



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

LA PROTEÍNA ESTILAR HT-B INTERACCIONA CON
UNA CINESINA DEL TUBO POLÍNICO DE *NICOTIANA*
ALATA

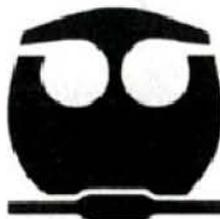
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

Beatriz Alejandra Ávila Castañeda

Tutor: Dr. Felipe Cruz García



Ciudad Universitaria
México D.F. Diciembre, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica, en la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Medicina, UNAM

Se le reconoce el apoyo de la Q. Laurel Fabila del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

El proyecto fue apoyado por DGAPA-UNAM (IN207406) Y PAIP-UNAM (629015). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Luis Cárdenas Torres	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. León Patricio Martínez Castilla	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Martha Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Roberto Coria Ortega	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Al comité tutorial, por las críticas y aportaciones a lo largo de la maestría: Dra. Martha Patricia Coello, Dr. Roberto Coria Ortega y al Dr. Felipe Cruz García.

Al comité de evaluación del trabajo: Dra. Marina Gavilanes Ruiz, Dr. Luis Cárdenas Torres y al Dr. León Patricio Martínez Castilla.

A Leticia García y Adelina Gonzalez por su paciencia y compromiso

A todos mis compañeros y amigos del conjunto E, en especial a Lilia, Daniel, Manuela, Mariana Rivas y Diana.

A las personas del laboratorio 104 quienes siempre me tendieron su mano: Claudia, Goyo, Yuridia, Alex y en especial a Javier, Karina y Andreita por la bella amistad que surgió en este nicho.

Al Dr. Felipe Cruz quien tuvo la agudeza y paciencia de dirigir este trabajo

En especial a mi familia y a todos mis amigos.

ÍNDICE

Introducción 1
Antecedentes 3
Generalidades de la flor 3
Polinización, germinación y crecimiento del tubo polínico 3
Sistemas de Incompatibilidad 4
Heteromórfico 5
Homomórfico 6
Esporoófitico (SIE) 6
Gametoófitico (SIG) 8
SIG en Papaveraceae 9
SIG dependiente de S-RNasas 10
Las S-RNasas: determinantes de la auto-incompatibilidad en el pistilo 11
Determinante masculina SLF 12
Genes modificadores 12
La proteína HT-B 14
Modelos del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas 15
Modelo del inhibidor 15
Modelo de la tasa de degradación de S-RNasas 16
Modelo del secuestro de las S-RNasas en vacuolas 17
Planteamiento del problema 19
Hipótesis 20
Objetivos 21
Materiales y Métodos 22
Resultados 36
Clonación de la proteína HT-B en el vector con el dominio de unión 36
Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con el dominio de unión y el de activación al DNA de GAL4 37
Identificación de las interacciones físicas entre proteínas 38
Identificación de los cDNAs recombinados en pGADT7-rec 40
Corroboración de la interacción por apareamiento de levaduras 44
Corroboración de la interacción entre HT-B y NapK 44
Características de las cepas para el apareamiento 44
Apareamiento o "mating" 47
Patrón de expresión de la cinesina 2HY-9 en diferentes órganos de <i>N. alata</i> 48
Sobreexpresión de NapK en <i>E. coli</i> 49
Discusión 52
Conclusiones 61
Perspectivas 62
Bibliografía 63
Apéndices 71

RESUMEN

Los sistemas de incompatibilidad están presentes en la mayoría de las angiospermas, esto permite que se genere mayor diversidad genética al restringir el proceso de fecundación. *Nicotiana glauca* es una planta que presenta un sistema de autoincompatibilidad gametofítico (GSI). Este sistema es controlado genéticamente por un locus multialélico conocido como el locus *S* el cual contiene a la determinante femenina (S-RNasa) y a la determinante masculina (SLF/SBF) quienes dirigen el rechazo del polen. Además de las determinantes de especificidad (SLF y S-RNasa), para que ocurra la respuesta de rechazo del polen satisfactoriamente se requiere de los productos de genes modificadores expresados en el estilo. Uno de ellos es el gen de la proteína HT-B, la cual es una proteína de secreción específica del estilo con una masa molecular de 8.2 kD. Cuando HT-B es silenciada técnicamente, en *Nicotiana glauca* y *Lycopersicon esculentum* con RNAi y RNA antisentido, las plantas transgénicas resultantes pierden la capacidad de rechazar el polen propio. Además, se sabe que en cruzas compatibles HT-B es degradada en los tubos polínicos por una proteína hipotética, evidenciando que la presencia de HT-B es necesaria para el rechazo del polen. En esta investigación proponemos que la estabilidad de HT-B, o cualquier otra función que HT-B lleve a cabo en el tubo polínico, depende de su interacción física con proteínas del TP. Por lo tanto, nuestro objetivo consistió en investigar las interacciones físicas entre HT-B y proteínas del polen de *N. glauca*. Para identificar los factores que interaccionen físicamente con HT-B, se realizó la técnica del doble híbrido en *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando una biblioteca de cDNA de polen, que se tamizó con la proteína HT-B como anzuelo. El ensayo reveló que la proteína HT-B interacciona con diferentes proteínas del polen. Una de estas interacciones fue caracterizada más a fondo encontrándose que HT-B interacciona con un fragmento de la cadena pesada de una proteína motora tipo cinesina de *Arabidopsis thaliana* y *Gossypium hirsutum*. En el trabajo se confirma que la interacción entre HT-B y la cinesina en *S. cerevisiae* es real al ser corroborada en ensayos de doble híbrido y de apareamiento. Asimismo se encontró que la expresión de la cinesina no es específica del polen, y que el tipo de cinesinas con las que comparte identidad pertenecen a la familia Kinesin-14, las cuales caminan hacia el extremo negativo de los microtúbulos que es el lado opuesto al crecimiento del tubo polínico, de esta manera se propone que la interacción entre HT-B y la cinesina dirigen el transporte retrógrado de las S-RNasas hacia el retículo endoplásmico de acuerdo al modelo propuesto por McClure, (2006).

ABREVIATURAS

ABP	Proteínas asociadas a filamentos de actina (actin binding protein)
AI	Autoincompatibilidad
AC	Autocompatible
BT	(Breakthrough)
cDNA	Cadena de DNA complementario
cDNAds	DNA complementario de doble cadena
COPI	Proteínas COPI que cubren las vesículas
COPII	Proteínas COPII que cubren las vesículas
DEPC	Diethylpicrocarbonato
DF	Determinante femenina
DO	Densidad óptica
DM	Determinante masculina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
DTT	1,4-ditiotrietol
GM	Gen o genes modificadores
GST	Proteína glutathion S transferasa (glutathion transferase protein)
IPTG	Isopropiltiogalactosido
KAPP	Proteína tipo cinasa asociada a fosfatasa (kinase associated protein phosphatase)
KHC	Cadena pesada de la cinesina
KLC	Cadena ligera de la cinesina
MAP	Proteína asociada a microtubulos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
MAT	Tipo de apareamiento (mating type)
MIP-MOD	Proteína intrínseca principal (Major intrinsic protein)
MLPK	Proteína tipo cinasa del locus MOD
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MTCO	Centro de organización de microtubulos
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PSV	Vacuolas de almacén de proteínas
PVC	Compartimentos prevacuolares
RE	Reticulo endoplásmico

RNA	Ácido ribonucleico
ScHT-B	Proteína HT-B de <i>Solanum chacoense</i>
SCP	Complejo Skp1/Cullin ó CDC53/F-box
SCR	Proteína rica en residuos de cisteína del locus S
SI	Sistema de incompatibilidad
SIE	Sistema de incompatibilidad esporofítico
SIG	Sistema de incompatibilidad gametofítico
SLF	Determinante masculina, proteína del locus S con caja F
SRK	Receptor tipo cinasa del locus S
SNARE	Receptor de atracción sensible a N-etilmato-imido (N-ethylmate imide-sensitive attachment receptor)
SMARTIII	Switching Mechanism at 5´end of RNA Transcript
TP	Tubo polínico
t-SNARE	Proteína SNARE de la membrana blanco
TPR	Repeticiones tetratricopeptido
v-SNARE	Proteína SNARE de la vesícula
Y2H	Ensayo de doble híbrido

INTRODUCCIÓN

A lo largo de la evolución de las angiospermas, han aparecido sistemas de autoincompatibilidad (AI) que les permiten prevenir la autofecundación y promover la diversidad genética en las especies. La AI es un mecanismo por el cual el pistilo puede distinguir y rechazar su propio polen mediante interacciones moleculares célula-célula (de Nettancourt, 1977).

La AI es clasificada en dos sistemas.- sistema de incompatibilidad esporofítica (SIE) y sistema de incompatibilidad gametofítica (SIG). Se controla genéticamente por un solo locus multialélico conocido como el locus S , el cual incluye dos unidades transcripcionales que determinan la especificidad de la respuesta de AI tanto en el polen como en el pistilo (Silva y Goring, 2001; Takayama e Isogai, 2005).

Nicotiana glauca es una solanácea que presenta SIG. En esta familia la determinante femenina de la AI es una glicoproteína básica conocida como S-RNasa (Anderson *et al.*, 1986; McClure *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1994). Esta proteína es específica de estilos y se transporta desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo al interior del tubo polínico (TP), probablemente por endocitosis y permanece en una vacuola si la cruce es compatible, no así en cruces incompatibles, en las que es liberada al citoplasma (Goldraij *et al.*, 2006). Una vez libre, la S-RNasa se comporta como agente citotóxico degradando el RNA del tubo polínico (Mc Clure *et al.*, 1989; Luu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1994). La determinante masculina (SLF) es una proteína con una caja F hacia la región del extremo amino (Entani *et al.*, 2003; O'Brien *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2004). La proteína SLF se localiza principalmente en el citoplasma del TP y cerca de la región periférica al retículo endoplásmico (Wang y Xue, 2005). La proteína SLF interacciona con las S-RNasas *in vivo* (Qiao *et al.*, 2004).

Para que el mecanismo del rechazo del polen ocurra se requiere de la interacción física de SLF con la S-RNasa de manera alelo S específica. Sin embargo, existe evidencia que otros factores no codificados en el locus S son necesarios para que ocurra el rechazo del polen. Estos factores se conocen como genes modificadores (GM) (McClure *et al.*, 2000).

El primer gen modificador clonado en *Nicotiana glauca* fue *HT-B* (McClure *et al.*, 1999). *HT-B* codifica una proteína pequeña de secreción de 8.2 kDa, rica en asparagina y aspartato hacia su extremo carboxilo. La participación de *HT-B* como GM en la AI fue demostrada cuando

este gen fue clonado y expresado en antisentido en plantas transgénicas de híbridos de *N. plumbaginifolia* X *N. alata* S₁₀₅-S₁₀₅, observándose que los híbridos perdieron la capacidad de rechazar el polen S₁₀₅ (McClure *et al.*, 1999). Otros estudios en *Lycopersicon esculentum* y *Solanum chacoense*, confirman la importancia de HT-B en la vía bioquímica del rechazo del polen como un GM (Kondo *et al.*, 2002-A). En la actualidad no se conoce a ciencia cierta cual es el papel bioquímico que desempeña HT-B en la respuesta de AI; sin embargo, se sabe que se introduce al citoplasma del tubo polínico en cruza compatibles e incompatibles, pero en el tubo polínico de cruza compatibles la proteína HT-B es degradada (Goldraj *et al.*, 2006). No obstante, se desconoce quien la estabiliza en cruza incompatibles o quien la degrada en cruza compatibles. Datos bioquímicos muestran que HT-B no interacciona físicamente con las S-RNasas, aunque no se sabe si lo hace con SLF.

Podrían existir dos maneras de estabilizar a HT-B en cruza incompatibles; 1) mediante alguna modificación postraduccional (i. e. fosforilación) ó 2) a través de la interacción con otras proteínas que formaran complejos con ella, las cuales podrían ser del propio polen o venir del estilo. Lo que es un hecho es que actualmente, las únicas proteínas estilares identificadas que participan directamente en el SIG son: las S-RNasas, 120K, HT-B y provenientes del polen solo SLF. El objetivo de este trabajo fue identificar proteínas del tubo polínico que interaccionaban físicamente con HT-B, con la finalidad de conocer factores que pudieran estabilizarla y de conocer otros elementos del tubo polínico que están en la vía de acción de HT-B para efectuar el rechazo del polen.

ANTECEDENTES

Generalidades de la flor

Las flores son estructuras especializadas en la reproducción que difieren en tamaño, color, forma y organización (Curtis, 2000). Están situadas en un receptáculo en donde se unen todos los verticilos florales (cáliz, corola, androceo y gineceo). El verticilo más externo, el cáliz, está formado por sépalos que constituyen la base. Junto a los sépalos crece la corola constituida por una serie de pétalos que generalmente son de colores brillantes y que rodean a los órganos reproductivos.

El gineceo es la parte femenina en la flor. El pistilo o carpelo se compone por el estigma, el estilo y el ovario. El estigma, se encuentra en la parte superior del estilo y está compuesto por múltiples células secretoras que funcionan como una superficie receptiva, en la cual se deposita el polen para germinar y desarrollar el tubo polínico (Howell, 1997). El estilo permite el crecimiento del tubo polínico guiándolo y nutriéndolo para que crezca a lo largo del tejido de transmisión hasta alcanzar el ovario, donde se encuentran los óvulos, los cuales por megagametogénesis forman el saco embrionario (gametofito femenino) compuesto generalmente por 7 células haploides, una de las cuales es la ovocélula.

La parte masculina de la flor (androceo) está formada básicamente por los estambres. Cada estambre se compone de un filamento largo que culmina en el extremo superior con una antera fértil generalmente bilobulada y tetralocular, en donde se desarrolla el polen. Las anteras tienen cuatro sacos polínicos o microesporangios, donde se forman los granos de polen (gametofito masculino) como producto de la microesporogénesis.

Polinización, germinación y crecimiento del tubo polínico

El polen, genera la célula vegetativa y la generativa, la que a su vez se dividirá en las células espermáticas que llevarán a cabo la doble fecundación.

La pared del polen es importante en eventos de reconocimiento entre el polen y el estigma. Se constituye de una capa interna conformada por pectincelulosa y una capa externa denominada exina compuesta de esporopolenina. En las últimas etapas del desarrollo del polen las células tapetales de la pared de la antera se desintegran y sus componentes cubren la superficie del polen formando lo que se conoce como trifina (Taylor, 1997).

De manera general, el proceso de polinización se inicia cuando los granos de polen son liberados del microesporangio y son transportados a la superficie del estigma por algún medio biótico o abiótico. Los granos de polen se adhieren al estigma y posteriormente se hidratan y germinan desarrollando el tubo polínico (TP). El TP crece a lo largo de la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar hasta encontrar el óvulo para liberar, en el saco embrionario de éste las células

esperáticas, ocurriendo la doble fecundación, que es característica de las plantas con flores (Angiospermas).

La polinización puede ser de dos tipos: 1) autopolinización, que ocurre cuando una planta hermafrodita es polinizada con su propio polen para fecundar a su ovocélula en el saco embrionario y 2) la polinización cruzada, que ocurre cuando el pistilo de una planta acepta polen de una planta diferente a ella, pero de su misma especie, lo que conlleva a la producción de nuevas y diferentes combinaciones alélicas que promueven la diversidad genética. Es por ello, que muchas especies evolucionaron para impedir o restringir la autopolinización (Charlesworth *et al.*, 2005).

El proceso de germinación del polen es complejo, componentes de la pared del polen, lípidos, proteínas tipo oleosinas y pequeñas moléculas aromáticas, como los flavonoides, son indispensables en la hidratación del polen y en el reconocimiento entre éste y el estigma (Taylor, 1997).

La germinación del polen y el crecimiento del tubo polínico hasta su encuentro con los óvulos es un proceso costoso. Existen diversos mecanismos como las vías de señalización, los fosfoinosítidos que controlan la endocitosis y exocitosis (Monteiro *et al.*, 2005), las proteínas de la familia RHO, como Rop que es una GTPasa que regula el gradiente de Ca^{2+} hacia la región apical del tubo polínico y la despolimerización de F-actina (Gu *et al.* 2003; Feijó *et al.*, 2004; Gu *et al.*, 2005) que deben prevalecer en una coordinación muy precisa para soportar el crecimiento del TP. Además de esto, coexisten otros mecanismos que limitan, en este nivel, la autofecundación en las plantas.

Sistema de autoincompatibilidad

Para evitar la autofecundación, las angiospermas desarrollaron diferentes mecanismos que van desde las barreras físicas a las genéticas, todas ellas englobadas en lo que se conoce como incompatibilidad sexual (Cruz-García y McClure, 2001).

La autoincompatibilidad (AI) se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil de producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). La AI es un mecanismo en el cual el pistilo de una planta reconoce y rechaza su propio polen, previniendo la autofecundación y promoviendo así la polinización cruzada.

Los sistemas de AI se pueden clasificar en dos grupos: 1) los sistemas heteromórficos y 2) los sistemas homomórficos, siendo los primeros los menos frecuentes en la naturaleza.

Sistema de Autoincompatibilidad Heteromórfico

En este tipo de AI las plantas producen distintos morfos florales en la población, los cuales están relacionados con diferentes posiciones de sus órganos reproductivos (pistilos y estambres), lo que establece barreras físicas y fisiológicas que impiden la autopolinización. Las plantas con este tipo de AI se clasifican en distílicas y trístílicas.

- Distílica.- Este tipo de sistema presenta dos morfos florales determinados a) PIN; morfo en las cuales el estilo es largo y los estambres cortos, y b) el morfo THRUM; presenta estilos cortos y los estambres largos (Fig. 1-A).
- Trístílica.- Presenta tres morfos florales y la clasificación se basa en el tamaño del estilo, es decir, las flores pueden tener un estilo corto, mediano o largo, minimizando así la probabilidad del depósito de polen propio en su estigma (Fig. 1-B).

Una característica importante en este tipo de arreglos morfológicos es que, además de la barrera física, el polen será únicamente compatible en aquellos casos en que coincida el tamaño de la antera con el del estilo en donde sea depositado (Fig. 1-B), de otra manera el polen será rechazado (de Nettancourt, 1977).

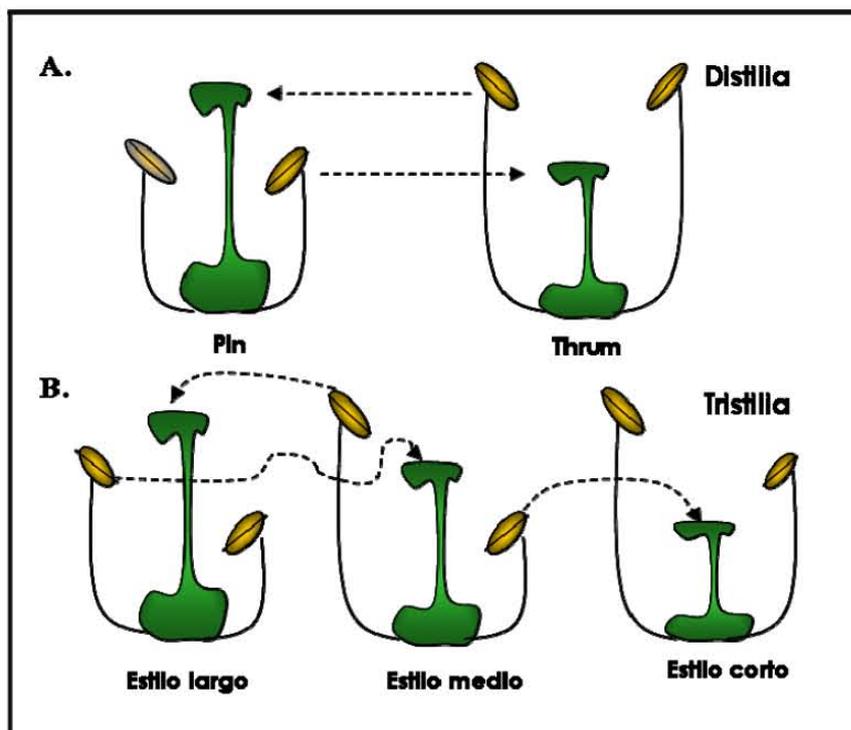


Figura 1. Sistemas de autoincompatibilidad heteromórficos. A) Distílica. B) Trístílica. Las líneas punteadas indican la compatibilidad del polen, relacionando el tamaño del estilo con el tamaño de las anteras.

Sistema de Incompatibilidad Homomórfico

En estos tipos de sistemas la incompatibilidad es controlada genéticamente por un solo locus multialélico conocido como el locus S , el cual incluye dos unidades transcripcionales, una que determina la especificidad de la respuesta de AI en el polen (determinante masculina) y otra en el pistilo (determinante femenina) (Takayama e Isogai, 2005). A pesar de que el control de la respuesta de AI está dictado por el locus S , el rechazo del polen se realiza por diversos mecanismos que han evolucionado de manera independiente (Charlesworth *et al.*, 2005). En algunas familias como Brassicaceae y Papaveraceae, el reconocimiento de las determinantes está dado por un mecanismo de ligando-receptor (Gaudet y McCornick, 1999; Takayama e Isogai, 2005). En Solanaceas, la determinante femenina tiene un papel citotóxico degradando el RNA del tubo polínico, abatiendo su crecimiento (McClure *et al.*, 1989). Es claro que en cada caso el tiempo de expresión de las determinantes de la especificidad es diferente, así como lo es su función, por ello los sistemas de incompatibilidad homomórficos se clasifican en: esporofítico y gametofítico.

Sistema de Incompatibilidad Esporofítico (SIE)

En el SIE, los productos del locus S correspondientes a la determinante masculina son expresados por células tapetales de la antera. En las últimas etapas de la maduración del polen, las células tapetales se desintegran y liberan sus proteínas, entre ellas las determinantes masculinas que serán depositados en la cubierta de los granos de polen en formación (Dickinson *et al.*, 2000). Si la planta es heterocigota, el polen portará los dos productos de los alelos S en su superficie, en cambio si la planta es homocigota, el polen solo portará un tipo de producto génico, en cualquiera de los dos casos el origen de los productos es de células esporofíticas.

El SIE se ha estudiado en familias como Brassicaceae y Convolvulaceae (Nasrallah y Nasrallah, 1993). La respuesta del rechazo del polen propio ocurre en la superficie del estigma, es rápida y por lo general evita la germinación del polen incompatible. Aunque en algunas ocasiones el polen llega a germinar, los tubos polínicos no penetran la cutícula del estigma y detienen su crecimiento casi inmediatamente.

En *Brassica* se identificaron y clonaron los genes que codifican para la determinante femenina (DF) y la determinante masculina (DM). La DF codifica un receptor con un dominio extracelular denominado S, una región transmembranal y un dominio citosólico con actividad de serina/treonina cinasa, conocido como SRK [S-locus Receptor Kinase](Fig. 2), el cual se expresa específicamente en las células papilares del estigma (Takasaki *et al.*, 2000); mientras que la DM

codifica una proteína de 8.4 kDa rica en cisteína (SCR= S-locus Cystein-Rich), que es sintetizada por las células tapetales de la antera y secretada a la cubierta del grano del polen (Stephenson *et al.*, 1997) (Fig. 2).

Cuando el ligando SCR y el receptor SRK del mismo haplotipo interactúan, se inicia una cascada de señales que concluye con la no hidratación y la no germinación del grano de polen (Takayama e Isogai, 2005). Se han identificado diferentes elementos en esta cascada de transducción. Se conocen dos moléculas reguladoras positivas, una de ellas es ARC1 [Armadillo Repeat Containing 1](Fig. 2), esta proteína es fosforilada e interacciona *in vivo* con la región citoplásmica del receptor SRK (Gu *et al.*, 1998), cuenta con una caja U que le confiere actividad de ligasa de ubiquitina E₃ (Stone *et al.*, 2003). Se propone que esta proteína está en la vía de degradación de proteínas mediante el proteosoma 26S, probablemente ARC1 marque a SRK para su degradación (Andersen *et al.*, 2004). Otra molécula reguladora positiva es la proteína MLPK [MOD locus Protein kinase](Fig. 2), la cual es una acuaporina tipo MIP-MOD [Major Intrinsic Protein] (Dixit *et al.*, 2001). Las acuaporinas forman canales que regulan el transporte de agua a través de las membranas. La proteína MLPK tiene un dominio de N-miristoilación y está anclada a la membrana plasmática de células del estigma, sugiriendo una cercanía con SRK y su posible interacción con ésta, por lo tanto, se propone que la proteína MLPK regula el transporte de agua a través de las membranas de las células del estigma para hidratar el polen que tenga un haplotipo S diferente al del estigma (Dixit *et al.*, 2001).

Otros componentes que regulan negativamente la cascada de transducción que da respuesta a la AI en *Brassica*, son las tioredoxinas THL1 y THL2. Estas proteínas interactúan con la región conservada de cisteínas del dominio transmembranal del receptor SRK. La interacción no es dependiente de fosforilación. La tioredoxina THL1 inhibe la autofosforilación de la actividad cinasa del receptor SRK (Takayama e Isogai, 2005). Otro regulador negativo aislado de *B. oleracea*, (Vanoosthuyse *et al.*, 2003) es una fosfatasa KAPP [kinase-associated protein phosphatase] que interactúa con el dominio cinasa de muchos receptores tipo cinasas. La proteína KAPP desfosforila a SRK inactivándola (Takayama e Isogai, 2005).

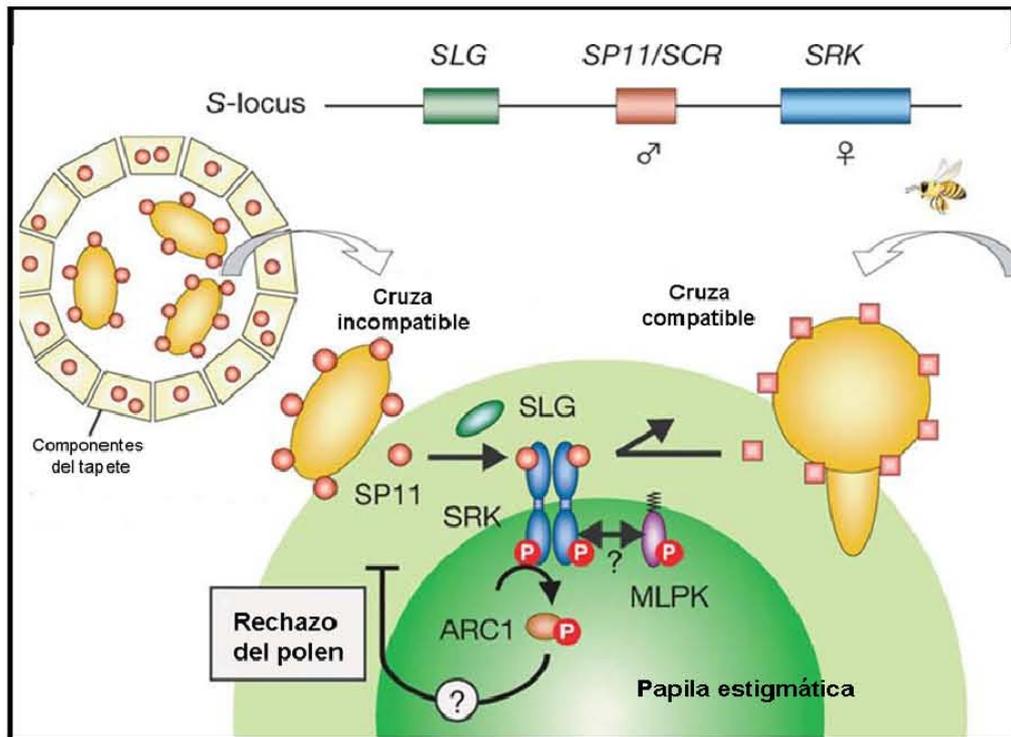


Figura 2. Representación molecular de SIE en Brassicaceae. En la parte de arriba se observa el locus *S* que contiene a las determinantes de la especificidad alélica. El receptor SRK es la determinante femenina, tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, este receptor se encuentran en las células papilares del estigma. La determinante masculina es la proteína SP11 que se encuentra abundantemente en la superficie del grano de polen. Después de la polinización, SP11 interacciona con el receptor SRK de forma alelo específica. La unión induce la autofosforilación del receptor conduciendo una cascada de señalización que finaliza con el rechazo del polen. La cascada de señalización no ha sido caracterizada, sin embargo, efectores positivos como MLPK y ARC1 se unen al receptor SRK indicando la importancia de estas proteínas en este sistema de incompatibilidad. Tomado de Takayama e Isogai, 2005

A pesar de que el sistema de incompatibilidad esporofítico es uno de los sistemas más descritos a nivel molecular, aún faltan factores por descubrir para describir la vía del rechazo del polen en Brassicaceae (Fig. 2).

Sistema de Incompatibilidad Gametofítico (SIG)

A diferencia del SIE, el sistema de incompatibilidad gametofítico (SIG) es el más difundido en las angiospermas y se ha descrito en más de 60 familias (Kao y McCubbin, 1996). En este caso, la determinante masculina se expresa después de la división meiótica de los microesporocitos, por ello, la respuesta de AI depende del genotipo haploide del grano de polen.

En especies con un SIG los granos de polen germinan y producen un TP, independientemente de su haplotipo *S*. Si la cruce es compatible, es decir no existe coincidencia entre el haplotipo *S* del polen con alguno del pistilo, el TP crecerá a lo largo del estilo hasta llegar al ovario; sin embargo, en cruces incompatibles, el tubo polínico será inhibido generalmente a nivel del estilo y no logrará alcanzar el ovario.

SIG en la familia Papaveraceae

Hasta la fecha solo se han identificado dos mecanismos diferentes para el SIG. El primero está descrito en Papaveraceas, en donde se propone que el reconocimiento entre las determinantes de la incompatibilidad ocurre por la interacción ligando-receptor. Es un mecanismo rápido: cuando el ligando interacciona con el receptor induce el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} , lo que promueve la despolimerización de filamentos de actina y evita el intercambio de vesículas de la zona apical del tubo polínico, lo que resulta en la inhibición de su crecimiento (Franklin-Tong y Franklin, 2003; Takayama e Isogai, 2005).

La determinante femenina en las Papaveraceas son proteínas S de secreción de 15 kDa. Las proteínas S, a diferencia de las determinantes en Brassicaceas (SIE) y en Solanaceas (SIG), no presentan una región hipervariable. El reconocimiento del polen radica en la estructura secundaria de estas proteínas compuesta por 6 hojas beta y 2 alfa hélices conectadas por 7 asas hidrofílicas. Estudios con mutaciones dirigidas muestran que las asparaginas presentes en el asa 6 son indispensables para no perder la capacidad de rechazar el polen (Kakeda *et al.*, 1998).

El gen de la determinante masculina en este sistema no se ha clonado; sin embargo, se sugiere que se localiza en la membrana plasmática del tubo polínico y que funciona como un receptor asociado a canales de calcio (Takayama e Isogai, 2005).

En respuesta a la interacción específica entre las determinantes en este sistema, se induce el rápido incremento de las concentraciones de calcio en el interior de los tubos polínicos. Normalmente el flujo parte de la región apical, pero cuando interaccionan las determinantes de la especificidad, la captación de calcio ocurre a través de todo el cuerpo del tubo polínico, lo que conlleva a la pérdida del gradiente de calcio que se tendría presentar a lo largo de éste (Franklin-Tong *et al.*, 2002). Como se sabe, el calcio juega un papel importante como segundo mensajero en diferentes cascadas de señalización. En el SIG en *Papaver* su función es interesante. Como consecuencia del incremento del calcio se observan diferentes cambios en el TP como: 1) la despolimerización de los filamentos de actina (Fig. 3). Al respecto, Huang *et al.* (2004) encontraron que proteínas como la Gelsolina y la Profilina conocidas como ABP que promueven la polimerización de la actina, pierden su capacidad de asociación a ésta (Huang *et al.*, 2004); 2) la fosforilación dependiente de calcio de una pirofosfatasa conocida como p26 (CDPK) (Fig. 3). Las pirofosfatasas conducen la biosíntesis celular catalizando reacciones para la producción de

paredes y membranas celulares, además de generar ATP, carbohidratos y proteínas (Rudd y Franklin-Tong, 2003); 3) también se propone que la fosforilación de una posible MAPK (mitogen-activated protein kinase) conocida como p56, probablemente desencadene la respuesta de muerte celular programada (PCD), (Rudd y Franklin-Tong, 2003) (Fig.3). En su conjunto, estos cambios dirigidos por el aumento de Ca^{2+} , aseguran que la respuesta del rechazo del polen en papaveraceas sea satisfactoria.

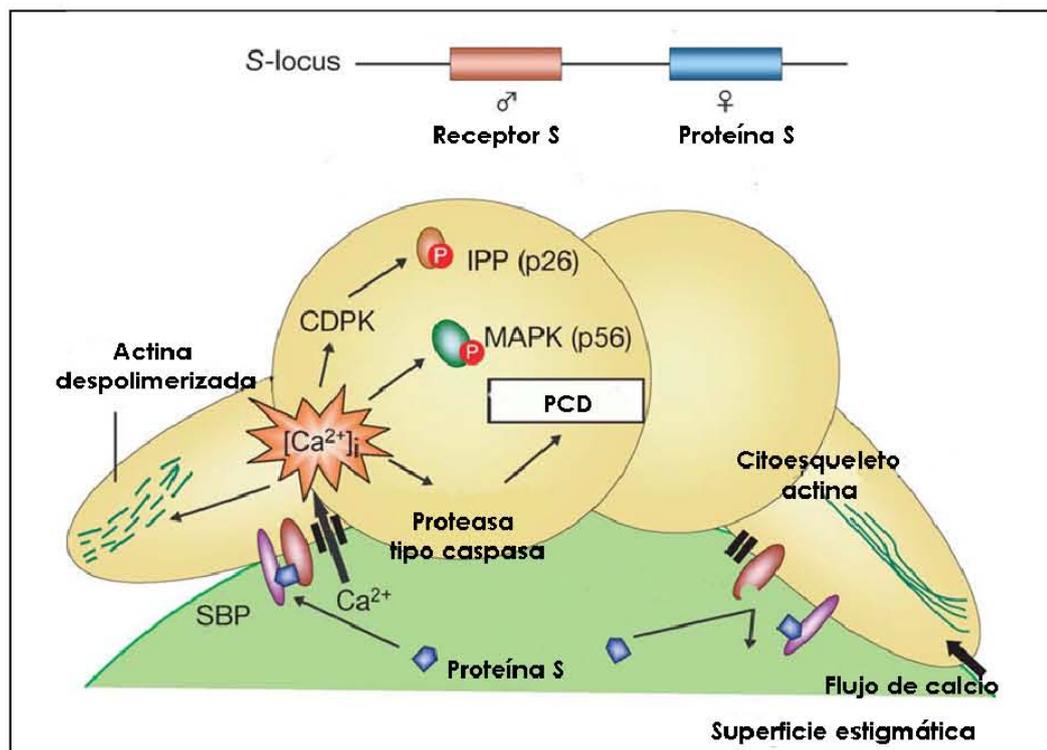


Figura 3. Modelo del rechazo del polen en *Papaver*. La determinante femenina es una proteína de secreción conocida como proteína S, esta proteína interactúa con la determinante masculina (DM), se sugiere que DM es un receptor que se encuentra a lo largo del tubo polínico, ya que la interacción entre las determinantes induce el flujo de Ca^{2+} por el cuerpo del tubo polínico. La proteína SBP se encuentra en la membrana plasmática del polen probablemente funcione como un receptor accesorio. El incremento de las concentraciones de Ca^{2+} conduce a la despolimerización de los filamentos de actina, la fosforilación de una pirofosfatasa p26 y de una MAPK p56 que puede desencadenar muerte celular programada (PCD) concluyendo en la inhibición del crecimiento del tubo polínico incompatible. Modificado de Takayama e Isogai, 2005.

SIG dependiente de S-RNasas

Este mecanismo del rechazo del polen se ha caracterizado en las familias Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae e involucra la degradación de RNA de tubos polínicos de cruza incompatibles. El modelo de estudio en el presente trabajo es *Nicotiana glauca*, planta perteneciente a la familia Solanaceae, por lo tanto se describirán con más detalle los factores y las determinantes que están involucrados en esta familia.

Las S-RNasas: determinantes de la auto-incompatibilidad en el pistilo

El grupo de Anderson *et al.* (1986) identificó y clonó en *N. alata* una proteína con una masa molecular de 32 kDa, esta proteína segregaba genéticamente con el fenotipo de AI para el alelo S_2 . Este grupo observó que esta proteína se encontraba en altas concentraciones en las regiones del estigma y del estilo y su funcionalidad parecía estar ligada, a los estilos maduros. Posteriormente McClure *et al.* (1989) mostraron la similitud en secuencia de aminoácidos de estas proteínas con las RNasas fúngicas T2 y Rh, y demostraron también que éstas proteínas tienen actividad de ribonucleasa.

La S-RNasa es una glicoproteína básica de alrededor de 30 kDa (Anderson *et al.*, 1986; Bredemeijer *et al.*, 1981; McClure *et al.*, 1989). Un análisis de comparación entre S-RNasas de diferentes especies, revela un rango de similitud entre éstas del 38% al 93% (Ai *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1992; Ishimizu *et al.*, 1998-B). Este análisis indica que las S-RNasas contienen 5 regiones conservadas nombradas de la C1 a la C5 (Ioerger *et al.*, 1991). Tres de estas regiones tienen mayor hidrofobicidad (C1, C4, C5) y comparten de 7 a 10 residuos de cisteína que están relacionados con la formación de cuatro puentes disulfuro que estabilizan la estructura terciaria de la proteína (Ioerger *et al.*, 1991). Entre las regiones C2 y C3 se encuentra el sitio activo, al igual que las RNasas fúngicas T2 y Rh, las S-RNasas conservan las dos histidinas necesarias para la actividad de ribonucleasa (McClure *et al.*, 1989). Además, las S-RNasas tienen dos regiones hidrofílicas con alto grado de variabilidad (regiones hipervariables Hva y Hvb), las cuales se sugiere que son las que interaccionan con la determinante masculina de manera alelo S específica (Ioerger *et al.*, 1991; Ishimizu *et al.*, 1998-A; Sims y Ordanic, 2001).

Por medio de experimentos de pérdida o ganancia de función se demostró que las S-RNasas son las determinantes alélicas de la AI en el pistilo (Huang *et al.*, 1994). Plantas transgénicas de *Petunia inflata* perdieron la capacidad de rechazar el polen: cuando una planta heterociga S_1S_2 fue transformada con el transgen para la S_1 -RNasa en antisentido, las plantas no pueden rechazar el polen S_1 , pero sí el polen S_2 . Por otra parte, cuando se expresó el transgen para la S_3 -RNasa en plantas S_1S_2 , se observó que estas plantas adquirieron la capacidad de rechazar el polen S_3 , demostrando de esta manera que las S-RNasas son las responsables de la especificidad alélica en el pistilo (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994).

Determinante masculina SLF

El gen que codifica la determinante masculina en Solanaceas y Scrophulariaceas, fue identificado en *Petunia inflata*, *Prunus mume* y en *Antirrhinum hispanicum* (Entani *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2004; Sijacic *et al.*, 2004) y fue denominado como SLF/SFB (S-locus F box protein). El gen *SLF/SFB* codifica para una proteína con caja F, se expresa únicamente en anteras y su transcrito es de alrededor de 1.4 kb. A pesar que las proteínas con caja F se asocian a las ligasas E₃ en la vía de degradación de proteínas, la función precisa del producto de SLF/SFB es aún desconocida. Se ha encontrado que esta proteína puede interactuar *in vitro* directamente con la S-RNasa, aunque la interacción no es alelo *S* específica (Qiao *et al.*, 2004). La determinante SLF se encuentra presente en el citoplasma y en la periferia del retículo endoplásmico del tubo polínico (Wang y Xue, 2005). En *Antirrhinum* la proteína SLF es parte del complejo SCF (Skp1/Cullin ó CDC53/F-box), el cual es muy importante para la ubiquitinación de proteínas blanco que deben ser degradadas por medio del complejo proteosomal 26S (Qiao *et al.*, 2004).

El modelo que presenta Qiao *et al.*, (2004) de acuerdo con sus resultados, es que AhSLF puede actuar como una proteína E₃ ligasa, para la transferencia de ubiquitina y la subsecuente degradación de las S-RNasas por el proteosoma 26S. Cabe mencionar que la interacción entre SLF/SFB y la S-RNasa no es alelo *S*-específica, por lo que SLF/SFB sólo desencadenaría la degradación de las S-RNasas que no comparten especificidad alélica, es decir en una cruce compatible (Lai *et al.*, 2002; Entani *et al.*, 2003). Por el contrario en cruces incompatibles, en donde SLF/SLB y la S-RNasas comparten especificidad alélica, esta última no debe ser degradada, de ésta manera que Qiao *et al.* (2004) proponga que la S-RNasa pudiera ser protegida por un factor que evitara su ubiquitinación y por lo tanto su degradación, este factor en las cruces compatibles deberá estar inactivo (Qiao *et al.*, 2004).

Genes modificadores

La respuesta del rechazo del polen en solanáceas, como en otros SI, ocurre por la interacción entre las determinantes de especificidad (S-RNasa-SLF/SFB); sin embargo, se sabe que otros genes no ligados al locus *S* denominados genes modificadores, son necesarios para la respuesta de rechazo del polen (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005). Esta aseveración se derivó de manera contundente de los experimentos de Murfett *et al.* (1996), quienes transformaron plantas

autocompatibles *N. plumbaginifolia* (AC) con el transgen de la *S_{A2}-RNasa*. Si la *S_{A2}-RNasa* fuera el único factor en la vía del rechazo del polen, se esperaría que en esta especie AC se convirtiera en AI. Sin embargo, las plantas transgénicas no fueron capaces de rechazar el polen *S_{A2}* ni el de *N. plumbaginifolia*. No obstante, cuando esta planta se cruzó con una de *N. alata* BT, la cual no expresa S-RNasas pero tiene el entorno genético del rechazo del polen, el híbrido rechazó el polen *S_{A2}* y el de *N. plumbaginifolia*. Estos resultados permitieron concluir que *N. alata* BT heredó factores diferentes a las S-RNasas y SLF/SFB requeridos para el rechazo del polen en *Nicotiana*. Estos genes se conocen como modificadores (GM) y fueron clasificados por McClure *et al.* (1999) en tres grupos:

GRUPO I. Son aquellos GM que afectan directamente la expresión de las determinantes de la especificidad del rechazo del polen.

GRUPO II. Son GM que interactúan genética o bioquímicamente con los determinantes de la especificidad sin afectar expresión. Además, no tienen participación en otras interacciones polen-pistilo.

GRUPO III. Son GM que participan tanto en el sistema de AI como en procesos generales durante la polinización como la nutrición del TP, la adhesión de polen, etc.

Existen una serie de proteínas que se han postulado como productos de genes modificadores del grupo III. Estas proteínas son: Nap11, NaTTS y NaPELPIII, quienes forman complejos con las S-RNasas *in vitro*. La mayoría de éstas proteínas están involucradas de alguna manera en el desarrollo del tubo polínico, tanto en cruzas compatibles como en cruzas incompatibles. Su asociación con la S-RNasa las postula como proteínas accesorias para el transporte de las S-RNasas al tubo polínico (Cruz-García *et al.*, 2005).

Al momento se han clonado dos GM (120K y HT-B) que están directamente involucrados con el sistema del rechazo del polen (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Goldraj *et al.*, 2006). La función de 120K y HT-B en el mecanismo del rechazo del polen fue comprobada al ser silenciados los genes por RNAi en híbridos de *N. plumbaginifolia* AC X *N. alata* AI (*S₁₀₅S₁₀₅* ó *S_{C10}S_{C10}*). Las plantas transgénicas resultantes fueron incapaces de rechazar polen *S₁₀₅* y *S_{C10}* (Hancock *et al.*, 2005). Asimismo, se sabe que la falta de HT-B ó 120K no afectan los niveles de la S-RNasa en los tubos polínicos de cruzas compatibles ni de cruzas incompatibles (Goldraj *et al.*, 2006), indicando que estas proteínas no participan en el transporte de las S-RNasas al tubo polínico.

La proteína HT-B

La proteína HT-B tiene 101 aa, cuenta con un péptido señal (PS) hacia el extremo amino y se predice un sitio de corte del PS después de la asparagina 24 dando origen a una proteína madura de 8.6 kDa, con un punto isoelectrónico de 3.76. Además, HT-B tiene hacia el extremo carboxilo un dominio rico en asparaginas, delimitado por tres residuos de cisteínas, las cuales podrían estar involucradas en la formación de puentes disulfuro o en modificaciones postraduccionales (McClure *et al.*, 1999). Esta proteína se expresa en las últimas etapas del desarrollo del pistilo coincidiendo con el momento en que la flor abre (antesis) y expone su estigma para recibir el polen (McClure *et al.*, 1999).

La participación de la proteína HT-B en el mecanismo del rechazo del polen fue clara cuando plantas de *N. alata* AI fueron transformadas con *HT-B* en antisentido. Las plantas transgénicas fueron autocompatibles (McClure *et al.*, 1999). Su papel en la incompatibilidad fue confirmado también en *Solanum chacoense*, donde se describió un ortólogo de HT-B (ScHT-B). Líneas transgénicas con un RNAi de ScHT-B, fueron incapaces de rechazar su propio polen (O'Brien *et al.*, 2002). Finalmente, en *Lycopersicon esculentum*, una mutación que genera un codón de término prematuro en un ortólogo de HT-B, provoca que las plantas no rechacen el polen propio (Kondo *et al.*, 2002-A; Kondo *et al.*, 2002-B). No obstante, se desconoce en detalle cual es el papel bioquímico que desempeña HT-B en la respuesta de AI. Sin embargo, en los tubos polínicos de cruza compatibles HT-B es degradado (Goldraij *et al.*, 2006), lo que sugiere que su estabilidad es importante en la respuesta de AI. Datos bioquímicos adicionales muestran que HT-B no interactúa físicamente con las S-RNasas, aunque no se sabe si lo hace con la proteína SLF/SFB. La estabilización de HT-B en los tubos polínicos de cruza incompatibles podría darse de dos maneras: 1) mediante alguna modificación postraducciona (i. e. fosforilación) ó 2) a través de otras proteínas que formaran complejos con ella, las cuales podrían ser del polen o venir del estilo. Lo cierto es que hasta el momento, las S-RNasas, HT-B, 120K y SLF/SFB son las únicas proteínas que se conocen que participan directamente en el SIG.

Modelos del rechazo del polen en sistemas basados en S-RNasas

Modelo del inhibidor

Durante varios años las investigaciones sobre el mecanismo del rechazo del polen en sistemas basados en la participación de S-RNasas, han alentado dos ideas principales: la primera se basa en el modelo del receptor, en donde la determinante masculina estaría presente, ya sea en la membrana o en la pared celular del polen, de esta manera la interacción alelo específica se daría a este nivel, ocasionando que la entrada de las S-RNasas fuera de manera específica, es decir solo ingresarían aquellas con coincidencia alélica. Sin embargo, esta idea fue descartada, ya que el grupo de Luu *et al.*, (2000) localizó por inmunocitoquímica la S₁₁-RNasa de *S. chacoense* en el citoplasma tanto de tubos polínicos compatibles como en incompatibles, de ahí que la segunda idea del modelo del inhibidor fuera apoyada. La segunda idea sugiere que las S-RNasas deben contar con dos dominios: un dominio funcional específico (DE) para cada S-RNasa y otro catalítico (DC), que está presente en todas las S-RNasas y que le confiere la actividad de ribonucleasa. El DC se obstruye con la presencia de un inhibidor general del polen que se uniría o inactivaría a todas las S-RNasas. La determinante masculina, junto con la S-RNasas que sean alelo específicas podrían unirse por medio de sus dominios específicos activando sólo las S-RNasas que tengan coincidencia alélica. De esta manera, el resultado es la degradación del RNA del tubo polínico y su subsecuente inhibición (Fig. 4).

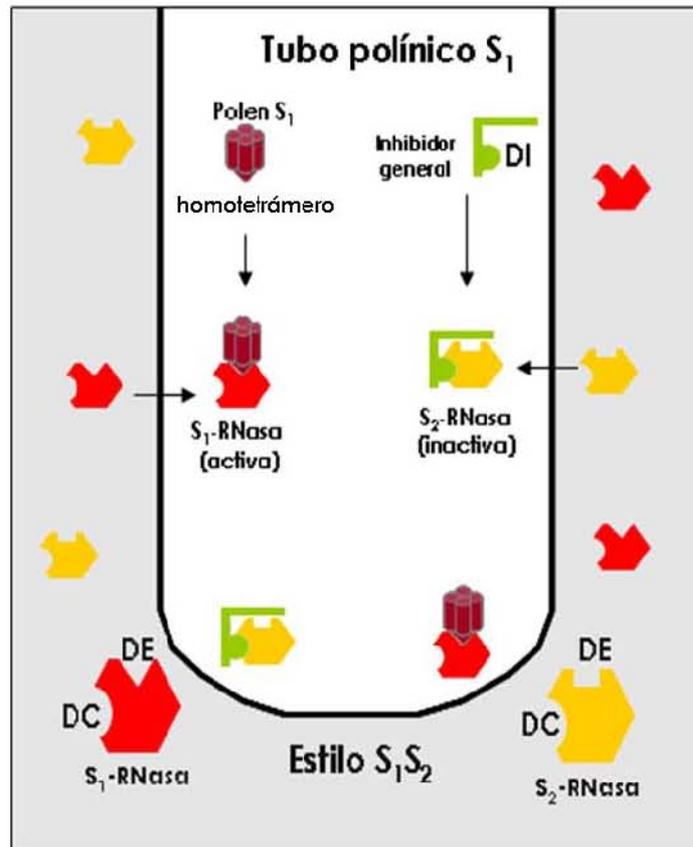


Figura 4. Modelo de inhibición. Tubo polínico S_1 creciendo en un estilo S_1S_2 . Las S-RNasas tienen un dominio catalítico (DC) y un dominio S-específico (DE). La proteína S_1 del polen al unirse al dominio S-específico de la S_1 -RNasa la activa. El modelo predice la presencia de un inhibidor general que cuenta con un dominio inhibidor (DI), en este caso se une a las S_2 -RNasas para inactivarlas. Modificado de Kao y Tsukamoto, (2004)

Modelo de la tasa de degradación de S-RNasas

A partir del descubrimiento de la determinante femenina, gran parte de las investigaciones se enfocaron en esclarecer la naturaleza de la determinante masculina (SLF/SBF), ya que las características bioquímicas de la determinante masculina conduciría a entender el mecanismo del rechazo del polen. La determinante masculina SLF/SBF es una proteína con un dominio con caja F hacia su extremo amino, las proteínas con este dominio están relacionadas con las ligasas E_3 de la vía de degradación de proteínas por el complejo 26S. La ligasa E_3 , forman parte del complejo SCF, el cual se constituye de una proteína reguladora Culling 1, del adaptador SKp1 y la proteína con

caja F. El complejo SCF se une directamente al sustrato que será degradado por el proteosoma 26S.

Las investigaciones de Qiao *et al.*, (2004), muestran que la proteína SLF/SBF presente en *Antirrhinum hispanicum* interacciona, en ensayos de doble híbrido y coimmunoprecipitación, directamente con las S-RNasas, sin embargo esta interacción no es alelo específica; experimentos de inmunoprecipitaciones demostraron la interacción de SLF/SBF con proteínas Culling 1 y SKp1 que son componentes del complejo SCF, lo que sugiere la formación de éste en el tubo polínico. Al mismo tiempo la utilización de inhibidores del proteosoma 26S señalan su participación en cruza compatibles. Finalmente se han detectado S-RNasas ubiquitinadas y su disminución en una crusa compatible, pero no en cruza incompatibles, lo que propone que son degradadas sólo en cruza compatibles. Con todos estos datos Qiao *et al.*, (2004), señalan que SLF/SBF forma parte del complejo SCF, SLF/SBF interacciona con las S-RNasas, permitiendo su ubiquitinación y concluyendo en su degradación por el proteosoma 26S en una crusa compatible.

Modelo del secuestro de las S-RNasas en vacuolas.

Este modelo descrito por Goldraij *et al.* (2006) se muestra en la figura 5 y señala el crecimiento del tubo polínico en una crusa compatible e incompatible en *Nicotiana*. Este modelo se basa en el hecho de que las S-RNasas se introducen desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo al tubo polínico por endocitosis no importando su haplotipo. De esta manera, las S-RNasas quedan secuestradas en una vacuola junto con 120K. Aunque se desconoce si HT-B se encuentra en la vacuola, se hipotetiza que sí. Bajo este modelo, HT-B juega un papel muy importante en el rechazo del polen, ya que se propone que como consecuencia de la interacción S-inespecífica entre la S-RNasa-SLF/SFB, HT-B es degradada por una proteína desconocida del polen durante una crusa compatible; sin embargo, si la crusa es incompatible, el complejo S-RNasa-SLF/SFB es específico, promoviendo directa o indirectamente la estabilización de HT-B, lo que suscitará que la membrana vacuolar, en donde se encuentran las S-RNasas, sea degradada, liberando a las S-RNasas al citoplasma del TP, en donde ejecutarán su acción citotóxica inhibiendo el crecimiento del TP (Fig. 5).

Sin duda, los modelos anteriores dejan a la vista diversas preguntas por contestar, por ejemplo, en el modelo de Goldraij *et al.* (2006) no es claro como se podría dar la interacción entre la S-RNasa y SLF/SFB, ni como éste complejo controla la ruptura de la vacuola ni como provoca la degradación o la estabilidad de HT-B (Goldraij *et al.*, 2006). Por otro lado, en el modelo de Qiao *et al.* (2004)

parecen no darle importancia a la participación de HT-B y 120K ni a la compartimentalización de las S-RNasas. De esta manera, el enfoque del presente trabajo está dirigido a dilucidar el papel de los componentes de la vía del rechazo del polen dependiente de S-RNasa, en especial de aquellos que se relacionen con la estabilidad de HT-B, así como a proporcionar elementos que dirijan las investigaciones posteriores a entender el control bioquímico de este mecanismo.

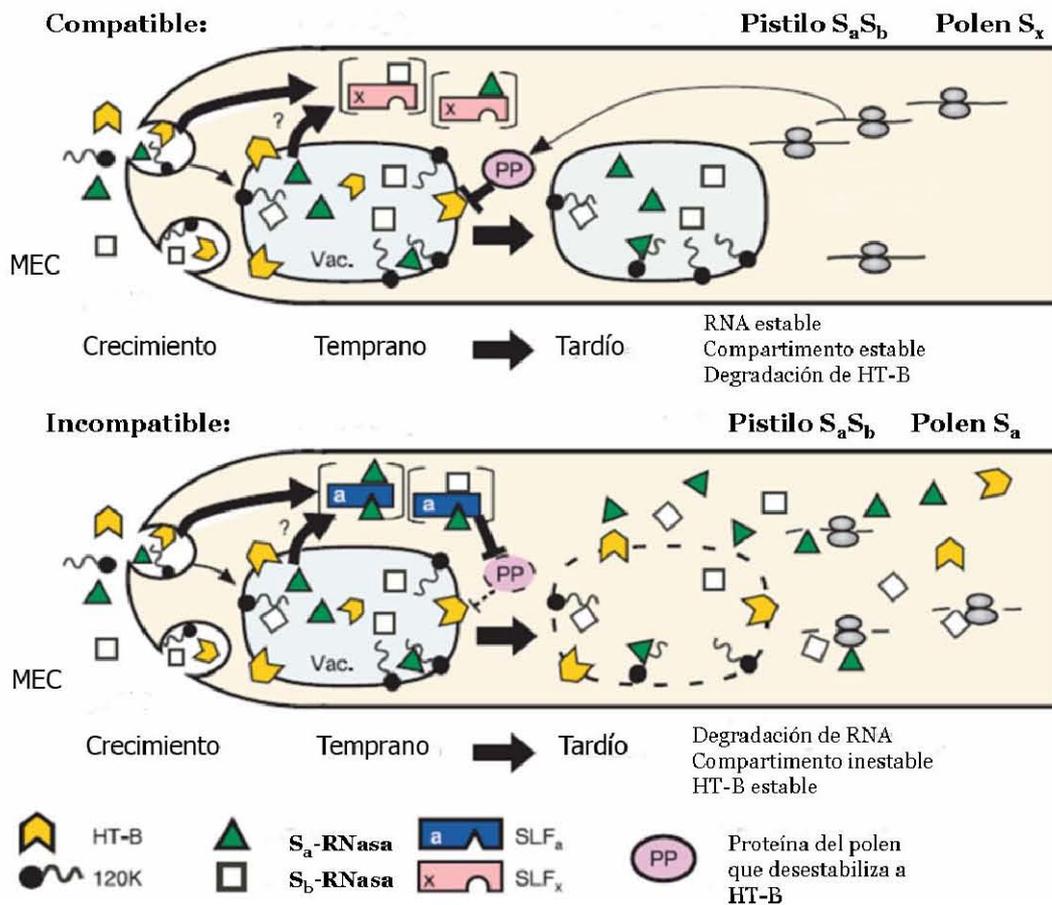


Figura 5. Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas. Arriba se observa una cruz compatible, las S-RNasas entran al tubo polínico por endocitosis y se almacenan en una vacuola a diferentes tiempos. También se muestra la participación de una proteína hipotética del polen (PP) que puede estar involucrada en la degradación de HT-B y por lo tanto, en la estabilidad de la vacuola en donde las S-RNasas están presentes. Abajo se representa una cruz incompatible, al igual que en una cruz compatible, se observa el ingreso de las S-RNasas por endocitosis y su almacenamiento en una vacuola, sin embargo, a diferencia de la cruz compatible, HT-B no se degrada y existe la liberación de las S-RNasas al citoplasma del tubo polínico, por ende la degradación de RNA. MEC=Matriz extracelular, Vac=Vacuola. Modificado de Goldraij *et al.* (2006).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

HT-B, es una proteína estilar que se transporta desde la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo hasta el citoplasma del tubo polínico e interviene directamente en el mecanismo del rechazo del polen en solanaceas. Su participación en la AI como gen modificador es clara, ya que cuando se abate su expresión en plantas transgénicas de *Nicotiana glauca*, estas son incapaces de rechazar el polen con el mismo haplotipo que el estilo. Hasta la fecha se desconoce el papel bioquímico de HT-B. Sin embargo, se sabe que en extractos proteicos de tubos polínicos compatibles disminuye su cantidad, no así en cruza incompatibles, lo que indica que su participación en el rechazo del polen está relacionada con su estabilidad. Estos hechos hacen suponer que HT-B funciona en el rechazo del polen mediante su interacción física con proteínas del tubo polínico que le permitan estabilizarse en una cruz incompatible o su degradación en cruza compatibles. De esta manera, la intención del trabajo es conocer las interacciones proteicas que pudieran existir entre HT-B y proteínas del tubo polínico con la finalidad de identificar proteínas que pudieran ser parte de la vía del rechazo del polen en sistemas dependientes de S-RNasas.

HIPÓTESIS

HT-B es una proteína estilar que se transporta al tubo polínico y que está involucrada en la AI, por lo que su participación en el rechazo del polen es a través de su interacción física con proteínas del tubo polínico.

OBJETIVO GENERAL

Identificar proteínas del polen de *Nicotiana glauca* que interactúen con HT-B.

OBJETIVOS PARTICULARES

Fusionar a HT-B al dominio de unión al DNA del promotor GAL4

Determinar si existen interacciones entre HT-B y proteínas del polen de *N. glauca* en *S. cerevisiae*

Seleccionar las clonas positivas de interacción en *S. cerevisiae*.

Identificar los cDNA's de las proteínas que interactúan con HT-B.

Corroborar las interacciones positivas entre HT-B y proteínas del polen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Purificación de RNA total

La extracción de RNA total se realizó en frío, se pesó 1 g de granos de polen, tallos, hojas, pétalos, anteras o estilos de plantas homocigas AI de *Nicotiana glauca* S₁₀₅S₁₀₅, se molieron en un mortero con nitrógeno líquido.

El tejido se homogenizó en un vortex durante 3 min con el amortiguador de extracción (Urea 7 M, TE 10x, SDS 1% y 2-mercaptoetanol 1%) y 5 ml de una mezcla de solventes Fenol-Cloroformo-Alcohol isoamílico (PCI) 50:49:1. Se centrifugó a 400 g durante 5 min a TA.

Se recuperó la fase acuosa y se le incorporaron 5 ml de PCI, se agitó por 3 min nuevamente en vortex y se centrifugó a 400 g por 5 min a TA.

La fase acuosa se mezcló vigorosamente con 5 ml de cloroformo durante 3 min y se centrifugó a 400 g por 15 min a temperatura ambiente. Nuevamente, se tomó la fase acuosa para precipitar los ácidos nucleicos con un mililitro de acetato de amonio 10M y un volumen de isopropanol frío, se incubó durante 30 min a -20°C. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 300 g por media hora a 4°C y el precipitado se resuspendió en 3 ml de agua con Dietilpirocarbonato (DEPC).

Para separar el RNA del DNA se agregaron 3 ml de una solución de LiCl 8 M y se incubó a 4°C durante una noche entera. Se centrifugó durante 20 min a 4°C y el botón se resuspendió en 500 µl de agua DEPC. Una vez más, se precipitó el RNA con 1/3 del volumen con acetato de amonio [10 M] y 700 µl de etanol 100 %, se incubó durante 20 min a -20°C y se centrifugó a 1300 g por 30 min a 4°C. Las sales fueron lavadas agregando etanol 70 % y centrifugando por 15 min a 4°C y 1300 g.

Purificación de RNA poli A⁺

Se obtuvo RNA poli A⁺ de polen de plantas homocigas AI de *Nicotiana glauca* S₁₀₅-S₁₀₅ mediante el sistema *poly AT tract mRNA Isolation System IV* (Promega), siguiéndose fielmente las especificaciones del manual (Apéndice I).

Ensayo de doble híbrido

El sistema de doble híbrido (Y2H) es un método genético *in vivo* que permite identificar la interacción entre dos proteínas. De igual manera, se pueden tamizar bibliotecas para detectar proteínas que interactúan con una proteína "anzuelo" (Causier y Davies, 2002). El sistema de doble híbrido se basa en el hecho de que factores transcripcionales que tienen separados su dominio de unión y su dominio de activación al DNA, deben interactuar físicamente para activar la transcripción (Fiels y Song, 1989).

En *S. cerevisiae* hay un factor transcripcional modular que controla la activación del promotor *GAL4*, este promotor controla la expresión de los genes reporteros *ADE*, *HIS* y *MEL1*. La evaluación de las interacciones entre proteínas se hace en la cepa AH109 de *S. cerevisiae*, la cual es auxótrofa a adenina e histidina. Para que ocurra la activación de la expresión, una de las proteínas evaluadas deberá ser fusionada al dominio de unión al DNA de *GAL4* y la otra con el dominio de activación. La interacción de las dos proteínas activará la transcripción de los genes reporteros, brindándole prototrofia a *S. cerevisiae* AH109 para adenina e histidina. Además, las clonas tendrán un fenotipo azul gracias a la actividad de la α -galactosidasa codificada por el gen *MEL1*, ya que su producto hidroliza el α -X-gal que es adicionado al medio de crecimiento.

Clonación y expresión de la proteína HT-B fusionada al dominio de unión al ADN de GAL4

El cDNA de la proteína HT-B fue amplificado por PCR con oligonucleótidos (Fig. 6-A) que permitieran amplificar el cDNA de la proteína madura. Estos oligonucleótidos fueron diseñados para crear en el cDNA los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* que fueron necesarios para clonarlo en el vector pAS2-1. Este vector contiene la secuencia del dominio de unión al DNA de GAL4 (Fig. 6-C).

Las reacciones de PCR fueron preparadas a una concentración final de "taq buffer" 1X (Roche), de desoxirribonucleótidos (dNTP's) 8 μ M, de cada oligonucleótido 5 ng/ μ l, de taq polimerasa 1 0.04 U/ μ l (Roche) y como molde 50 ng del cDNA de *HT-B* contenido en el vector pGEM.

Las condiciones de amplificación fueron: 1 ciclo de 94°C por 1 min, 30 ciclos a: 94°C por 30 seg, 56°C por 1 min, 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final de 72°C por 5 min.

Por medio de un análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.7% (p/v) (apéndice XIII), se corroboró que el producto de PCR correspondió al tamaño del cDNA de *HT-B* esperado (\approx 240pb) (Fig. 10-B). La banda fue purificada con el sistema CONCERT *Rapid Gel Extraction System* (Gibco BRL) de acuerdo a las condiciones del sistema (Apéndice II).

Para clonar el cDNA de HT-B en el vector pAS2-1, primero se utilizó el sistema de clonación *pGEM-T easy vector* (Promega) (Apéndice III) que tiene alta eficiencia en el ligado de productos de PCR (Fig. 6-B). Este vector, de alto número de copias, tiene los promotores T7 y SP6 del gen de la RNA polimerasa. Además incluye un sitio de inserción de productos de PCR flanqueado por el sitio de restricción *EcoRI*. Cuando el producto de PCR es insertado en el vector pGEM, el marco de lectura abierta que codifica la β -galactosidasa se interrumpe generando una enzima incapaz de hidrolizar el sustrato x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactósido). La expresión de la β -galactosidasa es inducida con IPTG (isopropiltiogalactósido). Estos elementos son importantes para identificar las clonas positivas. Una vez ligado el producto de PCR en el vector pGEM, las células de DH5 α de *E. coli* fueron transformadas por choque térmico (Apéndice VII).

Las clonas transformantes recombinantes presentan un fenotipo blanco, por la pérdida de la actividad de la β -galactosidasa. Se purificó el DNA plasmídico de las clonas recombinantes y fueron evaluadas por digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

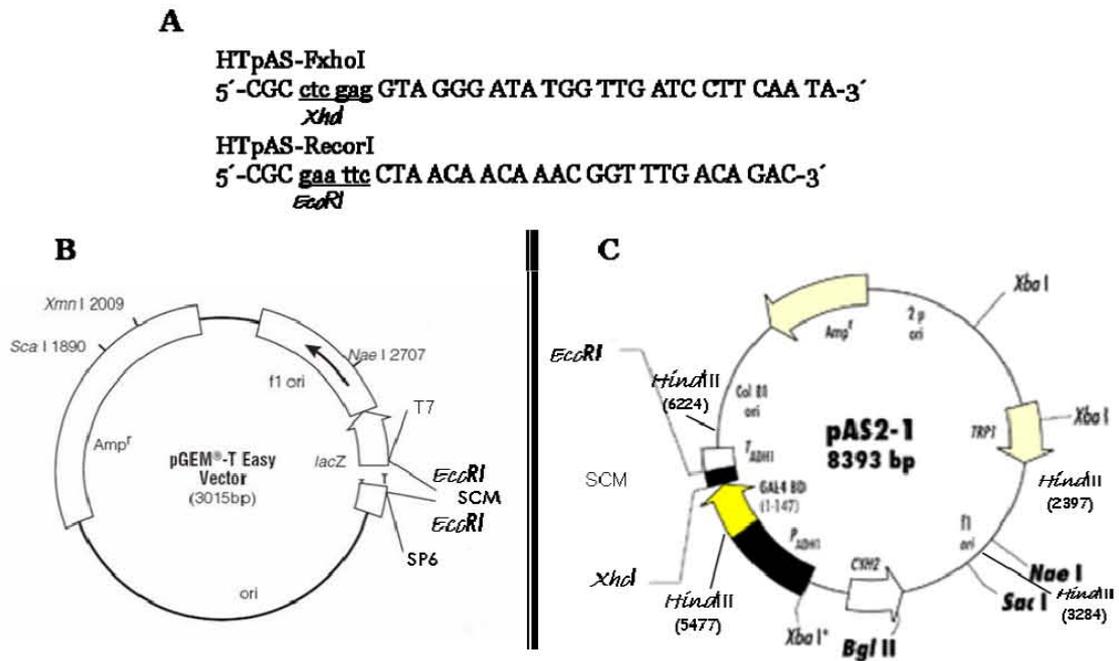


Figura 6. A) Oligonucleótidos con los sitios *EcoRI* y *XhoI* para clonar *HT-B* en pAS2-1 B) Vector pGEM-T Easy Vector, donde se clonó el producto de PCR de HT-B. C) Vector pAS2-1, cuenta con el dominio de unión al promotor GAL4BD. HT-B fue clonado en este vector para realizar el ensayo de Y2H.

Para generar el cDNA de *HT-B* con los sitios *XhoI* y *EcoRI*, se digirieron los plásmidos pGEM/HT-B con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*. De igual forma, el vector pAS2-1 fué linearizado por restricción con las mismas enzimas para crear los extremos cohesivos en los que se pueda ligar *HT-B*. La reacción de ligado se llevó acabo con la enzima *T4* DNA ligasa (Invitrogen) bajo las siguientes condiciones: 1.5 μ l de vector pAS2-1 digerido con *XhoI* y *EcoRI*, 5 μ l de *HT-B* digerido con *XhoI* y *EcoRI*, 1 μ l del amortiguador de la *T4* DNA ligasa 5X (Invitrogen), 1 μ l de *T4* DNA ligasa y 0.5 μ l de H₂O.

Con el plásmido pAS2.1-HT-B se transformó por choque térmico la cepa DH5 α de *E. coli*, las transformantes se evaluaron por digestión con las enzimas *EcoRI/XhoI* y con reacciones de PCR bajo las condiciones antes mencionadas. Las clonas fueron secuenciadas para verificar que el cDNA de *HT-B* se encontrara en marco de lectura con GAL4 (Fig. 10-A).

Síntesis de cDNA con adaptadores SMARTIII y CDSIII.

La construcción de la biblioteca transitoria de cDNA de polen se realizó con el sistema *Matchmaker Library Construction and Screening* (Clontech), el cual permitió incorporar durante la síntesis de cDNA los adaptadores SMARTIII y CDSIII a sus extremos con la finalidad de recombinar cada cDNA del polen con el vector pGADT-7-Rec (Fig. 7). Este vector contiene la secuencia que codifica el dominio de activación del factor transcripcional que activa el promotor *GAL4*.

El sistema SMARTIII (*Switching Mechanism at 5'end of RNA Transcript* de Clontech), es interesante, ya que cuenta con dos oligonucleótidos para la síntesis de la primera cadena del cDNA. Cada uno presenta el adaptador CDSIII; uno de ellos es el "CDSIII Primer", el cual tiene una región oligo dT para hibridar con la cola de poli A⁺ del RNA, el segundo es el "CDSIII/6Primer" que puede hibridar con diferentes secuencias del RNA poli A⁺. El uso único de cada oligonucleótido favorece que las bibliotecas estén representadas mayoritariamente con cDNA's, ya sea de la región terminal 3' ó de la región terminal 5' del RNA; es por ello que se utilizó una mezcla conformada por el 50% de cada oligonucleótido (Fig. 7).

La síntesis de la primera cadena de la biblioteca de cDNA de polen se sintetizó (cDNA ds), a través de reacciones de RT-PCR. Cuando la transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) encuentra el extremo 5' del templado (RNA poli A⁺) adiciona nucleótidos, principalmente deoxicitidina (dC) en el extremo 3' del cDNA. El oligonucleótido SMARTIII tiene una región (dG) hacia el extremo 3' que puede aparearse con la serie de nucleótidos (dC) presentes en el cDNA, ésto permite la incorporación del adaptador SMARTIII al templado. Por último, la transcriptasa reversa termina de replicar la región del templado que corresponde al adaptador SMARTIII (Fig. 7). Posteriormente, se realiza una reacción de LD PCR (Long Distance PCR) con la finalidad de amplificar solo aquellos cDNA's que contengan al adaptador SMARTIII; de esta forma se obtiene el cDNA con los adaptadores SMARTIII y CDSIII (Fig. 7) (Apéndice X).

La finalidad de contar con los cDNA's es que *S. cerevisiae* se puede transformar con el vector pGADT7-Rec, el cual además de contar con el dominio de activación del promotor GAL4, tiene los extremos CDSIII y SMARTIII (Fig. 7) para que ocurra la recombinación con el cDNA con extremos SMARTIII y CDSIII.

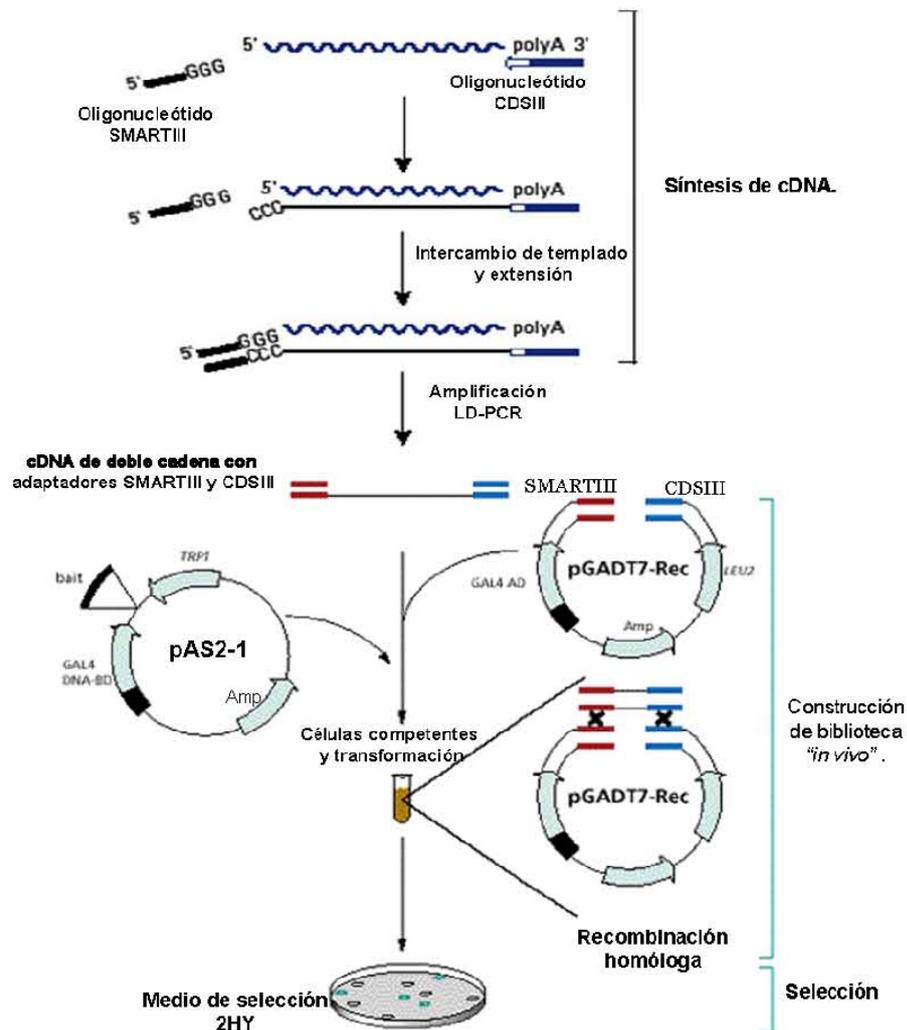


Figura 7. Síntesis de cDNA con los adaptadores SMARTIII y CDSIII y construcción de la biblioteca "in vivo"

Tamizado de una biblioteca de cDNA de polen utilizando a la proteína estilar HT-B como anzuelo

La cepa AH109 de *S. cerevisiae* fue utilizada para el ensayo de doble híbrido. Se cotransformó con pAS2-1/HT-B, cDNA de polen con los extremos CDSIII/SMARTIII y pGADT7-Rec (linearizado). El procedimiento utilizado fue de acuerdo al *Manual YEASTMAKER Yeast Transformation System 2* (Clontech) (Apéndice IX). Las células transformantes fueron sembradas en medio mínimo sintético (*synthetic dropout* = SD) sin triptofano, sin leucina, sin histidina, sin adenina y con α -X-gal. Como controles de transformación, se sembraron cajas con medio SD sin leucina y medio SD

sin triptofano. Las interacciones fueron seleccionadas mediante genes reporteros quienes son controlados por el promotor *GAL4*. Cuando el promotor se activa, los genes *ADE2*, *HIS3* y *MEL1* son expresados provocando que las transformantes con interacción crezcan en el medio y tengan un fenotipo de color azul, ya que el gen *MEL1* codifica para la α -galactosidasa que rompe la molécula α -X-gal en el medio. De esta forma, se seleccionaron las colonias que tienen solo los vectores con el dominio de activación y con el dominio de unión al promotor GAL4 (Fig. 13-A), las transformantes de color azul se sembraron tres veces en medio SD sin leucina y sin triptofano. Por último, las colonias azules que crecieron al resembrarlas nuevamente en medio SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal se tomaron como clonas con auténticas interacciones positivas en *S. cerevisiae*.

Los plásmidos de las levaduras que presentaron interacciones positivas fueron aislados con el kit *Zymoprep II Yeast Plasmid Miniprep* (zymo research) (Apéndice VI). Con los plásmidos, se transformó por choque térmico (Sambrook y Russell, 2001) a la cepa DH5 α de *E. coli* (Apéndice VII); las células fueron sembradas en medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml. Se purificó el plásmido de 10 colonias transformantes para su análisis (Apéndice V).

Selección de las clonas de *E. coli* con el plásmido pGADT7-Rec.

Las clonas de *E. coli* con pGADT7-Rec, fueron seleccionadas a partir de reacciones de PCR con los oligonucleótidos específicos que flanquean la región recombinante del vector pGADT7-Rec (Fig. 7). Las concentraciones finales a las cuales las reacciones de PCR fueron realizadas fueron: "taq buffer" 1X (Roche), de desoxirribonucleótidos (dNTP's) 8 μ M, de cada oligonucleótido 2 ng/ μ l, de *taq* polimerasa I 0.04 U/ μ l (Roche) utilizando como molde 3 μ l de la muestra de DNA plasmídico de cada clona. Las condiciones del termociclador fueron 1 ciclo de 5 min. a 94°C, 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y una extensión de 7 min a 72°C.

El segundo método utilizado para la identificación del vector pGADT7-Rec, fue mediante la digestión de las muestras con la enzima *HindIII*, la cual libera la región recombinante del vector pGADT7-Rec (Fig. 11-B).

Análisis de secuencias

Los cDNAs de las clonas positivas se secuenciaron en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM (www.ibt.unam.mx/sintesis). Las secuencias fueron analizadas para determinar la existencia de secuencias homólogas en la base de datos. Con esta finalidad, se utilizó el sitio WORKBENCH (<http://seqtool.sdsc.edu/CGI/BW.cgi>) y el banco de datos de secuencias de plantas (GenBank Plant Sequences).

Hibridaciones DNA:DNA

El cDNA digerido, se fraccionó en un gel de agarosa al 1% (Apéndice XIII), se transfirió a una membrana Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia), a través de un sistema de réplica en Southern (Apéndice XI). El DNA se fijó covalentemente a la membrana con luz UV (700 000 $\mu\text{J}/\text{Cm}^2$) por 70 s, la membrana se almacenó a -80°C hasta su uso.

Las sondas de DNA fueron marcadas con [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP según las indicaciones del sistema *Random Primer Labeling System* (Invitrogen). Se utilizaron 25 ng de DNA que fueron marcados con 50 μCi de [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP, 3,000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$.

La membrana con el DNA fijo, fue prehibridada a 65°C con 20 ml de solución de hibridación: Na_2PO_4 1M pH7.2, SDS 10 % y 40 μl de EDTA 0.5 M, durante 4 h. Previamente a la hibridación, la sonda se desnaturalizó a 95°C con 5 ml de solución de hibridación durante 5 min. La membrana se expuso durante toda la noche a la sonda desnaturalizada a una temperatura de 65°C . Posteriormente se realizaron dos lavados con solución SSC 4X+SDS 0.1% por 10 min, y dos lavados más con SSC 2X+SDS 0.1% de 10 min.

La membrana radiactiva se expuso a una película Hyperfilm MP (Amersham) durante 2 días a -80°C .

Hibridaciones RNA:DNA

El RNA total se fraccionó en un gel desnaturalizante de agarosa al 2% (Apéndice XIII), y el RNA se transfirió a una membrana Hybond-N⁺ (Amersham Pharmacia), a través de un sistema de réplica en Northern (Apéndice XI). Al igual que las hibridaciones DNA:DNA, el RNA se fijó covalentemente a la membrana con luz UV (700 000 $\mu\text{J}/\text{Cm}^2$) por 70 s, la membrana se almacenó a -80°C hasta su uso.

De la misma forma que en las hibridaciones DNA:DNA, se utilizó como sonda el DNA marcado con ^{32}P dCTP según las indicaciones del sistema *Random Primer Labeling System* (Invitrogen). Se utilizaron 25 ng de DNA que fueron marcados con 50 μCi de $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP, 3,000 Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$. La membrana se prehibridó a 65°C con 20 ml de solución de hibridación: Na_2PO_4 1M pH7.2 con SDS 10% y 40 μl de EDTA 0.5 M, durante 4 h. Previamente a la hibridación, la sonda se desnaturalizó a 95°C con 5 ml de solución de hibridación durante 5 min. La membrana se expuso durante toda la noche a la sonda previamente desnaturalizada a una temperatura de 65°C. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución de hibridación: el primero por 10 min, los dos siguientes por 15 min.

La membrana radiactiva se expuso a una película Hyperfilm MP (Amersham) durante 4 días a -80°C.

Ensayos de apareamiento entre levaduras

Las levaduras *S. cerevisiae* en su ciclo de vida pueden permanecer en dos estados, uno haploide y otro diploide. Cuando las levaduras se encuentran en estado haploide tienen la facultad de aparearse, dicho apareamiento solo ocurre entre células a y células alfa. Esta determinación está dictada por un locus conocido como *MAT* (*Mating Type*). Las células MAT a transcriben los genes que producen un receptor acoplado a proteínas G conocido como Ste2p y una feromona denominada Factor a. El receptor Ste2p se activa con la presencia del factor alfa, producido por las células alfa, desencadenando una serie de señales intracelulares que culminan en la fusión de las dos células con tipo de MAT opuesto. (Cappellaro *et al.*, 1991).

En esta investigación se realizó un ensayo de apareamiento con la finalidad de confirmar la interacción entre la proteína estilar HT-B y la proteína del polen NapK.

Siembra del ensayo de apareamiento

Se tomó una de las colonias con el vector pGADT7/NapK y se estirió en una placa con medio YPDA, en esta misma placa y encima de la colonia previamente estriada, se sembró una colonia transformada con el vector pAS2-1/HT-B (Fig. 8). Las levaduras se incubaron durante 8 horas para su apareamiento. Se raspó la superficie de la placa con el asa y se estirió sobre una placa con medio 2SD (SD/-Trp/-Leu/X- α -Gal) y en 4SD (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -Gal). Se tomaron como positivas aquellas colonias que crecieron en estos medios y que presentaron fenotipo azul (Fig. 8).

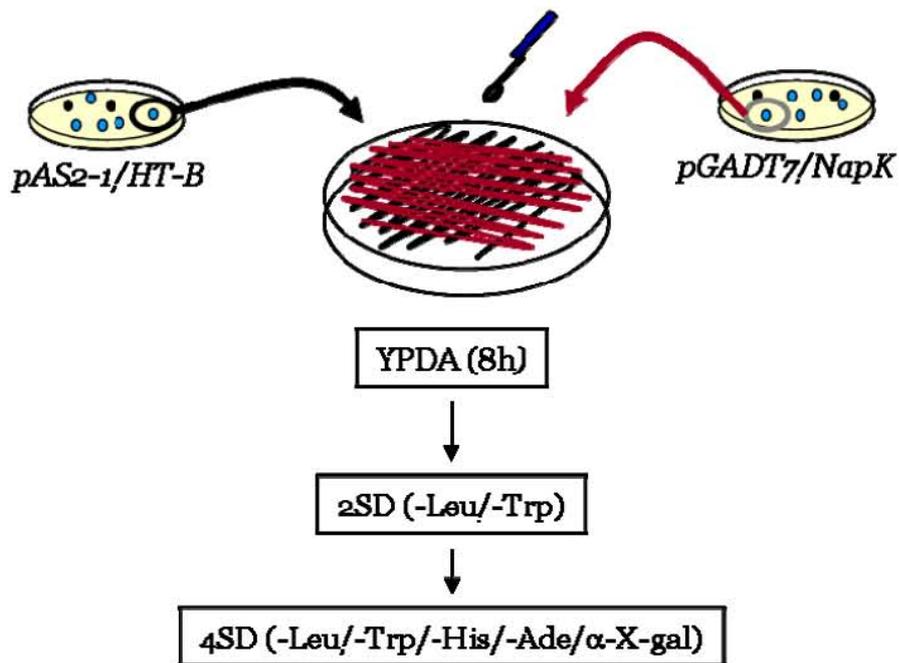


Figura 8. Esquema del apareamiento para la corroboración de las interacciones del doble híbrido

Se realizaron los siguientes apareamientos:

- AH109 (pAS2-1/HT-B) vs. Y187 (pAS2-1/HT-B)
- AH109 (pAS2-1/HT-B) vs. Y187 (sin transgen)
- AH109 (pAS2-1/HT-B) vs. Y187 (pGADT7/NapK)
- AH109 (pGADT7/NapK) vs. Y187 (pGADT7/NapK)
- AH109 (pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK)*
- Y187 (pAS2-1/HT-B) vs. AH109 (pAS2-1/HT-B)
- Y187 (pAS2-1/HT-B) vs. AH109 (sin transgen)
- Y187 (pAS2-1/HT-B) vs. AH109 (pGADT7/NapK)
- Y187 (pGADT7/NapK) vs. Y187 (pGADT7/NapK)
- Y187 (pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK)*

*Levaduras que no fueron apareadas sino sólo cotransformadas.

Clonación del cDNA de la proteína NapK en el vector pGEX 4T-2

El vector pGEX 4T-2 permite la expresión de polipéptidos para su purificación en condiciones no desnaturizantes. Este vector codifica para la proteína citoplásmica de 26 kDa glutatión-S-

transferasa (GST), cuenta con un sitio de clonación múltiple que permite fusionar la proteína de interés al extremo carboxilo de este polipéptido.

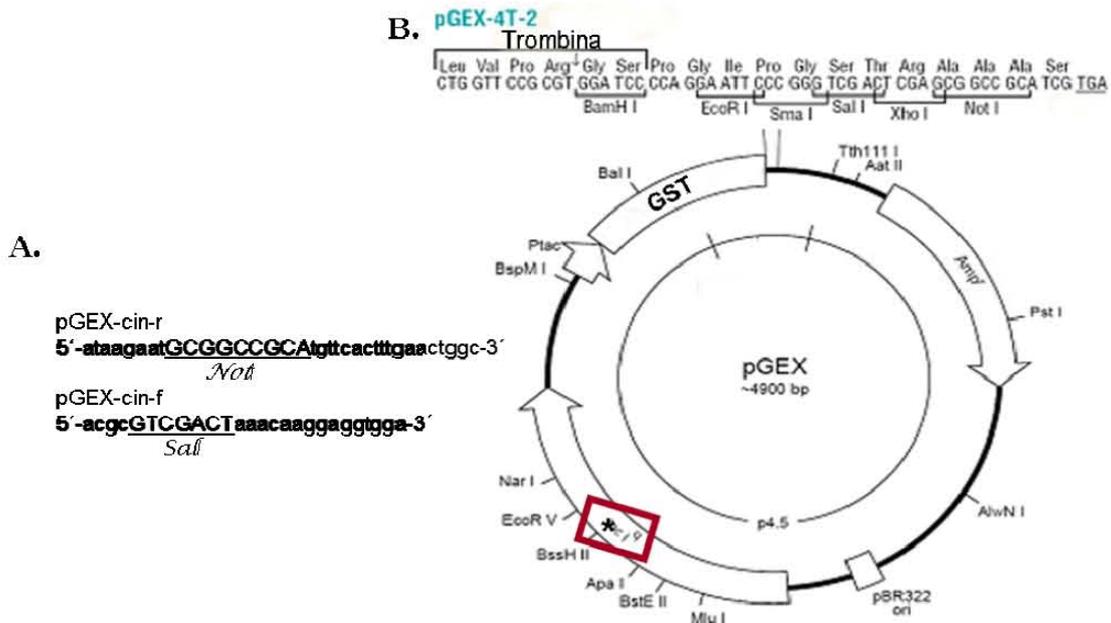


Figura 9. Vector pGEX 4T-2. A) Se muestran los oligonucleótidos diseñados para incorporar a NapK en éste vector, en mayúsculas se ven los sitios de restricción para clonarlo. B) Esquema del vector pGEX 4T-2 con el sitio de clonación múltiple

La clonación de la proteína que resultó de la búsqueda del doble híbrido (NapK) en el vector pGEX 4T-2, se facilitó al utilizar el sistema de clonación *pGEM-T easy vector* (Promega) que tiene una alta eficiencia en el ligado de productos de PCR. El fragmento de cDNA de la proteína Napk se amplificó con oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia obtenida del experimento de doble híbrido (Y2H). Los oligonucleótidos cuentan con sitios de restricción *NotI* y *SalI*. La clona pGEM/NapK se digirió con esas enzimas para liberar el fragmento de cDNA correspondiente a la proteína NapK y ligarlo en el vector pGEX 4T2. La cepa BL21 de *E. coli* fue transformada con este vector recombinante.

La corroboración de la clona fue a través de PCR e hibridación, utilizando como sonda el cDNA de la proteína NapK liberada a partir de pGAD7/NapK.

Sobreexpresión de la proteína NapK

La preparación de la columna de afinidad de NapK requiere grandes cantidades de la proteína GST-NapK, para lograr esto, se transformó la cepa BL21 de *E. coli* con la clona pGEX 4T-2/NapK.

Esta cepa contiene el gen *l* del bacteriófago T7 que codifica para la $T7$ RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac UV5* (Fig. 8-B*), el cual se induce con isopropiltiogalactósido (IPTG) (Dabrowski y Kur, 1998).

Condiciones de microescala

Se hizo un precultivo, incubando 3 ml de medio LB+amp (100 μ g/ml) con la clona pGEX 4T-2/NapK de la cepa BL21 de *E. coli* y pGEX 4T-2 como control, se incubó a 37°C toda la noche.

Del cultivo anterior se tomaron 60 μ l para sembrar 6 ml de medio 2xYTA+amp 100 μ g/ml (apéndice XII) y se incuban a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta llegar a una $DO_{600} = 0.5-0.7$. Se indujo la expresión de la proteína con IPTG a una concentración final de 0.1 mM y se incubó de 2 a 4 h en medio 2xYTA+amp (100 μ g/ml) (Apéndice XII).

El cultivo se centrifugó a 1300 g por 5 min. Las células fueron resuspendidas en 300 μ l de PBS 1X 4°C (Apéndice XII). Las células se lisaron con 300 μ l del amortiguador de lisis ($MgCl_2$ 5 mM, lisozima 1 μ g/ml, RNasa A 50 μ l/ml) y se incubaron por 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron congeladas con $N_2(liq)$ y se descongelaron y se volvieron a congelar. Una vez descongeladas, se centrifugaron a 1300 g por 3 min. El sobrenadante, que es la fase soluble, se colocó en un tubo limpio. El botón se resuspendió con PBS 1X (Apéndice XII) en el mismo volumen que se consigue de la fase soluble, esta fracción fue la fracción insoluble.

Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida (Apéndice XIII), se fraccionaron a 130 volts por 2.5 h. Uno de los geles se tiñó con azul de Coomassie (Apéndice XIV) y el otro se transfirió por medio del Trans-Blot SD (BIO-RAD) a una membrana de nitrocelulosa a 75 mA por 45 min. La membrana se tiñó con Rojo de Ponceau (Apéndice XIV) para verificar la transferencia de las proteínas. La membrana con las proteínas se utilizó en ensayos de réplica en Western.

Condiciones de macroescala

Se hizo un precultivo, sembrando 3 ml de medio LB+amp (100 μ g/ml) con la clona pGEX 4T2/NapK de la cepa BL21 de *E. coli* y pGEX 4T-2 como control, se incubó a 37°C/250 rpm toda la noche.

Se sembraron 50 ml de medio 2xYTA+amp (100 μ g/ml) con 500 μ l del precultivo durante 2.5 h aproximadamente hasta llegar a una $DO_{600} = 0.5-0.7$. Se indujo la sobreexpresión de la proteína GST-NapK con IPTG (0.1 mM concentración final) por 3 horas a 37°C/250 rpm. El cultivo se centrifugó a 500 g por 10 min, el sobrenadante fué eliminado y las células se resuspendieron en 5 ml de PBS 1X.

Una vez resuspendidas las células se alicuotaron en 5 tubos, cada uno con 1 ml, se centrifugaron nuevamente a 1300 g por 3 min. Cada botón de células se resuspendió en 1 ml de amortiguador de lisis (ver microescala); se incubó por 10 min a temperatura ambiente, se congeló con N₂(liq) y se descongeló dos veces. Se centrifugó a 1300 g por 3 min y el sobrenadante, en el que se encontraban las proteínas sobreexpresadas, fue cuantificado por el método de Bradford (Apéndice XVI).

Purificación de la proteína GST-NapK con glutatión agarosa

La fracción soluble proteica esta compuesta tanto por las proteínas nativas de *E. coli* así como de la proteína sobreexpresada GST-NapK, por lo que es necesario purificarla para la preparación de la columna de afinidad. Para ello, se cuantificó la proteína de la fracción soluble por el método de Bradford para evaluar, según la capacidad de la resina, la cantidad de resina (Glutatión agarosa) que se ocuparía (Apéndice XII). La resina se hidrató y equilibró al 50% (Apéndice XII) y se utilizó para la purificación de GST-NapK como sigue:

1. Se coloca en un tubo la mezcla proteica mas la resina equilibrada.
2. Se incuba a temperatura ambiente durante 45 min con rotación constante.
3. El tubo se centrifuga a 35 g/5 min.
4. El sobrenadante es la fracción proteica no unida y se coloca en un tubo limpio para su análisis.
5. La resina es lavada con 10 volúmenes cama de PBS 1X.
6. Se centrifuga a 35 g/5 min, repetir pasos 5 y 6 dos veces más. Conservar los sobrenadantes para su análisis electroforético.
7. Después del último lavado, la resina es tratada con un volumen cama de amortiguador de elución (Apéndice XII) y se incuba a temperatura ambiente por 10 min.
8. Se centrifuga a 35 g/5 min repetir los pasos 7 y 8 dos veces más. Juntar los sobrenadantes, que están enriquecidos con la proteína GST-NapK, para su análisis.

Análisis tipo Western

La membrana con las proteínas se incuba en solución de bloqueo (Apéndice XII) por 1 h en agitación constante. Se pone en contacto con el primer anticuerpo (anti-GST), que se agrega a la solución de bloqueo nueva con una dilución de 1:2,000; se deja incubando durante toda la noche

con agitación constante a 4°C. Se lava con PBS 1X + 0.1% Tween-20 durante 5 min y se realiza un segundo lavado por 10 min.

Se coloca el segundo anticuerpo anti-conejo, ya sea acoplado a peroxidasa o fosfatasa alcalina, es importante conocerlo ya que de esto dependerá el tipo de revelado. Se usa a una concentración de 1:40,000 en solución de bloqueo y se incuba en agitación constante durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lava la membrana con PBS 1X+0.1% Tween-20 durante 10 min y se repite este lavado dos veces más.

Si el segundo anticuerpo utilizado está acoplado a peroxidasa, el revelado es de la siguiente manera:

- Se prepara la solución de quimioluminiscencia (Apéndice XII)
- La membrana se coloca entre dos acetatos para evitar que se seque
- La membrana se pone en contacto con la solución. Se quita el exceso de solución y se coloca nuevamente entre los dos acetatos.
- Se coloca en un cassette para exposición y encima una hoja de película fotográfica (Hyperfilm ECL, Amersham biosciences) por 15 seg.
- Se revela con solución de revelado (Apéndice XII) hasta tener la intensidad deseada y se coloca en solución de fijado (Apéndice XII).

Si se utilizó el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina después de los lavados se incuba la membrana en amortiguador pH=9.5 (Apéndice XII) por 10 min. Después en 10 ml de amortiguador pH=9.5 agregar 100 µl de nBT (Apéndice XII) y 100 µl de BCIP (Apéndice XII). Dejar revelar hasta la intensidad deseada. La acción de la fosfatasa se detiene con agua y 1 ml solución de EDTA [0.5 M].

RESULTADOS

Clonación de la proteína HT-B en el vector de unión

El dominio de unión al promotor *GAL4* se encuentra en el vector pAS2-1 (Fig. 6-C). Para fusionar la proteína HT-B a éste dominio se diseñaron oligonucleótidos que permitieran amplificar el cDNA de *HT-B* con los sitios *XhoI* y *EcoRI* (Fig. 6-A y 10).

Se generó el cDNA de HT-B con los sitios de restricción indicados mediante reacciones de PCR (Fig.10-B1), utilizándose como templado el cDNA de HT-B que codifica para la proteína madura, es decir, sin péptido señal. El producto de PCR obtenido fue de alrededor de 240 pb, lo que correspondió al tamaño esperado (McClure *et al.*, 1999) (Fig.10-B).

Tanto el vector pAS2-1 como los productos de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *XhoI* y *EcoRI*, se ligaron y se usaron para transformar *E. coli*. El análisis de restricción mostrado en la figura 10-B2 señala una clona positiva que libera el cDNA de HT-B con el tamaño esperado. La secuencia nucleotídica de esta clona indica que se mantuvo el marco de lectura con el dominio de unión al DNA de *GAL4*, como se aprecia en la figura 10-A.

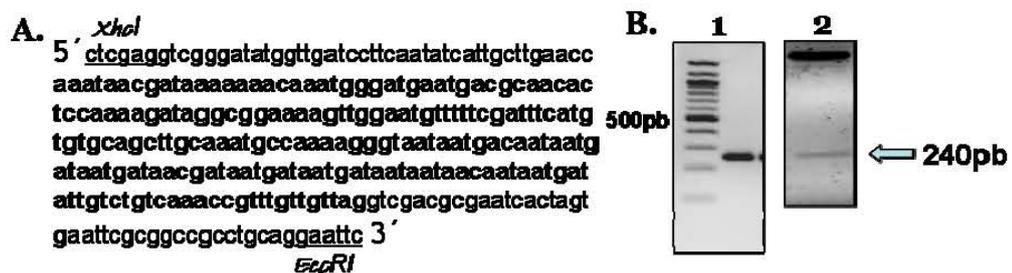


Figura 10. A) Secuencia de nucleótidos de la proteína HT-B en el vector pAS2-1. Se muestran los sitios de restricción *XhoI* y *EcoRI* presentes en los oligonucleótidos diseñados. En negritas está la secuencia de la proteína HT-B madura B) 1. Reacción de PCR para verificar la construcción pAS2-1/HT-B 2. Liberación de HT-B después de digerir pAS2-1/HT-B con *XhoI* y *EcoRI*.

Transformación de levadura con los vectores que codifican el dominio de unión y activación al DNA de GAL4.

Para obtener el cDNA total del polen de *N. alata* AI, se purificó RNA poli A⁺ (Fig. 11A). El cDNA obtenido se muestra en la figura 11A (panel derecho), el cual incluye en sus extremos 5' y 3' a la secuencia SMARTIII y CDSIII, respectivamente.

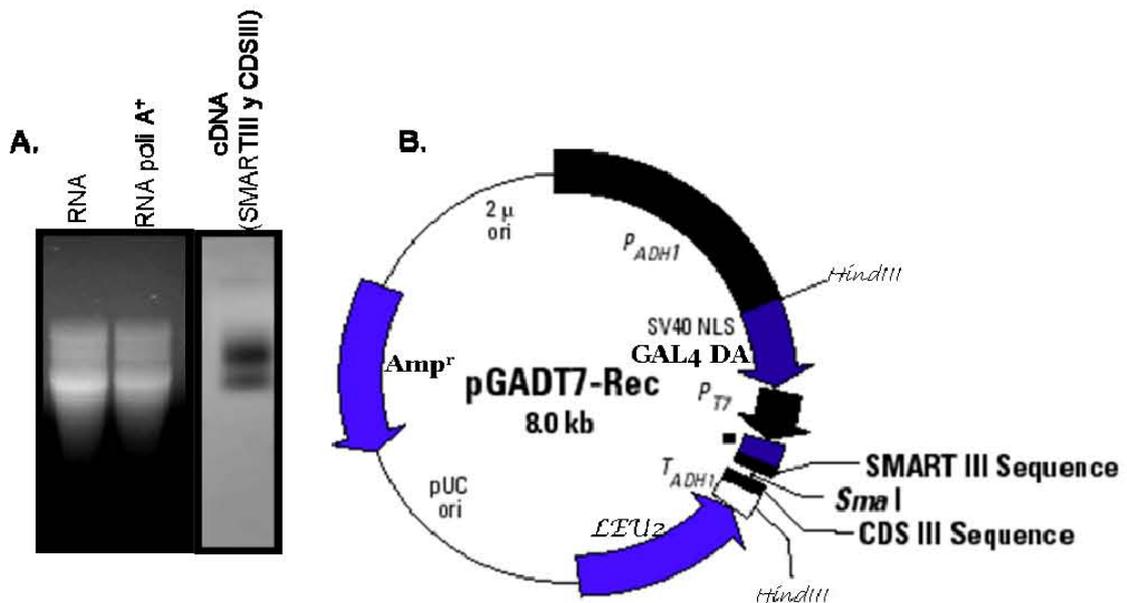


Figura 11. A) Extracción de RNA, RNA poli A⁺, cDNA con los extremos SMARTIII y CDSIII, para recombinarlo en el vector pGADT7-Rec. B) Vector pGADT7-Rec, tiene el dominio de activación del promotor GAL4 (GAL4DA)

Para generar una biblioteca transitoria de cDNA de polen y llevar a cabo el experimento de doble híbrido, la cepa AH109 de *S. cerevisiae* fue cotransformada con pAS2-1/HT-B, pGADT7-Rec linealizado con extremos SMARTIII/CDSIII y con el cDNA con los extremos SMARTIII/CDSIII. De esta forma, las levaduras transformadas que pudieran crecer en medio mínimo 4SD (SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal) serían aquellas que contaran con los dos vectores circularizados y con la interacción proteica. En la figura 12 se muestra que crecieron alrededor de 360 clonas azules (Fig. 12), de las cuales se seleccionaron las colonias de mayor tamaño, ya que las más pequeñas podrían ser

inespecíficas (Manual Matchmaker Library Construction, Clontech). De las clonas seleccionadas se tomó una muestra de 60 para un análisis posterior. El resto de las clonas fueron congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ con YPDA + glicerol.

En el ensayo de doble híbrido se realizó un escrutinio inicial de la biblioteca transitoria presente en *S. cerevisiae* de 4.12×10^5 células; si las 360 colonias recuperadas del experimento de doble híbrido fueran positivas, éstas representarían un 0.087% de transformantes.

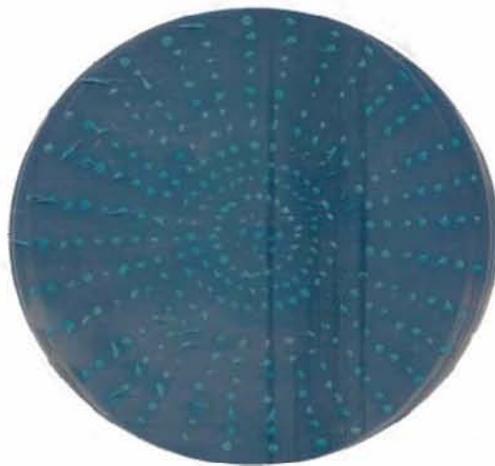


Figura 12. 360 clonas de *S. cerevisiae* con el fenotipo azul del doble híbrido entre HT-B y el cDNA de polen S₁₀₅ de *N. alata*

Identificación de interacciones físicas entre proteínas

Para profundizar en el análisis de las 60 clonas seleccionadas, éstas fueron segregadas independientemente en medio 2SD (SD/-Leu, /-Trp), con el objetivo de seleccionar aquellas que contuvieran el plásmido con el dominio de unión al DNA (pAS2-1/HT-B) y sólo un plásmido con el dominio de activación pGAD7-cDNA, de ésta forma, se eliminarían plásmidos con un dominio de activación que no participara en la interacción registrada (Fig. 13-A).

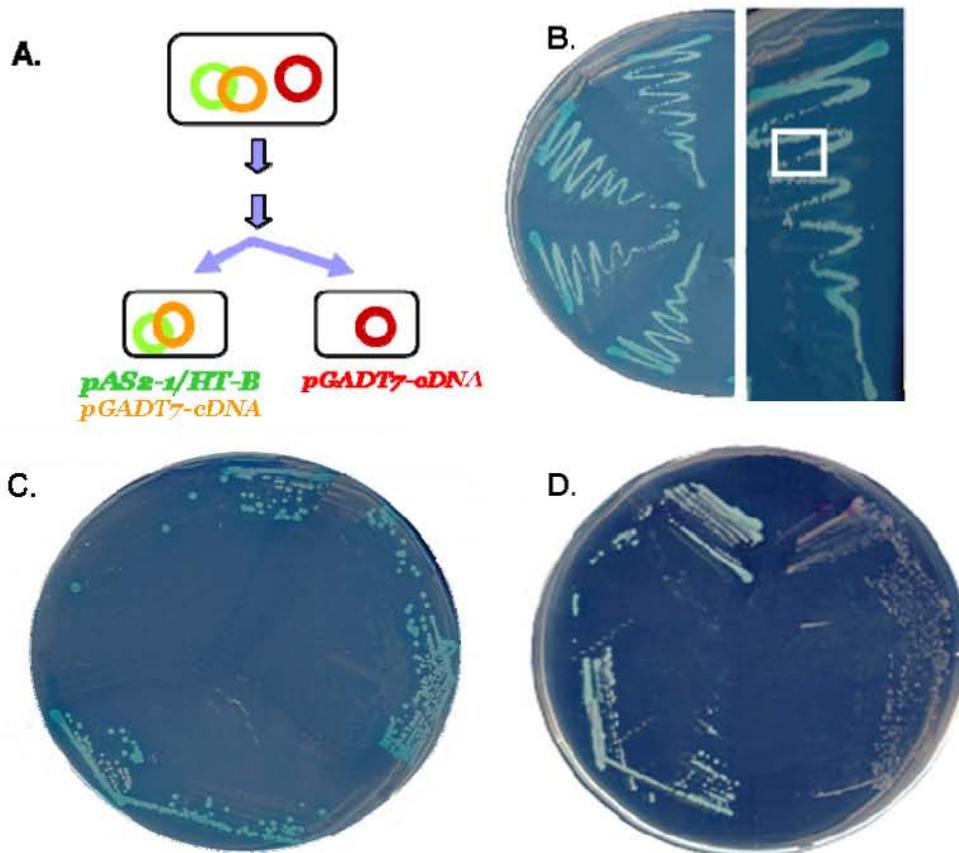


Figura 13. A) Esquema de segregación para separar los vectores que no estén involucrados en la interacción. B) Primera segregación de las clonas del doble híbrido creciendo en medio 2SD. Clonas segregantes, en el recuadro se muestra clonas que pierden y disminuye la coloración azul. C) Tercera segregación de las clonas del doble híbrido, aislamiento de las clonas. D) Clonas crecidas en medio 4SD para verificar la interacción, se mantiene el crecimiento abundante y el fenotipo azul.

Una vez segregadas las clonas, se resembraron en medio 4SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal para verificar si mantenían el fenotipo de interacción (Fig. 13-D). Sólo tres clonas cambiaron su color azul por rojo y detuvieron su crecimiento. Se purificaron los plásmidos de las 57 clonas de *S. cerevisiae* para transformar a *E. coli* y seleccionar los plásmidos pGADT7 recombinantes.

Identificación de los cDNAs recombinados en pGADT7-rec

Las plásmidos derivados de *E. coli* después de la transformación con plásmidos de clonas independientes de levaduras fueron evaluadas por PCR usando oligonucleótidos específicos para los extremos CDSIII y SMARTIII del plásmido pGADT7. El propósito de éste análisis fue recuperar los plásmidos que contuvieran los cDNA's del polen que cuando se tradujeron en *S. cerevisiae*, sus productos interaccionaron con HT-B. Como era de esperarse, se detectaron clonas de *E. coli* con el plásmido pGADT7, de las cuales se sintetizaron diferentes cDNA's de tamaños variables (Fig. 14-A). Las longitudes fueron desde 200 hasta los 800 pb.

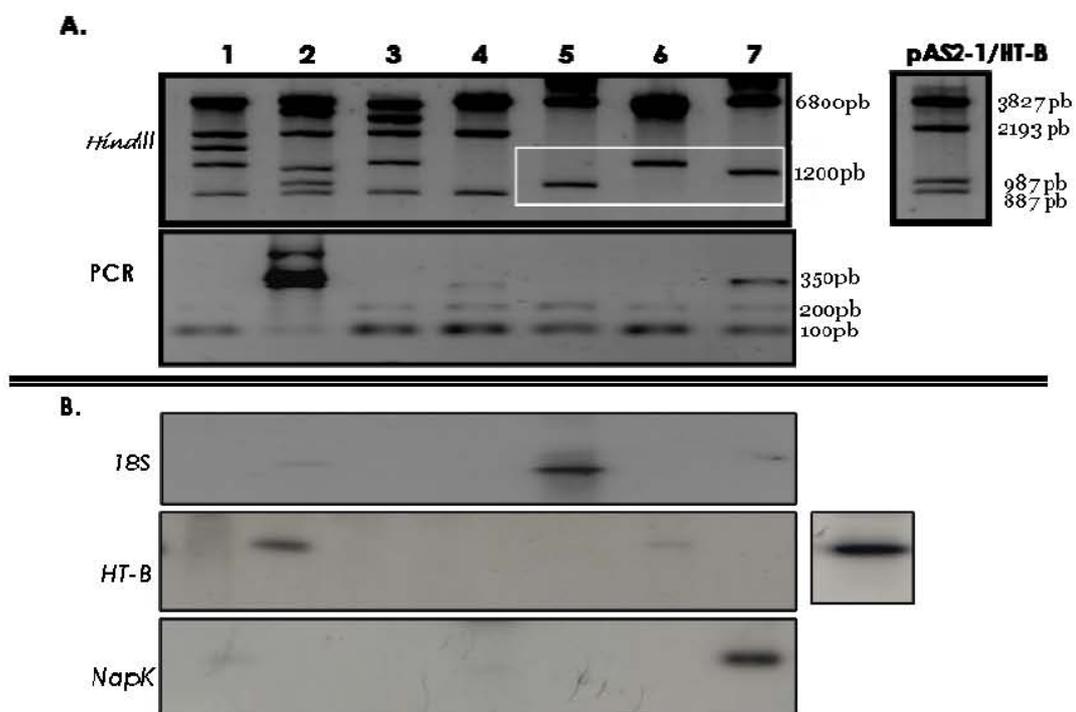


Figura 14. A) Análisis de las clonas seleccionadas del doble híbrido entre la proteína HT-B y proteínas del polen de *N. glauca*. Arriba se presentan las digestiones con la enzima *Hind*III, se tienen 8 patrones, la clona pAS2-1/HT-B libera 4 fragmentos. Abajo se muestran los productos de PCR de estas clonas. B) Hibridaciones DNA:DNA. Del lado izquierdo se señalan las sondas utilizadas para la identificación de 18S, HT-B y NapK. El recuadro de la derecha muestra la hibridación entre pAS2-1/HT-B utilizando como sonda a HT-B.

Para confirmar la identidad de las clonas, se realizó un análisis de restricción, por lo cual se utilizó la enzima *Hind*III (Fig. 14-A). Según el mapa de restricción del vector pGADT7-Rec (Fig. 11-B), la digestión con esta enzima debe liberar un sólo fragmento de alrededor de 871pb siempre y cuando el vector se encuentre covalentemente cerrado, lo cual no es posible porque al momento de la transformación, el plásmido se encontraba lineal, por lo tanto los fragmentos liberados que

no correspondan a este tamaño fueron DNA's recombinantes. Cabe mencionar que el cDNA que se recombinó en pGADT7-Rec podría contar con un sitio de restricción interno para la enzima *HindIII*, por ello, sería normal que la digestión liberara más de un fragmento. En la figura 14-A se observan 7 patrones de digestión encontrados en todas las clonas evaluadas. El tamaño de los fragmentos liberados fue mayor a los 871pb. Es importante señalar que la digestión del vector pAS2-1/HT-B con *HindIII* libera cuatro fragmentos de tamaños 3827pb, 2193pb, 987pb y 887pb (Fig. 6-C), los cuales se observan en la figura 14-A. Saber esto fue muy útil, ya que se pudieron detectar las clonas de *E. coli* con el vector pAS2-1/HT-B. De esta manera, las clonas que se secuenciaron fueron las que tuvieran el patrón de digestión 5, 6 y 7, que correspondió a las clonas 2HY-3, 2HY-12 y 2HY-9 de *S. cerevisiae*, respectivamente (Fig. 14-A).

Sorpresivamente, la secuencia de nucleótidos de la clona 2HY-3 mostró una identidad del 100% con el RNA ribosomal 18S. Para descartar que alguna de las otras clonas que presentan patrones de restricción diferentes pudiera corresponder al cDNA del RNAr 18S, se llevaron a cabo una serie de hibridaciones DNA:DNA, usando como sonda el RNAr 18S. En la figura 14-B panel 1, se observa que el cDNA del RNAr 18S hibrida fuertemente con el patrón de digestión número 5 y ligeramente con el 2 y con el 7. La sonda utilizada para este ensayo se obtuvo a partir de la digestión con la enzima *HindIII* de la clona pGADT7/18S, ésta reacción libera el cDNA del RNAr 18S más un pequeño fragmento que corresponde al vector pGADT7-Rec, una secuencia que tienen todas las clonas, por lo que no es extraño observar hibridaciones ligeras con otras clonas. Asimismo, se realizaron otras hibridaciones utilizando como sonda a *HT-B* (Fig.14-B panel 2), la cual, hibrida fuertemente con las clonas que presentan el patrón de digestión número dos, indicando que estas pertenecen a la clona pAS2-1/HT-B. Por otro lado, cuando se utilizó como sonda a la clona *2HY-9* (Fig.14-B panel 3) solamente se hibrida con las clonas que presentan el patrón de digestión número 7 (Fig. 14-B 2 y 3). La secuencia de ésta clona, muestra que el cDNA recombinado es de 301pb.

El cDNA de la clona 2HY-9 fue comparado con el banco de datos de secuencias de plantas (GenBank Plant Sequences) a nivel de secuencia de aminoácidos (Fig. 15). Esta proteína presentó una identidad de 48.7% con un fragmento de la región amino terminal de la cadena pesada de una cinesina de *Arabidopsis thaliana* (Fig. 15) con un valor E= 9e-09 y de 54.4% con una cinesina de *Gossypium hirsutum* (Fig. 15) con un valor E= 6e-13; en cuanto al porcentaje de similitud que tiene la secuencia de aminoácidos de la clona 2HY-9 que es de 78%% con *Arabidopsis thaliana* y de 86%% con *Gossypium hirsutum* (Fig. 15).

muestran identidad del 100% con el RNA ribosomal 18S (Fig. 17); la secuencia de aminoácidos de 3 clonas pertenecen a la cinesina (2HY-9) (Fig. 17, barra verde); otras 3 clonas murieron en la segregación y con la columna de color morado suman 42 clonas, lo que corresponde al 70% del total de las clonas analizadas, estas clonas no se han secuenciado, ya que se decidió hacerlo sólo para aquellas que liberaran una única banda al ser digeridas con la enzima *Hind*III. Sin embargo, se tiene presente que estas clonas deberán ser analizadas en un futuro.

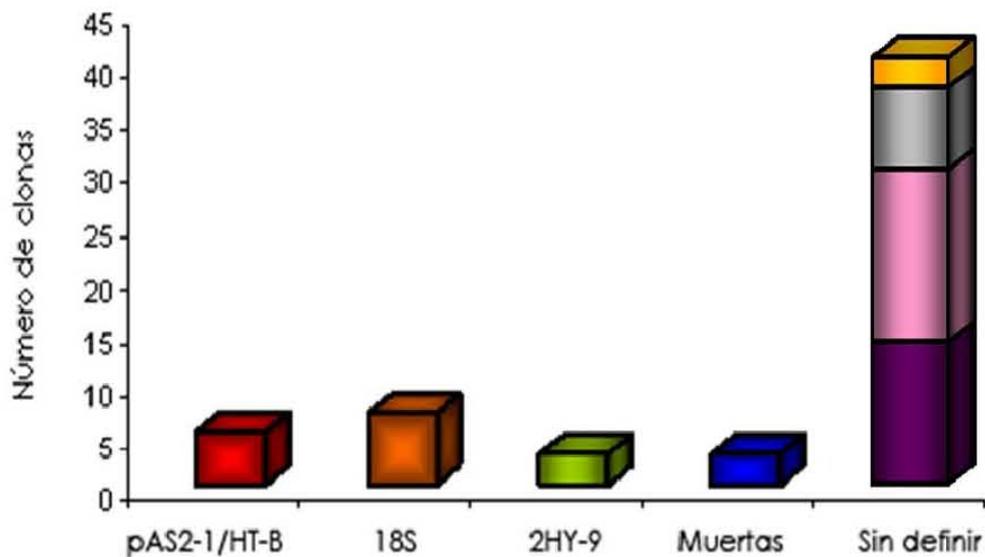


Figura 17. Número de clonas derivadas del ensayo de doble híbrido. El histograma muestra las 60 clonas analizadas, de las cuales 5 corresponden a pAS2-1/HT-B, 7 clonas son RNA ribosomal 18S, 3 son 2HY-9 y 42 clonas de secuencia no determinada. Sin embargo, de las 42 clonas, 14 representadas en color morado muestran un patrón de digestión #1 (Fig.14), 17 clonas de color rosa muestran un patrón de digestión #3 (Fig.14), las grises corresponden a 8 clonas que presentan un patrón de digestión #4 y por último, 3 clonas representadas de amarillo muestran un patrón de digestión #7 (Fig. 14).

Corroboración de la interacción por apareamiento de levaduras

Características de las cepas para el apareamiento y transformación

Las cepas utilizadas para el apareamiento son la Y187 y la AH109 de *S. cerevisiae* que tienen los tipos MAT α y MAT a , respectivamente. Para llevar a cabo el ensayo se requirió de la transformación de las cepas Y187 y AH109 con las clona pGADT-7/NapK y con pAS2-1/HT-B (Apéndice IX). Cada una de las transformaciones se sembró en el medio mínimo respectivo para su selección (SD-Trp) o (SD-Leu).

Corroboración de la interacción entre HT-B y NapK

Con la finalidad de confirmar que la proteína proveniente de la clona cDNA 2HY-9, denominada (NapK= cinesina del polen de *N. alata*) interacciona directamente con HT-B, se realizó un ensayo de doble híbrido únicamente entre estas dos proteínas. En la figura 18 se muestran las clonas que crecieron en el medio mínimo 4SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X- α -gal/. Lo que indica que la interacción entre HT-B y NapK en la cepa AH109 de *S. cerevisiae* es independiente de alguna otra proteína del polen. El ensayo de doble híbrido fue repetido en la cepa Y187 de *S. cerevisiae* con la idea de evaluar la interacción en otra cepa de *S. cerevisiae*. Como se observa en la figura 21-V, la interacción, aunque el crecimiento es muy pobre, se repite en la cepa Y187.

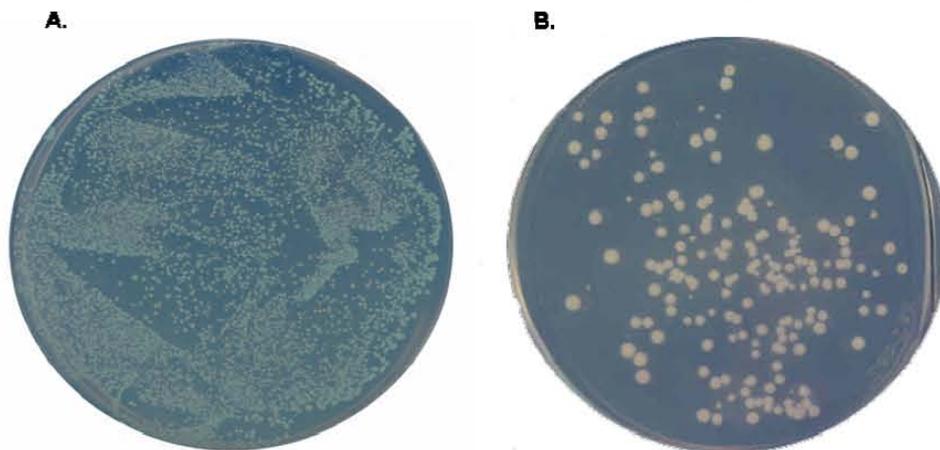


Figura 18. Corroboración de las interacciones mediante ensayos de doble híbrido utilizando únicamente las proteínas de interacción en la cepa AH109 de *S. cerevisiae*. A.- Interacción entre las proteínas HT-B y NapK B.- Interacción entre el RNAr 18S y HT-B.

Las interacciones entre HT-B y NapK son específicas, ya que cuando se transformaron levaduras AH109 ó Y187 con el vector pAS2-1/HT-B ó con el vector pGADT7-NapK solamente (Fig. 19), las levaduras no crecieron en el medio 4SD (Fig. 20- A y B). Lo anterior no se debió a que las levaduras no hayan sido transformadas con uno u otro vector, ya que éstas sí crecieron en el medio SD-Leu y SD-Trp, lo que señala que las levaduras se transformaron correctamente con las construcciones pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK (Fig. 18-A y Fig. 21-V).

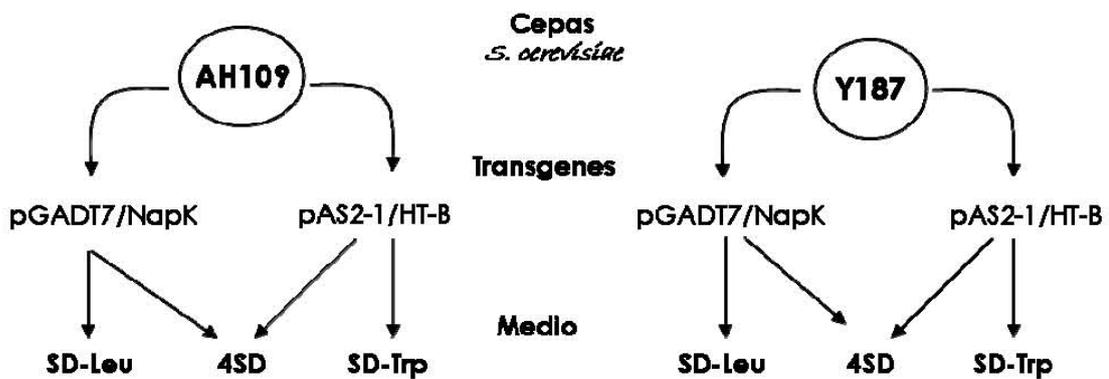


Figura 19 . Transformaciones en las cepas AH109 y Y187 de *S. cerevisiae*, con los transgenes pGADT7/NapK y pAS2-1/HT-B para cada cepa. El medio de selección fue 4SD para evaluar interacción, como control de transformación se sembró en medio SD-Leu para pGADT7/NapK y SD-Trp para pAS2-1/HT-B.

Por otro lado, cuando las levaduras AH109 de *S. cerevisiae* son transformadas con pAS2-1/HT-B y pGADT-7/2HY-3 (RNAr 18S), se observa crecimiento en el medio 4SD (Fig. 18-B).

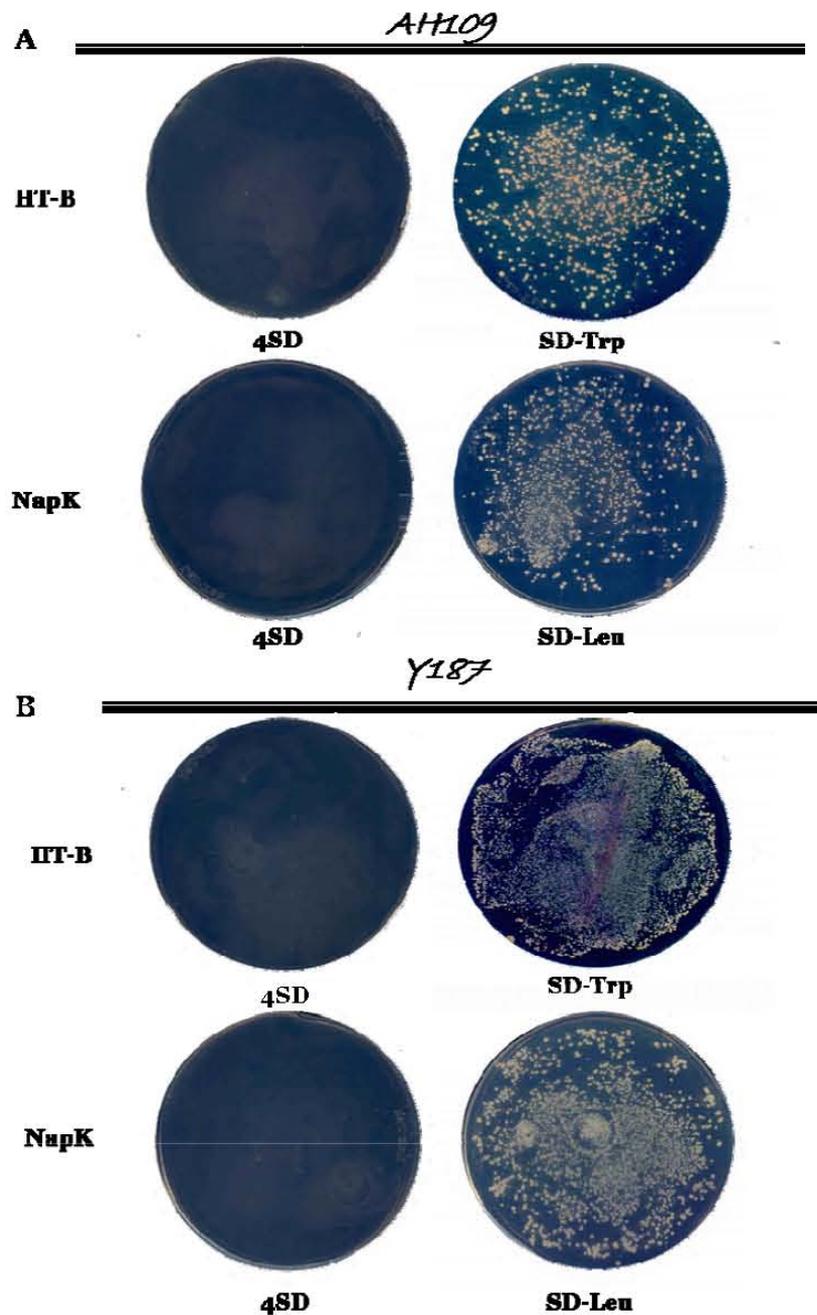


Figura 20. A) Transformaciones de la cepa AH109 de *S. cerevisiae* con pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK. Primera fila son levaduras transformadas con pAS2-1/HT-B, la primera se encuentra en medio 4SD y la segunda en SD-Trp. La segunda fila es la transformación con pGADT7/NapK en medio 4SD y SD-Leu como control de transformación. B) Transformaciones de la cepa Y187 de *S. cerevisiae* con pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK. Primera fila transformación con pAS2-1/HT-B, y la segunda con pGADT7/NapK, la primera columna son transformaciones crecidas en medio 4SD y la segunda en SD-Trp y SD-Leu de abajo hacia arriba.

Apareamiento o “mating”

Otro de los ensayos que se sugieren para la corroboración de la interacción proteína-proteína en el doble híbrido, es por apareamiento o “mating”. Las cepas AH109 y Y187 de *S. cerevisiae* son levaduras haploides que tienen la capacidad de fusionarse, gracias a las aglutininas que presentan en su membrana, obteniéndose levaduras diploides (Zhao *et al.*, 2001; Hashimoto *et al.*, 2005). Este ensayo consiste en transformar por separado las cepas AH109 y Y187 de *S. cerevisiae* con las construcciones pAS2-1/HT-B ó pGADT7/NapK. Las clonas resultantes son sujetas al apareamiento durante 8 horas en medio sin selección. Si existe interacción física entre las proteínas a evaluar, las levaduras podrán crecer en un medio mínimo 4SD. Los apareamientos evaluados fueron los siguientes:

- I. Cotransformación de la cepa AH109 con los vectores pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK
- II. Transformación de la cepa AH109 con el vector pAS2-1/HT-B
- III. Transformación de la cepa AH109 con el vector pGADT7/NapK
- IV. “Mating” entre las clonas AH109 (pAS2-1/HT-B) y Y187 (pAS2-1/HT-B)
- V. Cotransformación de la cepa Y187 con los vectores pAS2-1/HT-B y pGADT7/NapK
- VI. Transformación de la cepa Y187 con el vector pAS2-1/HT-B
- VII. Transformación de la cepa Y187 con el vector pGADT7/NapK
- VIII. “Mating” entre las clonas Y187 (pAS2-1/HT-B) y Y187 (pAS2-1/HT-B)

El resultado del apareamiento se muestra en la figura 21. Se aprecia que el crecimiento en el medio restrictivo (4SD) sólo ocurre cuando HT-B y NapK están presentes tanto en la cepa AH109 como en la Y187 (paneles VIII y IV), con un crecimiento similar a aquel que se presenta cuando *S. cerevisiae* AH109 es transformado con HT-B y NapK (panel I y V). Sin embargo, cuando las cepas AH109 ó Y187 fueron transformadas por separado con HT-B ó NapK el crecimiento en el medio restrictivo fue nulo (paneles II, III, VI, VII).

Los resultados anteriores permiten concluir que la proteína estilar HT-B interacciona con la proteína NapK en *S. cerevisiae*.

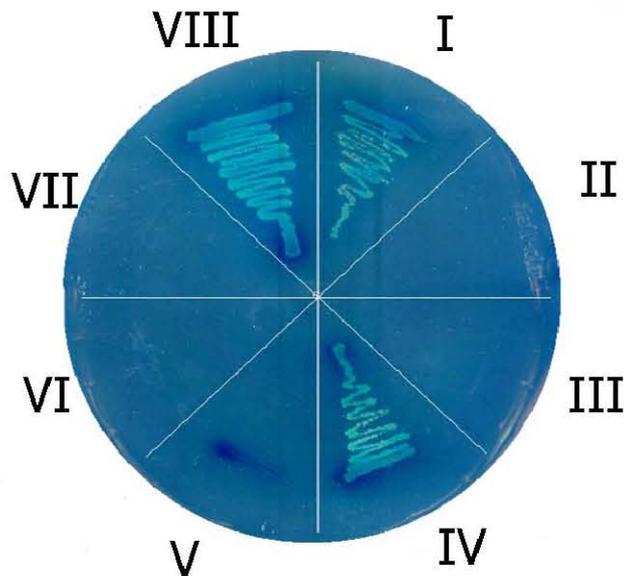


Figura 21. Corroboración de la interacción entre HT-B y NapK por apareamiento de levaduras.

- I. Cepa AH109 cotransformada con el dominio de unión al promotor gal 4 fusionado a la proteína HT-B y con el dominio de activación gal 4 fusionado a la proteína NapK.
- II. Cepa AH109 transformada con el dominio de unión al promotor gal 4 fusionado a la proteína HT-B.
- III. Cepa AH109 transformada con el dominio de activación del promotor gal4 fusionado a la proteína NapK.
- IV. Crecimiento de células diploides. Apareamiento entre la clona AH109 (DU-HT-B) y Y187 (DA-NapK)
- V. Cepa Y187 cotransformada con el dominio de unión al promotor gal 4 fusionado a la proteína HT-B y con el dominio de activación gal 4 fusionado a la proteína NapK.
- VI. Cepa Y187 transformada con el dominio de unión al promotor gal 4 fusionado a la proteína HT-B.
- VII. Cepa Y187 transformada con el dominio de activación del promotor gal4 fusionado a NapK
- VIII. Crecimiento de células diploides. Apareamiento entre las clonas AH109 (DA-NapK) y Y187 (DU-HT-B)

Patrón de expresión de la cinesina (2HY-9) en diferentes órganos de *N. alata*.

Para determinar el patrón de expresión de *NapK*, se realizó un análisis por réplica en Northern con RNA total de tallos, hojas, pétalos, anteras y estilos. En la figura 22 se observa que el transcrito de *NapK* se expresa en todos los tejidos evaluados. La señal se presenta alrededor de 2400 pb, un tamaño similar al reportado para los genes de las diferentes cadenas pesadas de las cinesinas (Kirchner *et al.*, 1999; Cai *et al.*, 2000).

El cDNA de la clona 2HY-12 fue utilizado como sonda en otro ensayo de réplica en Northern (Fig. 21-B). Con las cantidades de RNA que se usaron en este estudio (Fig. 22-C y D) no se detectó ninguna señal, lo que sugiere que el cDNA de esta clona podría ser un falso positivo.

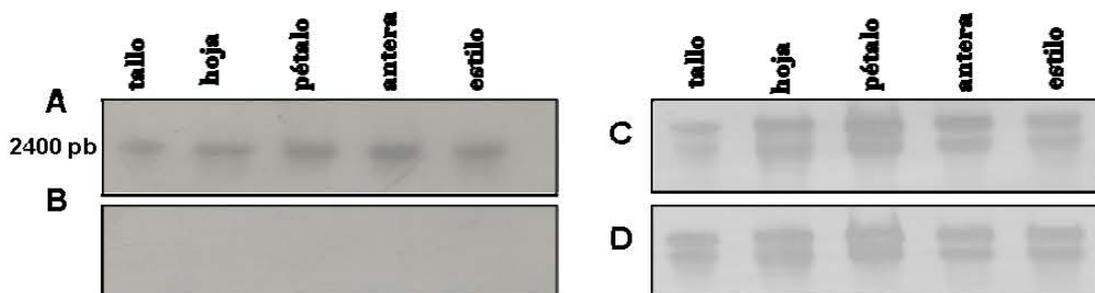


Figura 22. Expresión de *NapK* en plantas de *N. alata*. A) *NapK* B) 2HY-12 C) y D) RNA transferido a la membrana y teñido con azul de metileno.

Datos adicionales

Sobreexpresión de *NapK* en *Escherichia coli*

Un ensayo recomendado para evaluar interacciones proteína-proteína es el de "Pull down", para lo cual se requiere tener al menos una de las dos proteínas que interactúan con un alto grado de pureza.

Aunque no fue uno de los objetivos iniciales de esta tesis, se inició con la sobreexpresión de *NapK*, como una proteína de fusión con la proteína GST, en *E. coli*.

La expresión de la proteína quimérica GST-*NapK* se indujo en *E. coli* y el vector pGEX 4T-2 (Fig. 9-B). Este vector codifica para la proteína Glutathion S-transferasa (GST). La finalidad de fusionar *NapK* a esta proteína es sobreexpresarla en la cepa BL21 de *E. coli*. La clona fue evaluada amplificándola y sobreexpresándola en pequeña escala (Fig. 23-B y C). La sobreexpresión de la proteína *NapK* se indujo con IPTG (ver Materiales y Métodos) y se comparó con la sobreexpresión de la proteína GST de 26 kDa (Fig. 23-C, carril 3). La proteína *NapK* fusionada a la GST de 36kDa se observa en la figura 23-(carril 3, clona 1,2). Los 10 kDa de diferencia corresponden al producto del fragmento de *NapK* fusionada a GST.

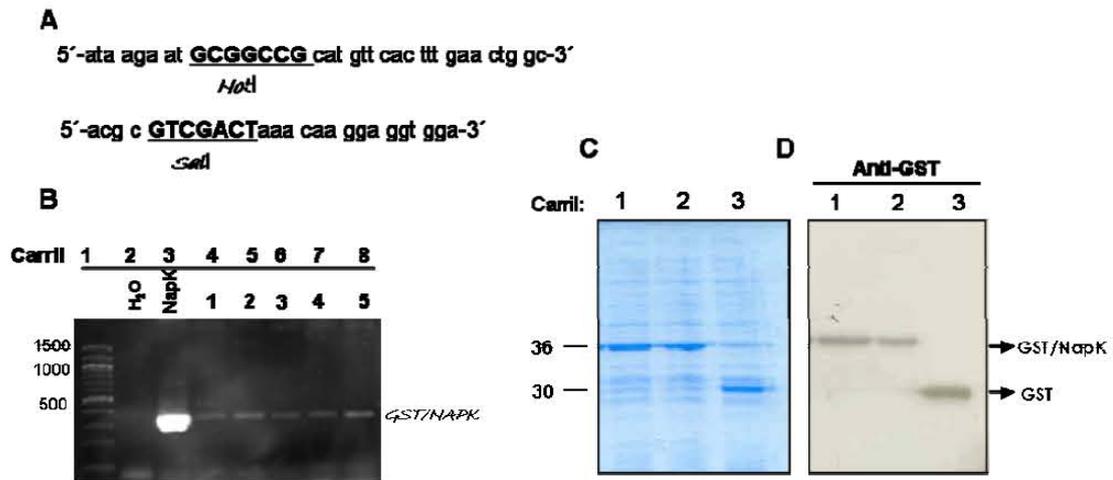


Figura 23. Clonas de *E. coli* expresando la proteína quimérica GST-NapK. A) Oligonucleótidos con los sitios de restricción *NotI* y *SacI* para clonar a NapK en el vector pGEX. B) Amplificación por PCR de las clonas positivas *GST/NapK*. C) Análisis por SDS-PAGE de la sobreexpresión de la proteína GST-NapK. D) Western blot usando el anticuerpo anti-GST.

Para recuperar a la proteína recombinante, se lisaron las células de la cepa BL21 de *E. coli*. La proteína GST-NapK se presenta mayoritariamente en la fracción soluble (Fig. 24-A carril S). Para purificar la proteína NapK recombinante se utilizó la resina de afinidad GST agarosa, un gradiente de NaCl para liberar proteínas unidas inespecíficamente a la columna y la posterior elución de GST-NapK de la resina con glutatión reducido. En la figura 24-A se observa la sobreexpresión de la NapK fusionada a la proteína GST en las diferentes fracciones proteicas con una masa de 36 kDa, de igual manera se ve a la proteína GST a 26 kDa. Para estar completamente seguros se realizó un ensayo de western-blot identificando a la proteína GST, las señales corresponden a las proteínas sobreexpresadas (Fig. 24-B).

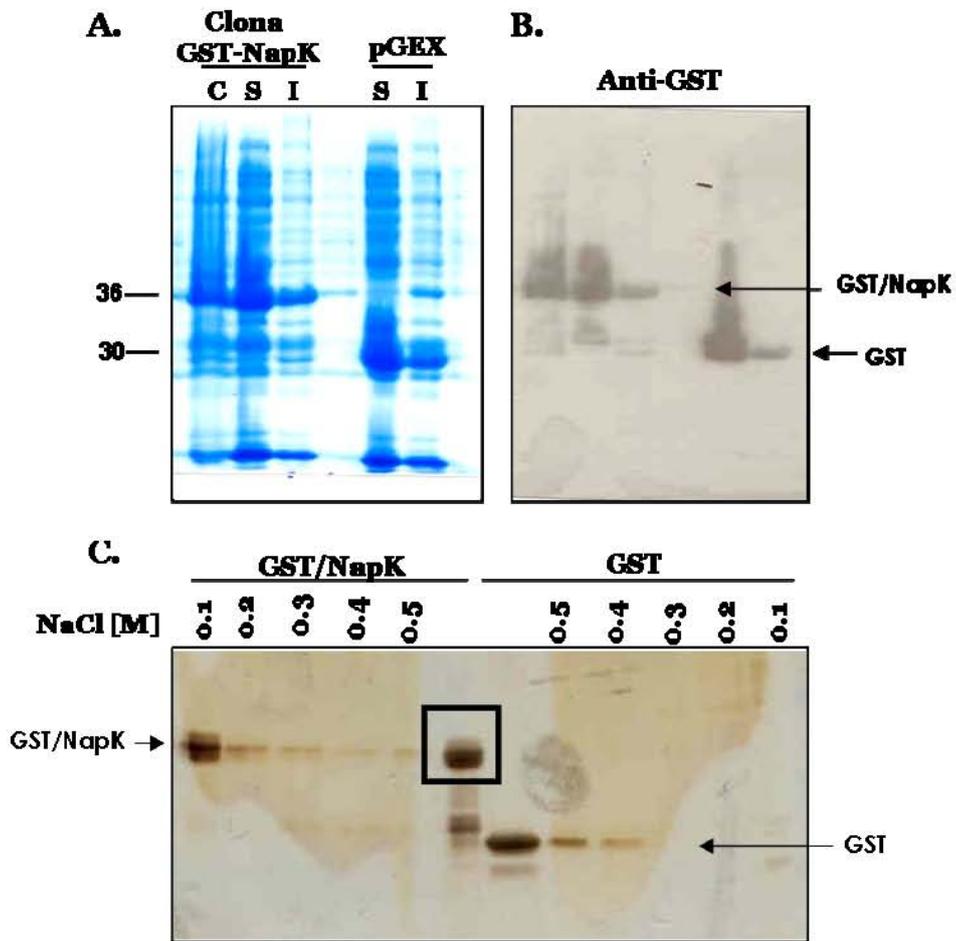


Figura 24. Sobreexpresión de la proteína de fusión GST-NapK en *E. coli* A) Clona que sobreexpresa a la proteína de fusión GST-NapK separada en un gel de acrilamida desnaturizante teñido con azul de coomassie, C=son células de *E. coli* sin lisar, S=fracción soluble después de lisar, I=fracción insoluble después de lisar. B) Inmunoréplica utilizando anticuerpos anti GST. C) Fracciones eluidas de la columna de agarosa a diferentes concentraciones de sal, en el recuadro se muestra la proteína GST-NapK ya eluida. Gel de acrilamida al 12% teñido con plata, se observa la purificación de las proteínas GST-NapK y GST con un gradiente de NaCl.

A partir de la fracción de proteínas solubles, las proteínas GST y GST/NapK se purificaron uniéndolas a la glutatión agarosa y lavando con un gradiente de NaCl, en la figura 24-C se muestra tanto GST/NapK en una fracción muy enriquecida como GST pura en otra fracción. De esta manera se podrá realizar en el futuro un ensayo de "Pull down" (Fig. 24-C).

DISCUSIÓN

Como producto de la interacción entre la proteína HT-B con el cDNA total de polen crecieron 360 clonas en medio mínimo 4SD (-Leu/-Ade/-His/-Trp/ α -X-gal). Es de notar la cantidad de interacciones positivas en el ensayo, y aunque no se esperaba una cantidad definida, se sospechaba de la presencia de muchas interacciones falsas, las cuales pueden estar dadas por la presencia de más de uno de los vectores transformados (Fig. 13-A).

Esta posibilidad fué descartada con la segregación de 60 clonas tomadas como muestra para su análisis (Fig.13). Los criterios de selección de las 60 clonas no fueron al azar, se prefirieron aquellas clonas que tuvieron un crecimiento abundante y que presentaron una mayor intensidad de coloración azul, lo que estaría directamente ligado a la fuerza de la interacción. Recordemos que la expresión del gen *MEL1* esta bajo el control del promotor *GAL4*, y que el gen codifica para una α -galactosidasa la cual hidroliza α -X-gal que es añadido al medio de selección. De esta forma, las clonas positivas además de crecer en medio mínimo 4SD (-Leu/-Ade/-His/-Trp/ α -X-gal) contaron con fenotipo de color azul fuerte, lo que significó que la interacción de los dominios de unión y activación estuvieron por más tiempo unidos, dando como resultado una mayor transcripción del gen *MEL1*. Las 60 clonas fueron segregadas en medio mínimo 2SD (-Leu/-Trp/ α -X-gal), de donde tres de ellas resultaron ser falsos positivos por contar con más de un vector involucrado en la interacción (Fig.13-A y D); es decir, estas clonas, cambiaron su fenotipo azul por rojo debido a la falta de adenina y dejaron de crecer. Por otro lado, las transformaciones realizadas con sólo uno de los dominios, ya sea de unión o de activación, con diferentes entornos genéticos y que fueron sembradas en medio 4SD, no tuvieron la capacidad de crecer, lo que indica que dominios diferentes a los presentes por la cotransformación, no activan al promotor *GAL4* (Fig. 20). De esta forma, puede pensarse que las proteínas exógenas presentes en el ensayo interaccionan positivamente y que la proteína HT-B está interaccionando con una o varias proteínas del polen. Inesperadamente al revelarse las secuencias de los cDNAs de las clonas interesantes (ver Métodos y Resultados). Una de ellas (de las más abundantes), fue analizada en su secuencia de aminoácidos. El resultado indicaba que no existía identidad con ninguna proteína de plantas conocida; sin embargo, la secuencia de nucleótidos mostró el 100% de identidad con el RNA ribosomal 18S. A pesar de que la interacción entre HT-B y RNAr 18S se corroboró nuevamente en un ensayo de doble híbrido (Fig. 18-B), este resultado es un falso positivo, ya que la secuencia del RNAr 18S no se traduce y es necesaria la traducción del dominio de activación a la que esta fusionada

para activar la transcripción de los genes *ADE*, *HIS* y *MEL1*. Por lo tanto, el resultado de la traducción del RNAr 18S es una proteína aberrante que interacciona con la proteína HT-B. La aparición de falsos positivos, como el RNAr 18S, ocurre durante la síntesis del cDNA, ya que para su síntesis se usaron los oligos dT y "random primer" como iniciadores. El hecho de encontrar una interacción sin sustento entre el RNAr 18S con HT-B deja a la vista que el RNA poli A⁺ que se purificó, se encontraba aún enriquecido con el RNA ribosomal (Fig. 11). Por lo que se propone que el estudio de interacciones proteína-proteína por medio de ensayos de Y2H requiere de la doble purificación del RNA poli A⁺.

Otra de las clonas analizadas y secuenciadas fue la clona 2HY-9. Esta clona tiene identidad del 48.7% con una cinesina de *Arabidopsis thaliana* y 56.9% con una cinesina de *Gossypium hirsutum*. El porcentaje de clonas que resultaron codificar para proteínas tipo cinesina fue del 3.22% (Fig. 17).

La interacción con la cinesina de *N. alata* (NapK) fue corroborada transformando *S. cerevisiae* solamente con HT-B y NapK, así como en ensayos de apareamiento o "mating" entre la cepas AH109 (HT-B) y Y187 (NapK ó 2HY-9). En ambos casos la interacción fue positiva.

Ya que la evidencia de la interacción entre HT-B y NapK fue observada en *S. cerevisiae*, será necesario corroborar tal interacción por otros métodos tales como ensayos de "Pull down", cromatografía de afinidad, etc.

Dado que en esta investigación sólo se evaluó una fracción de las clonas generadas (60 de 360 clonas), es importante continuar con el análisis del resto para evitar la pérdida de clonas con interacciones importantes.

Cinesinas

Las cinesinas son proteínas conocidas como motores moleculares que están presentes en todos los organismos eucarióticos. Estas proteínas convierten la energía química almacenada en moléculas de ATP en fuerza mecánica a lo largo de los microtúbulos (Kirchner *et al.*, 1999; Goldstein y Valentine, 1999). La presencia de 14 familias de cinesinas (Lawrence *et al.*, 2004) denota su importancia y diversificación funcional en diferentes especies. Son importantes en la mitosis y meiosis, en el posicionamiento y movimiento de organelos, en la formación flagelar, en la transducción de señales, en el transporte vesicular y en el acomodo de los microtúbulos en la célula (Goldstein y Valentine, 1999 ; Vale y Milligan 2000; Lloyd y Hussey, 2001).

Las cinesinas convencionales son heterotetrámeros que consisten de dos cadenas pesadas (KHC's) de 100—130 kDa y de dos cadenas ligeras (KLCs) de 60-70 kDa (Goldstein y Valentine, 1999).

Las cadenas pesadas de una cinesina convencional tienen tres dominios: Un dominio motor generalmente hacia el extremo amino, una región central en forma de tallo en el cual se dimerizan las dos cadenas pesadas y un dominio globular generalmente hacia el extremo carboxilo. Todas las cinesinas contienen altamente conservado el dominio motor con alrededor de 350 aminoácidos (Richardson *et al.*, 2006) (Fig. 25). Este dominio cuenta con un sitio de unión a ATP y un sitio de unión a microtúbulos. De los motores moleculares conocidos, las cinesinas parecen ser las más procesivas, en las que cada molécula de ATP proporciona la energía para “caminar” 8 nm (Schnitzer, 1997). Cabe mencionar que el dominio motor no siempre está presente hacia la región amino, también se conocen cinesinas que lo sitúan en el extremo carboxilo o en la región media de la cadena pesada (Goldstein y Valentine, 1999), lo cual es importante ya que existe relación del dominio motor con la dirección en la que ésta proteína se mueve.

En este trabajo se encontró que el cDNA de NapK hibrida con un transcrito de alrededor de 2,200 pb, tamaño que coincide con el de las cinesinas convencionales, incluida una reportada para tubos polínicos de *Nicotiana tabacum* (Cai *et al.*, 2000).

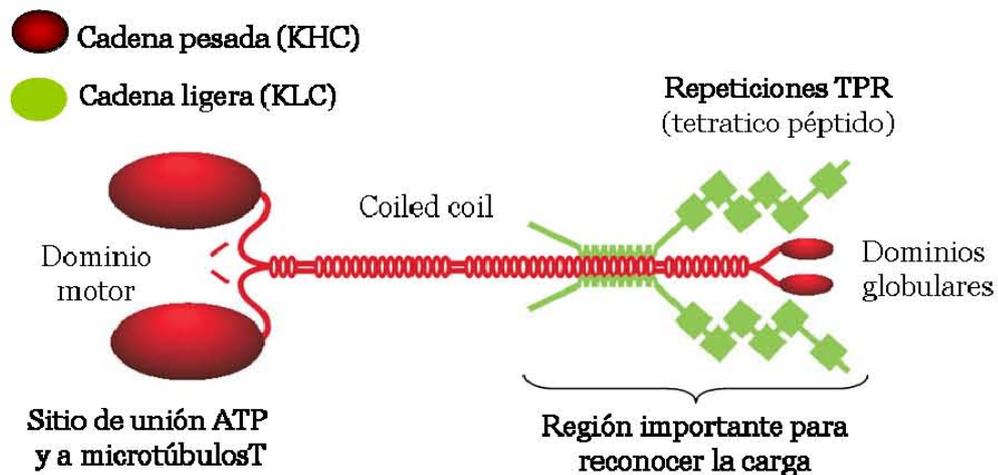


Figura 25. Esquema de una cinesina convencional. La cadena pesada de la cinesina (KHC) contiene: 1) dominios motores en la región amino de cada cadena pesada que tienen un sitio de unión a microtúbulos y tienen un sitio de unión a ATP; 2) dominios "coiled coil" con el dímero que se forma con las dos cadenas pesadas; 3) dominios globulares, hacia la región carboxilo de la KHC, importantes en el reconocimiento de la carga. La cadena ligera de la cinesina (KLC), en *N. crassa* no se presenta, tiene: 1) repeticiones tetraco péptido (TPR) que están involucradas en las interacciones proteína-proteína y en el reconocimiento de la carga, 2) la región helicoidal importante para la unión de la KLC con la cadena pesada.

Por su parte, la cadena ligera (KLC) no está tan conservada como el dominio motor de la cadena pesada. En una cinesina convencional, la KLC tiene hacia su extremo amino un dominio helicoidal que la une a la cadena pesada, también presenta un motivo de 6 repeticiones tetratricopéptido (TPR), que es una secuencia de 34 aminoácidos que modula las interacciones proteína-proteína, ya sea intramoleculares o intermoleculares (Gindhart y Goldstein, 1996). En *Drosophila melanogaster*, la cadena ligera de las cinesinas regula la actividad de la cadena pesada, ya que la interacción entre estas dos es específica (Gauger y Goldstein, 1993). Además, esta cadena identifica la carga que debe transportar a través de interacciones con proteínas accesorias (Kumar *et al.*, 1995; Gindhart y Goldstein, 1996), receptores (Almenar y Goldstein, 2001) o regiones membranales conocidas como balsas lipídicas (Goldstein, 2001). Las cinesinas en organismos como *Neurospora crassa* no son convencionales, no cuentan con una cadena ligera, por lo que se sugiere que la selección de la carga que debe transportar está relacionada con dominios cercanos a la región carboxilo de la cadena pesada (Kirchner *et al.*, 1999).

Estudios en *D. melanogaster* indican que la activación de la cinesina no se da a través de la disociación y asociación de las cadenas (Gauger y Goldstein, 1993). En cambio, trabajos en *N. crassa* sugieren que la activación está dada por la conformación de la cinesina (Kirchner *et al.*, 1999; Seiler *et al.*, 2001), mostrando dos estados, uno en el que la cinesina se encuentra plegada e inactiva y un estado activo propiciado por la unión de la carga (Fig. 26).

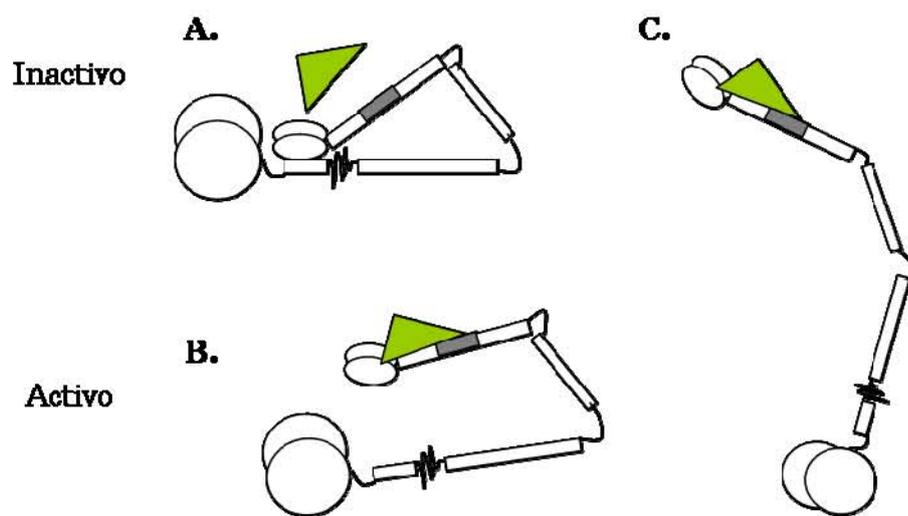


Figura 26. Modelo de activación de las cinesinas de *N. crassa*. A) estado inactivo de la cinesina, el dominio globular está muy cerca del dominio motor. B) identificación de la carga, cambio conformacional y activación de la cinesina C) cinesina activa

La proteína NapK encontrada en el ensayo de Y2H, que tiene interacción con la proteína estilar HT-B, tiene identidad con la región amino de la cadena pesada de las cinesinas de *A. thaliana* y *G. hirsutum*. Si HT-B se une a la región amino de la cadena pesada de una proteína tipo cinesina no convencional, los trabajos en *N. crassa* nos dan elementos para sugerir que HT-B activa a la cinesina para el transporte de la carga. Se requieren de diversos ensayos que deberán confirmar esta hipótesis.

Las cinesinas son proteínas muy abundantes y de expresión ubicua en las angiospermas (Richardson *et al.*, 2006), lo que se confirma con nuestros resultados, ya que NapK tiene una expresión ubicua en los órganos estudiados en *N. alata* (Fig. 22). La proteína NapK tiene identidad con cinesinas de *Arabidopsis*. Sólo en esta especie se han identificado alrededor de 61 miembros (Lee y Liu, 2004). Estudios filogenéticos sitúan a la mayoría de las cinesinas vegetales en las familias Kinesin-14 y Kinesin-7 (Lawrence *et al.*, 2004). Gran parte de las cinesinas que pertenecen a la familia Kinesin-14, contiene el dominio motor hacia su región carboxilo, indicando que la identificación de la carga está dada por su región amino (Lawrence *et al.*, 2004). Cabe mencionar que las cinesinas de ésta familia están involucradas en el transporte membranal y organelar (Soldati y Schliwa, 2006). Nuestros datos indican que la proteína HT-B interacciona con la proteína NapK que muestra identidad con la región amino de la cadena pesada de *A. thaliana* (Fig. 16), la cinesina de *A. thaliana* pertenece a la familia Kinesin-14, de esta manera se sugiere que NapK podría ser un miembro de ésta familia.

El transporte vesicular, crecimiento del TP, HT-B y el rechazo del polen en *Nicotiana*

Las células eucariotas desarrollaron un sistema endomembranoso que divide a la célula en diferentes compartimentos, en cada uno se realizan diversas funciones que son necesarias para mantener el equilibrio en la célula (Lewin, 2004).

El transporte vesicular intracelular requieren del reconocimiento y la fusión de las vesículas a la membrana blanco entre los diferentes organelos (Nebenfuhr, 2002). Cuando el transporte de las vesículas se dirige del RE al Aparato de Golgi se dice que el transporte es anterógrado, si se presenta en sentido contrario del aparato de Golgi al RE se denomina retrógrado (Battery *et al.*, 1999). La fusión de la vesícula en la membrana blanco depende de moléculas SNARE (soluble N-

ethylmale-imide-sensitive attachment protein receptor) que están presentes tanto en la vesícula (v-SNARE), como en la membrana blanco (t-SNARE) (Dieffenbach *et al.*, 2002). La interacción de estas proteínas está regulada por diferentes tipos de GTPasas que pertenecen a la familia de proteínas Rab (Batterly *et al.*, 1999; Ueda *et al.*, 2004). Las Rab GTPasas han sido identificadas como parte del sistema de endocitosis en plantas y su participación es indispensable en el crecimiento del tubo polínico (TP) (Ueda *et al.*, 2004). La mayoría de las proteínas Rab aisladas cuentan con señales de isoprenilación hacia el extremo carboxilo, actualmente se realizan experimentos para definir si la proteína HT-B cuenta con estos sitios de prenilación hacia su extremo carboxilo, lo cual es esencial para la unión a la membrana y para la interacción con otras moléculas reguladoras, (McClure, comunicación personal, 2006) de confirmarse esta hipótesis, cobraría relevancia el tráfico vesicular intracelular como parte del mecanismo del rechazo del polen en *Nicotiana glauca*.

El tubo polínico es una célula elongada que crece de forma apical, su crecimiento polarizado se mantiene por la fusión de las vesículas secretoras en la región del ápice incorporando componentes de la membrana plasmática y de la pared celular (Taylor, 1997; Samaj *et al.*, 2004).

El citoesqueleto del TP está compuesto por microtúbulos, filamentos de actina y sus proteínas asociadas (Cai *et al.*, 2000-A). Los microtúbulos se extienden y orientan a lo largo de la parte axial de los TP y se concentran en su región cortical. Los filamentos de actina además de orientarse de manera muy similar a los microtúbulos, éstos se encuentran formando una red en la región subapical del TP (Cai *et al.*, 1997). La participación del citoesqueleto en la respuesta de rechazo del polen, se demostró en *Papaver*, donde se determinó que algunos intermediarios en la cascada de señalización desestabilizan el citoesqueleto de actina evitando el crecimiento del tubo polínico en cruces incompatibles (Geitmann *et al.*, 2000; Snowman *et al.*, 2002).

En el tubo polínico se encuentran una serie de proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). Una de ellas es una proteína homóloga de cinesina del tubo polínico de *Nicotiana tabacum*, la cual se localiza en la región apical y en el cortex (Lancelle *et al.*, 1987; Cai *et al.*, 1993 y 2005). Esta cinesina se relaciona con pequeñas estructuras vesiculares (Tiezzi *et al.*, 1992). De manera interesante se detectó a una cinesina de 90-kD en el tubo polínico de *Nicotiana tabacum*, la cual se asocia a organelos de la región cortical de los microtúbulos de los tubos polínicos (Cai *et al.*, 2000). La función de las diferentes MAP's encontradas en el TP debe estar relacionada a su localización, lo que indicaría que estas proteínas tienen distintas funciones (Romagnoli *et al.*, 2003;

Hirokawa y Takemura, 2004); sin embargo, su carácter de motores moleculares los posicionan en acciones relacionadas directamente con el transporte vesicular. El hecho encontrar en el ensayo de doble híbrido una proteína asociada a microtúbulos y su posible participación en el tráfico vesicular del TP, nuevamente dirige la atención hacia entender el mecanismo del rechazo del polen en el contexto del tráfico vesicular.

La dirección del movimiento de las cinesinas a lo largo de los microtúbulos está relacionado con la posición del dominio motor de su cadena pesada (Goldstein y Valentine, 1999). Los microtúbulos crecen a partir del centro de organización de microtúbulos (MTOC) (Azimzadeh *et al.*, 2001) y a pesar de que en plantas no se ha observado una estructura como tal, se han encontrado elementos y proteínas homólogas que indican que existe una estructura parecida (Lloyd y Hussey, 2001). A partir del MTOC, los microtúbulos crecen en dos direcciones, una en la que la síntesis es rápida conocida como el extremo positivo (+) del microtúbulo y otra en el que el crecimiento del microtúbulo es lento, lo que es conocido como el extremo negativo (-) (Azimzadeh *et al.*, 2001). Las cinesinas que presentan su dominio motor hacia el extremo amino de la cadena pesada se mueven en dirección al extremo positivo del microtúbulo. En cambio, las cinesinas que sitúan su dominio motor hacia su extremo carboxilo caminan o se desplazan hacia el extremo negativo. Si la interacción entre la proteína HT-B y NapK ocurre *in vivo*, entonces la dirección en la que se movería NapK junto con HT-B, sería hacia el extremo negativo de los microtúbulos, es decir hacia el centro del tubo polínico.

El transporte vesicular, HT-B y el rechazo del polen en *Nicotiana*

El modelo del secuestro de las S-RNasas en vacuolas descrito por Goldraj *et al.* (2006) nos sitúa en un punto en donde el tráfico vesicular es esencial para describir el rechazo del polen. Estudios de inmunolocalización en *N. alata* indican que la entrada de las S-RNasas al tubo polínico ocurre por endocitosis (Goldraj *et al.*, 2006). El endosoma temprano formado con estas proteínas, se transforma en un endosoma tardío y puede o no fusionarse a una vacuola en donde las S-RNasas son almacenadas. Esta forma de aislar el efecto citotóxico que se produce con las S-RNasas dentro del TP es parecida a al de las células que producen la toxina ricina A (DiCola *et al.*, 2005; McClure, 2006-A). Las ricinas son citotoxinas que se introducen a su célula blanco por endocitosis, llegan a la red tubular endosomal (TEN) (Bonifacino y Rojas, 2006) de donde se transportan en dos direcciones: ya sea para formar un endosoma temprano, después uno tardío y culminar en el almacén de la toxina en las vacuolas ó por medio de un transporte retrógrado que dirigen pequeñas cantidades

de la citotoxina hacia el Aparato de Golgi y después al retículo endoplásmico (RE) (Vago *et al.*, 2005). La salida de la ricina A al citoplasma de la célula blanco se da a través del sistema de degradación del RE (ERAD) por el cual las ricinas A pueden translocarse del RE al citoplasma (Roberts y Smith, 2004; Di Cola *et al.*, 2005). McClure (2006) señala que las S-RNasas posiblemente utilicen esta vía retrógrada para escapar al citoplasma del TP, de esta manera, las S-RNasas del RE al traslocarse al citoplasma del TP interaccionarían con SLF, recordemos que SLF se encuentra mayoritariamente en la periferia del RE (Wang y Xue, 2005). Una vez que la S-RNasa es traslocada al citoplasma del TP interacciona específicamente con SLF, estabilizando a la proteína HT-B, como consecuencia se provocaría la ruptura de la vacuola y la liberación masiva de las S-RNasas al citoplasma del TP, en donde se degradará su RNA, dando como resultado final la inhibición de su crecimiento (Goldraj *et al.*, 2006) y el fenotipo de incompatibilidad. En cambio si la interacción no es alelo específica, se conduciría a la degradación de la proteína HT-B, manteniendo a las S-RNasas estables en el compartimento vacuolar.

Es interesante pensar en este escenario, ya que el objetivo planteado en este trabajo fue encontrar proteínas del polen que permitan establecer la funcionalidad de HT-B en el mecanismo del rechazo del polen. Por las características de la proteína NapK sería poco probable que participara como la proteína hipotética (PP) involucrada en la estabilidad de HT-B, como se señala en el modelo de Goldraj *et al.*, (2006). El hallazgo de una posible interacción de HT-B con un motor molecular (NapK) nos conduce a pensar que el sistema de tráfico endomembranoso podría jugar un papel importante en el rechazo del polen. Dado que la proteína NapK tiene identidad con cinesinas de *A. thaliana*, y *G. hirsutum*, las cuales presentan su dominio motor hacia la región carboxilo de la cadena pesada, nos deja ver que su movimiento sería hacia el interior del TP y el hecho de que HT-B contenga posibles señales de isoprenilación como las proteínas Rab, refuerza la idea de que la proteína HT-B pueda asociarse a sistemas membranosos (Goldraj *et al.*, 2006). Nosotros proponemos que HT-B se asocia a las vesículas que transportan a las S-RNasas y que la interacción entre HT-B y NapK ocurre a través de un dominio de HT-B que ve hacia el citoplasma, así mismo, que el transporte retrogrado de las vesículas se lleva a cabo a través de microtúbulos como se muestra en el modelo de la figura 27.

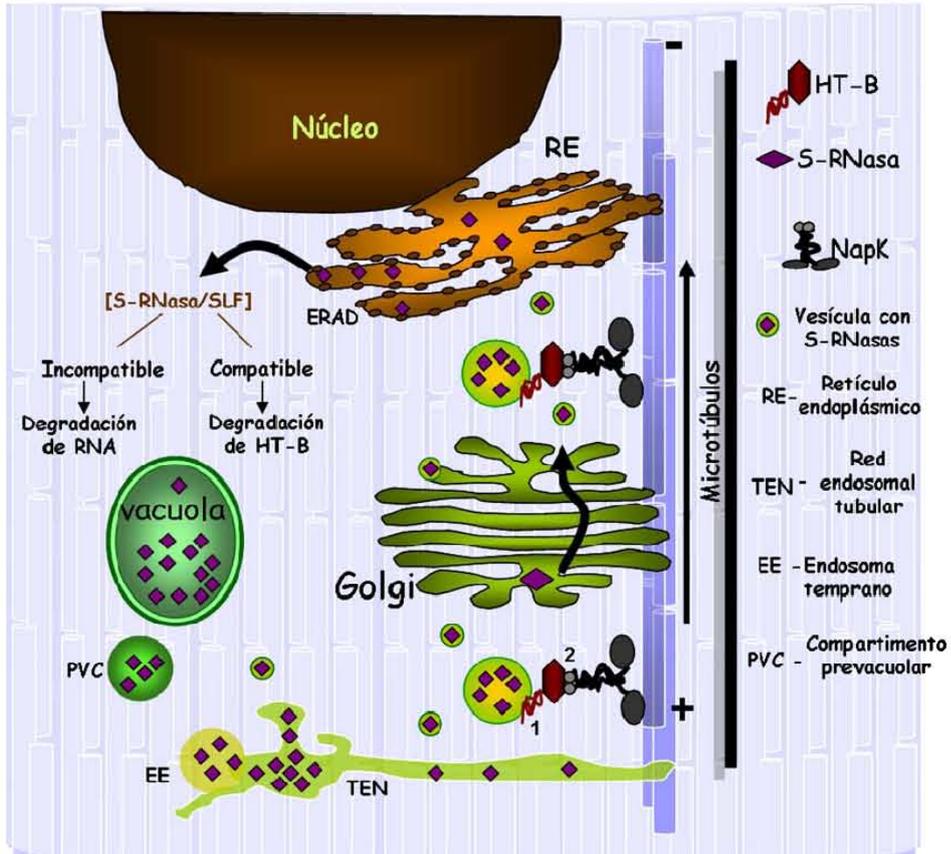


Figura 27. Modelo de la interacción entre NapK y HT-B y su participación en el rechazo del polen en *N. glabra*. 1.- La proteína HT-B se asocia a las vesículas que contienen a las S-RNasas quedando localizada hacia la cara citoplasmática. 2.- El transporte de las S-RNasas hacia el retículo endoplásmico (RE) se lleva a cabo por medio de la interacción entre NapK y HT-B. La proteína NapK dirige su carga hacia el extremo negativo de los microtúbulos. 3.- Una vez que las S-RNasas se encuentran en el RE son liberadas al citoplasma del tubo polínico donde pueden interactuar con SLF/SFB y darse el reconocimiento específico, desencadenando o no la ruptura de la membrana vacuolar donde se encuentran contenidas las S-RNasas.

CONCLUSIONES

La proteína estilar HT-B interacciona físicamente en el entorno de *S. cerevisiae* con la región amino terminal de la cadena pesada de una proteína tipo cinesina del polen de *N. alata* (NapK).

La proteína NapK muestra un patrón de expresión de RNAm ubicuo en diferentes órganos de *N. alata*.

La proteína NapK es homóloga a cinesinas de la familia Kinesin-14, las cuales presentan un dominio de interacción proteína-proteína hacia la región amino terminal.

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

- A) Corroborar la interacción molecular entre NapK y HT-B por otros métodos como:
- Pull down, cromatografía de afinidad

 - Estudios de colocalización de HT-B y NapK en tubos polínicos de cruzas compatibles e incompatibles.
- B) Evaluar la función de NapK en el mecanismo del rechazo del polen silenciando NapK en el tubo polínico.
- C) Determinar si la participación de NapK afecta el tráfico vesicular de las S-RNAsas.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ai Y, Tsai DS, y Kao TH. (1992) **Cloning and sequencing of cDNAs encoding two S proteins of a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*.** Plant Mol Biol 19: 523-528
- ❖ Almenar-Queralt A y Goldstein LSB. (2001) **Linkers, packages, and pathways: new concepts in axonal transport.** Curr Op Neuro Biol 11, 550-557
- ❖ Andersen P, Kragelund BB, Olsen AN, Larsen FH, Chua N-H, Poulsen FM, y Skriver K. (2004) **Structure and biochemical function of a prototypical Arabidopsis U-box domain.** J Biol Chem. 279: 40053-40061.
- ❖ Anderson MA, Cornish EC, y Mau S-L. (1986) **Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*.** Nature. 321: 38-44.
- ❖ Azimzadeh J, Traas J y Pastuglia M. (2001) **Molecular aspects of microtubule dynamics in plants.** Curr Op Plant Biol 4: 513-519.
- ❖ Battery NH, James NC, Greenland AJ, y Brownlee C. (1999) **Exocytosis and endocytosis.** The Plant Cell 11: 643-659.
- ❖ Bonifacino JS y Rojas R. (2006) **Retrograde transport from endosomes to the *trans*-Golgi network.** Nature 7: 568-579
- ❖ Bredemeijer GMM y Blaas J. (1981) **S-specific protein in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*.** Theor Appl Genet 59: 185-190
- ❖ Cai G, Bartalesi A, DelCasino C, Moscatelli A, Tiezzi A, y Cresti M. (1993) **The kinesin-immunoreactive homologue from *Nicotiana glauca* pollen tube: biochemical properties and subcellular localization.** Planta 191: 496-506
- ❖ Cai G, Del Casino C y Cresti M. (2000) **Cytoskeletal basis of organelle trafficking in the angiosperm pollen tube.** Supplement A in Ann Bot. 85: 69-77
- ❖ Cai G, Moscatelli y Cresti M. (1997) **Cytoskeletal organization and pollen tube growth.** Trends Plant Sci. 2: 86-91.
- ❖ Cai G, Ovidi E, Romagnoli S, Vantard M, Cresti M, y Tiezzi A. (2005) **Identification and characterization of plasma membrane protein that bind to microtubules in pollen tubes and generative cells of tobacco.** Plant Cell Physiol 46: 563-578.
- ❖ Cai G, Romagnoli S, Moscatelli A, Ovidi E, Gambellini G, Tiezzi A y Cresti M. (2000) **Identification and characterization of a novel microtubule-based motor associated with membranous organelles in tobacco pollen tubes.** Plant Cell 12: 1719-1736.
- ❖ Cappellaro C, Hauser K, Mrsá V, Watzel M, Watzel G, Gruber C y Tanner W. (1991) ***Saccharomyces cerevisiae* α - and α -agglutinin: characterization of their molecular interaction.** EMBO 10: 4081-4088.

- ❖ Causier B y Davies B. (2002) **Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system**. *Plant Mol Biol* 50: 855-870
- ❖ Charlesworth D, Vekemans X, Castric V, y Glémin S. (2005) **Plant self-incompatibility systems: a molecular evolutionary perspective**. *New Phytol* 168: 61-69
- ❖ Cruz-García F, Hancock CN, Kim D y McClure B. (2005) **Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro***. *Plant J* 42: 295-304.
- ❖ Cruz-García F, y McClure B. (2001). **Sexual Incompatibility**. In Bohjwani, S. S. y W. Y. Soh (eds.). *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Inglaterra. Pp. 166-196.
- ❖ Curtis H. (2000) **Biología**. 6^{ta} edición. Edit. Panamericana. México.
- ❖ Dabrowski S y Kur J. (1998) **Cloning and expression in *Escherichia coli* of the recombinant His-tagged DNA polymerases from *Pyrococcus furiosus* and *Pyrococcus woesei***. *Protein Expr Purif* 14: 131-138
- ❖ de Nettancourt D. (1977). **Incompatibility in angiosperms**. Monographs on theoretical and applied Genetics 3. Springer-Verlag, EUA.
- ❖ de Nettancourt D. (2001) **Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants**. Springer-Verlag, EUA
- ❖ Dickinson HG, Elleman CJ y Doughty J. (2000) **Pollen coatings-chimaeric genetics and new functions**. *Sex Plant Reprod* 12: 302-309.
- ❖ Di Cola A, Frigerio L, Lord JM, Roberts LM y Ceriotti (2005) **An: endoplasmic reticulum-associated degradation of ricin A chain has unique and plant-specific features**. *Plant Physiol* 137: 287-296
- ❖ Diefenbach RJ, Diefenbach E, Douglas MW y Cunningham AL. (2002) **The heavy chain of conventional kinesin interacts with the SNARE proteins SNAP25 and SNAP23**. *Biochemistry* 41:14906-14915.
- ❖ Dixit R, Rizzo C, Nasrallah M, y Nasrallah J. (2001) **The *Brassica* MIP-MOD gene encodes a functional water channel that is expressed in the stigma epidermis**. *Plant Mol Biol* 45: 51-62.
- ❖ Entani T, Iwano M, Shiba H, Che F-S, Isogai A, y Takayama S. (2003) **Comparative analysis of the self-incompatibility (S-) locus region of *Prunus mume*: identification of a pollen-expressed F-box gene with allelic diversity**. *Gene to Cells* 8, 203-213.
- ❖ Feijó JA, Costa SS, Prado AM, Becker JD y Certal AC. (2004) **Signalling by tips**. *Curr Op Plant Biol* 7: 589-598.
- ❖ Fields S y Song O. (1989) **A novel genetic system to detect protein-protein interactions**. *Nature* 340: 245-246.

- ❖ Franklin-Tong VE, Holdaway-Clarke T, Straatman KR, Kunkel JG y Hepler PK. (2002) **Involvement of extracellular calcium influx in the self-incompatibility response of *Papaver rhoeas***. Plant J 29: 333-345.
- ❖ Franklin-Tong VE y Franklin FCH. (2003) **Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms**. Trends Plant Sci 8: 598-604.
- ❖ Gaudet T y McCornick S. (1999) **Signaling pollen-pistil interactions**. Semin Cell Dev Biol 10: 139-147.
- ❖ Gauger AK y Goldstein LSB. (1993) **The *Drosophila* kinesin light chain**. J Biol Chem 268: 13657-13666.
- ❖ Geitmann A, Li Y-Q, Cresti M. (1996). **The role of the cytoskeleton and dictyosome activity in the pulsatory growth of *Nicotiana tabacum* and *Petunia hybrida* pollen tubes**. Bot Acta 109:102-9
- ❖ Geitmann A, Snowman BN, Emons AMC y Franklin-Tong VE. (2000). **Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas***. Plant Cell 12: 1239-1251
- ❖ Gindhart JG, y Goldstein LSB. (1996) **Tetratricopeptide repeats are present in the kinesin light chain**. Trends Plant Sci 21: 52-53
- ❖ Goldstein LSB. (2001) **Kinesin molecular motors: transport pathways, receptor, and human disease**. Proc Natl Acad Sci USA 98: 6999-7003
- ❖ Goldstein LSB y Valentine PA. (1999) **The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization**. Annu Rev Cell Dev Biol 15: 141-183
- ❖ Goldraj A, Kondo K, Lee CB, Hancock N, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillip TE, Cruz-García F y McClure B. (2006) **Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana***. Nature 439:805-810.
- ❖ Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias D y Goring DR. (1998) **Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase**. Proc Natl Acad Sci USA 95: 382-387.
- ❖ Gu Y, Vernoud V, Fu Y y Yang Z. (2003) **ROP GTPase regulation of pollen tube growth through the dynamics of tip-localized F-actin**. J Exp Bot 54: 93-101.
- ❖ Gu Y, Fu Y, Dowd P, Li S, Vernoud V, Gilroy S y Yang Z. (2005) **A Rho family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes**. J Cell Bio 169: 127-138.
- ❖ Hancock CN, Kent L y McClure BA. (2005) **The stylar 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana***. Plant J 43: 716-723.
- ❖ Hashimoto S, Aritomi K, Minohara T, Nishizawa Y, Hoshida H, Kashiwagi S y Akada R. (2005) **Direct mating between diploid sake strains of *Saccharomyces cerevisiae***. Appl Microbiol Biotech1: 1-8

- ❖ He Y y Wetzstein HY. (1995). **Fixation induces differential tip morphology and immunolocalization of the cytoskeleton of pollen tubes.** *Plant Physiol* 93: 757-73
- ❖ Hirokawa N. y Takemura R. (2004) **Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics.** *Exp Cell Res* 301: 50-59.
- ❖ Howell SH. (1997) **Molecular Genetics of Plant Development,** Cambridge University Press. Inglaterra.
- ❖ Huang S, Blanchoins L, Chaudhry F, Franklin-Tong VE y Staiger CJ. (2004) **A Gelsolin-like protein from *Papaver rhoeas* pollen (PrABP80) stimulates calcium regulated severing and depolymerization of actin filaments.** *J Biol Chem* 279: 23364-23375.
- ❖ Huang S, Lee H-S, Karunanandaa B, y Kao T-H. (1994) **Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen.** *Plant Cell* 6: 1021-1028.
- ❖ loerger TR, Gohlke JR, Xu B. y Kao T-H. (1991) **Primary structural features of the self-incompatibility protein in *Solanaceae*.** *Sex Plant. Reprod* 4: 81-87
- ❖ Ishimizu T, Shinkawa T, Sakiyama F y Norioka S. (1998) **Primary structural features of rosaceous S-RNases associated with gametophytic self-incompatibility.** *Plant Mol Biol* 37: 931-941
- ❖ Ishimizu T, Endo T, Yamaguchi-Kabata Y, Nakamura KT, Sakiyama Fumio y Norioka S. (1998) **Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of Rosaceae: implications for S-allele-specific recognition sites in S-RNase.** *FEBS Lett* 440: 337-342
- ❖ Kakeda K, Jordan ND, Conner A, Ride JP, Franklin-Tong VE y Franklin FCH. (1998) **Identification of residues in a hydrophilic loop of the *Papaver rhoeas* S protein that play a crucial role in recognition of incompatible pollen.** *Plant Cell.* 10: 1723-1731
- ❖ Kao TH, y McCubbin AG. (1996) **How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding?.** *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12059-12065
- ❖ Kao TH, y Tsukamoto T. (2004) **The molecular and genetics bases of S-RNase-based self-incompatibility.** *Supp Plant Cell.* 16: S72-S83.
- ❖ Kirchner J, Seiler S, Fuchs S, y Schliwa M. (1999) **Functional anatomy of the kinesin molecule *in vivo*.** *EMBO J* 18 : 4404-4413
- ❖ Kondo K, Yamamoto M, Matton DP, Sato T, Hirai M, Norioka S, Hattori T, y Kowiyama Y. (2002) **Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT genes required for stylar function of self-incompatibility.** *Plant J* 29: 627-636.
- ❖ Kondo K, Yamamoto M, Itahachi R, Sato T, Egashira H, Hattori T, y Kowiyama Y. (2002) **Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors.** *Plant J* 30: 143-153.
- ❖ Kumar J, Yu H y Sheetz MP. (1995) **Kinectin and essential anchor for kinesin driven vesicle motility.** *Science* 267: 1834-1837.

- ❖ Lai Z, Ma W, Han B, Liang L, Zhang Y, Hong G y Xue Y. (2002) **An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum.** Plant Mol Biol 50: 29-42
- ❖ Lancelle SA, Cresti M, y Hepler PK. (1987) **Ultrastructure of the cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of *Nicotiana glauca*.** Protoplasma 140:141-50
- ❖ Lawrence CJ, Dawe RK, Christie KR, Cleveland DW, Dawson SC, Endow SA, Goldstein LSB, Goodson HV, Hirokawa N, Howard J, Malmberg RL, McIntosh R, Miki H, Mitchison TJ, Okada Y, Reddy ASN, Saxton WM, Schliwa M, Scholey JM, Vale RD, Walczak CE y Wordeman L. (2004) **A standardized kinesin nomenclature.** J Cell Biol 167: 19-22.
- ❖ Lee H-S, Huang S y Kao T-H. (1994) **S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*.** Nature 367: 560-563
- ❖ Lee H-S, Singh A y Kao T-H. (1992) **RNase X2, a pistil-specific ribonuclease from *Petunia inflata*, shares sequence similarity with solanaceous S proteins.** Plant Mol Biol 20: 1131-1141
- ❖ Lee Y-R, Liu B. (2004) **Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins.** Plant Physiol 136: 3877-3883
- ❖ Lewin B. (2004) **Genes VIII.** Cap 27. Protein trafficking. Pearson Prentice Hall, USA. Pp. 787-809.
- ❖ Lloyd C, y Hussey P. (2001) **Microtubules-associated proteins in plants- Why we need a MAP.** Nature Rev Mol Cell Biol 2:40-45.
- ❖ Luu D-T, Qin X, Morse A y Cappadoccia M. (2000) **S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility.** Nature 407: 649-651
- ❖ McClure BA. (2004) **S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection.** Plant Cell 16: 2840-2847
- ❖ McClure BA. (2006) **New views of S-RNase based self-incompatibility.** Curr Op Plant Biol 9: 1-7.
- ❖ McClure BA, Cruz-García F, Beecher BS. y Sulaman W. (2000) **Factors affecting inter and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** Ann Bot. 85:113-123
- ❖ McClure BA y Franklin-Tong VE. (2006) **Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition.** Planta 224: 233-245.
- ❖ Mc Clure BA, Haring V, Ebert PR, Anderson MA., Simpson RJ, Sakiyama F y Clarke AE. (1989) **Style self-incompatibility gene product of *Nicotiana glauca* are ribonucleases.** Nature 342: 955-957
- ❖ Mc Clure BA, Mou B, Canevascini S. y Bernatzky R. (1999) **A small asparagines-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** Proc Natl Acad Sci USA, 96: 13548-13553.

- ❖ Moscatelli A, DelCasino C, Lozzi L, Cai G, Scali M, Tiezzi A y Cresti M. (1995) **High molecular weight polypeptides related to dynein heavy chains in *Nicotiana tabacum* pollen tubes.** J Cell Sci 108: 1117-1125.
- ❖ Murfett J, Atherton TL, Mou B, Gasser CS, y McClure BA. (1994) **S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection.** Nature 367: 563-566.
- ❖ Nasrallah JB y Nasrallah ME. (1993) **Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response.** Plant Cell 5: 1325-1335.
- ❖ Nebenfuhr A. (2002) **Vesicle traffic in the endomembrane system: a tale of COPs, Rabs and SNAREs.** Curr Op Plant Biol 5: 507-512.
- ❖ O'Brien M., Kapfer C, Major G, Laurin M, Bertrand C, Kondo K, Kowyama Y, y Matton DP. (2002) **Molecular analysis of the stylar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*.** Plant J 32: 985-996.
- ❖ O'Brien M, Major G, Chantha S-C y Matton DP. (2004) **Isolation of S-RNase binding proteins from *Solanum chacoense*: identification of a SBP1 (RING finger protein) orthologue.** Sex Plant Reprod 17: 81-87.
- ❖ Qiao H, Wang H, Zhao L, Zhou J, Huang J, Zhang Y y Xue Y. (2004) **The F-Box Protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*.** Plant Cell 16: 582-595.
- ❖ Richardson DN, Simmons MP y Reddy ASN. (2006) **Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes.** BMC Genomics 7: 1-37
- ❖ Roberts LM y Smith DC. (2004) **Ricin: the endoplasmic reticulum connection.** Toxicon 44: 469-472
- ❖ Romagnoli S, Cai G, y Cresti M. (2003) ***in vitro* assays demonstrate that pollen tube organelles use kinesin-related motor proteins to move along microtubules** Plant Cell 15: 251-269.
- ❖ Rudd JJ, y Franklin-Tong VE. (2003) **Signals and targets of the self-incompatibility response in pollen of *Papaver rhoeas*.** J Exp Bot 54: 141-148
- ❖ Safadi F, Reddy VS y Reddy ASN. (2000) **A pollen-specific novel calmodulin-binding protein with tetratricopeptide repeats.** J Biol Chem 275: 35457-35470
- ❖ Samaj J, Baluska F, Voigt B, Schlicht M, Volkmann D y Menzel D. (2004) **Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling.** Plant Physiology 135:1150-1161

- ❖ Sambrook J y Russell D. (2001) **Molecular Cloning A Laboratory Manual**. CSHL Press Third Edition. Nueva York.
- ❖ Schnitzer MJ y Block SM. (1997) **Kinesin hydrolyses one ATP per 8-nm step**. Nature 388: 386-388
- ❖ Seiler S, Kirchner J, Horn C, Kallipolitou A, Woehlke G y Schliwa M. (2000) **Cargo binding and regulatory sites in the tail of fungal conventional kinesin**. Nature Cell Biol 2: 333-338
- ❖ Sijacic P, Wang X, Skirpan AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin A, Huang S y Kao T-H. (2004) **Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility**. Nature 429: 302-305
- ❖ Silva HF y Goring DF. (2001) **Mechanisms of self-incompatibility in flowering plants**. CMLS 58:1988-2007
- ❖ Sims TL, y Ordanic M. (2001) **Identification of a S-ribonuclease-binding protein in *Petunia Hybrida***. Plant Molecular Biology 47: 771-783.
- ❖ Snowman BN, Kovar DR, Shevchenko G, Franklin-Tong VE y Staiger CJ. (2002) **Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during the self-incompatibility response**. Plant Cell 14: 2613-2626.
- ❖ Soldati T y Schliwa M. (2006) **Powering membrane traffic in endocytosis and recycling**. Nature review 5:897-908.
- ❖ Stephenson AG, Doughty J, Dixon S, Elleman C, Hiscock S y Dickinson HG. (1997) **The male determinant of self-incompatibility in *Brassica oleracea* is located in the pollen coating**. Plant J 12: 1351-1359.
- ❖ Stone SL, Anderson EM, Mullen RT y Goring DR. (2003) **ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen**. Plant Cell 15: 885-898.
- ❖ Takayama S e Isogai A. (2005) **Self-incompatibility in plants**. Annu Rev Plant Biol 15: 467-487.
- ❖ Takasaki T, Hatakeyama K, Suzuki G, Watanabe M, Isogai A y Hinata K. (2000) **The S receptor kinase determines self-incompatibility in *Brassica stigma***. Nature 403: 913-916.
- ❖ Taylor LP. (1997) **Pollen germination and tube growth**. Annu Rev Plant Physiol 48: 461-491.
- ❖ Tiezzi A, Moscatelli A, Cai G, Bartalesi A y Cresti M. (1992) **An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in *Nicotiana tabacum* pollen tubes**. Cell Motil Cytoskeleton 21:132-137.
- ❖ Ueda T, Uemura T, Sato MH y Nakano A. (2004) **Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells**. Plant J 40: 783-789.

- ❖ Ueda K, y Matsuyama T. (2000) **Rearrangement of cortical microtubules from transverse to oblique or longitudinal in living cells of transgenic *Arabidopsis thaliana*.** Protoplasma. 213: 28-38.
- ❖ Ushijima K, Yamane H, Watari A, Kakehi E, Ikeda K, Hauck NR, Iezzoni AF y Tao R. (2004) **The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*.** Plant J 39: 573-586
- ❖ Vago R, Marsden CJ, Lord M, Ippoliti R, Flavell DJ, Flavell SU, Ceriotti A y Fabbrini MS. (2005) **Saporin and ricin A chain follow different intracellular routes to enter the cytosol of intoxicated cells.** FEBS Lett 272: 4883-4995
- ❖ Vale RD y Milligan RA. (2000) **The way things move: Looking under the hood of molecular motor proteins.** Science 288: 88-95.
- ❖ Vanoosthuysse V, Tichtinsky G, Dumas C, Gaude T, Cock JM. (2003) **Interaction of calmodulin, a sorting nexin and kinase-associated protein phosphatase with the *Brassica oleracea* S locus receptor kinase.** Plant Physiol 133: 919-929.
- ❖ Wang HY y Xue YB. (2005) **Subcellular localization of the S locus F-box protein AhSLF-S₂ in pollen and pollen tube of self-incompatible *Antirrhinum*.** J Integrative Plant Biol 47:76-83.
- ❖ Weller SG,(1995) **The evolution of self-incompatibility in flowering plants: a phylogenetic approach. In: experimental and molecular approaches to plant biosystematics. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden (Vol 53) (Hoch PC and Stephenson AG., eds) pp. 355-382, Missouri Botanical Garden**
- ❖ Zhao H, Shen Z-M, Kahn PC y Lipke PN. (2001). **Interaction of α -agglutinin and a-agglutinin, *Saccharomyces cerevisiae* sexual cell adhesion molecules.** J Bact 183: 2874-2880

APÉNDICES

I. Purificación del RNA mensajero.

El sistema para aislar el RNA mensajero del RNA total del polen fue a través del sistema *PolyAtract mRNA Isolation Systems* de Promega.

Soluciones

SSC 0.5X

Para preparar 1.2 ml, se mezclan 30 μ l de la solución SSC 20X con 1.170 ml de agua libre de RNAsas en un tubo estéril también libre de RNAsas.

SSC 0.1X

Para preparar 1.4 ml, se mezclan 7 μ l de la solución SSC20X con 1.393 ml de agua libre de RNAsa en un tubo estéril también libre de RNAsas.

Preparación del RNA mensajero.

- Se coloca 0.1-1.0 mg de RNA total en un tubo eppendorf libre de RNAsas
- Se afora a 500 μ l con agua libre de RNAsas.
- Se incuba a una temperatura de 65°C por 10 min.
- Se adiciona 3 μ l de oligo (dT) biotinilado y 13 μ l de una solución de SSC20X. Se mezcla cuidadosamente y se incuba a temperatura ambiente hasta que se enfríe completamente.

Mientras se enfría completamente el RNA se lavan las partículas paramagnéticas de estreptavidina (SA-PMPs).

- Agitar el tubo que contienen las SA-PMPs con el dedo hasta dispersarlas completamente.
- Colocar el tubo en el magneto (Magnetic Stand) hasta que las SA-PMPs se sitúen en un extremo del tubo, aproximadamente 30 segundos.
- Cuidadosamente obtener el sobrenadante. Es muy importante de no centrifugar las partículas.

- Quitar el tubo del magneto y lavar las SA-PMPs con 300 μl de la solución SSC 0.5X, agitar las partículas y colocar el tubo en el magneto nuevamente para poder separar las SA-PMPs de la solución. Repetir el lavado dos veces más.
- Después del último lavado resuspender las SA-PMPs en 100 μl de la solución SSC 0.5X.

II. Purificación de DNA de gel de agarosa

- Cortar el fragmento del gel que contiene el DNA
- Pesar el fragmento del gel y colocarlo en un tubo de 1.5 ml
- Añadir 30 μl del amortiguador de solubilización del gel (L1) por cada 10 mg de gel.
- Incubar el tubo a 50°C por 15 min. Mezclar cada tres min por vortex.
- Una vez que se ha disuelto el gel dejar 5 min más.
- Colocar la columna en un tubo recolector y agregar el gel disuelto
- Centrifugar a 1300 g por 1 min. Desechar el sobrenadante.
- Agregar 500 μl de amortiguador para solubilización (L1) en la columna para lavarla.
- Incubar a temperatura ambiente por 1 min y desechar el sobrenadante
- Nuevamente lavar la columna con 700 μl de amortiguador de lavado (L2) e incubar por 5 min a temperatura ambiente
- Centrifugar a 1300 g por 1 min, desechar el sobrenadante
- Centrifugar nuevamente por 1 min desechar el residuo del sobrenadante.
- Agregar directamente al centro de la columna 50 μl de TE previamente calentado
- Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar a 1300 g por 2 min.

III. Clonación de productos de PCR.

- Amplificar el fragmento de DNA que se requiera
- Correr en un gel de agarosa al 0.7% el producto de PCR
- Extracción del DNA del gel (apéndice II)
- Ligar el producto de PCR ya purificado en la siguiente reacción:

Buffer T4 ligasa	10 μl
*Producto de PCR	7 μl
*Vector pGEM	1 μl
Ligasa DNA T4	1 μl
H ₂ O	1 μl

- Dejar incubando a temperatura ambiente por una hora.
- Transformar células competentes

*Mantener una relación de 3:1 de producto de PCR con el vector pGEM de acuerdo las concentraciones que presenten.

IV. Células competentes de *E. coli*

Solución de CaCl₂ para células competentes

CaCl₂ 60 mM

Glicerol 15% v/v

PIPES (Piperazina-N,N"-bis[ácido 2-etanosulfónico]) 10 mM pH 7.0

- Se crece una colonia de *E. coli* en 50 ml de medio LB toda la noche a 37°C / 250 rpm.
- Inocular con 4 ml del cultivo anterior 400 ml de medio LB.
- Dejar crecer a 37 °C a 250 rpm hasta alcanzar una DO₅₉₀ de 0.375
- Vaciar el cultivo en 4 tubos estériles y dejar los tubos en hielo de 5 a 10 min.
- Centrifugar a 3000 rpm 5 min/4 °C.
- Resuspender el botón con 20 ml por tubo de solución para células competentes bien fría. NO PIPETEAR y juntar las fracciones en un tubo.
- Centrifugar por 5 min a 3,000 rpm y 4 °C.
- Resuspender el botón en 80 ml de CaCl₂ fría, mantenerlas en hielo por 30 min.
- Centrifugar por 5 min a 3,000 rpm y 4 °C.
- Resuspender el botón en 5 ml de CaCl₂ fría y hacer las alícuotas de 50-100µl.
- Colocar los tubos en N₂(liq) y guardar a -80°C.

V. Purificación de plásmido de *E. coli*

La purificación del plásmido se realizó con el protocolo de lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001) como sigue:

- El cultivo celular (5 ml) es centrifugado por 3 min a 6,000 rpm,
- Las células son resuspendidas en 200µl del amortiguador de resuspensión (50mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA y RNasa A [20 mg/ml]).
- Añadir 200µl del amortiguador de lisis (200 mM NaOH, 1% SDS (p/v),
- Mezclar inclinando los tubos suavemente 6 veces e incubar a temperatura ambiente durante 5 min.
- Agregar 350µl de solución de neutralización (CH₃COOK pH 4.0)
- Centrifugar durante 10 min.
- El sobrenadante se precipita con 1/3 de volumen de acetato de amonio [10M] y 1 volumen de isopropanol frío. Se dejan mínimo 2 horas a -20°C.
- Centrifugar los tubos a 1300 g durante 15 min
- Lavar con 300 µl de etanol 70%
- Centrifugar nuevamente a 1300 g por 5 min
- Decantar, dejar secar y disolver el plásmido de cada tubo con 40 µl de H₂O.

VI. Purificación de plásmido de *S. cerevisiae*

Se siguieron las instrucciones del *kit Zymoprep II- Yeast Plasmid Miniprep* el cual se detalla a continuación:

- Crecer 1.5 ml de cultivo líquido de *S. cerevisiae*
- Centrifugar el cultivo por 2 min a 35 g
- Agregar 200 μ l de Solución 1
- Añadir 3 μ l de *Zymolasa* (5U/ μ l) y resuspender el pellet agitando cuidadosamente.
- Incubar a 37°C por 15-60 min
- Agregar 200 μ l de la solución 2 y mezclar bien.
- Añadir 400 μ l de la solución 3 y mezclar bien.
- Centrifugar a máxima velocidad, 1300 g por 3 min.
- Transferir el sobrenadante a la columna Zymo-spin-I
- Colocar la columna en el tubo colector
- Centrifugar la columna por 30 seg.
- Desechar el líquido presente en el tubo colector.
- Agregar 550 μ l de amortiguador para el lavado de la columna y centrifugar de 1-2 min
- Colocar la columna en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
- Añadir 10 μ l de agua y centrifugar por 1 min para eluir el plásmido.

El kit provee la zymolasa, las columnas y las soluciones es por ello que no indica la composición de las mismas.

VII. Transformación de bacterias por choque térmico

- Descongelar 100 μ l de células competentes en hielo.
- Mezclar 1-3 μ l de plásmido y dejar en hielo durante 30min.
- En un baño a 42°C colocar las células por 45 seg.
- Colocar las células en hielo durante 2 min.
- Agregar 400 μ l de medio SOC.
- Incubar a 37°C/250 rpm durante 2 h.
- Centrifugar las células a 400 g por 1 min.
- Resuspender las células en 100 μ l de medio LB.
- Sembrarlas en el medio de selección correspondiente a 37°C toda la noche.

VIII. Células competentes de levaduras

Solución 1.1XTE/LiAc

1.1 ml de TE 10X

1.1 ml de LiAc 1M

Aforar a 10ml con H₂O

Medio YPDA

Medio YPD (SIGMA)

Adicionar adenina (0.03% v/v)

Solución 1.1XTE/LiAc

1.1 ml de TE10X

1.1 ml de LiAc 1M

Aforar a 10 ml con H₂O

- Estriar en una placa con medio YPDA la cepa AH109 o Y187. Crecer a 30°C por tres días.
- Inocular una colonia en un tubo de 15 ml con 3 ml de medio líquido YPDA.
- Incubar a 30°C en agitación constante 240 rpm por 8 h.
- Sembrar 50 ml de medio líquido YPDA contenidos en un matraz de 250 ml con 5 µl del cultivo anterior.
- Incubar a 30°C con agitación constante (230-250rpm) por 16-20 h, hasta llegar a una DO₆₀₀=0.15-0.3.
- Centrifugar las células a 700 g por 5 min a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 ml de YPDA.
- Incubar a 30°C por 3-5 h/250 rpm hasta llegar a una DO₆₀₀=0.4-0.5.
- Centrifugar las células a 700 g por 5 min a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 3 ml de una solución 1.1X TE/LiAc.
- Separar en dos fracciones de 1.5 ml cada una y centrifugar cada tubo a 1300 g por 15 seg.
- Descartar el sobrenadante y resuspender cada botón con 600 µl de 1.1X TE/LiAc.

IX. Transformación de levaduras

PEG/LiAc (polietilenglicol 4000/acetato de litio)

8 ml de PEG al 50%

1 ml de TE 10X

1 ml de LiAc 1M

Preparar justo antes de usar.

Solución 1.1XTE/LiAc

1.1 ml de TE10X

1.1 ml de LiAc 1M

Aforar a 10 ml con H₂O

DMSO (dimetil sulfóxido)

- Preparar células competentes (protocolo anterior)
- En un tubo estéril de 15 ml mezclar:

20 μ l de ds cDNA

6 μ l de pGADT7-rec (0.5 μ g/ μ l)

5 μ g pAS2-1/HT-B

20 mg de Acarreador de DNA

(precalentado a 100°C/5 min reposar en hielo 5min más antes de mezclarlo)

- Agregar 600 μ l de células competentes y mezclar ligeramente.
- Agregar 2.5 ml PEG/LiAc, mezclar ligeramente.
- Incubar a 30°C por 45 min, mezclando las células cada 15 min.
- Agregar 160 μ l de DMSO, mezclar y colocar el tubo a 42°C por 20 min, mezclar las células cada 10 min.
- Centrifugar a 700 g por 5 min.
- Resuspender el botón en 3 ml de medio líquido YPD Plus.
- Incubar en 30°C con agitación constante por 90 min.
- Centrifugar a 700 g por 5 min.
- Resuspender el botón en 1 ml de NaCl (0.9% p/v)
- Sembrar en el medio de selección apropiado.

X. Construcción de la biblioteca de cDNA con adaptadores SMARTIII y CDSIII.

Los reactivos utilizados fueron los del kit (*MATCHMAKER Library Construction and Screening Kit*)

En un tubo eppendorf mezclar:

1.0 μ g de RNA poli A⁺

0.5 μ l del oligonucleótido CDSII Primer

0.5 μ l del oligonucleótido CDSIII/6Primer

Llevar a un volumen de 4 μ l con H₂O desionizada

- Incubar por 2 min a 72°C.
- Incubar en hielo 2 min más.

Se agrega a la mezcla:

2 μ l de 5X First-Strand Buffer

1 μ l de DTT (20 mM)(1,4-ditiotrietol)

1 μ l dNTP (10 mM)

1 μ l de transcriptasa reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)

- Incubar a 42°C por 10 min

Se adiciona:

1 μ l del oligonucleótido SMARTIII

- Incubar por 1 h a 42°C
- Incubar por 10 min a a 75°C

- Se enfría el tubo a temperatura ambiente para agregar 2 unidades de RNasa H, se incuba 20 min a 37°C.

XI Hibridación DNA:RNA

- Colocar en un recipiente cuadrado 1/3 de amortiguador SSC10X.
- Colocar una base cuadrada plana que salga del líquido, generalmente se utiliza las bases para hacer geles de agarosa.
- Cortar tres papeles filtro del tamaño del gel que se quiera transferir y uno en donde dos extremos sean mucho mas largos, deberán salir de la base, una membrana de nitrocelulosa del tamaño del gel y una pila de 7 cm como mínimo de papel periódico.
- Poner sobre la base un papel filtro rectangular, sus extremos más largos deberán tocar el amortiguador para absorber el líquido, sus extremos más cortos deberán coincidir con el tamaño de la base del gel. Encima se deberá poner otro papel filtro del tamaño del gel a transferir.
- Colocar el gel boca abajo, la membrana cuidando de no dejar burbujas, los dos papeles filtro restantes y la pila de papel periódico.
- Encima se coloca una base de acrílico y un peso para que el papel absorba el amortiguador SSC10X y se transfiera el DNA del gel a la membrana.
- Dejar mínimo 6 h o toda la noche.

XII. Soluciones y medios

Medio LB sólido + ampicilina

Para un litro

10 g Bacto-tryptone (BD DIFCO)

5 g Bacto-yeast extract (BD DIFCO)

10 g NaCl (J. T. Baker)

15 g Bacto agar por cada litro medio LB

Ampicilina 1 ml de ampicilina [100 mg/ml] (SIGMA)

4SD y 2SD

Minimal SD Base (Clontech)

-Leu y - Trp DO Supplement (Clontech)

-Leu, -Trp, -His, -Ade DO Supplement (Clontech)

Medio YPD

20 g/l peptona (BD DIFCO)

10 g/l extracto de levadura (BD DIFCO)

20 g/l agar (Invitrogen)

Agregar 950 ml de H₂O

Ajustar el pH 6.5 y esterilizar en autoclave

Enfriar a 55°C y añadir dextrosa (glucosa) al 2%(50 ml de una solución estéril 40% para 1 L de medio)

YPDA

Medio YPD

Adicionar adenina (0.003% v/v)

2xYTA

Para un litro de medio
Tryptona 16 g (BD DIFCO)
Extracto de levadura 10 g (BD DIFCO)
NaCl 5 g (J. T. Baker)
Ajustar el pH 7 (NaOH)

SOC

Medio LB
Glucosa 0.02 M (concentración final)

Soluciones generales

PBS 10X

NaCl 40.0314 g (1.37 M) (J. T. Baker)
KCl 1.0065 g (27 mM) (J. T. Baker)
Na₂HPO₄·7H₂O 5.7635 g (43 mM) (J. T. Baker)
NaH₂PO₄·H₂O 0.9659 g (14 mM) (J. T. Baker)
Disolver con 300 ml de H₂O
Ajustar a pH 7.3 con NaOH
Aforar a 500 ml
Esterilizar con autoclave.

SSC 20X

NaCl (3 M) (J. T. Baker)
Citrato de sodio (0.3 M) (J. T. Baker)

Soluciones para ensayo tipo réplica en Western

Amortiguador de transferencia

Tris 25 mM (SIGMA)
Glicina 0.188 M (SIGMA)
SDS 0.1% (SIGMA)
Metanol 200 ml (J. T. Baker)
Aforar a un litro con H₂O

Solución de bloqueo 100 ml

Leche baja en grasa 5 g
Tween-20 0.1 ml
Disolver en PBS 1X

Solución de revelado cuando se usa anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina

10 ml de solución amortiguadora PH 9.5
100 µl de nBT
100 µl de BCIP

nBT

nBT, nitro blue tetrazolium (SIGMA) 33 mg/ml
en 70% DMSO, dimetil sulfóxido (SIGMA)

BCIP

BCIP, 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (SIGMA) 17 mg/ml
en 100% DMSO dimetil sulfóxido (SIGMA)

Amortiguador pH9.5

Tris base 0.1 M (SIGMA)
NaCl 0.1 M (J. T. Baker)
MgCl₂ 10 mM (J. T. Baker)
Ajustar pH 9.5

Solución de quimioluminiscencia

100 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 ml
2% de Peróxido de Hidrógeno 17 µl
Solución A 25 µl
Solución B 50 µl

Solución A

0.35 g Ácido p cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) (SIGMA)
DMSO (dimetilsulfóxido) llevarlo a 25 ml

Solución B

1.1 g luminol (5-amino 2,3-dihidro 1,4-ftalazina diona) (SIGMA)
DMSO (dimetilsulfóxido) llevarlo a 25 ml

Solución de revelado cuando se usa anticuerpo acoplado a peroxidasa

Revelador (Kodak GBX), 103 ml aforar a 473 ml con H₂O.

Solución para fijar cuando se usa anticuerpo acoplado a peroxidasa

Fijador (Kodap GBX), 828 ml aforar a 3.8 L con H₂O.

Preparación de la resina Glutation agarosa

- Se hidrata la resina a 4°C con agua desionizada durante 20 h.
- La resina se lava tres veces con 10 volumen cama de PBS 1X. (un volumen cama equivale a un volumen, en mililitros, de resina hidratada)
- Centrifugar a 35 g por 3 min después de cada lavado.
- La resina se equilibra 50% v/v con PBS 1X.

Amortiguador de elución de proteínas de la resina

Disolver 0.003 g de glutatión reducido (Gibco BRL)
en 1 ml Tris HCl pH 9.5 [50 mM] (SIGMA)

XIII. Geles

Gel de poliacrilamida-SDS

Acrilamida al 4% (apilador)

Acrilamida 5.85 g
Bis-acrilamida 0.15 g
EDTA 0.5 M 600 μ l
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8 37.8 ml
Aforar a 150 ml
Guardar a 4°C

Acrilamida (separadora)

	10%	12.5%
Acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%	5 ml	6.25 ml
4X Tris-Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml	3.75 ml
H ₂ O desionizada	5 ml	3.75 ml

4X Tris-Cl/SDS pH8.8

Tris 91 g (1.5 M)
Disolver en 300 ml de H₂O
Ajustar a pH 8.8 con HCl
Aforar a 500 ml con H₂O
Filtrar (0.45 μ m)
Agregar 2 g SDS (0.4% p/v)
Guardar a 4°C

Gel de agarosa 1%

300 mg de agarosa (gibco BRL)
30 ml de amortiguador TBE1X
Calentar hasta disolver
Agregar 10 μ l de bromuro de etidio (0.5 mg/ml)

Gel de agarosa para RNA

Para un gel de 30 ml disolver 600 mg/ml en 26 ml de H₂O-DEPC.
Agregar MOPS 1X
Añadir Formaldehído 3% concentración final
y 3 μ l de Bromuro de etidio al 0.5 mg/ml.

Las muestras de RNA se prepararon con buffer FRB 1.5X, por cada microlitro de RNA colocar 4 μ l de buffer FRB.
Se calientan 15 min a 65°C y 5 min en hielo.

XIV. Tinción de geles

Plata (AgNO_3)

Una vez finalizada la electroforesis:

- Incubar el gel en metanol (CH_3OH) al 50% por una hora y media.
- Hacer lavados de 10 min cada uno con agua.
- Dejar en agua toda la noche.
- Incubar en 100 ml de metanol al 50% con 100 μ l de formaldehído (HCHO) al 37% durante una hora y media.
- Quitar la solución y lava rápidamente 3 veces con agua. Hacer un cuarto lavado y dejar el gel en agua mientras se preparan las siguientes soluciones:

Solución A

0.8g Nitrato de plata (AgNO_3)
4ml H_2O

Solución B

21 ml Hidróxido de sodio (NaOH) 0.36%
1.4 ml Hidróxido de amonio (NH_4OH)

Solución C

Agregar la solución A a la B por goteo y agitación
Si queda turbia, agregar hidróxido de amonio hasta que quede transparente
Aforar a 100 ml.

- Desechar el agua del gel y agregar la solución C. Dejar en agitación 15min.
- Lavar 3 veces con abundante agua y agitación por 5min cada lavado
- Preparar solución D

Solución D

2.5 ml Citrato de sodio al 1%
250 μ l Formaldehído al 37%
Aforar a 500 ml

- Revelar con la solución D.
- Detener el revelado con ácido acético 10% y metanol 50%

Coomassie

- Colocar el gel en la solución siguiente:

Etanol (EtOH) 20%
Sulfato de amonio (NH_4)₂ SO_4 8%
Ácido fosfórico (H_3PO_4) 1.6%
Coomassie G-250 0.08%

- Incubar toda la noche
- Lavar durante todo el día con agua hasta la intensidad deseada.

Ponceau S

Ponceau S 0.5 g se disuelven en
1ml de ácido acético glacial
Aforar a 100 ml con H₂O

- Después de la transferencia de proteínas
- Colocar la membrana en la solución de Ponceau hasta cubrir
- Agitar un poco
- Lavar con H₂O hasta que aparezcan las bandas

XV. Extracción de proteínas de estilos

Amortiguador de extracción de proteínas

50 mM Tris HCl pH8
50 mM NaCl
1% β-mercaptoetanol
Inhibidores de proteasas (según la marca)

Por cada gramo de tejido se utiliza 4 ml de amortiguador.

- En un crisol se muele el tejido con N₂(liq).
- Una vez que se tiene la pasta, colocarla en otro tubo en donde se adiciona el amortiguador de extracción
- Se agita en el vortex
- Centrifugar por 20 min/500 g y 4°C
- Guardar el sobrenadante a -80°C

XVI. Cuantificación de proteínas

BSA [1mg/ml]
Bradford Bio-Rad 5X

Cada vez que se desee cuantificar proteínas es necesario hacer la curva patrón siguiente:

- Colocar en 6 tubos:
 1. 200 µl Bradford + 800 µl H₂O
 2. 200 µl Bradford + 798 µl H₂O + 2 µl BSA
 3. 200 µl Bradford + 796 µl H₂O + 4 µl BSA
 4. 200 µl Bradford + 794 µl H₂O + 6 µl BSA
 5. 200 µl Bradford + 792 µl H₂O + 8 µl BSA
 6. 200 µl Bradford + 790 µl H₂O + 10 µl BSA
- Medir absorbancia A₅₉₅
- Graficar la curva patrón
- Colocar en 1 tubo 990 µl Bradford + X µl de muestra + X µl de H₂O hasta llegar a 1 ml.
- Medir la absorbancia A₅₉₅
- Medir la concentración de acuerdo a la curva patrón.