 3.620	P = 0.0931
Residual (within columns)	9.445E+14	6	1.574E+14		
Total	2.084E+15	8			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	9				

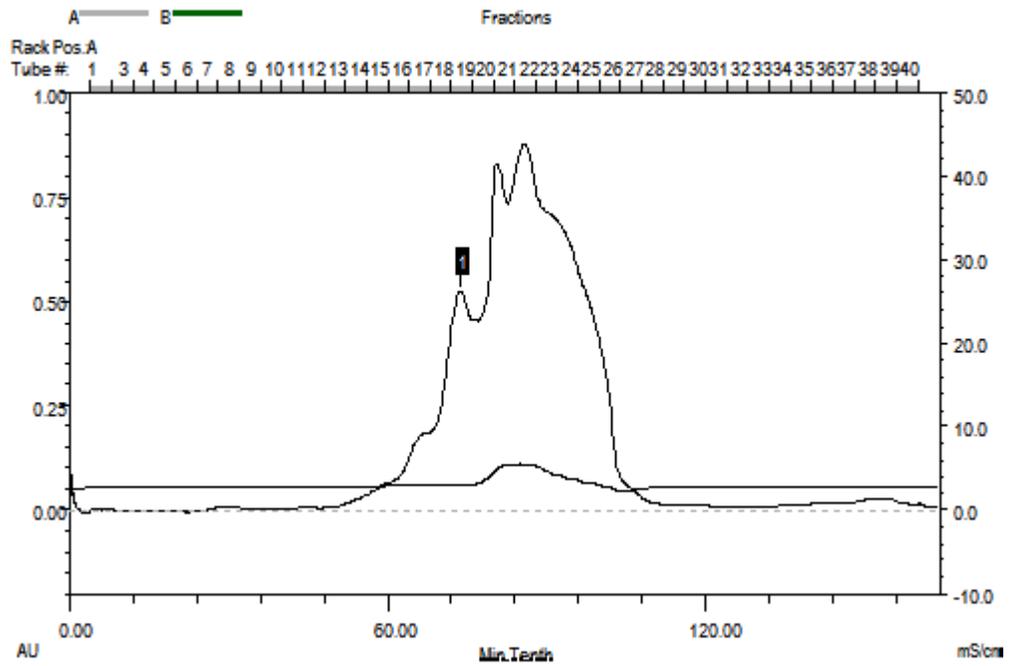
Number of families		1						
Number of comparisons per family		3						
Alpha	0.05							
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary			
pYES vs. R1-1		22640000	-5.407e+007 to 8.792e+006	No	ns			
pYES vs. R2-2		22930000	-2.914e+007 to 3.372e+007	No	ns			
R1-1 vs. R2-2		24930000	-6.498e+006 to 5.636e+007	No	ns			
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF
pYES vs. R1-1	72930000	29930000	-22640000	10240000	3	3	3.126	6
pYES vs. R2-2	72930000	50000000	22930000	10240000	3	3	0.3166	6
R1-1 vs. R2-2	29930000	50000000	24930000	10240000	3	3	3.442	6

Termotolerancia inducida

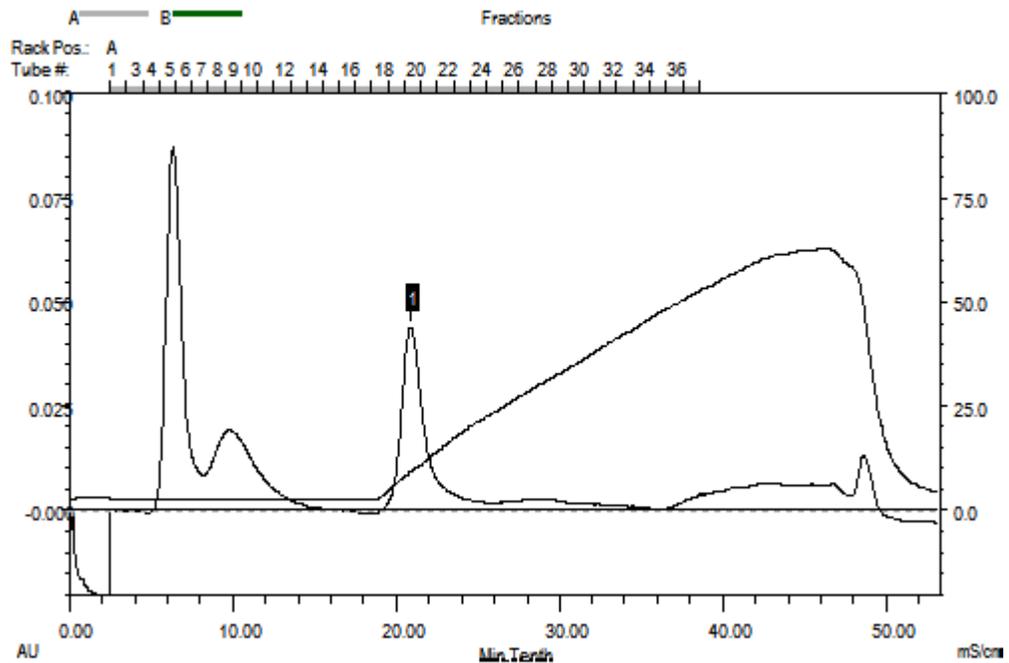
Table Analyzed	Data 1				
ANOVA summary					
F	0.7978				
P value	0.4929				
P value summary	ns				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)			No		
R square	0.2101				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.8375 (2, 6)				
P value	0.4778				
P value summary	ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)			No		
Bartlett's test					
Bartlett's statistic (corrected)					
P value					
P value summary					
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)					
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2.419E+12	2	1.209E+12	F (2, 6) = 0.7978	P = 0.4929
Residual (within columns)	9.096E+12	6	1.516E+12		
Total	1.151E+13	8			
Data summary					
Number of treatments (columns)	3				
Number of values (total)	9				

Number of families		1							
Number of comparisons per family		3							
Alpha		0.05							
Tukey's multiple comparisons test		Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary				
pYES vs. R1-1		-1260000	-4.345e+006 to 1.825e+006	No	ns				
pYES vs. R2-2		-766667	-3.851e+006 to 2.318e+006	No	ns				
R1-1 vs. R2-2		493333	-2.591e+006 to 3.578e+006	No	ns				
Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff.	SE of diff.	n1	n2	q	DF	
pYES vs. R1-1		2393000	3653000	-1260000	1005000	3	3	1.773	6
pYES vs. R2-2		2393000	3160000	-766667	1005000	3	3	1.079	6
R1-1 vs. R2-2		3653000	3160000	493333	1005000	3	3	0.694	6

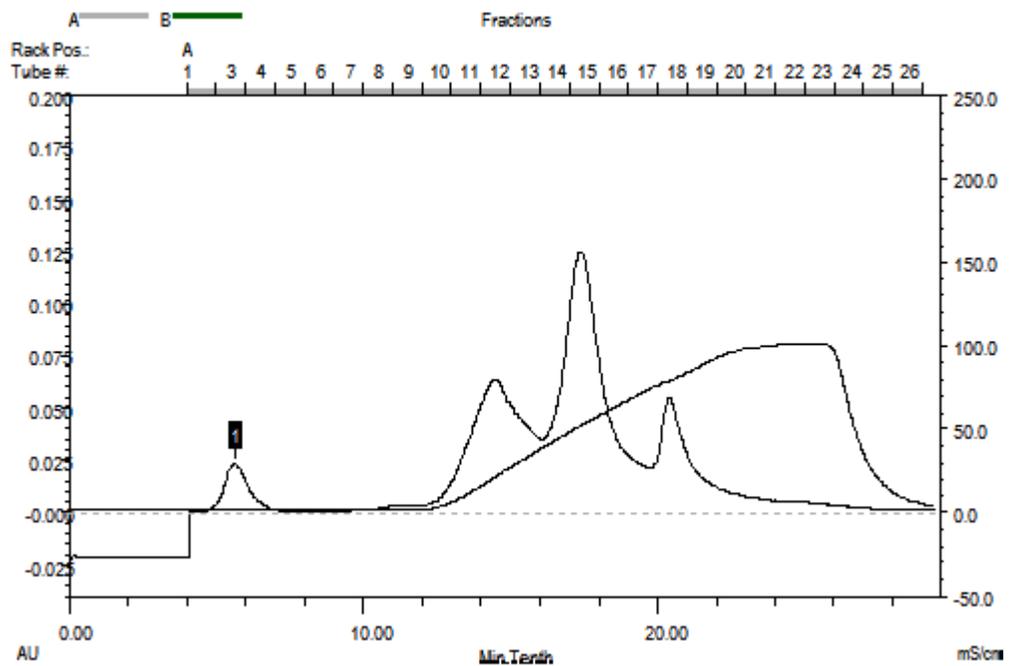
S5.- Cromatogramas de la purificación de la mayehuelina de *A. tequilana*



S5a: Cromatografía de exclusión molecular. Se indica con una etiqueta la fracción 19 donde se detectó a la mayehuelina por medio del *western blot*.

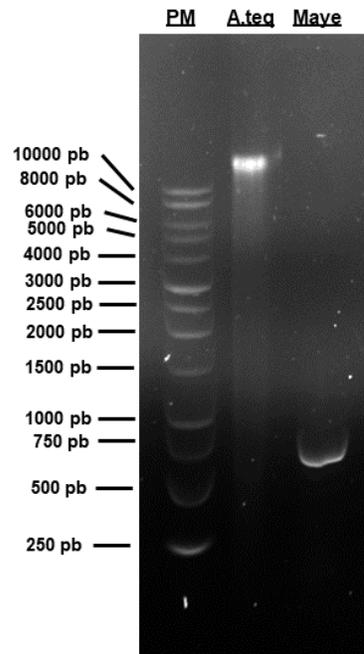


S5b: Cromatografía en columna de hidroxiapatita. la etiqueta indica las fracciones 19, 20 y 21 donde se detectó a la mayehuelina por medio del *western blot*.



S5c: Cromatografía de intercambio aniónico. Se indica con una etiqueta la fracción 20 donde se detectó a la mayehuelina por medio del western blot.

S6.- DNA de *A. tequilana* y amplificación mediante PCR del gen *Mayehuelina*



DNA extraído de *A. tequilana* y gen *Mayehuelina* amplificado mediante PCR resueltos mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Gel teñido con *Midori Green* de *Nippon Genetics*.

S7.- Cuentas de luciferasa y su expresión relativa

Cuentas de luciferasa

	Saporina 13.3 nM	Mayehuelina 0.0 nM	Mayehuelina 15.4 nM	Mayehuelina 30.8 nM	Mayehuelina 61.6 nM	Mayehuelina 123.2 nM
Ensayo 1	622300	3818600	1171600	412400	71050	-57455
Ensayo 2	317910	1877210	709110	286510	57210	-33120
Ensayo 3	856300	7226800	2667800	1780300	784800	44536

Expresión relativa de luciferasa

	Saporina 13.3 nM	Mayehuelina 0.0 nM	Mayehuelina 15.4 nM	Mayehuelina 30.8 nM	Mayehuelina 61.6 nM	Mayehuelina 123.2 nM
Ensayo 1	0.1630	1	0.30681	0.10800	0.01861	-0.01505
Ensayo 2	0.1694	1	0.37775	0.15263	0.03048	-0.01764
Ensayo 3	0.1185	1	0.36915	0.24635	0.10860	0.00616

S8.- Análisis ANOVA del efecto de la mayehuelina sobre la inhibición de la traducción de la luciferasa

ANOVA summary					
F	252.2				
P value	< 0.0001				
P value summary	****				
Are differences among means statistically significant? (P < 0.05)	Yes				
R square	0.9906				
Brown-Forsythe test					
F (DFn, DFd)	0.8324 (5, 12)				
P value	0.5509				
P value summary	ns				
Significantly different standard deviations? (P < 0.05)	No				
ANOVA table	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Treatment (between columns)	2.063	5	0.4126	F (5, 12) = 252.2	P < 0.0001
Residual (within columns)	0.01963	12	0.001636		
Total	2.082	17			
Number of treatments (columns)	6				
Number of values (total)	18				

Number of families	1			
Number of comparisons per family	15			
Alpha	0.05			
Tukey's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Saporina 13.3 nM vs. Mayehuelina 0.0 nM	-0.8497	-0.9606 to -0.7388	Yes	****
Saporina 13.3 nM vs. Mayehuelina 15.4 nM	-0.201	-0.3119 to -0.09006	Yes	***
Saporina 13.3 nM vs. Mayehuelina 30.8 nM	-0.01872	-0.1296 to 0.09219	No	ns
Saporina 13.3 nM vs. Mayehuelina 61.6 nM	0.09771	-0.01320 to 0.2086	No	ns
Saporina 13.3 nM vs. Mayehuelina 123.2 nM	0.1591	0.04820 to 0.2700	Yes	**
Mayehuelina 0.0 nM vs. Mayehuelina 15.4 nM	0.6488	0.5378 to 0.7597	Yes	****
Mayehuelina 0.0 nM vs. Mayehuelina 30.8 nM	0.831	0.7201 to 0.9419	Yes	****
Mayehuelina 0.0 nM vs. Mayehuelina 61.6 nM	0.9474	0.8365 to 1.058	Yes	****
Mayehuelina 0.0 nM vs. Mayehuelina 123.2 nM	1.009	0.8979 to 1.120	Yes	****
Mayehuelina 15.4 nM vs. Mayehuelina 30.8 nM	0.1822	0.07134 to 0.2932	Yes	**
Mayehuelina 15.4 nM vs. Mayehuelina 61.6 nM	0.2987	0.1878 to 0.4096	Yes	****
Mayehuelina 15.4 nM vs. Mayehuelina 123.2 nM	0.3601	0.2492 to 0.4710	Yes	****
Mayehuelina 30.8 nM vs. Mayehuelina 61.6 nM	0.1164	0.005518 to 0.2273	Yes	*
Mayehuelina 30.8 nM vs. Mayehuelina 123.2 nM	0.1778	0.06692 to 0.2887	Yes	**
Mayehuelina 61.6 nM vs. Mayehuelina 123.2 nM	0.0614	-0.04951 to 0.1723	No	ns

S9.- Cálculo de IC₅₀ de la mayehuelina sobre la traducción *in vitro* de la luciferasa

Datos normalizados

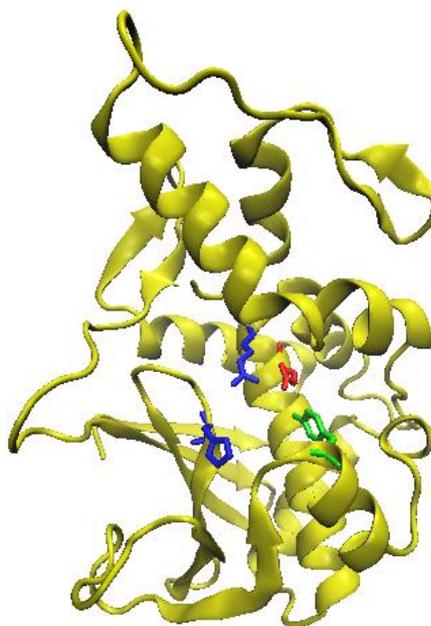
Log([] mayehuelina)	% de inhibición		
	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
0	100	100	100
1.187521	30.97336	38.03677	37.18108
1.488551	11.17548	15.61945	24.95213
1.789581	2.273988	3.455966	11.23503
2.090963	-1.077077	-1.335694	2.412771

Cálculo de IC₅₀

log(inhibitor) vs. normalized response -- Variable slope	
Best-fit values	
LogIC50	1.04
HillSlope	-1.644
IC50	10.97

Std. Error	
LogIC50	0.03661
HillSlope	0.1975
95% Confidence Intervals	
LogIC50	0.9613 to 1.119
HillSlope	-2.070 to -1.217
IC50	9.147 to 13.17
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	13
R square	0.989
Absolute Sum of Squares	218.3
Sy.x	4.098
Number of points	
Analyzed	15

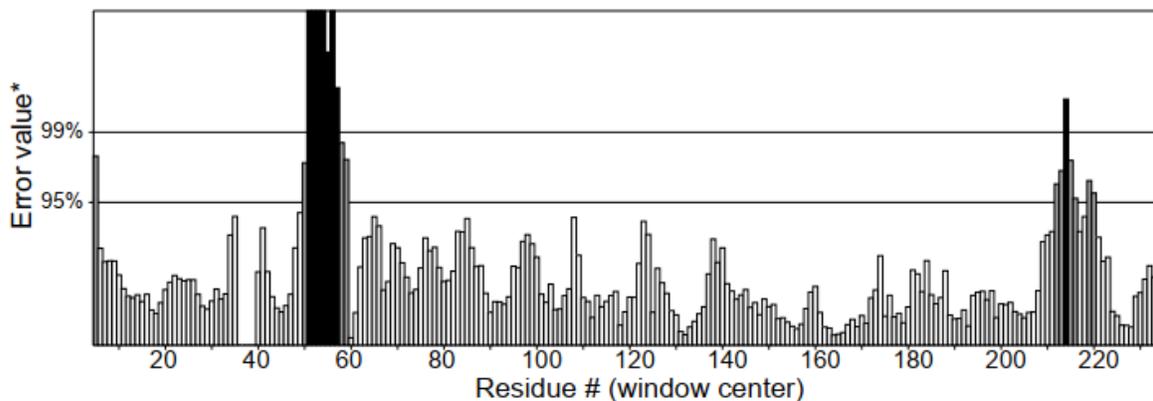
S10.- Modelamiento por homología de la mayehuelina conteniendo histidina en su sitio catalítico



Se muestran resaltados los aminoácidos que componen el sitio catalítico. Modelo creado con el servidor Swiss-Model [<https://swissmodel.expasy.org>] Imágenes editadas con el visor molecular "VMD" v1.9.3.

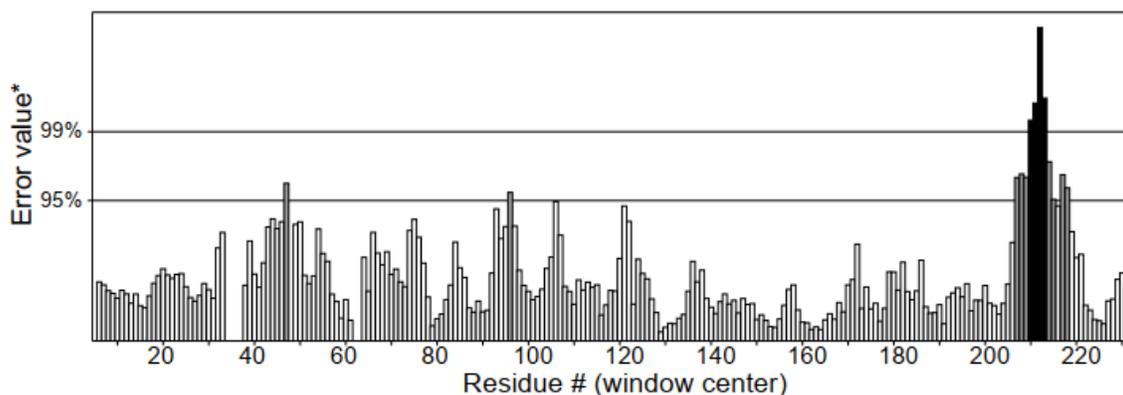
S11.- Validación de los modelos por homología de la mayehuelina D78 y la mayehuelina H78

Overall quality factor**: 92.070

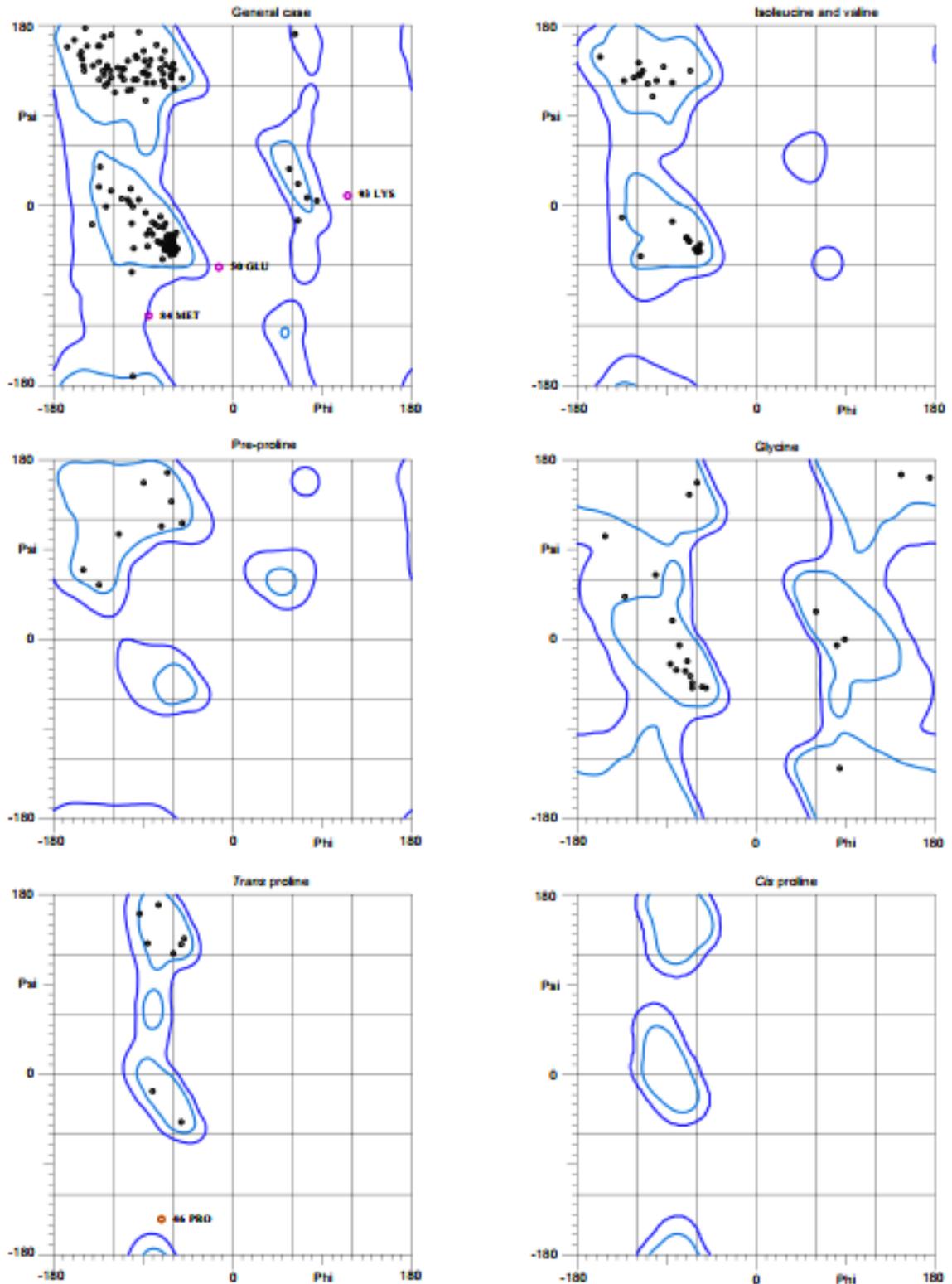


Prueba ERRAT [<http://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>]del modelo por homología de la mayehuelina versión aspartato.

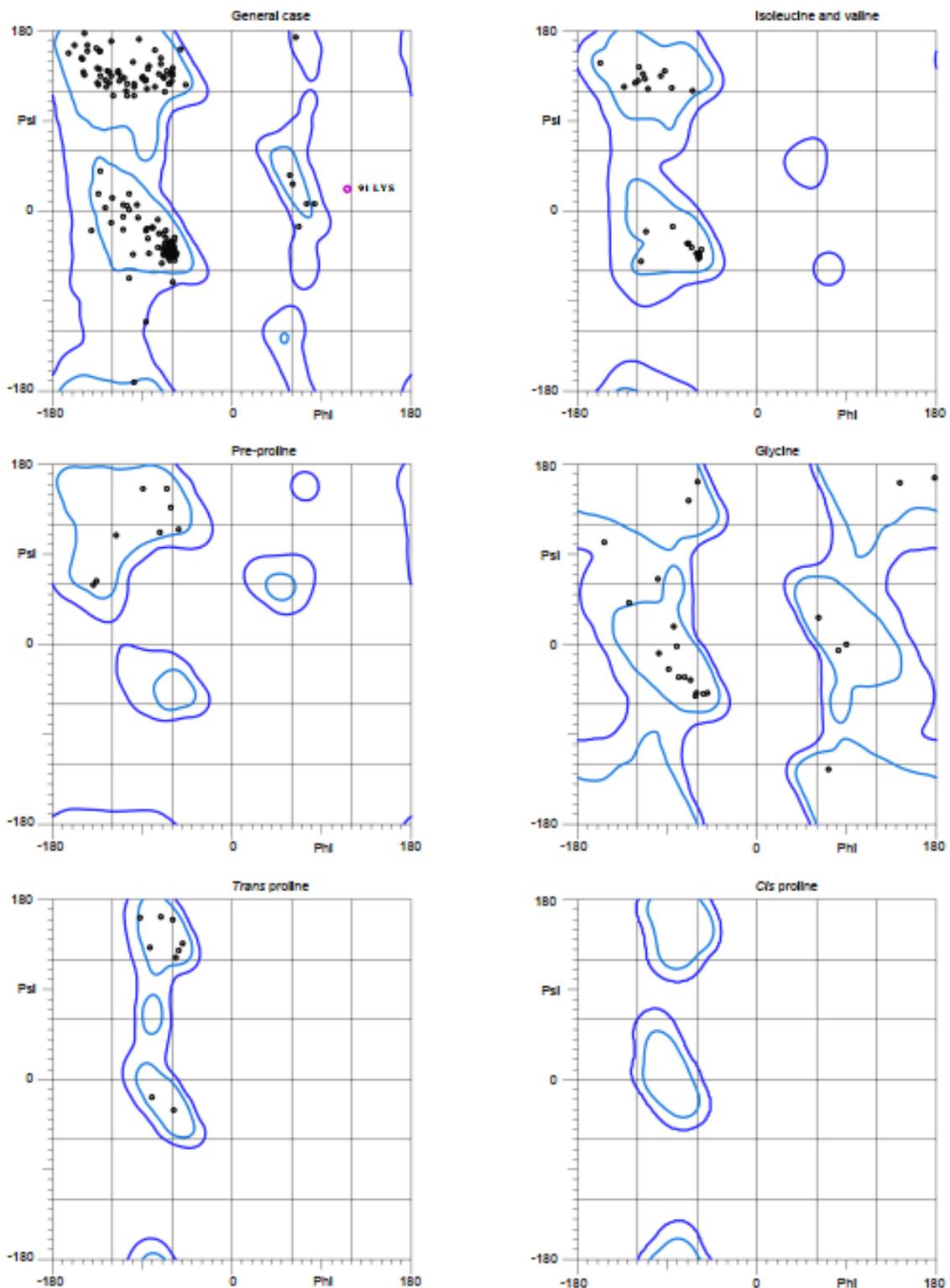
Overall quality factor**: 94.118



Prueba ERRAT [<http://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>]del modelo por homología de la mayehuelina versión histidina.

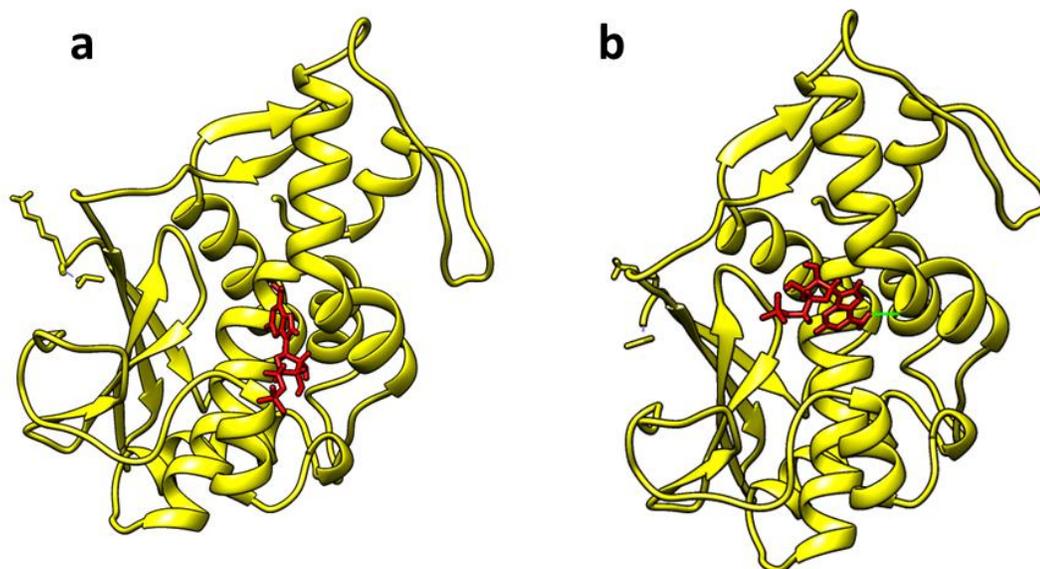


Gráfica de Ramachandran del modelo de la mayahuelina H78. El 94.1% de los aminoácidos (223/237) están en regiones favorables y el 98.3% de los aminoácidos (233/237) se encuentran en regiones permitidas. Solo cuatro aminoácidos P46, E50, M84 y L93 se localizaron fuera de regiones permitidas. Gráfico generado con el servidor *Molprobit* [<http://molprobit.biochem.duke.edu>]



Gráfica de Ramachandran del modelo de la mayehuelina D78. El 94.9% de los aminoácidos (223/235) están en regiones favorables y el 99.6% de los aminoácidos (234/235) se encuentran en regiones permitidas. Solo un aminoácido L91 se localizó fuera de las regiones permitidas. Gráfico generado con el servidor *Molprobability* [<http://molprobability.biochem.duke.edu>]

S12.-Análisis de interacción proteína-ligando de la mayehuelina D78 y la mayehuelina H78 con la adenina monofosfato



Interacción proteína-ligando entre la adenina monofosfato y las dos isoformas de la mayehuelina de *A. tequilana*. a) versión con aspartato. b) versión con histidina. Modelos por homología contruidos en el servidor Swiss-Model [<https://swissmodel.expasy.org>]. Estructura del AMP obtenida de la base de datos [<http://zinc.docking.org>]. Análisis realizados con el servidor SwissDock [<http://www.swissdock.ch>]. Imágenes editadas con el programa *UCSF Chimera* v1.11.2

Energía libre de Gibbs de la interacción de AMP con las dos versiones de la mayehuelina de *A. tequilana*

Proteína	Ligando	Unión al sitio activo	ΔG (kCal/Mol)
Mayehuelina D78	AMP	si	-7.76
Mayehuelina H78	AMP	si	-9.55