



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de la mayahuelina de *Agave tequilana* y su
efecto sobre la termotolerancia en células de
*Saccharomyces cerevisiae***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Biólogo

P R E S E N T A :

Eric Fernando Sosa Jiménez



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Jorge Nieto Sotelo**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



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.

1. Datos del alumno

Sosa

Jiménez

Eric Fernando

56 58 17 84

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

310264226

2. Datos del tutor

Dr.

Jorge

Nieto

Sotelo

3. Datos sinodal 1

Dr.

Eleazar

Martínez

Barajas

4. Datos sinodal 2

Dra.

Alicia

Gamboa

De Buen

5. Datos sinodal 3

Dra.

Irma

Bernal

Lugo

6. Datos sinodal 5

Dr.

Ulises Yunuén

Rosas

López

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de la mayehuelina de *Agave tequilana* y su efecto sobre la termotolerancia en células de *Saccharomyces cerevisiae*

75 p

2018

A mi papá,

*Ojalá disfrutes este logro, ya que una huella de tu
esfuerzo está presente en todo lo que hago.*

Y a mi mamá,

*Aunque nuestra despedida fue prematura, te llevo
presente en el corazón todos los días de mi vida.*

Agradecimientos:

Primero quiero agradecer a mi papá, Carlos, por todo el apoyo brindado a lo largo de mi existencia, por haberme proporcionado una excelente educación y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir.

A mis tías Claudia, Luz Aurora y Angélica, por todo su cariño, por estar al pendiente de mí en todo sentido y cuidarme como un hijo.

A Martha Eugenia por ser cómplice en mi primera salida internacional, por formar parte continúa en mi formación y también por incluirme en su vida como su tercer hijo.

Al Dr. Jorge Nieto por dirigir y contribuir en tiempo, consejos y financiamiento la realización de este proyecto.

Le agradezco a mis compañeros de laboratorio "Agaveros": Jesús, Felipe y Yahima por ayudarme en muchas cosas, desde compartir sus ideas y opiniones hasta ayudarme en un par de ocasiones cuando tuve que quedarme toda la noche trabajando en el laboratorio.

Al Dr. Fernando Lledías y la Biól. Viridiana Rivas por compartir su conocimiento, su experiencia y su laboratorio en el IBT para resolver el problema de la inmunodetección que me tenía tan agobiado.

A mis demás compañeros de laboratorio "Maiceros": Miguel, Leopoldo, Raymundo, Alejandro, Alejandra, Alberto y Lucy por su apoyo moral, consejos y bromas que amenizaron el trabajo en el laboratorio.

Gracias a mis amigos de toda la vida, Santiago, Emilio, Raúl, Daniela, María José, José María, Sara, Camila, Gabriela y Andrea por los momentos que pasamos y por mantenernos juntos a pesar del tiempo y de mis largas desapariciones.

Y muy importante, a toda mi familia, tanto en la Ciudad de México como en Puebla, ya que son el principal motor que me impulsa a perseguir mis sueños y también porque son, más que una fuente, una cascada de apoyo y motivación.

Eric

ÍNDICE

| Contenido | Página |
|--|--------|
| Resumen | 1 |
| 1.0 Introducción | 2 |
| 1.1 Clasificación | 3 |
| 1.2 Transporte intracelular | 4 |
| 1.3 Distribución y origen evolutivo de las RIPs | 5 |
| 1.4 Toxicidad de las RIPs | 7 |
| 1.5 Función biológica de las RIPs | 8 |
| 1.6 <i>S. cerevisiae</i> como un modelo eucarionte para evaluar la toxicidad de las RIPs | 9 |
| 2.0 Antecedentes | 9 |
| 3.0 Objetivo General | 12 |
| 3.1 Objetivo Particular | 12 |
| 4.0 Materiales y Métodos | 12 |
| 4.1 Identificación de la cepa W303-1a (<i>S. cerevisiae</i>) | 12 |
| 4.2 Identificación de vectores | 13 |
| 4.3 Cuantificación de los vectores | 13 |
| 4.4 Amplificación por PCR del gen <i>Mayehuelina</i> a partir de los vectores | 14 |
| 4.5 Transformación de <i>S. cerevisiae</i> con las construcciones del gen <i>Mayehuelina</i> | 15 |
| 4.6 Extracción del DNA plasmídico de las cepas transformadas | 16 |
| 4.7 Amplificación del gen <i>Mayehuelina</i> a partir de los plásmidos obtenidos de levaduras transformantes | 16 |
| 4.8 Extracción de proteínas totales de <i>A. tequilana</i> | 17 |
| 4.9 Cuantificación de proteínas de <i>A. tequilana</i> | 18 |
| 4.10 Purificación del anticuerpo anti-mayehuelina a partir de suero de conejo .. | 19 |
| 4.11 Inducción de la mayehuelina recombinante en <i>S. cerevisiae</i> | 20 |
| 4.12 Extracción de proteínas totales de <i>S. cerevisiae</i> | 21 |
| 4.13 Cuantificación de proteínas de <i>S. cerevisiae</i> | 21 |
| 4.14 Evaluación de la integridad de las proteínas de <i>S. cerevisiae</i> | 21 |

| | |
|---|-----------|
| 4.15 Inmunodetección de la mayehuelina | 22 |
| 4.16 Optimización de los ensayos de termotolerancia | 23 |
| 4.17 Ensayos de termotolerancia de las transformantes | 25 |
| 4.18 Análisis estadísticos | 26 |
| 5.0 Resultados | 26 |
| 5.1 Aislamiento y transformación de la cepa W303-1a con las construcciones pYES-DEST52- <i>Mayehuelina</i> o pYES-DEST52- <i>Mayehuelina::V5::His</i> | 26 |
| 5.2 Extracción de proteína de <i>A. tequilana</i> en forma nativa y desnaturalizada y, purificación de anticuerpo (anti-mayehuelina) inducido en suero de conejo inmunizado | 30 |
| 5.3 Inducción e inmunodetección de la pYES-DEST52- <i>Mayehuelina</i> y de pYES-DEST52- <i>Mayehuelina::V5::His</i> en células de <i>S. cerevisiae</i> | 31 |
| 5.4 Re-secuenciación de la construcción pYES-DEST52- <i>Mayehuelina</i> | 33 |
| 5.5 Efectos de la mayehuelina y de la mayehuelina::V5:his sobre la termotolerancia basal e inducida de <i>S. cerevisiae</i> | 36 |
| 6.0 Discusión | 39 |
| 7.0 Conclusión | 46 |
| 8.0 Perspectivas | 47 |
| 9.0 Literatura citada | 47 |
| 10.0 Tablas y figuras suplementarias | 58 |
| 11.0 Anexo | 63 |

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y TABLAS

| Figuras | Página |
|---------|---|
| 1 | Mecanismo de acción de las RIPs 2 |
| 2 | Estructura esquemática de las RIPs..... 3 |
| 3 | Destinos y rutas intracelulares de las RIPs tipo II 5 |
| 4 | Crecimiento en espiral del agave 10 |
| 5 | Esquema del vector pYES-DEST52 13 |
| 6 | Crecimiento de la cepa W303-1a de <i>S. cerevisiae</i> 27 |
| 7 | Cuantificación de ADN de las clonas..... 28 |
| 8 | Amplificación por PCR de las dos construcciones 28 |
| 9 | Transformación de la cepa W303-1a de <i>S. cerevisiae</i> 29 |
| 10 | Amplificación del gen <i>Mayehuelina</i> a partir del plásmido extraído de levaduras transformadas 30 |
| 11 | Proteínas del cogollo de <i>A. tequilana</i> 31 |
| 12 | Curva de crecimiento de las transformantes 32 |
| 13 | Inmunodetección de la mayehuelina 33 |
| 14 | Alineación de la secuencia de la clona R1-3 con la secuencia de mayehuelina de <i>A. tequilana</i> 34 |
| 15 | Evaluación de la termotolerancia de las transformantes inducidas con galactosa 37 |
| 16 | Evaluación de la termotolerancia de las transformantes inducidas con dextrosa 38 |

| Cuadros | Página |
|---------|--|
| 1 | Componentes empleados en la reacción de PCR para amplificar al gen <i>Mayehuelina</i> 14 |
| 2 | Descripción del programa 251 15 |
| 3 | Diluciones por tratamiento 25 |

| | | |
|---|---|----|
| 4 | Promedio de las unidades formadoras de colonia (CFUs) y de los porcentajes de termotolerancia de las transformantes inducidas con D-galactosa | 37 |
| 5 | Promedio de las unidades formadoras de colonia (CFUs) y de los porcentajes de termotolerancia de las transformantes inducidas con Dextrosa | 39 |

Tablas Suplementarias

Página

| | | |
|----|---|----|
| S1 | Cuantificación de las clonas..... | 58 |
| S2 | Cuantificación de proteínas desnaturalizadas de <i>A. tequilana</i> | 58 |
| S3 | Cuantificación de proteínas nativas de <i>A. tequilana</i> | 59 |
| S4 | Cuantificación de los anticuerpos anti-mayehuelina | 59 |

Figuras Suplementarias

Página

| | | |
|----|---|----|
| S1 | SDS-PAGE de las proteínas extraídas de cultivos de levadura..... | 60 |
| S2 | Densitometría de la inducción de la mayehuelina | 61 |
| S3 | Evaluación de la termotolerancia de todas las transformantes después de ser inducidas en medio con D-galactosa..... | 61 |
| S4 | SDS-PAGE de proteínas totales de la transformante pYES-DEST52- <i>Mayehuelina::V5:His</i> | 62 |

RESUMEN:

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs) son una familia de proteínas que poseen la actividad ARN N-glicosidasa, la cual inhibe la síntesis proteica de los ribosomas. Usualmente se encuentran en plantas y se les atribuye una función defensiva. No obstante, algunas RIPs presentan poca o nula actividad inhibitoria de los ribosomas o se ubican en diferentes compartimentos celulares, por lo que se han generado hipótesis que plantean otras funciones biológicas. La mayehuelina es una RIP tipo I que se acumula de manera abundante en el cogollo de *Agave tequilana*, la estructura de esta planta con mayor resistencia al calor. Debido a su alta concentración en el cogollo y a una variación alélica natural en el sitio activo de la proteína se postula que la mayehuelina podría favorecer la resistencia al estrés calórico. En este trabajo se expresó y evaluó el efecto de la mayehuelina en el crecimiento y la tolerancia al calor de *Saccharomyces cerevisiae*. Se expresaron dos versiones de proteína recombinante construidas en un vector que permite su expresión regulada en *S. cerevisiae*: la primera sólo con la proteína madura y la segunda fusionada al epítipo V5 y a una etiqueta de histidinas. Los vectores fueron introducidos en la cepa W303-1a y la expresión de la proteína recombinante fue inducida en las células transformantes en medio mínimo con D-galactosa. Para realizar la inmunodetección se purificó el anticuerpo de mayehuelina inducido en suero de conejo. Inmediatamente después, se evaluó su nivel de termotolerancia basal e inducida. Sólo se logró expresar la mayehuelina fusionada al epítipo V5 y los resultados mostraron que la proteína recombinante no fue tóxica para las células, ya que no afectó su crecimiento a la temperatura óptima (25°C) respecto a la cepa control. También se observó que las células que expresaron a la mayehuelina fusionada al epítipo V5 aumentaron significativamente su termotolerancia basal. Por el contrario, en el caso de la termotolerancia inducida no se detectaron cambios significativos respecto a la cepa control. Estas evidencias confirmaron la hipótesis de que la mayehuelina está relacionada con la resistencia al calor. Sin embargo, queda aún por estudiarse el mecanismo de acción y la posible actividad ARN N-glicosidasa de la mayehuelina.

1.0 INTRODUCCIÓN:

Las proteínas inactivadoras de los ribosomas (RIPs, por sus siglas del inglés *Ribosome Inactivating Proteins*) son una familia de proteínas que poseen actividad ARN N-glicosidasa, la cual rompe irreversiblemente el enlace glicosídico en la posición conservada 4,324 (GAGA*A) de la subunidad 28S del ARN ribosomal (rARN) de los eucariontes, así como la posición homóloga 2,660 de la subunidad 23S de los procariontes (De Virgilio *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2016). Este sitio se ubica en una región denominada el lazo sarcina-ricina (SRL, por sus siglas en inglés [α -sarcin-ricin loop]), la cual se requiere para la elongación de los péptidos sintetizados (X. Shi *et al.*, 2013). Esta modificación inhibe la síntesis proteica ya que impide la unión o el correcto funcionamiento de los factores de elongación 1 y 2 (EF-1 y EF-2) eliminando la actividad traduccional del ribosoma (Barbieri *et al.*, 1993; X. Shi *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015).

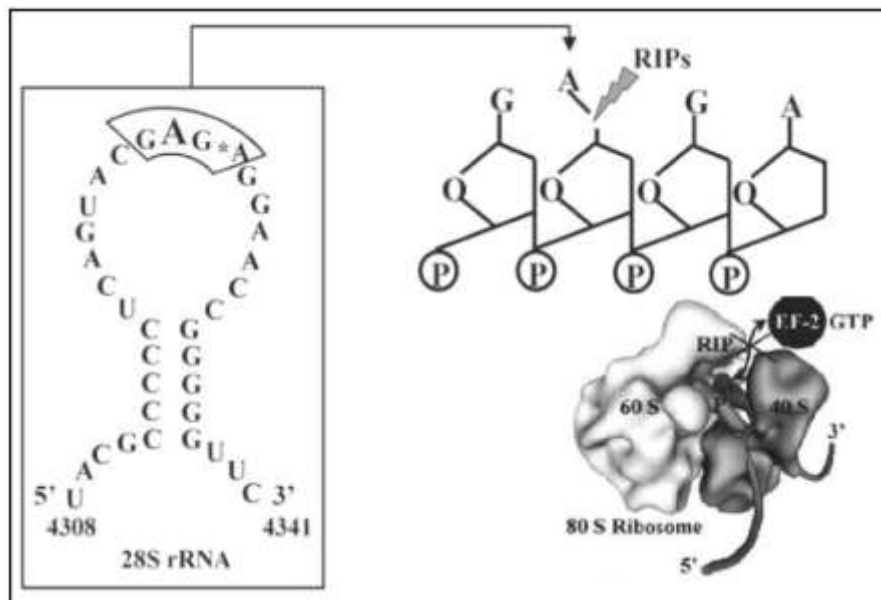


Figura 1. Mecanismo de acción de las RIPs en el SRL del rARN 28S de células eucariontes. (Girbés *et al.*, 2004)

A pesar de que el nombre sugiere que algunas RIPs únicamente depurinan al rARN, también se ha observado que pueden tener afinidad por otros sustratos, por ejemplo: el ARN de transferencia (tARN), el ARN mensajero (mARN), los ARN virales e incluso el ADN, por lo que se ha propuesto denominarlas como

glicosidasas de polinucleótidos de adenosina (Peumans *et al.*, 2001; Stirpe, 2004; Bolognesi *et al.*, 2016). Sin embargo, no se ha llegado a ningún consenso.

1.1 Clasificación

La clasificación y función de las RIPs continúa en debate. Principalmente se dividen en RIPs tipo I y tipo II, aunque se ha propuesto un tercer grupo, las RIPs tipo III (Schrot *et al.*, 2015). Las RIPs tipo I, denominadas holo-RIPs, están constituidas únicamente de una sola cadena (cadena A), con un peso molecular entre los 23 y los 32 kDa, con la actividad catalítica ARN N-glicosidasa (Nielsen y Boston, 2001). Sin embargo, de acuerdo con Peumans y colaboradores (Peumans *et al.*, 2001) las RIPs tipo I se subdividen en proteínas de una o dos cadenas, ya que existen algunos ejemplos donde la cadena original es proteolíticamente procesada, formando una proteína de dos cadenas unidas por interacciones no covalentes. Las RIPs tipo II, conocidas como quimero-RIPs, presentan un peso molecular de 60 kDa aproximadamente; son heterodímeros formados por la cadena A, funcionalmente equivalente a la cadena de las RIP tipo I, unida por un puente disulfuro a la cadena B con propiedad de lectina (Stirpe y Battelli, 2006). Por último, las RIPs tipo III son proteínas traducidas como precursores que requieren de un procesamiento para su activación (Peumans *et al.*, 2001).

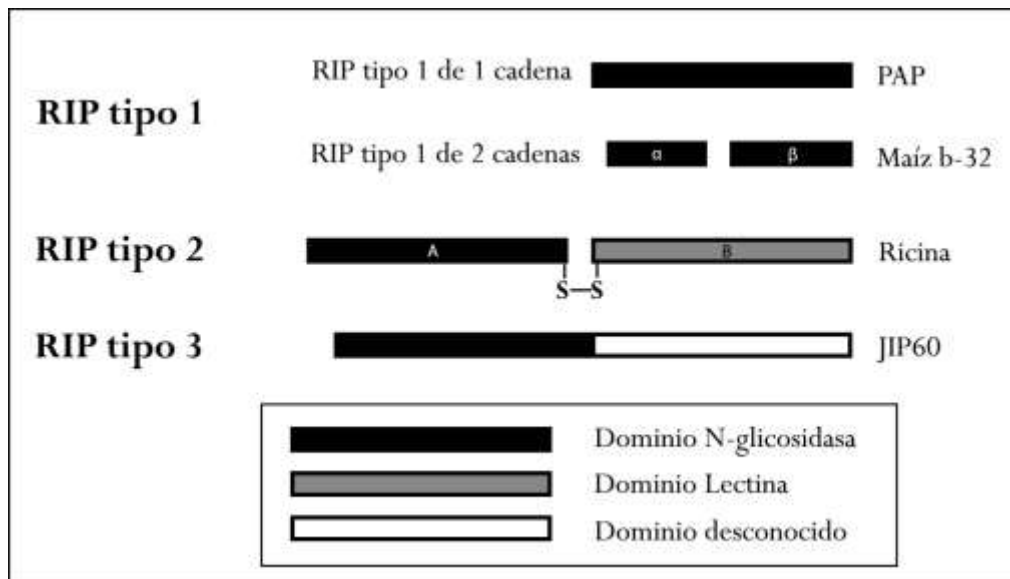


Figura 2. Estructura esquemática de los tres tipos de RIPs (Peumans *et al.* 2001).

De los tres tipos, las más estudiadas son las de tipo II, ya que varias proteínas representativas de este grupo son citotóxicas; sin embargo, representan la menor proporción de RIPs conocidas (Stirpe, 2004). La abrina y la ricina, por ejemplo, son sustancias que provienen de las semillas de *Abrus precatorious* y *Ricinus communis*, respectivamente (Chen *et al.*, 2015). El efecto tóxico de estas semillas es conocido desde hace siglos. Sin embargo, hasta finales del siglo XIX se purificó el compuesto activo de ambas y se reconoció que eran proteínas de esta familia (Bolognesi *et al.*, 2016).

1.2 Transporte intracelular

En comparación con las RIPs tipo I, usualmente se les atribuye mayor citotoxicidad a las RIPs tipo II, debido a la cadena B, que tiene la actividad de lectina. Esta cadena les permite unirse a glicoproteínas de la membrana celular y, posteriormente, ser introducidas a la célula por medio de la endocitosis (Walsh *et al.*, 2013). Es importante destacar que las RIPs tipo II se unen a diferentes tipos de glicoproteínas de membrana, lo cual ejerce una importante influencia en la ruta intracelular que siguen (Ferrerias *et al.*, 2011). Actualmente, se han descrito cuatro principales rutas intracelulares (Figura 3) para las RIPs tipo II. Las primeras dos rutas consideran que cierta cantidad de RIPs es reciclada o eliminada, ya sean excretadas fuera de la célula por endosomas o degradadas por medio de lisosomas (Ferrerias *et al.*, 2011; Spooner y Lord, 2015). La tercera y cuarta rutas facilitan la entrada de la cadena A al citosol, donde ésta puede ejercer su actividad glicosidasa sobre los ribosomas. Para el caso de la tercera ruta, debido a su alta concentración, las RIPs son liberadas de manera espontánea en el citosol (Ferrerias *et al.*, 2011). En la cuarta ruta las RIPs son transportadas primero al aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplasmático, donde la cadena A es separada de la cadena B para finalmente ser retrotranslocada al citosol (Ferrerias *et al.*, 2011; Gadadhar y Karande, 2013; Spooner y Lord, 2015).

La ausencia de la cadena B en las RIPs tipo I limita su internalización a la célula y, por lo tanto, son consideradas poco tóxicas. Sin embargo, pueden llegar a serlo si son internalizadas por procesos naturales como la pinocitosis (invaginación de la

membrana celular que permite la entrada de sustancias sin la participación de receptores) o mediante procesos artificiales como los liposomas (Stirpe y Battelli, 2006). Por otro lado, las RIPs tipo I potencialmente podrían inactivar a los ribosomas en la misma célula donde son sintetizadas. Sin embargo, también se han observado algunos ejemplos donde son secuestradas en la vacuola, en la pared celular, en cuerpos proteicos o son excretadas fuera de la célula para así evitar su acción en los ribosomas (Carzaniga *et al.*, 1994).

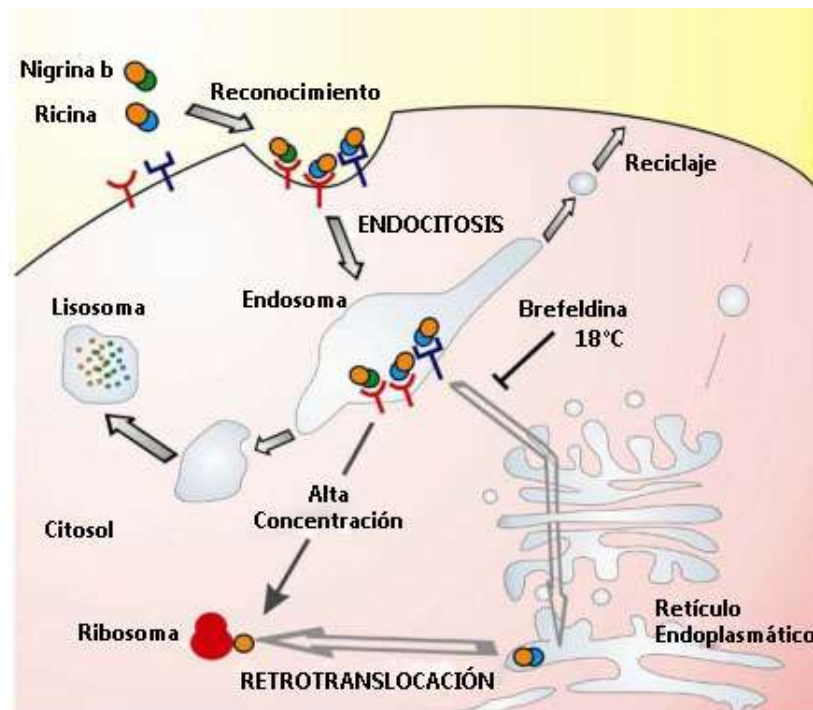


Figura 3. Destinos y rutas intracelulares de las RIPs tipo II. 1) Las RIPs recientemente introducidas a la célula son excretadas por los endosomas. 2) Las RIPs son llevadas a los lisosomas donde son digeridas. 3) El endosoma libera espontáneamente a algunas RIPs en el citosol, que posteriormente inactivan a los ribosomas. 4) Las RIPs son dirigidas al aparato de Golgi y posteriormente al retículo endoplásmico donde se libera la cadena A que es retrotranslocada al citosol. (Ferrerias *et al.*, 2011)

1.3 Distribución y origen evolutivo de las RIPs

Esta familia de proteínas se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, pero también se ha encontrado en hongos, bacterias, algas e incluso en algunos tejidos de metazoarios (Girbés *et al.*, 2004; Bolognesi *et al.*, 2016; Schrot *et al.*, 2015) Actualmente se han descrito RIPs en diversos tejidos vegetales, de

aproximadamente 50 especies que pertenecen a 17 familias, destacando en Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Sambucaceae, Phytolaccaceae, Caryophyllaceae y Poaceae (Vivanco *et al.*, 1999; De Virgilio *et al.*, 2010). Ejemplos de RIPs tipo I son la curcina, proveniente de las semillas de *Jatropha curcas*, la saporina, que se encuentran en las semillas de *Saponaria officinalis*, la bouganina, aislada de las hojas de *Bougainvillea spectabilis*, entre otros (Fermani *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Stirpe *et al.*, 1983). Además de la ricina y la abrina, otras RIPs tipo II en plantas son la volkensina, aislada de las raíces de *Adenia volkensis* y la riproximina, obtenida de *Ximenia americana* (Severino *et al.*, 2009; Voss *et al.*, 2006). El único ejemplo conocido de RIP tipo III es JIP60, una proteína inducida por jasmonato en hojas de *Hordeum vulgare* (Chaudhry *et al.*, 1994; Choudhary *et al.*, 2008). En otros organismos como *Escherichia coli* se han descrito las Stx1 y Stx2, las cuales presentan la cadena A de las RIPs (Di *et al.*, 2012); mientras que en algas sólo se ha estudiado la lamjapina, una RIP tipo I encontrada en *Laminaria japonica* (Liu *et al.*, 2002). También se han descrito diversas RIPs en hongos como son la sarcina proveniente de *Aspergillus giganteus*, la flamulina y la velutina de *Flammulina velutipes*, la liofilina encontrada en *Lyophyllum shimeiji*, entre otros (Endo y Wool, 1982; Lam y Ng, 2001; H. Wang y Ng, 2000; H. Wang y Bun, 2001). Por último, recientemente se descubrió *in silico* la presencia de RIPs en los mosquitos *Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus* (Lapadula *et al.*, 2013), lo cual fue posteriormente confirmado experimentalmente en varias especies del género *Culex* (Lapadula *et al.*, 2017).

Existen tres hipótesis acerca del origen evolutivo de las RIPs en plantas (Bolognesi *et al.*, 2016). La hipótesis más reciente involucra mayor información ya que toma en cuenta que las RIPs están distribuidas en otros reinos (Bacteria, Fungi y Animalia), por lo que establece que el origen de las RIPs ocurrió en algún ancestro de Bacteria, de Archaea o Eukarya e incluso que las RIPs comenzaron a evolucionar antes de que las tres divisiones divergieran (Lapadula *et al.*, 2013). Las otras dos hipótesis son más antiguas y no consideran la presencia de RIPs en otros reinos, sin embargo, presentan su propia evidencia para el desarrollo de las RIPs en plantas. La primera indica que las RIPs tipo II se desarrollaron en un

antepasado de las angiospermas. Posteriormente, las RIPs tipo I surgieron a partir de una deleción de la cadena B (Lapadula *et al.*, 2013). Por otro lado, la segunda establece que un ancestro del dominio RIP se originó en una angiosperma hace aproximadamente 300 millones de años. A través de eventos de transferencia horizontal con bacterias, las plantas obtuvieron el dominio lectina, dando origen a las RIPs tipo II. Por medio de una deleción de la cadena B y/o por evolución convergente se originaron las RIPs tipo I (Peumans y Van Damme, 2010

A pesar de la nueva evidencia, el estudio de la evolución y filogenia de las RIPs aún presenta dos problemas principales: el número limitado de secuencias que se tiene y su irregular distribución en las plantas y otros taxa. Por lo anterior, el origen evolutivo de las RIPs aún permanece desconocido (Bolognesi *et al.*, 2016).

1.4 Toxicidad de las RIPs

Aunque todas las RIPs tienen la capacidad de depurar el lazo sarcina- ricina de los ribosomas, éstas no presentan el mismo grado de toxicidad (Walsh *et al.*, 2013). Existen diversas estrategias para evaluar el efecto tóxico de las RIPs que van desde ensayos de actividad *in vitro* en células cultivadas como los hepatocitos de rata, los reticulocitos de conejo, e incluso las células HeLa, hasta ensayos *in vivo*, que expresan los genes correspondientes en bacterias o levaduras como *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Pichia pastoris* o *Schizosaccharomyces pombe* (Di *et al.*, 2011; Reyes *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Diversos estudios han indicado que el nivel de toxicidad no depende precisamente del tipo al que pertenece la RIP o a su capacidad para depurar los ribosomas (Li *et al.*, 2007). Por ejemplo, la nigrina b, una RIP tipo II obtenida de la corteza del saúco (*Sambucus sp.*) tiene una toxicidad prácticamente nula. Se ha observado en células cultivadas y en ensayos con ratón que la nigrina b es entre 1,000 y 10,000 veces menos tóxica que la ricina (Battelli *et al.*, 1997; Ferreras *et al.*, 2010). Más aún, se ha observado que en *S. cerevisiae* no toda la toxicidad de la ricina se debe a la inactivación de los ribosomas, lo cual sugiere que las RIPs tienen otros mecanismos de acción y funciones no dilucidados (Li *et al.*, 2007). Además, es importante destacar que no todas las RIPs inactivan al ribosoma de la misma manera. A pesar de que todas

depurinan el lazo sarcina-ricina, su sitio de reconocimiento y anclaje es diferente, lo que genera diversos grados de efectividad (Chiou *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2015; May *et al.*, 2013).

1.5 Función biológica de las RIPs

El papel biológico de las RIPs en plantas aún no está completamente esclarecido, ya que no necesariamente todas las funciones biológicas están directamente relacionadas con su actividad enzimática conocida (Bolognesi *et al.*, 2016; Nielsen y Boston, 2001). Por un lado, para entender el contexto de su actividad ARN N-glicosidasa, varios estudios sugieren que las RIPs han evolucionado como mecanismos de defensa contra la herbivoría (Schrot *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha observado que la producción de RIPs aumenta bajo diferentes condiciones fisiológicas como la senescencia, la apoptosis, el estrés osmótico y el calórico (Narayanan *et al.*, 2005; Stirpe *et al.*, 1996). Otros han estudiado que actúan como proteínas de reserva en las semillas (R.S. Liu *et al.*, 2002). Incluso se ha observado que RIPs tipo I como la PAP (*Pokeweed Antiviral Protein*) pueden tener una función de regulación negativa, ya que han sido capaces de inhibir la traducción de mARNs por medio de su unión a la “cofia” (estructura cap-5') y por depurinación del mensajero, en lugar de actuar sobre los ribosomas e inhibir por completo la traducción (Vivanco y Tumer, 2003). La PAP también tiene la capacidad de inhibir la traducción de ARNs sin cofia, a través de la vía IRES (Sitio interno de entrada del ribosoma, del inglés *Internal Ribosome Entry Site*), sin la necesidad de depurinar la cadena ribonucleica (Vivanco y Tumer, 2003). Todo lo anterior, parece sugerir que no todas las RIPs están involucradas con la inactivación de los ribosomas, en especial las RIPs tipo I, que usualmente permanecen dentro de la célula que los sintetiza. Cabe destacar, que se ha reportado un cambio natural de aminoácido en el sitio catalítico de la charibdina, una RIP tipo I. La charibdina presenta una valina en la posición 79 en lugar del aminoácido conservado tirosina, presente en todas las RIPs conocidas actualmente (Touloupakis *et al.*, 2006), por lo que es posible que la charibdina tenga una actividad enzimática adicional o diferente a la de una N-glicosidasa.

A pesar de no conocer las diversas funciones y/o propiedades enzimáticas de todas las RIPs, éstas han suscitado el interés para ser usadas en diversas actividades humanas como la medicina y la agricultura. Algunas RIPs han mostrado ser buenos candidatos como anticancerígenos (nigrina b), otras son usadas como abortivos (tricosantina), y otras presentan propiedades que pueden ser utilizadas como antiinflamatorios y antiespasmódicos. Además, se ha reportado actividad antiviral en plantas y animales, antibacterial, antifúngica e insecticida. Incluso, las RIPs tipo II altamente tóxicas como la ricina, han sido utilizadas como armas biológicas (Bolognesi *et al.*, 2016; Peumans *et al.*, 2001; Schrot *et al.*, 2015).

1.6 *Saccharomyces cerevisiae* como un modelo eucarionte para evaluar la toxicidad de las RIPs

La levadura del panadero, denominada *S. cerevisiae*, es un organismo eucarionte unicelular ampliamente estudiado. *S. cerevisiae* es fácil de crecer, posee un ciclo de vida corto y cuenta con un genoma pequeño, totalmente secuenciado, de aproximadamente 2×10^7 pares de bases, apenas 2.6 veces mayor que el genoma de *E. coli*. Además, es un organismo sencillo de manipular por técnicas de biología molecular. Por ello, *S. cerevisiae* es el modelo biológico eucarionte ideal para realizar estudios de genética (Botstein y Fink, 2011; Duina *et al.*, 2014; Milo y Phillips, 2015) y para evaluar la toxicidad de las RIPs (Li *et al.*, 2007).

2.0 ANTECEDENTES:

El género *Agave* pertenece a la subfamilia Agavoideae de la familia Asparagaceae (The APG, 2009). Los agaves son plantas con hojas suculentas, fibrosas, usualmente espinadas y en forma de roseta que se desarrollan en climas cálidos y secos (Good-Avila *et al.*, 2006). El crecimiento de las hojas sigue una espiral (Figura 4) conformada por las hojas del centro denominado cogollo (hojas no desplegadas) y por las hojas internas, medias y externas (hojas desplegadas) (Luján *et al.*, 2009).

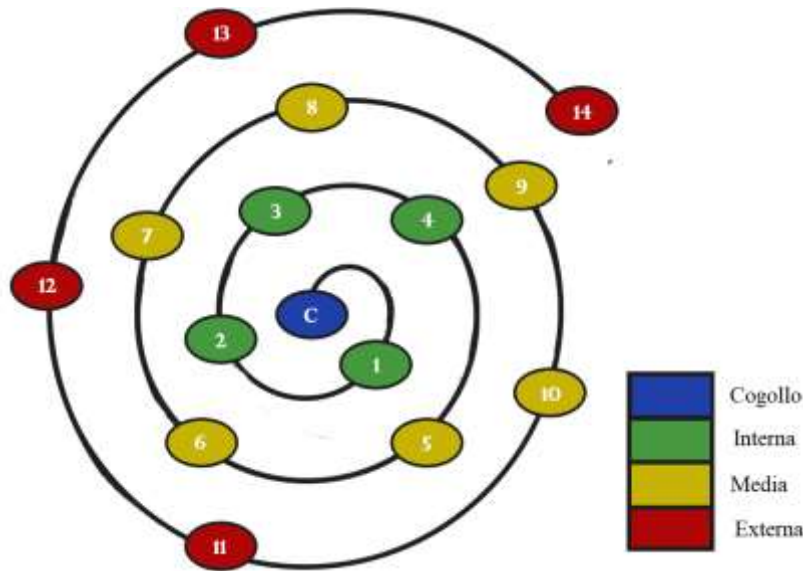


Figura 4. Crecimiento en espiral del agave y su clasificación en hojas plegadas del cogollo (C) o desplegadas, ya sea internas (1-4), medias (5-10) y externas (11-14).

En un estudio realizado para conocer la respuesta al choque de calor (*Heat shock response*, HSR) de *A. tequilana* a diversas temperaturas (28, 44, 48 y 54°C) mediodía con luz y en diferentes secciones de la espiral de hojas, se observaron respuestas en dos niveles (Luján *et al.*, 2009):

1) A nivel organismo, el porcentaje de daño generado por los choques de calor en las hojas del cogollo fue prácticamente nulo. Sin embargo, este porcentaje aumentó conforme las hojas se alejan del centro de la espiral. También observaron que las hojas internas y del cogollo tienen la capacidad de disminuir su temperatura entre 5 y 6°C, respecto al ambiente, a diferencia de las hojas medias y externas que sólo abatieron su temperatura 2°C. El número mayor de estomas observados en las hojas internas y del cogollo explican su capacidad para disminuir la temperatura foliar. Sin embargo, esta respuesta fisiológica no basta para explicar completamente por qué el cogollo presenta una mayor resistencia al calor que las hojas internas (Luján *et al.*, 2009).

2) A nivel molecular, la acumulación de proteínas de choque de calor (*Heat Shock Proteins*, HSP) fue distinta en las diversas hojas de *A. tequilana*. Únicamente las hojas del cogollo expresaron todo el perfil de HSPs evaluadas en respuesta a un

choque de 54°C (\approx 48°C temperatura foliar en el cogollo). Además, comparado con el resto de las hojas, las proteínas del cogollo presentaron un menor grado de ubiquitinación y menor contenido del grupo carbonilo (características que miden el nivel de daño en proteínas). El conjunto de estos resultados explicó la mayor resistencia al calor observada del cogollo, comparada con las hojas internas, medias y externas. Cabe destacar que, a 54°C, el nivel de expresión de los transcritos de las HSPs no correlaciona con el nivel de expresión de sus proteínas, ya que la mayor acumulación de estos transcritos ocurre a los 44°C. Esto sugiere que existe algo que regula negativamente su traducción en el cogollo hasta los 44°C (Luján *et al.*, 2009).

Posteriormente, mediante electroforesis de proteínas (SDS-PAGE), se identificó una banda intensa correspondiente a una proteína específica del cogollo con un peso molecular de 27 kDa (Lledías, Cabanillas, Nieto-Sotelo, datos no publicados), la cual se expresa en todas las temperaturas analizadas por Luján y colaboradores (Lujan *et al.*, 2009).

La secuencia proteica, obtenida por espectrometría de masas (Lledías, Mendoza, Nieto-Sotelo, datos no publicados), fue utilizada para identificar a una clona de ADN complementario (cADN) que la codificaba dentro de una colección de marcadores de secuencia expresada (*Expressed Sequence Tag*, ESTs) de *A. tequilana* (Martínez-Hernández *et al.*, 2010). Ambas secuencias, proteica y nucleotídica, indicaron que pertenece a la familia de RIPs tipo I. A la proteína se le asignó el nombre de mayehuelina en honor a la deidad mexicana Mayehuel, la diosa del maguey (Martínez y Nieto-Sotelo, datos no publicados). Por medio de anticuerpos policlonales inducidos en conejo contra la proteína purificada, se observó que también se expresa en el cogollo de otras especies del género *Agave*. (Hernández Bermúdez, 2018). Al comparar las secuencias de aminoácidos de la Mayehuelina predicha por el cDNA de *A. tequilana* y la obtenida por espectrometría de masas, se observó que la proteína se sintetiza como un precursor de mayor longitud que, en el proceso de maduración, pierde los péptidos N-terminal y C-terminal (Reyes, 2014). La proteína resultante tiene un peso

molecular hipotético de 27 kDa, el cual coincide con el peso experimental observado en SDS-PAGE. Un análisis bioinformático de la secuencia del N-terminal removido, indica que puede ser un péptido señal para la translocación de la proteína al retículo endoplásmico (Lledías-Martínez F., Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados; Reyes, 2014).

En un estudio previo se expresó en células de *S. cerevisiae* de manera heteróloga el gen *Mayehuelina* en dos versiones distintas: la que codifica para la proteína madura de 27 kDa y una versión fusionada, en su extremo C-terminal, a una etiqueta de histidinas para facilitar, en caso de necesidad, la inmunodetección o purificación de la proteína recombinante. Ninguna de las dos construcciones tuvo efecto sobre el crecimiento o el desarrollo de las células en condiciones estándar (Reyes, 2014).

A la fecha, la función biológica de la mayehuelina aún permanece desconocida. Por lo tanto, en este trabajo se evaluaron los efectos de esta proteína bajo condiciones de estrés calórico en células de *S. cerevisiae*.

3.0 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la termotolerancia basal e inducida en células de *S. cerevisiae* transformadas con la mayehuelina

3.1 OBJETIVO PARTICULAR:

Expresar la mayehuelina en *S. cerevisiae* en la cepa W303-1a con los plásmidos pYES-DEST52-*Mayehuelina* y pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His*

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1 Identificación de la cepa W303-1a (*S. cerevisiae*).

Se tomaron muestras de un cultivo congelado a -70°C de la cepa W303-1a y se sembraron en cajas Petri con medio sólido YPDA (Anexo). Las células sembradas se cultivaron en una incubadora a 30°C durante 3 días. Posteriormente, se aislaron colonias separadas y fueron resembradas en una caja Petri dentro de una

cuadrícula de medio selectivo (SD) complementado con adenina hemisulfatada, uracilo, triptófano, histidina y leucina (SD + suplementos) y, en dos medios de control negativo: SD Trp⁻ y SD Leu⁻ (Anexo). Las colonias que crecieron en el medio SD + suplementos y que no crecieron en los controles negativos, fueron subcultivadas en medio YPDA.

4.2 Identificación de vectores.

La Biól. Sandi Reyes (Reyes, 2014) proporcionó dos tipos de construcciones con la secuencia que codifica a la mayehuelina madura insertada en el plásmido pYES-DEST52 (*Gateway™ Vector*) (Figura 5). El inserto se introdujo entre los sitios de restricción *attR1* y *attR2* dejando fuera al gen *CmR* y el gen *ccdB*. La primera construcción incluye un codón de término en el extremo 3' de la secuencia de la mayehuelina (*pYES-DEST52-Mayehuelina*). La segunda construcción no incluye este codón de término (*pYES-DEST52-Mayehuelina::V5::His*) y, por lo tanto, la mayehuelina de esta construcción se transcribe y traduce con la epítipo V5 (14 amino ácidos) y una etiqueta de 6 histidinas provenientes del plásmido (Figura 5). Ambas construcciones tienen un peso aproximado de 6,635 pb.

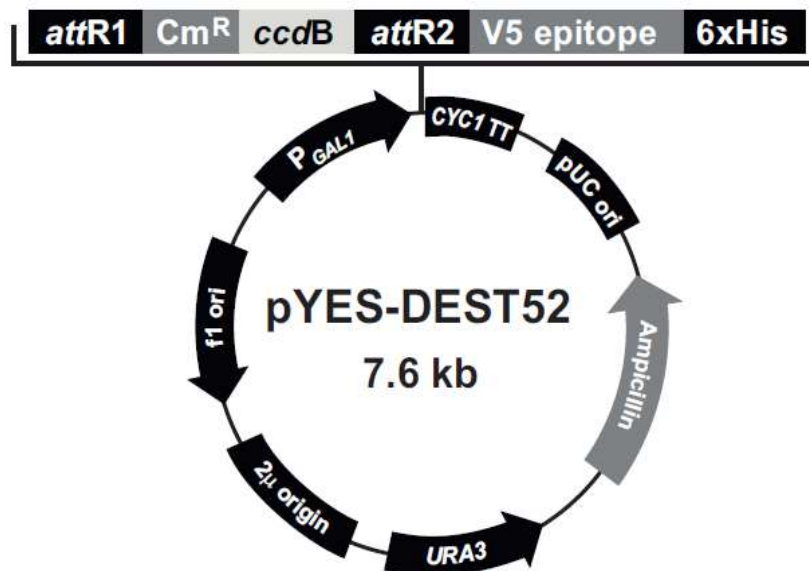


Figura 5. Esquema del vector pYES-DEST52 con el sitio de recombinación entre *attR1* y *attR2*.

4.3 Cuantificación de los vectores.

Se preparó la cámara de electroforesis horizontal con un gel de agarosa al 1 % en 50 mL de TAE 1X (Anexo) y bromuro de etidio al 0.01 %. Se utilizaron 300 mL de TAE 1X como buffer de corrida. La concentración de las construcciones (clonas R1 y R2) proporcionadas por Reyes (Reyes, 2014) eran desconocidas, por lo que se diluyeron 1:10. Se mezcló 1 μ L de cada dilución de ADN mencionada anteriormente con 1 μ L de azul de bromofenol y 4 μ L de agua destilada estéril (buffer de carga) y se cargaron en los carriles del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder durante 45 min a 100 V. Como referencia se utilizó 0.5 μ g (1 μ L) de *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* de *Thermo Scientific*. Una vez que concluyó el tiempo, se recuperó el gel, se visualizó con el *Gel Doc EZ Imager* y el programa *Image-Lab software* versión 5.0 de *Bio-Rad*®.

4.4 Amplificación del gen de la mayahuelina a partir de los vectores.

Se usaron oligonucleótidos específicos para amplificar la secuencia de la mayahuelina con una longitud de 735 pb. Para la reacción se emplearon los oligonucleótidos F2: 5' GTG AAA TTT GAG GTC ACC CT 3' y R3: 5' TTT GTA GTT AAC TTC AAC GTT 3'. Se utilizaron las clonas catalogadas por la Biól. Sandi Reyes como R1-3, R1-4, R1-5, R2-2, R2-3 y R2-4. Las condiciones de la reacción se describen en el cuadro 1.

Como control positivo se utilizó 1 μ L de ADN total de *A. tequilana*, el cual tenía una concentración de 200 ng/ μ L. El control negativo incluyó todos los componentes de la reacción de PCR menos el plásmido. Se utilizó el termociclador *Mastercycler gradient* de *Eppendorf*. Se creó el programa denominado 251, el cual se describe en el cuadro 2.

Cuadro 1. Componentes empleados en la reacción de PCR para amplificar al gen *Mayehuelina*. Se utilizó la polimerasa de la marca *Thermo Fisher Scientific (Taq DNA Polymerase, cat. EP0402)*

| Componente | Concentración Stock | Concentración Final | Volumen (μL) |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|---|
| H ₂ O inyectable | - | - | 14 |
| Solución de KCl | 10X | 1X | 2 |
| Solución de MgCl ₂ | 25 mM | 2 mM | 1.6 |
| dNTPs | 10 mM | 0.2 mM | 0.4 |
| Oligonucleótido F2 | 10 μM | 0.2 μM | 0.4 |
| Oligonucleótido R3 | 10 μM | 0.2 μM | 0.4 |
| Polimerasa Taq | 5 U/ μL | 0.05 U/ μL | 0.2 |
| Plásmido | 10 ng/ μL | 0.5 ng/ μL | 1 |

Cuadro 2. Descripción del programa 251 para amplificar la mayehuelina con los oligonucleótidos F2 y R3.

| Paso | Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) | Duración |
|-------------|--|---------------------|
| 1 | 95 | 2 min |
| 2 | 95 | 30 seg |
| 3 | 55.2 | 30 seg |
| 4 | 72 | 45 seg |
| 5 | Regresar al paso 2 | 31 ciclos |
| 6 | 72 | 7 min |
| 7 | 5 | (Tiempo indefinido) |
| Fin | | |

4.5 Transformación de *S. cerevisiae* con las construcciones del gen *Mayehuelina*.

Se realizó siguiendo el protocolo de choque de calor descrito por Gietz y Woods (Gietz y Woods, 2002). Se creció un cultivo de la cepa W303-1a en 5 mL de medio

líquido YPDA 2X (Anexo) a 30°C durante una noche. Se midió la D.O.₆₀₀ y se diluyó el medio hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ ≈ 0.05. Se dejó crecer hasta una D.O.₆₀₀ entre 0.4 y 0.6, para alcanzar la fase logarítmica media.

Utilizando los datos de la cuantificación de los plásmidos se tomaron 0.1 µg de las construcciones pYES-DEST52-*Mayehuelina* (R1-3), pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* (R2-2) o del plásmido vacío (pYES-DEST52), y se aforaron a 34 µL con agua destilada estéril. Después del choque de calor se centrifugaron los tubos a 13,000 rpm durante 0.5 min y el sobrenadante se desechó. Se resuspendió en 1 mL de agua estéril y se sembraron alícuotas de 100 µL en cajas Petri con medio auxotrófico SD Ura⁻ (Anexo). Como controles positivos se sembraron alícuotas en medio YPDA y como negativos en medio SD Trp⁻ (Anexo). Se utilizaron perlas de vidrio estéril para dispersar las alícuotas. Las cajas se dejaron en la incubadora aproximadamente 5 días a 30°C.

4.6 Extracción del ADN plasmídico de las cepas transformadas.

Se sembraron 3 colonias de cada transformación en 5 mL de medio SD Ura⁻ (Anexo) manteniéndose en la incubadora a 30°C con agitación en el carrusel (velocidad 3) durante toda la noche. Al día siguiente se tomaron alícuotas de 2 mL y se centrifugaron durante 1 min a 13,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante por decantación y se realizó un lavado con 1 mL de agua destilada estéril. Se resuspendió en 500 µL de buffer de lisis A (Anexo) y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 500 µL de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó en el aparato Vórtex a velocidad máxima durante 3 min. Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 5 min. Se recuperó la fase acuosa sin perturbar la interfase. Se colocó 1/10 de volumen (respecto al recuperado) de una solución de acetato de sodio 3 M a pH 5.2 y 3 volúmenes de etanol al 100% previamente enfriado a -20°C. Se dejó precipitando 2 horas en el congelador a -20°C. Se centrifugó a 13,000 rpm a 4°C durante 10 min. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% (enfriado a -20°C) y se volvió a centrifugar 5 min a 13,000 rpm y 4°C. Se eliminó el sobrenadante por decantación y los tubos se colocaron boca abajo en la gradilla de secado hasta que se evaporó

todo el etanol. Finalmente, la pastilla de ADN extraído se resuspendió en 50 μ L de buffer TE 1X (Anexo). La muestra se cuantificó en el *Nanodrop* 2000 de *Thermoscientific* y se confirmó la integridad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % realizada a 100 V durante 45 min.

4.7 Amplificación del gen *Mayehuelina* a partir de los plásmidos obtenidos de levaduras transformantes.

Se utilizaron las mismas condiciones de reacción que en la amplificación a partir de los plásmidos obtenidos por Reyes. Sin embargo, el volumen total de muestra (ADN) fue de 5 μ L (~10 ng) y de agua inyectable 10 μ L. Se separó el producto de la amplificación en un gel de agarosa al 1 % durante 45 min a 100 V.

4.8 Extracción de proteínas totales de *A. tequilana*.

Se compraron 4 ejemplares de *A. tequilana* en el vivero “Pueblo Viejo” de Cuautla, Morelos. Para la extracción de proteínas se colectó una muestra de cogollo cortando a 10 cm arriba de la base del cogollo que inmediatamente se congeló en N₂ líquido. Las hojas se rompieron mecánicamente dentro de una bolsa *Ziploc* y en seguida fueron molidas con hielo seco hasta obtener un polvo fino que se almacenó a -70°C durante una noche para evaporar el hielo seco. A continuación, se siguieron dos protocolos distintos (Lledías *et al.*, 2017a; Lledías *et al.*, 2017b), de acuerdo a si se deseaba tener extractos de proteínas en conformación desnaturalizada o nativa.

Para la extracción de proteínas en su conformación nativa se colocaron 450 mg del polvo obtenido del cogollo en un tubo *Eppendorf* de 2 mL resuspendiéndose inmediatamente durante 0.5 min con un émbolo en 500 μ L de buffer de extracción A (Anexo) y manteniéndose todo el tiempo en hielo. Luego se realizó un hoyo en la parte inferior del tubo *Eppendorf* y se introdujo en un tubo *Falcon* de 15 mL. Se centrifugó a 4,400 rpm a 4°C durante 60 min y se recuperó el sobrenadante. Se añadieron 2 volúmenes de acetona y se dejó precipitando toda la noche. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó durante 10 min con el tubo invertido.

La pastilla se resuspendió en 50 μ L de buffer de proteínas nativas 1X (Anexo). Se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, las proteínas disueltas fueron almacenadas en el congelador a -20°C .

Para la extracción de proteínas desnaturalizadas se siguió el protocolo de Lledías y colaboradores (Lledías *et al.*, 2017a; Lledías *et al.*, 2017b). Para esto, se colocaron 450 mg del polvo obtenido del cogollo en un tubo *Eppendorf* de 2 mL. Se resuspendió rápidamente durante 0.5 min con un émbolo en 500 μ L de buffer de extracción B (Anexo) manteniéndose en todo momento en hielo. Luego se realizó un hoyo en la parte inferior del tubo *Eppendorf* y se introdujo en un tubo *Falcon* de 15 mL. Se centrifugó a 4,400 rpm a 4°C durante 60 min y se recuperó el sobrenadante. Se añadieron 4 volúmenes de una solución con TCA 10%, β -mercaptoetanol 0.07% (acetona como diluyente) y se dejó precipitando toda la noche. Se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. La pastilla se lavó 2 veces con acetona y β -mercaptoetanol al 0.07% para eliminar el TCA. En cada lavado se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C y después se dejó secando durante 10 min con el tubo invertido. La pastilla se resuspendió en 100 μ L de buffer Laemmli 1X (Anexo) y se agregaron 2 μ L de TCA al 100%. El tubo se calentó en el *Thermomixer R* de *Eppendorf* a 95°C con agitación de 500 rpm durante 5 min. A continuación, se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min en temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se volvió a añadir el mismo volumen del buffer Laemmli 1X y se añadieron 20 μ L de NaOH 0.5 M. Nuevamente se calentó a 95°C durante 5 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas disueltas fueron almacenadas en el congelador a -20°C .

4.9 Cuantificación de proteínas de *A. tequilana*.

Para esto, se siguió una modificación del protocolo de Lowry (Schleif y Wensink, 1981). Se colocaron 2 μ L de cada muestra en tubos *Eppendorf* con 798 μ L de H_2O destilada y se agregaron 200 μ L de TCA al 50%. Las muestras se mantuvieron

precipitando durante 1 hora en hielo y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 5 min a 4°C. Se les desechó el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 200 µL de NaOH al 0.5 M, dejándose disolver toda la noche a temperatura ambiente. A cada muestra, se le agregó 1 mL de la solución C (Anexo) y se dejó incubar 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó 0.1 mL de la solución D (Anexo) y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Se calibró la curva patrón con 0, 2, 5, 10, 25 y 50 µg de BSA, proveniente de un concentrado comprado contenido en el *Pierce BCA Protein Assay kit* de *Thermo Scientific* (Cat. 23225), siguiendo el mismo protocolo. Se realizaron 3 réplicas por ensayo y se midió la absorbancia a 660 nm.

4.10 Purificación del anticuerpo anti-mayehuelina a partir de suero de conejo.

Los extractos de proteínas en conformación nativa se separaron mediante electroforesis. Se preparó el gel separador al 8 % (Anexo, gel separador P) y el gel concentrador al 4% (Anexo, gel concentrador P). Se unieron 25 carriles del peine para formar uno sólo de 10 cm de ancho y se cargaron 2,250 µg de proteína en 400 µL de buffer de proteínas nativas 1X (Anexo). La electroforesis se llevó a cabo en el buffer de corrida P (Anexo). Se dejó correr la electroforesis a 100 V durante 6 horas en el equipo *OmniPAGE Mini Wide* de *Cleaver Scientific®*. El gel se tiñó durante 1 hora con agitación lenta en 100 mL de solución de Comassie (Anexo). Posteriormente se retiró la solución de Comassie del gel con lavados de 2 horas en 100 mL de solución desteñidora (Anexo). Se cortó la banda más prominente que corresponde a la mayehuelina (Hernández-Bermúdez, datos no publicados) con una navaja y se cortó en trozos de 2 mm que se colocaron en un tubo *Eppendorf*. Se agregaron 1,494 µL de PBS 1X (Anexo) y 6 µL de glutaraldehído al 50%. Se dejó agitando por inversión a 4°C durante toda la noche en el equipo *Bambino hybridization oven* de *Boekel Scientific®*.

Al día siguiente, se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS 1X. Se rompieron mecánicamente los pedazos de gel con un émbolo en solución PBS 1X hasta formar un coloide. Posteriormente se transfirió a un tubo *Falcon* de 15 mL, el cual

se centrifugó a 4,400 rpm durante 3 min a 4°C y se eliminó el sobrenadante. Se agregaron 4 mL de NaBH₄ 20 mM; se agitó por inversión y se dejó 1 hora a temperatura ambiente, mezclando por inversión cada 15 min. Se centrifugó a 4,400 rpm durante 3 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se lavó con PBS 1X. Se resuspendió la pastilla en 2 mL de suero de conejo (No. 110) inmunizado con la Mayehuelina (Lledías-Martínez F., Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados) y se aforó a 6 mL con PBS 1X. Nuevamente se pasó al agitador por inversión *Bambino hybridization oven* durante una noche a 4°C.

Al día siguiente, se centrifugó el tubo a 4,400 rpm durante 5 min a 4°C, se lavó la pastilla con PBS 1X y se resuspendió en 2 mL de glicina 50mM pH 2.0. Se mezcló con el aparato Vórtex durante 1 min a velocidad baja, se centrifugó a 4,400 rpm durante 3 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Se agregó 1/4 de volumen de Tris 0.5 M pH 8.5. Se colocó una membrana para diálisis en la boca del tubo y se dejó sumergido en PBS 1X durante una noche a 4°C. Se concentró el anticuerpo transfiriendo la solución a un tubo concentrador con membrana de celulosa de la marca *Merck Millipore* (Cat. MRCPRT010) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 hora a 4°C. Finalmente se agregaron 10 µL de NaN₃ al 0.5% por cada 1 mL.

4.11 Inducción de la mayehuelina recombinante en *S. cerevisiae*.

Durante una noche se crecieron cultivos de 10 mL, sembrados a partir de una colonia de cada cepa transformada, ya sea con el vector pYES-DEST52, pYES-DEST52-*Mayehuelina* o con pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His*, en medio SD Ura⁻ 2% (Anexo) a 25°C y se agitaron con el carrusel. Al día siguiente, se diluyeron los cultivos en 90 mL de medio fresco para alcanzar una D.O.₆₀₀ ≈ 0.05 y se dejaron crecer hasta la fase logarítmica (D.O.₆₀₀ ≈ 0.4 - 0.5) a 25°C con agitación de 130 rpm. Cada uno de los cultivos se dividió en 8 tubos *Falcon* de 15 mL y se centrifugaron durante 2 min a 4,000 rpm a 4°C. Se lavaron las pastillas con 1 mL de H₂O destilada estéril y se transfirieron a tubos *Eppendorf* de 2 mL. Se centrifugó nuevamente durante 1 min a máxima velocidad a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se juntaron las pastillas de un mismo cultivo en 1 mL de medio inductor SGal Ura⁻ 2 % (galactosa) (Anexo) y se añadió a un matraz *Erlenmeyer*

con 89 mL del mismo medio. Se midió nuevamente la D.O.₆₀₀ de cada cultivo asegurando que tuviera un valor similar a su última medición y se dejaron crecer durante 24 horas a 25°C con agitación de 130 rpm. Durante el desarrollo de estos cultivos se tomaron alícuotas de 10 mL cada una a los tiempos 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 horas. Las muestras se centrifugaron durante 2 min a 4,000 rpm a 4°C. Se lavaron con 1 mL de H₂O destilada estéril y se transfirieron a tubos *Eppendorf* de 2 mL. Se centrifugaron durante 1 min a máxima velocidad y se desechó el sobrenadante. Las pastillas se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron en el congelador a -70°C. Como control negativo se realizó el mismo protocolo. Sin embargo, se intercambié el medio inductor SGal Ura⁻ 2% por medio SD Ura⁻ 2% (Anexo). Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.12 Extracción de proteínas totales de *S. cerevisiae*.

Para esto, se siguió el método descrito por Hovarth y Riezman (Hovarth y Riezman, 1994). Las pastillas obtenidas de la inducción se resuspendieron en 100 µL de Laemmli 1X (Anexo). Se agitaron durante 0.5 min en el aparato Vórtex a máxima velocidad y posteriormente se calentaron a 95°C en el *Thermomixer R* de *Eppendorf*, durante 5 min, a 500 rpm. Se centrifugaron las muestras a 13,000 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente y se recuperaron sus sobrenadantes que contenían las proteínas disueltas.

4.13 Cuantificación de proteínas de *S. cerevisiae*.

Se siguió una modificación del Dr. Lledías al protocolo de micro ensayo descrito en la hoja técnica para el *Bradford Reagent* de *Sigma-Aldrich* (Cat. B6916). Se colocaron 2 µL de muestra y se llevaron a un volumen de 800 µL con H₂O destilada. Se adicionaron 200 µL de la solución de *Bradford* y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Se calibró la curva patrón con 0, 2, 5, 10, 15 y 20 µg de BSA de *New England Biolabs* (Cat. B9001S). Se realizaron 3 réplicas por muestra y se midió la absorbancia a 595 nm.

4.14 Evaluación de la integridad de las proteínas de *S. cerevisiae*.

Para confirmar la integridad de las proteínas de los extractos obtenidos se realizó una electroforesis SDS-PAGE con un gel separador al 12% (Anexo, gel separador A) y gel concentrador al 4% (Anexo, gel concentrador A). Se cargaron muestras de 30 µg de proteína total con el buffer de Laemmli 1X (Anexo) en un volumen final de 20 µL y se hirvieron a 95°C durante 5 min. Como marcador de peso molecular se utilizó la mezcla *All blue standards* de *Bio-Rad* (cat. 161-0373). Se separaron las proteínas con 200 V constantes durante 1.5 horas en la cámara SE 250 *Mighty Small II Mini Vertical Electrophoresis Unit* de *Hoefler* en el buffer de corrida (Anexo, buffer de corrida A). El gel fue sumergido en H₂O destilada, se calentó en un horno de microondas durante 25 segundos a potencia máxima (1.6 kW) y se dejó incubando 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el agua y se sumergió en solución de Coomassie al 0.2% (Anexo), se calentó durante 25 segundos en el horno de microondas a potencia máxima y se incubó durante 50 min a temperatura ambiente. Se retiró el colorante y se lavó con H₂O destilada durante 15 min, calentando el gel en el microondas durante 25 segundos a potencia máxima cada vez, hasta que las bandas de las proteínas fuesen perfectamente visibles.

4.15 Inmunodetección de la mayahuelina.

Se realizó un *western blot* con los extractos de proteínas de las cepas transformadas e inducidas. Como control positivo se utilizaron 20 µg de un extracto de proteínas totales de cogollo de *A. tequilana*. Se cargaron muestras de 60 µg de proteínas totales con buffer de Laemmli 1X (Anexo) en un volumen final de 20 µL y se hirvieron a 95°C durante 5 min. Las proteínas se separaron mediante electroforesis SDS-PAGE con las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, el gel se sumergió durante 15 min en buffer de transferencia (Anexo). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa *Hybond-C Extra* de *Amersham Biosciences*, previamente remojadas en H₂O destilada estéril y reactivadas durante 10 min en buffer de transferencia, usando el equipo *TransBlot Cell* de *Biorad* durante 2 horas a 380 mA constantes. La membrana se

bloqueó durante toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo (Anexo). Al día siguiente, se retiró la membrana y se incubó 1.5 horas con el anticuerpo primario de conejo (anti-mayehuelina) diluido 1:5000 en la solución de bloqueo (Anexo); concluido el tiempo se lavó 6 veces con TBST 1X (Anexo). Posteriormente, la membrana se incubó 1.5 horas con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejeor *IgG-HRP* de *Santa Cruz Biotechnology* (cat. SC-2004) diluido 1:5000 en la solución de bloqueo; al final de este lapso se lavó nuevamente 6 veces con TBST 1X. La membrana se reveló con el *kit Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate* de *Thermoscientific* (cat. 34080). Se diluyeron los sustratos 1:5 con H₂O destilada estéril y luego se mezclaron en partes iguales. La membrana se sumergió durante 5 min en esa mezcla, asegurando el contacto con las proteínas. Se retiró la membrana, se eliminó el exceso de sustrato y se colocó entre dos hojas de acetato dentro de un *cassette* para autoradiografía FBXC810 de *Fisher Scientific*. La membrana se expuso durante 2 min a una película de rayos X (*Medical X-ray General Purpose Blue*, de *Kodak*, cat. 822 5526) dentro de un cuarto oscuro con luz roja de seguridad. Posteriormente la película se sumergió en la solución reveladora *GBX developer and replenisher* de *Kodak* (cat. 190 0984) diluido 1:5 durante 1 min, se lavó 30 segundos en agua de la llave y se transfirió a la solución fijadora *GBX fixer and replenisher* de *Kodak* (cat. 190 2485) diluido 1:5 durante 1 min. Finalmente, la película se lavó con agua corriente y se dejó secar durante 5 min.

4.16 Optimización de los ensayos de termotolerancia.

La optimización se llevó a cabo con la cepa pYES-DEST52, que contiene el vector de expresión vacío, con el objeto de obtener valores de termotolerancia (basal o inducida) cercanos al 1 % de sobrevivencia que permitiesen observar efectos hasta 100 veces mayores o menores al control (entre 0.01 y 100 % de sobrevivencia) debidos a la expresión de la mayehuelina en las transformantes con las construcciones experimentales (pYES-DEST52-*Mayehuelina* y pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His*).

Se sembró una colonia de pYES-DEST52 en 10 mL de medio SD Ura⁻ 2% y se cultivó toda la noche a 25°C con agitación por carrusel. Posteriormente, el cultivo se diluyó en 75 mL de medio fresco para alcanzar una D.O.₆₀₀ ≈ 0.05 y se dejó crecer hasta la fase logarítmica (D.O.₆₀₀ ≈ 0.4 - 0.5) a 25°C con agitación de 130 rpm. El cultivo se dividió en 8 tubos *Falcon* de 15 mL y se centrifugaron durante 2 min a 4,000 rpm a 4°C. Se lavaron las pastillas con 1 mL de H₂O destilada estéril y se transfirieron a tubos *Eppendorf* de 2 mL. Se centrifugaron nuevamente durante 1 min a máxima velocidad a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se juntaron las pastillas del cultivo en 1 mL de medio inductor SGal Ura⁻ 2% (galactosa) (Anexo) y se añadió a un matraz *Erlenmeyer* con 74 mL del mismo medio. Se incubó durante 16 horas a 25°C a 130 rpm.

El volumen total del cultivo (≈ 75 mL) se dividió en matraces *Erlenmeyer* previamente calentados en baño maría a 50 y 37°C con volumen final de 25 mL cada uno. En el caso de la termotolerancia basal (matraces precalentados a 50°C), las células se incubaron durante 10, 20, 30, 40, 50 y 60 min a 130 rpm en esta temperatura. Para la termotolerancia inducida (matraces precalentados a 37°C), las células se incubaron durante 30 min en esta temperatura a 130 rpm e inmediatamente después se cambiaron a 50°C durante 30, 40, 50, 60, 70 y 80 min a 130 rpm. Para el tratamiento control, las células se mantuvieron en el matraz original a 25°C durante 30 min (después de dividir el volumen) a 130 rpm. Se colectó una alícuota de 1 mL de cada tratamiento en los diferentes tiempos. Cada 1 mL se diluyó 6 veces de manera seriada en una proporción 1:10 y se sembraron 50 µL de cada dilución en una caja Petri con medio sólido SD Ura⁻ 2%. Las alícuotas se dispersaron con perlas de vidrio. Las cajas se incubaron a 30°C durante 3 días hasta que se visualizaron colonias. De acuerdo con Zdor (Zdor, 2016) se contó el número de colonias por caja y se consideraron sólo aquellas que tuvieran entre 30 y 300 colonias para calcular las unidades formadoras de colonia (CFUs, por sus siglas en inglés) por mL utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{CFUs}{mL} = \frac{\text{Colonias en placa}}{\text{Volumen plaqueado (mL)}} \times \text{Factor de dilución}$$

Cabe destacar que el factor de dilución debe corresponder a la placa contada. Por ejemplo, si se inocularon 50 μL en una placa con factor de dilución 10^4 y se contaron 96 colonias, el número original de CFUs/mL es igual a 1.92×10^7 .

$$\frac{\text{CFUs}}{\text{mL}} = \frac{96}{0.05 \text{ mL}} \times 10^4 = 1.92 \times 10^7$$

Si existían 2 o más placas con un número de colonias dentro del intervalo, se calcularon el número de CFUs/mL de cada placa y se obtuvo un promedio.

En el caso de la termotolerancia basal, se observó que la transformante pYES-DEST52 alcanza el 1% de sobrevivencia cuando el choque de calor dura 30 min. Y, en el caso de la termotolerancia inducida, esto se observó 60 min después del choque de calor a 50°C .

4.17 Ensayos de termotolerancia de las transformantes.

Siguiendo las condiciones de la optimización (punto 4.16), se sembraron colonias de las transformantes pYES-DEST52-*Mayehuelina*, pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* y pYES-DEST52. Se siguieron los mismos pasos hasta la incubación a 25°C durante 16 horas a 130 rpm en el medio de inducción SGal Ura^r 2%.

Para evaluar la sobrevivencia de las células, se realizaron tres tratamientos: termotolerancia inducida, termotolerancia basal y tratamiento control. El volumen total de cada cultivo ($\approx 75 \text{ mL}$) se dividió en matraces *Erlenmeyer* previamente calentados en baño María a 50°C y 37°C con volumen final de 25 mL cada uno. En el caso de la termotolerancia basal (matraces precalentados a 50°C), las células se incubaron durante 30 min a 130 rpm en esta temperatura. Para la termotolerancia inducida (matraces precalentados a 37°C), las células se incubaron durante 30 min en esta temperatura a 130 rpm e inmediatamente después se cambiaron a 50°C durante 60 min a 130 rpm. Para el tratamiento control, las células se mantuvieron en el matraz original a 25°C durante 30 min (después de dividir el volumen) a 130 rpm. Al terminar los tratamientos, se colectaron 1 mL de cada cultivo y se diluyeron 6 veces de manera seriada en una

proporción 1:10 cada vez. Posteriormente, se tomaron 50 μ L de cada dilución y se sembraron en una caja Petri con medio sólido SD Ura⁻ 2% (Cuadro 3). La prueba se realizó por triplicado. Se realizó otro triplicado del ensayo descrito anteriormente; sin embargo, se sustituyó el medio inductor SGal Ura⁻ 2% por medio mínimo SD Ura⁻ 2% para reprimir al promotor *GAL-1* del plásmido y, por lo tanto, la síntesis de las dos versiones de la mayehuelina.

Cuadro 3. Diluciones por tratamiento sembradas en caja Petri (50 μ L).

| Tratamiento | Diluciones sembradas | | | | | |
|----------------|----------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | 10 ⁻⁴ | 10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁶ |
| Control (25°C) | X | X | X | X | X | X |
| T. Inducida | X | X | X | X | X | X |
| T. basal | X | X | X | | | |

4.18 Análisis estadísticos. Se realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y de Kolmogorov-Smirnov a las CFUs de cada cepa transformada utilizando el programa *SPSS Statistics* versión 21 de *IBM*. Posteriormente, para observar la diferencia entre la media de las 3 transformantes, se realizaron análisis de varianza (ANOVA, por sus siglas en inglés) de una vía utilizando el programa *GraphPad Prism* versión 5 de *GraphPad Software*, donde el factor es el tipo de transformante que cuenta con 3 niveles (pYES-DEST52, pYES-DEST52-*Mayehuelina* y pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His*). Debido a un error en la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*, se descartó y se realizó una *t de student* de dos colas y muestras independientes para analizar la diferencia entre la media de pYES-DEST52 y pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* en cada tratamiento (control, termotolerancia basal y termotolerancia inducida); también se realizó la prueba *post hoc* de Tukey y se graficaron los datos.

5.0 RESULTADOS:

5.1 Aislamiento y transformación de la cepa W303-1a con las construcciones pYES-DEST52-*Mayehuelina* o pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His.

Antes de realizar la transformación, primero se verificaron las auxotrofías de la cepa W303-1a de *S. cerevisiae*. Las colonias inoculadas en medio mínimo SD + suplementos crecieron (Figura 6). Sin embargo, no lo hicieron en los medios carentes de un nutrimento esencial, tal como era de esperarse para esta cepa con el genotipo *MATa can1-100, 112 trp1-1, ura3-1, ade2-1, his3-11, 15 leu2-3* (Folch-Mallol *et al.*, 2004).

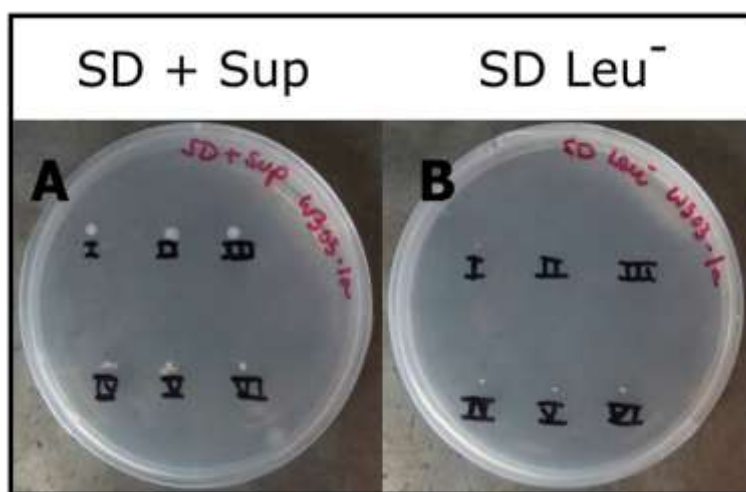


Figura 6. Crecimiento de la cepa W303-1a de *S. cerevisiae*. A) Medio sólido con todos los requerimientos nutricionales [SD + Sup]. B) Ejemplo de un medio carente del nutrimento leucina [SD Leu⁻]. Los números romanos identifican a la colonia original de donde fueron sembradas.

También se verificó la calidad y cantidad del ADN de los plásmidos pYES-DEST52-*Mayehuelina* y pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His obtenidos por Reyes (Reyes, 2014). El peso esperado es ~6,635 pb y para cada clona se observaron entre 3 y 4 bandas con pesos moleculares aproximados entre 4 y >10 kb (Figura 7). Comparando la intensidad de las bandas de los plásmidos con los estándares de ADN usados, se determinó su concentración en los tubos originales (Figura 7 y Tabla S1). Para confirmar la inserción del gen *Mayehuelina* en los plásmidos, se amplificó por medio de PCR con los oligonucleótidos F2 y R3 observándose los productos esperados con un peso de 735 pb (Figura 8).

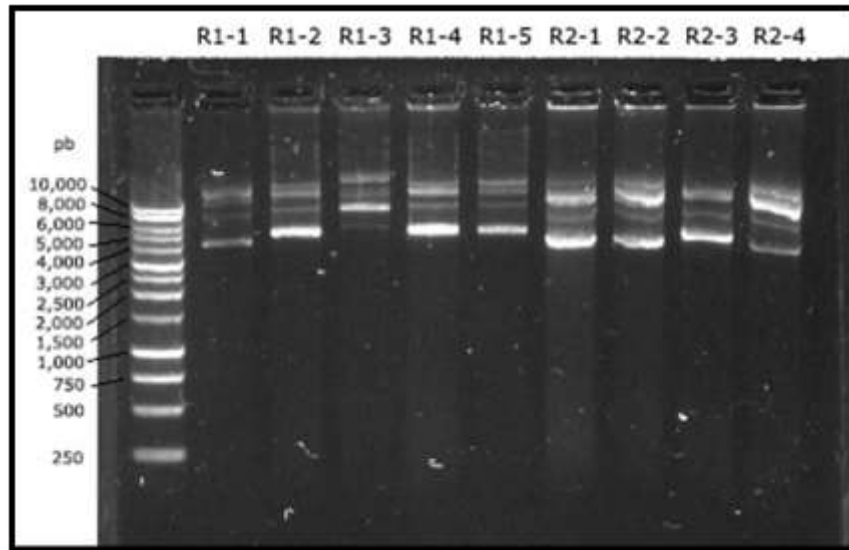


Figura 7. Cuantificación del ADN de las clonas del gen *Mayehuelina* insertado en los vectores Gateway. Los carriles precedidos por R1 muestran las clonas de la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*. Los carriles precedidos por R2 muestran clonas de la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His. El peso hipotético de ambas construcciones es 6,635 pb.

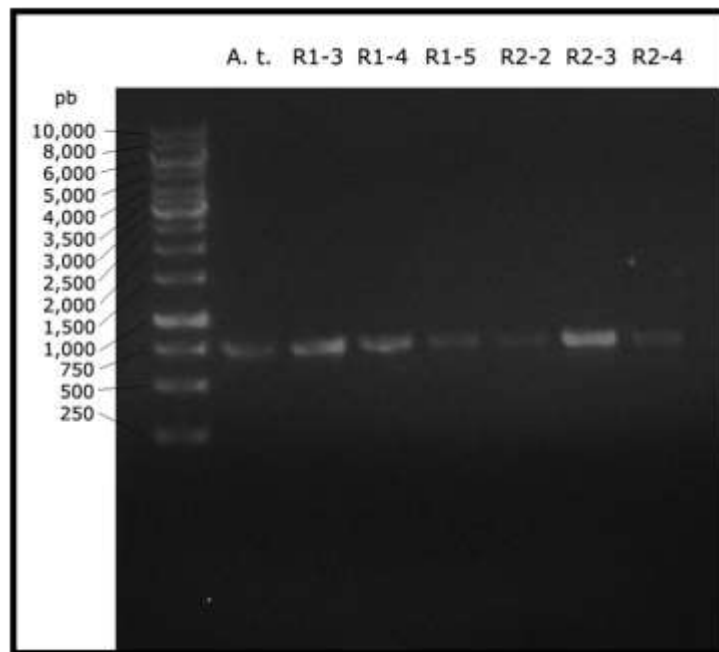


Figura 8. Amplificación por PCR de las dos construcciones clonadas de *Mayehuelina*. Carril A.t., muestra el control positivo con ADN genómico de *A. tequilana*; los carriles R1 corresponden a las clonas con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*; los carriles R2 corresponden a las clonas con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His.

Una vez verificadas y confirmadas la autenticidad de la cepa y plásmidos utilizados en este trabajo, se procedió a transformar la cepa W303-1a. Se obtuvieron colonias transformadas capaces de crecer en medio SD Ura⁻ (Figura 9), resultado esperado, ya que el plásmido pYES-DEST52 complementó la auxotrofia de la cepa W303-1a con el gen *URA3* (Materiales y Métodos).

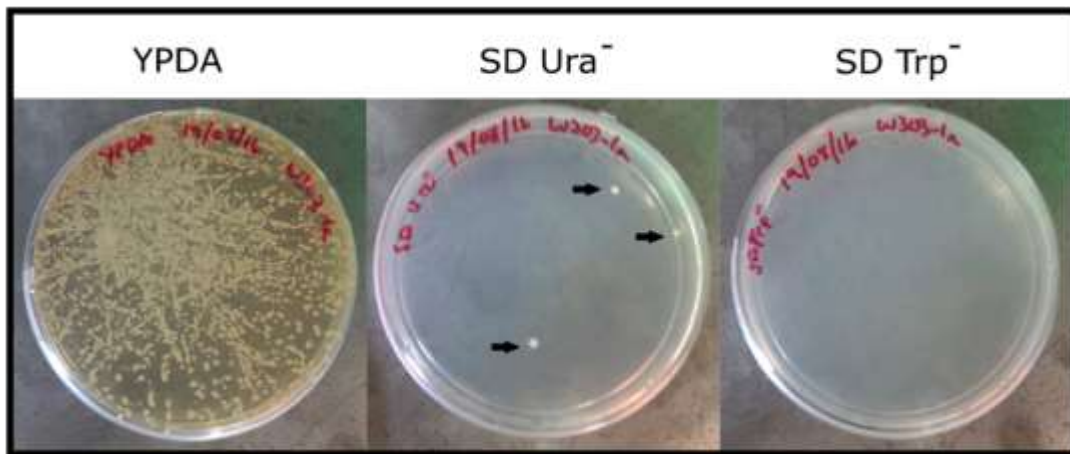


Figura 9. Transformación de la cepa W303-1a de *S. cerevisiae*. Se muestra el crecimiento de las transformantes con el plásmido pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His en el medio enriquecido [YPDA], como control positivo, en medio sin uracilo [SD Ura⁻] y en medio sin triptófano [SD Trp⁻], como control negativo.

Para la transformación se utilizó como control positivo de viabilidad el medio YPDA, observándose un gran número de colonias. Como control negativo se usó el medio SD Trp⁻, donde no se observaron colonias (Figura 9). Posteriormente, se extrajo el ADN de las cepas transformantes pYES-DEST52, pYES-DEST52-*Mayehuelina* y pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His observándose dos bandas (datos no mostrados). Para evaluar si el gen *Mayehuelina* estaba inserto en el ADN mencionado, se amplificó por medio de PCR. Únicamente las cepas transformadas con los clones de *Mayehuelina* amplificaron una banda de 735 pb correspondiente al gen *Mayehuelina*, mientras que la transformante con el plásmido vacío no amplificó este fragmento (Figura 10).

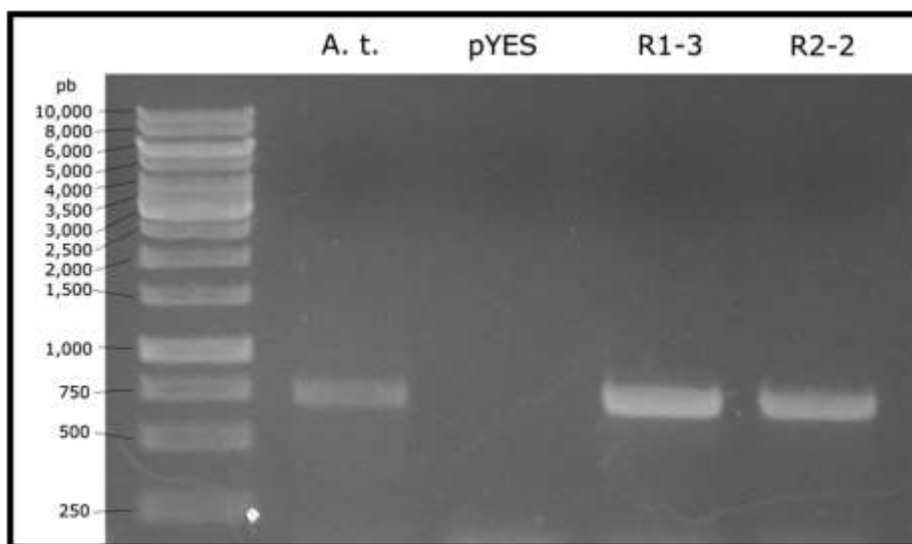


Figura 10. Amplificación del gen *Mayehuelina* a partir del plásmido extraído de levaduras transformadas. A.t., control positivo con ADN de *A. tequilana*; pYES, *S. cerevisiae* transformada con el plásmido vacío; R1-3, *S. cerevisiae* transformada con pYES-DEST52-*Mayehuelina*; R2-2, *S. cerevisiae* transformada con pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His.

5.2 Extracción de proteínas de *A. tequilana* en forma nativa y desnaturalizada y purificación de anticuerpo anti-mayehuelina a partir de suero de conejo inmunizado.

Para inducir las dos versiones de mayehuelina en *S. cerevisiae*, y luego realizar su inmunodetección, era necesario contar con el anticuerpo primario (anti-mayehuelina) y una muestra de proteínas totales de *A. tequilana* como control positivo. Por lo tanto, se realizaron extractos de proteínas totales a partir de cogollos de *A. tequilana* (Materiales y métodos) y se purificó el anticuerpo primario (Materiales y métodos) inducido anteriormente en suero de conejo (Lledías-Martínez F. y Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados). La extracción de proteínas en condiciones desnaturalizantes rindió en promedio 15.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla S2), mientras que la extracción de proteínas en condiciones no desnaturalizantes rindió en promedio 19 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Tabla S3). Es posible que la menor cantidad de proteína extraída en condiciones desnaturalizantes se deba a que el protocolo tiene un mayor número de pasos y se pueda ir perdiendo muestra en cada lavado. La integridad de las proteínas en ambos extractos se confirmó mediante electroforesis. Para el caso de las proteínas nativas, se observaron principalmente

tres bandas en el gel separador siendo la banda más prominente la mayehuelina (Figura 11a), como ya se había observado anteriormente (Lledías-Martínez F., Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados). Para el caso de las proteínas desnaturalizadas, se observó a la mayehuelina como la banda más prominente, migrando cerca del marcador molecular de 25 kDa (Figura 11b), confirmando lo anteriormente visto (Lledías-Martínez F., Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados). Por otro lado, la purificación del anticuerpo anti-mayehuelina rindió en promedio 65.4 µg/mL (Tabla S4).

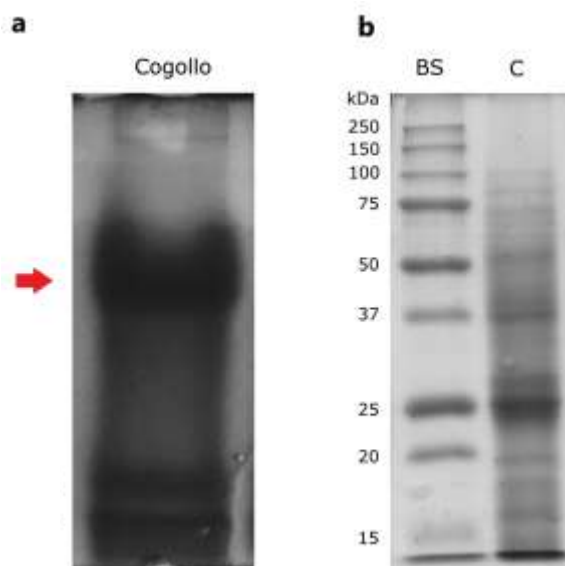


Figura 11. Proteínas del cogollo de *A. tequilana*. a) Electroforesis de proteínas en condiciones nativas; la flecha señala a la banda prominente de mayehuelina. b) Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes con el marcador molecular (BS) *Precision Plus Protein All Blue Standards* de Biorad.

5.3 Inducción e inmunodetección de la pYES-DEST52-*Mayehuelina* y de pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5:His en células de *S. cerevisiae*.

Ya contando con los elementos necesarios, se realizó la inducción e inmunodetección de las dos versiones de mayehuelina para evaluar si las transformantes contenían el gen *Mayehuelina* y a la vez sintetizaban la proteína codificada.

A lo largo de la inducción, se midieron las D.O.₆₀₀. El crecimiento de las transformantes durante las primeras 12 horas fue lento (Figura 12), similar a una

fase lag. Después de esa hora, el crecimiento se elevó considerablemente (Figura 12), similar a una fase exponencial. Al concluir las 24 horas las transformantes alcanzaron un $D.O._{600} \approx 2.0$, la máxima observada durante la inducción (Figura 12). Es importante destacar que el crecimiento no varió significativamente entre las transformantes ($p = 0.97$).

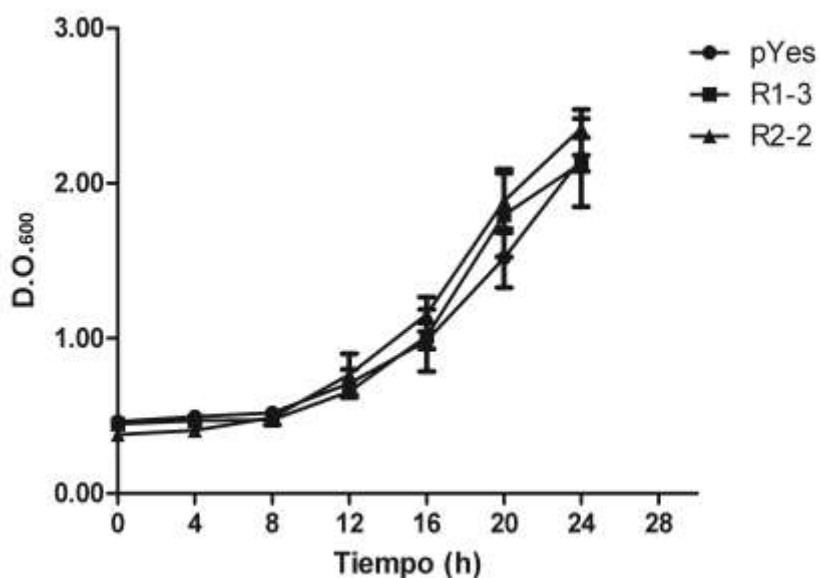


Figura 12. Curva de crecimiento de las transformantes con el plásmido vacío [pYES] o con las construcciones pYES-DEST52-*Mayehuelina* [R1-3] y pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His [R2-2] durante la inducción en el medio con galactosa (SGal).

Debido a que los extractos de proteínas totales de *A. tequilana* mostraron una banda prominente de mayehuelina teñida con azul de Coomassie al separarse por electroforesis, se analizó si las proteínas recombinantes también serían visibles en los extractos de proteínas totales de las levaduras transformadas. Sin embargo, no se observó ninguna banda prominente en la zona correspondiente al peso de la mayehuelina en ninguna de sus dos versiones a lo largo del tiempo de la inducción, ni diferencias entre la electroforesis de las transformantes que contenían alguna versión de la mayehuelina y la transformante con el plásmido vacío (Figura S1). Probablemente, esto se deba a que *S. cerevisiae* tiene un bajo nivel de expresión de proteínas recombinantes (Jayaraj, y Smooker, 2009)

La cuantificación de la mayehuelina en los extractos de las transformantes por medio de *western blot* reveló que la expresión de la mayehuelina::V5::His comenzó a las 12 horas. Sin embargo, la mayor acumulación de esta proteína ocurrió a las 20 horas (Figura 13a y Figura S2), lo cual coincide con la etapa de mayor crecimiento en la inducción (Figura 12). La cantidad de mayehuelina recombinante fue muy baja, puesto que se necesitaron 60 µg de proteína total, cantidad mayor a la requerida en cogollos de *A. tequilana*, en los cuales 20 µg de proteína total son suficientes para detectar mayehuelina en grandes cantidades (Figura 13a). En contraste, no se detectó mayehuelina en la transformante con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina* (Figura 13b). Como era de esperarse, tampoco se detectó a la mayehuelina en el control negativo (la transformante pYES-DEST52) (Figura 13a).

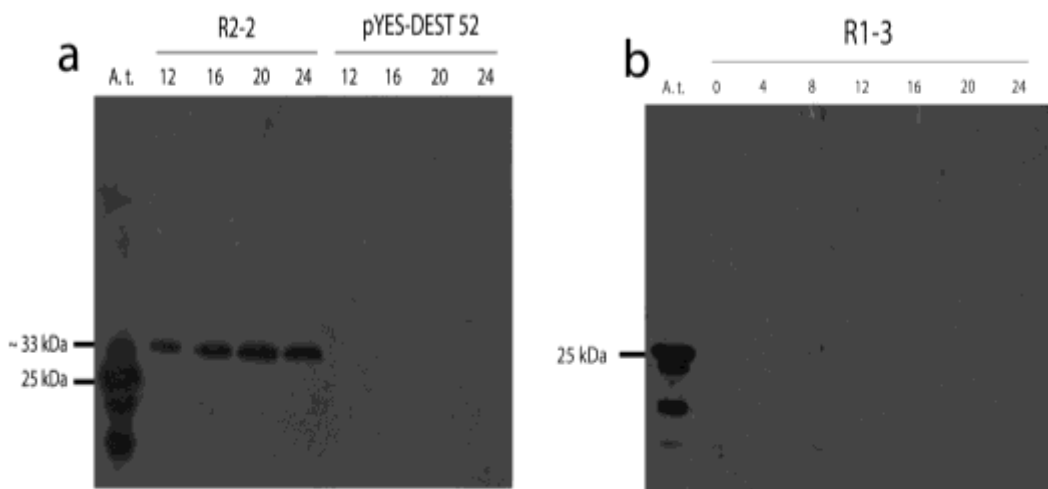


Figura 13. Inmunodetección de la mayehuelina en cepas de *S. cerevisiae* transformadas con el gen *Mayehuelina*. En ambos geles, A.t. muestra el extracto de proteínas de *A. tequilana* usado como control positivo. a) Carriles R2-2, análisis del extracto de proteínas de la cepa transformada con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His; carriles pYES-DEST-52, análisis del extracto de proteínas de la cepa transformada con el plásmido vacío. En ambos casos se muestran alícuotas tomadas a las 12, 16, 20 y 24 hrs de inducción con galactosa. b) Carriles R1-3, análisis del extracto de proteínas de la cepa transformada con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*. Se muestran alícuotas tomadas a las 0, 4, 8, 12, 16, 20 y 24 hrs de inducción con galactosa.

5.4 Re-secuenciación de la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*

Debido a que no se logró detectar a la mayehuelina recombinante en el *western blot* de células transformadas con pYES-DEST52-*Mayehuelina*, los insertos de los plásmidos recibidos de Reyes (Reyes, 2014) fueron secuenciados. Los resultados obtenidos con el oligonucleótido T7 mostraron que la secuencia de la clona R1-3 (con la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina*) presentó muchas discrepancias, que impidieron su alineación correcta con *Mayehuelina* silvestre de *A. tequilana* (Figura 14).

```

>Mayehuelina (A. tequilana)
>R1-3

-----
-----ATACAAAA-----TACATTATGTATTTTAAATCTGA
          I Q K          Y I M Y F N L
          Y K N          T L C I L I *
          T K I          H Y V F * S D

--GTGAAATTTGAGGTCAACCTCGATGTACGAACGCTAGACGCTGCAGGTTACAGACCTTC
CCGAGAATGGTATGATGCATATGCATATCTTGATATTAAATGCT--ATTTTATAAAG----

  V K F E V N L D V R T L D A A G Y R A F
T E N G M M H M H I L I L N A I L * R
P R M V * C I C I S * Y * M L F Y K E
  R E W Y D A Y A Y L D I K C Y F I K K

CAGGACGATCTCCGAAAAGGTTGGCAGACAAGTACATAGGACCTGCAGGCAACAATGTTGC
-----AAAACTTT-----GTACATAATA-CTGGAAAAACAACG----

  Q D D L R K R L A D K Y I G P A G N N V A
          K L          C T * Y W K K Q R
          N F          V H N T G K N N V
          T L          Y I I L E K T T Y

GGTGCTGCCCCACGACAACGAAGGAGCCCCGCAATGG-----TTCGACCTGAGACTAACAGG
-----TATCCTGTCACTATGGCGG-----CCGCATTAAGTACCCTTGCTTTACACTTTAAGC

  V L P H D N E G A P Q W          F D L R L T G
  I L S L W R          P H * V P F A L H F K
  S C H Y G G          R I K Y P L L Y T L S
  P V T M A A          A L S T L C F T L * A

CGCCGAGGAGCACAGACCACAGTGAGGTTTCGCGTCGGCAACC-TCGACGTGGTCGGTTAT
TTCCG-----GCTCGTATAATGTGTGGATTTTGAGTTCTAATCCGTCATAT-----TTTC

  A G G A Q T T V R F R V G N L D V V G Y
L P          A R I M C G F * V L I R P Y          F
  F R          L V * C V D F E F * S V H I          F
  S G          S Y N V W I L S S N P S I F          S

```

CAGATGGGGACGACCTGGTACG-----AGTTCGGGAAAAACGGCGACAAGCAATGGATT
TGGATGTGTATAAGCTAAAATGGAGAAAAAATCCTGGATATA---CCACCGTTGATATATC

Q M G T T W Y E F G K N G D K Q W I
L D V Y K L K W R K K S W I Y H R * Y I
W M C I S * N G E K N P G Y T T V D I S
G C V * A K M E K K I L D I P P L I Y

CC-----CAACTCTCAG-----TTCTTGGGCTTCAGAGGCGACT----
CCAATGGCATCTTTCAGAACATTTTAAATCATTTCATCTGCTCAATGTACCACCAAC

P N S Q F L G F R G D
P M A S F R T F * I I S F I C S M Y H Q P
Q W H L S E H F K S F H S S A Q C T T N
P N G I F Q N I L N H F I H L L N V P P T

--ACGGGGC-ACTGGCAAACGCAG-----CAGGCAAGAAAGTGACGGAGATAAA
CAACGGTTCAACTGGAGATCACCGCCTTTTTACTTACCGCACAGAAAAGTACC---CACAA

Y G A L A N A A G K K V T E I N
N G S T G D H R L F T Y R T E K Y P Q
P T V Q L E I T A F L L T A Q K S T H K
Q R F N W R S P P F Y L P H R K V P T S

CCTTAATGTATACGGTTTCGAAGCA-----GCTG-TGAAAAC-----ACTC
TTT-----TATCCGGCCTTTACTCACATTCTTGCCCGACTGATGAAGGCTCATCCGGAATC

L N V Y G F E A A V K T L
V L S G L Y S H S C P T D E G S S G I
F Y P A F T H I L A R L M K A H P E F
F I R P L L T F L P D * * R L I R N S

GCCACGTCCACAAAAGG----CAACGAGGGGGCAGAGGCACTGATAGTCGTGGCTCAGTTGG
CTCATGGCAATGAAAGAGTCTGAACTGGTGATATGGAATACTGTTACCCTTGTTACACCGT

A T S T K G N E G A E A L I V V A Q L
P H G N E R V * T G D M E Y C S P L L H R
L M A M K E S E L V I W N T V H P C Y T V
S W Q * K S L N W * Y G I L F T L V T P

TCTCC----GAAGCCTGCAGATTCCATC-----CTCTCCAAC
CTTCCATGAACAACTGAAACGTTTTCATCGCTTGGAGTGAATACCACGACGATTCCGGC

V S E A C R F L I L S N
L P * T N * N V F I A L E * I P R R F P A
F H E Q T E T F S S L W S E Y H D D F R
S S M N K L K R F H R F G V N T T T I S G

GCTCTCTCAAC-----CAGGATA-----AACGACCCAACGCCTCTCTATCTCAAGC
AGTTTCTACACATATATTCGCAAGATGTGGCGTGTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCA-

A L S T R I N D P T P L Y L K
V S T H I F A R C G V L R * K P G L F P
Q F L H I Y S Q D V A C Y G E N L A Y F H
S F Y T Y I R K M W R V T V K T W P I S I

AATGGATGCTGGATGATCTAGAGAGGGAATGGGGGACGTA-----CTCTG-----
-----TAGTTGGTTTATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGTATGAGT

Q W M L D D L E R E W G T Y S
* L V Y * E Y V F R L S Q S L Y E
S W F I E N M F F V S A N P C M S
V G L L R I C F S S Q P I P V * V

```

-----AGATTTTG-----ATGTGCTACAATA-----ACTTTCCCGGCACTTACAAC
TTCACAGATTTTGGACATCATACGTGCCCTAGTATGGACTGACTATCTTCTCCCCCTC----

      E I L           M C Y N           N F P G T Y N
F H R F * H H T C P S M D * L S S P P S
F T D F D I I R A L V W T D Y L L P P L
S Q I L T S Y V P * Y G L T I F S P L F
TTCCCAAACCGAT-CATAAACCAAAATGTAATCGCGACGGCTAACGAACTGCGCAAAATAC
TTTCTCATCACTGGTACATACTACTGACT---ATCGCTAGGGCTGACACGTTGTCTGACTGT

      F P K P I   I N Q N V   I A T A N E L R K I
      F S S L V H T T D     Y R * G * H V V * L
      S H H W Y I L L T     I A R A D T L S D C
      L I T G T Y Y * L     S L G L T R C L T V

TT-----GGTATCC-TGCTCAA-CGTTGAA-----GTTAACTACAAA-----
ACGTCCTGGGCGTATCCATGATCAGTCATTGACTGTCCTTGATGACTGCATTACATCGTTCGG

L       G I L L N V E           V N Y K
Y V W A Y P * S V I D C P * * L H Y I V R
T S G R I H D Q S L T V L D D C I T S F G
R L G V S M I S H * L S L M T A L H R S

-----
GCGCAAGAAATACGTTAATATCATAATAC

      A Q E I R * Y H N
      R K K Y V N I I I
      G A R N T L I S * Y

```

Figura 14. Alineación de la secuencia de DNA de la clona R1-3 (azul) con la secuencia de mayehuelina madura de *A. tequilana* (negro) y sus respectivas secuencias de aminoácidos. En el caso de la clona R1-3, se muestran los diferentes marcos de lectura.

5.5 Efectos de la mayehuelina y de la fusión *Mayehuelina::V5:His* sobre la termotolerancia basal e inducida de *S. cerevisiae*.

Con base en la inmunodetección de la mayehuelina, se estableció que a las 16 horas era el mejor momento para concluir su inducción antes de someter las células a los ensayos de termotolerancia, ya que después de las 20 horas la acumulación de mayehuelina disminuyó (Figura 13a y Figura S2).

En el caso de los cultivos control mantenidos a 25°C durante 30 min post-inducción con galactosa, no se observaron diferencias significativas ($p = 0.1996$) entre los promedios de CFUs/mL de las tres transformantes (Figura 15a).

En el caso de los cultivos sometidos a termotolerancia inducida, se observó una disminución drástica de los promedios de CFUs/mL relativo al control a 25°C (Figura 15b y Tabla 1). El análisis descriptivo indicó que el promedio de CFUs/mL

de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His aumentó 4.4 veces comparado con el promedio de la transformante pYES-DEST52 y, por lo tanto, también su porcentaje de termotolerancia inducida aumentó (Tabla 1). Sin embargo, el análisis estadístico no indicó diferencias significativas entre los promedios de CFUs/mL de este tratamiento ($p = 0.052$) (Figura 15b).

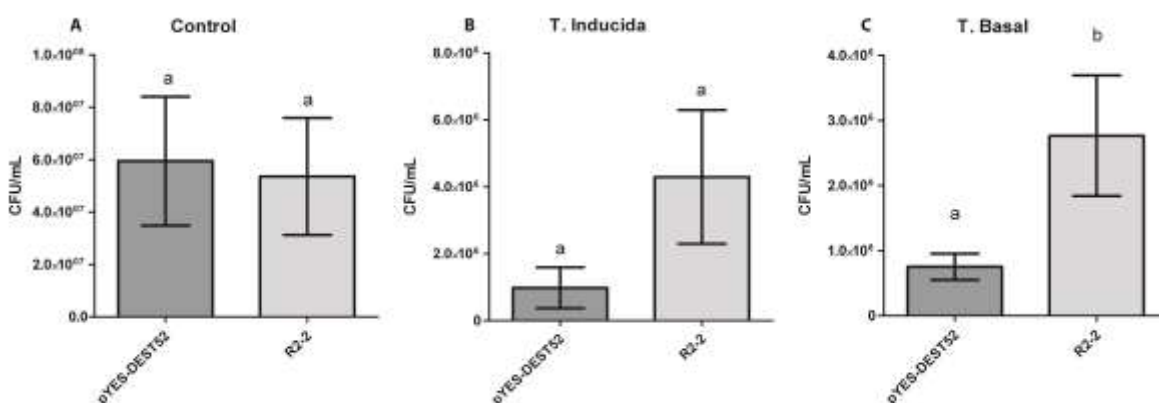


Figura 15. Evaluación de la termotolerancia de las transformantes con el plásmido control o con el gen *Mayehuelina*::V5::His después de ser inducidas en medio con galactosa. A) CFU de cultivos control sin choque de calor. B) CFU de cultivos con choque de calor a 37°C y posteriormente a 50°C [Termotolerancia Inducida]. C) CFU de cultivos con choque de calor directamente a 50°C [Termotolerancia Basal]. Las barras muestran el promedio ($n = 3$) con su desviación estándar. El análisis *t* de *student*, indica que la media de las barras con letras diferentes son significativamente diferentes.

Cuadro 4. Promedio de las unidades formadoras de colonia (CFUs) y de los porcentajes de termotolerancia de las transformantes inducidas con D-galactosa. Se muestran la transformante con el plásmido vacío [pYES-DEST52] y las construcciones pYES-DEST52-*Mayehuelina* [R1-3] y pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His [R2-2].

| Transformante | Tratamiento | n | CFUs/mL | Desviación estándar | Porcentaje | Aumento en las CFUs/mL | Aumento en el porcentaje |
|---------------|-------------|---|----------|---------------------|------------|------------------------|--------------------------|
| pYES-DEST52 | Control | 3 | 5.95E+07 | 2.46E+07 | 100.00 | | |
| | T. Inducida | 3 | 9.78E+05 | 6.09E+05 | 1.64 | | |
| | T. Basal | 3 | 7.52E+05 | 2.01E+05 | 1.26 | | |
| R2-2 | Control | 3 | 5.36E+07 | 2.23E+07 | 100.00 | | |
| | T. Inducida | 3 | 4.29E+06 | 2.00E+06 | 8.03 | 4.39 | 4.90 |
| | T. Basal | 3 | 2.77E+06 | 9.26E+05 | 5.17 | 3.68 | 4.11 |

Por último, en el caso de los cultivos sometidos a termotolerancia basal, también se observó una disminución de los promedios de CFUs/mL relativo a los cultivos mantenidos a 25°C (Figura 15c y Tabla 1). El análisis descriptivo indicó que el promedio de CFUs/mL de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His aumentó 3.7 veces respecto al promedio de la transformante con el plásmido vacío (Tabla 1). El análisis *t* de *student* confirmó que sí existen diferencias significativas entre las transformantes pYES-DEST52 y pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His ($p = 0.021$) ($F(2, 2) = 21.32$, $p = 0.09$) (Figura 15c).

Para confirmar si el efecto positivo significativo de la termotolerancia basal de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His se debía a la proteína recombinante inducida con galactosa, se realizaron los mismos ensayos sustituyendo la galactosa por dextrosa durante las 16 horas de inducción (Materiales y Métodos). En todos los tratamientos (temperatura control, termotolerancia inducida y basal) no hubo diferencias significativas entre el promedio de CFUs/mL de las transformantes ($p > 0.05$) (Figura 16 y Tabla 2).

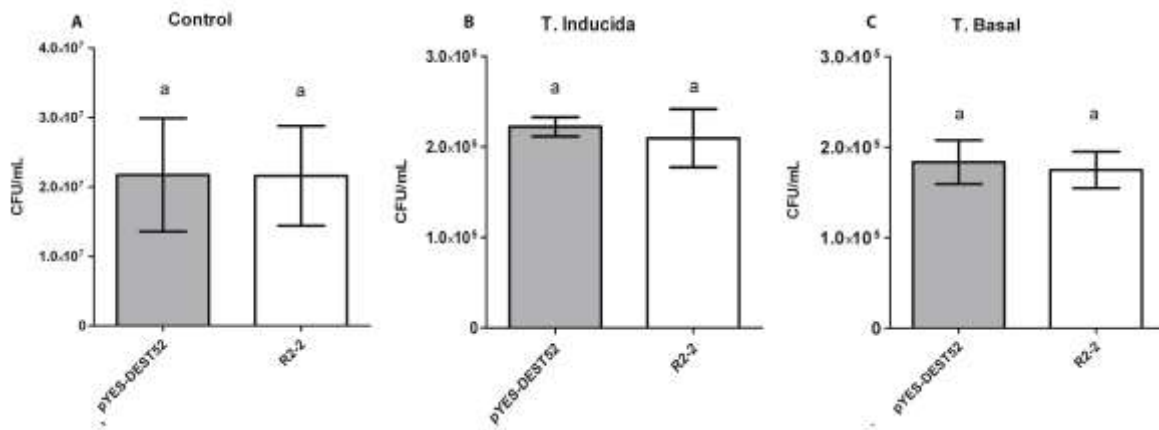


Figura 16. Evaluación de la termotolerancia de las transformantes con el plásmido control o con el gen *Mayehuelina*::V5::His incubadas en medio con dextrosa. A) CFU de cultivos control sin choque de calor. B) CFU de cultivos con choque de calor a 37°C y posteriormente a 50°C [Termotolerancia Inducida]. C) CFU de cultivos con choque de calor directamente a 50°C [Termotolerancia Basal]. Las barras muestran el promedio con su desviación estándar. Las barras con letras diferentes indican que las diferencias entre las muestras son estadísticamente significativas.

Cuadro 5. Promedio de las unidades formadoras de colonia (CFUs) y porcentajes de termotolerancia de las transformantes inducidas con Dextrosa. Se muestran la transformante con el plásmido vacío [pYES-DEST52] y las construcciones pYES-DEST52-*Mayehuelina* [R1-3] y pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* [R2-2].

| Transformante | Tratamiento | n | CFUs/mL | Desviación Estándar | Porcentaje | Aumento en las CFUs/mL | Aumento en el porcentaje |
|---------------|-------------|---|----------|---------------------|------------|------------------------|--------------------------|
| pYES-DEST52 | Control | 3 | 2.17E+07 | 8.16E+06 | 100.00 | | |
| | T. Inducida | 3 | 2.22E+05 | 1.06E+04 | 1.02 | | |
| | T. Basal | 3 | 1.83E+05 | 2.42E+04 | 0.84 | | |
| R2-2 | Control | 3 | 2.16E+07 | 7.19E+06 | 100.00 | | |
| | T. Inducida | 3 | 2.09E+05 | 3.21E+04 | 0.97 | 0.94 | 0.95 |
| | T. Basal | 3 | 1.75E+05 | 2.01E+04 | 0.81 | 0.96 | 0.96 |

También se realizaron ensayos de termotolerancia con las transformantes de la clona R1-3 (pYES-DEST52-*Mayehuelina*). Sin embargo, el análisis de varianza indicó que no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) con la transformante pYES-DEST52 en ninguno de los tratamientos (Figura S3).

6.0 DISCUSIÓN:

El análisis de proteínas por medio de electroforesis SDS-PAGE y teñido con *Coomassie Brilliant Blue* confirmó la integridad y cuantificación de las proteínas, pero no permitió observar (en *S. cerevisiae*) las bandas de la mayehuelina esperadas a los ~33 kDa en el caso de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* y a los 27 kDa en la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina* (Figura S1a y S1b). Una de las desventajas de *S. cerevisiae*, como modelo de estudio eucarionte, es que generalmente tiene un nivel de expresión de proteínas recombinantes relativamente bajo (Jayaraj y Smooker, 2009). Por ello, es bastante probable que los bajos niveles de las dos versiones de la mayehuelina estuviesen encubiertos por las propias proteínas de la levadura y la detección de su acumulación mediante esta técnica sea imposible, a diferencia de las hojas del cogollo de *A. tequilana* que sintetizan mayehuelina en grandes cantidades (Lledías-Martínez F., Nieto-Sotelo J. *et al.*, datos no publicados).

Pese lo anterior, el *western blot* permitió detectar la versión de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His (Fig. 13a) aunque la cantidad de la proteína recombinante fue muy baja comparado con lo encontrado en *A. tequilana*, ya que se requirieron 60 µg de proteína total de levadura en lugar de 20 µg de proteína total del cogollo. Anteriormente, se había detectado mayor cantidad de esta versión de la mayehuelina en *S. cerevisiae* (Reyes, 2014). Sin embargo, en ese mismo trabajo, también se detectó una segunda banda aproximada a los 27 kDa en la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His (Reyes, 2014). Reyes sugiere que hubo una degradación o modificación post-traducciona que generó dos versiones de la proteína recombinante. En cambio, en este trabajo no se detectó la banda de 27 kDa (Figura 9a) lo que pudo deberse a que se usó un el protocolo diferente para extraer proteínas totales en *S. cerevisiae*.

En el caso del protocolo empleado por Reyes (Reyes, 2014), se usaron bajas temperaturas para extraer y mantener las proteínas, además de inhibidores de proteasas. Es posible que, pese a estas precauciones, el alto contenido de proteasas en las hojas de *A. tequilana* haya provocado el corte proteolítico de la mayehuelina. El protocolo de Hovarth y Riezman (Hovarth y Riezman, 1994) empleado en este trabajo, implicó un tratamiento a altas temperaturas de las proteínas (95°C). Es posible que estas condiciones hayan desnaturalizado proteínas incluyendo a la maquinaria de degradación de las células de *S. cerevisiae*, lo cual impediría su acción (la degradación de otras proteínas). En este trabajo se observó que el rendimiento e integridad de las proteínas extraídas con el protocolo de Hovarth y Riezman fue superior (Figura S4) al empleado por Reyes y no afectó de ninguna manera a la mayehuelina (Figura 13a).

Reyes tampoco detectó la expresión de la mayehuelina en la clona R1-3 de la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina* atribuyendo este resultado a un mal plegamiento de la proteína recombinante (Reyes, 2014). Para re-examinar este problema, se secuenció nuevamente a la clona R1-3. A diferencia de la clona R2-2, la re-secuenciación de la clona R1-3 indicó que contiene muchos errores, inserciones y deleciones respecto a la secuencia de la *Mayehuelina* de *A.*

tequilana (Figura 14 y Figura S5). Además, el codón de inicio en la clona R1-3 no se encontró en el mismo lugar respecto a la clona R2-2 y también carecía de la secuencia consenso para iniciar la transcripción sugerida en el manual del vector de expresión pYES-DEST52. Por lo anterior, muchos codones de inicio (ATG) podrían ocasionar la traducción de nuevos marcos de lectura (Figura 14) que generarían cadenas polipeptídicas de diversos tamaños (ninguna mayor a 38 aminoácidos) diferentes al marco de lectura de lectura de la *Mayehuelina* de *A. tequilana* (Figura 14).

Debido a que la secuencia del gen *Mayehuelina* en la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*, realizada con la clona R1-3 no es correcta, se descartó de la discusión, ya que con esta construcción no es confiable poder inferir los efectos de la mayehuelina en la termotolerancia de *S. cerevisiae* o su mecanismo de acción.

Este trabajo confirmó que la versión de la mayehuelina fusionada al epítotope V5 y a la cola de histidinas de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His no es tóxica en células de *S. cerevisiae* (Reyes, 2014). Es importante mencionar que la versión de la mayehuelina sin la fusión tampoco fue tóxica en la levadura, ya que otra clona estudiada de la construcción pYES-DEST52-*Mayehuelina* (clona R1-1), cuya expresión se comprobó mediante inmunodetección, no mostró diferencias significativas en el crecimiento de los cultivos (Jesús Gutiérrez, Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, datos no publicados).

Superficialmente, el efecto positivo de la mayehuelina observado en los ensayos de termotolerancia basal de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina*::V5::His se podría considerar irrelevante (Tabla 1), dado que existen proteínas que tienen un rol más importante en la sobrevivencia de *S. cerevisiae* al estrés calórico. Por ejemplo, la HSP104 es una proteína no constitutiva que induce su expresión bajo condiciones de choque de calor. HSP104 actúa re-solubilizando agregados de proteínas desnaturalizadas para que éstas puedan ser nuevamente plegadas de manera correcta. Su delección disminuye entre 100 y 1000 veces la termotolerancia de *S. cerevisiae*. De hecho, basta con únicamente sobre expresar a HSP104 para

elegir la sobrevivencia de *S. cerevisiae* en choques de temperatura letales a un nivel similar al que causa una termoinducción o aclimatación a temperatura subletal (Lindquist y Kim, 1996; Verghese *et al.*, 2012).

Sin embargo, cabe destacar que la respuesta al estrés calórico es un fenómeno global que involucra la expresión de ~300 genes y la represión de ~600 genes en *S. cerevisiae* (Morano *et al.*, 2012). Probablemente, de manera individual, la mayoría de estos genes no alteran radicalmente la termotolerancia de *S. cerevisiae*, pero sí de manera conjunta. Un caso de proteína involucrada en la respuesta al estrés calórico es HSP12, la cual al igual que la mayehuelina, presenta un efecto por sobreexpresión relativamente bajo en la termotolerancia basal, pero cuyo efecto es estadísticamente significativo en *S. cerevisiae*. HSP12 es una proteína localizada en la membrana plasmática y el citoplasma de la levadura (Pacheco *et al.*, 2009). Su expresión incrementa 100 veces después de un choque de calor a 37°C (Praekelt y Meacock, 1990). Sin embargo, HSP12 sólo aumenta significativamente la termotolerancia de *S. cerevisiae* 1.25 veces en condiciones intracelulares reducidas de trehalosa (Pacheco *et al.*, 2009). El mecanismo de acción de HSP12 ha sido poco estudiado. Sin embargo, se sabe que estabiliza la fluidez de la membrana bajo condiciones de estrés (Verghese *et al.*, 2012).

Por lo tanto, observado desde un contexto global, el efecto de la mayehuelina no es despreciable, aun cuando su efecto sea menor a los factores de transcripción de la respuesta al estrés calórico o al de algunas otras proteínas como la HSP104.

Incluso el efecto de la mayehuelina en la termotolerancia de *S. cerevisiae* también es mayor comparado con el efecto observado en otras proteínas recombinantes de plantas y hongos evaluadas en modelos eucariontes similares al empleado en este trabajo como es el caso de otras cepas de *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *Pichia pastoris* (Gao *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2000; Jiang *et al.*, 2009). De los trabajos anteriores el que presenta mayor similitud con el protocolo descrito en este trabajo fue el de Gao *et al.*, 2012, quienes expresaron la proteína ThHSP18.3, una sHSP de *Tamarix hispida*, en la cepa INVSC1 de *S. cerevisiae*

utilizando el vector de expresión pYES2. Gao y colaboradores encontraron un aumento significativo en la termotolerancia de la transformante en diferentes choques de calor a 36, 40, 44, 48 y 52°C. No obstante, el aumento no es mayor a 1.5 veces respecto a su cepa control transformada únicamente con el vector de expresión vacío. Bajo esta perspectiva, donde el efecto evaluado en la termotolerancia viene dado por una proteína recombinante, el aumento generado por la mayehuelina es apreciable.

Aunque aún falta confirmarlo, es posible que el efecto de estas proteínas en sus respectivas plantas sea mayor que en la levadura, ya que el nivel de expresión de proteínas recombinantes en *S. cerevisiae* es relativamente bajo (Jayaraj y Smooker, 2009). En cambio, la cantidad de mayehuelina es muy alta en el cogollo de *A. tequilana*, la estructura con mayor resistencia al choque de calor en esa planta, representando alrededor del 10% de la proteína total de las hojas (Lledías, Cabanillas, Nieto-Sotelo, datos no publicados; Luján *et al.*, 2009).

Los ensayos de termotolerancia de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5::His* sólo mostraron un aumento significativo en la termotolerancia basal de *S. cerevisiae*, pero no en la termotolerancia inducida (Figura 15), lo que sugiere que el mecanismo de acción de la mayehuelina podría estar relacionado al de las proteínas inducidas en la respuesta al calor como las HSP. La hipótesis de que su función es similar al de otros factores inducidos por el estrés en la levadura implica también que la actividad de estos otros factores de estrés endógenos de la levadura no es limitante, lo que explica el efecto nulo de la mayehuelina bajo condiciones de termotolerancia inducida, al no complementar o reforzar la actividad de estas proteínas. El efecto positivo de la mayehuelina únicamente en condiciones de termotolerancia basal indica que protege de alguna manera el severo daño causado por esta condición de estrés. Por lo tanto, es posible que la mayehuelina tenga una función redundante con alguna HSP, ya que el efecto sólo fue significativo en condiciones donde la presencia de HSPs es nula o muy baja, es decir en respuesta al choque de 50°C de células previamente mantenidas a 25°C. Los niveles de protección a los efectos del calor de la

mayehuelina fueron similares a los de las HSP de bajo peso molecular (sHSP). Las sHSP son chaperonas que previenen la agregación y precipitación de proteínas desnaturalizadas (Haslbeck y Vierling, 2015). En el caso de *S. cerevisiae*, es posible que la mayehuelina sustituya la función de la HSP26, no sólo porque presentan un tamaño similar, sino porque es una proteína que induce su expresión durante el estrés calórico (Haslbeck *et al.*, 2004) y, por lo tanto, no estaba acumulada en el ensayo de termotolerancia basal. Más aún, la actividad de HSP26 es predominante a 37°C (Haslbeck *et al.*, 2004) como en el caso de los ensayos de termotolerancia inducida realizados.

Tanto en plantas como en levadura, la respuesta al choque de calor aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) en las células (Fedyeva *et al.*, 2014; Jamieson, 1998). Debido a esto, otro posible mecanismo de acción de la mayehuelina es como atrapador (*scavenger*) ROS, evitando el daño a otras proteínas y su consecuente degradación por la ausencia de HSPs durante la termotolerancia basal. En este caso, la actividad de la mayehuelina se podría comparar con la de otros atrapadores de ROS que atraen el daño (por ej. acetil-cisteína, etanol, etc.) para evitar la oxidación y degradación de proteínas constitutivas. Existen ejemplos de proteínas vegetales como la GhMT3a de *Gossypium hirsutum* y la ASR1 de *Oryza sativa* que presentan este tipo de actividad. Estas proteínas fueron evaluadas en células de *S. cerevisiae* y *E. coli*, aumentando significativamente la tolerancia de estas células al estrés oxidativo (Il-Sup *et al.*, 2012; Xue *et al.*, 2009). En el caso de ASR1, observaron que atrae H₂O₂ y lo convierte en H₂O por medio de su oxidación evitando que otras proteínas reaccionen con el H₂O₂ (Il-Sum *et al.*, 2012).

En ambos mecanismos, la mayehuelina sería una excelente primera línea de defensa contra el estrés calórico, dado que el costo energético para su síntesis y acción sería menor comparado con otras proteínas como la HSP104 que ocupa ATP para realizar su actividad (Vashist *et al.*, 2010). Sin embargo, todavía queda por evaluar si estas hipótesis son correctas o no.

En la actualidad, las RIPs son prácticamente conocidas sólo por su actividad ARN N-glicosidasa. Usualmente, esta actividad se relaciona con la defensa contra herbívoros, hongos, bacterias y virus (Bolognesi *et al.*, 2016). Sin embargo, debido a su localización en diferentes compartimentos celulares, algunos estudios sugieren que las RIPs pueden tener otras funciones biológicas diferentes como la inducción de la apoptosis (Narayanan *et al.*, 2005). A pesar de ello, la literatura generalmente presenta estas funciones como hipótesis y, hasta la fecha, sólo se encontró un trabajo experimental realizado con la cinnamomina, una RIP tipo II, que confirma una función distinta: la de proteína de reserva en semillas de *Cinnamomum camphora* (R.S. Liu *et al.*, 2002). La función biológica de la mayehuelina en *A. tequilana* aún podría ser de defensa contra herbivoría, ya que no se ha descartado que tenga la actividad normal de las RIPs o cierto grado de toxicidad en mamíferos. Sin embargo, los ensayos de termotolerancia muestran que la versión de mayehuelina de la transformante pYES-DEST2-*Mayehuelina::V5::His* tiene un efecto significativamente positivo sobre la termotolerancia basal de la levadura (Figura 15) aportando la primera evidencia de que una RIP tipo I está relacionada con la respuesta al estrés calórico.

Que la función biológica de la mayehuelina sea diferente o adicional a la defensa contra herbivoría se puede deber a la estructura del sitio catalítico. La mayehuelina presenta la sustitución de una tirosina conservada a un ácido aspártico en la posición 76. El modelamiento *in silico* de la estructura de la mayehuelina de *A. tequilana* mediante homología permitió detectar cambios en la conformación tridimensional del sitio catalítico comparado con otras RIPs como la saporina o la cadena A de la ricina (Nieto-Sotelo *et al.*, datos no publicados). La charibdina es el único caso publicado de una sustitución natural en el sitio catalítico similar al de la mayehuelina. En la charibdina la sustitución implica el intercambio de tirosina por valina (Touloupakis *et al.*, 2006). Touloupakis y cols. observaron que la charibdina no es un fuerte inhibidor de la síntesis proteica, ya que es 100 veces menor que la saporina. Además, debido a su alta acumulación en el bulbo de *Charybdis marítima*, Touloupakis y cols. especulan que la inhibición de la traducción no es la principal función de la charibdina. Si la mayehuelina

presenta la capacidad ARN N-glicosidasa, ésta probablemente tenga un grado de inhibición similar a la charibdina, muy bajo respecto a otras RIPs como la ricina y la saporina. Por lo tanto, puede ser que su función biológica principal esté más relacionada al estrés calórico que a la defensa contra herbivoría.

Finalmente, aunque en este trabajo no se analizó el efecto de la mayehuelina en la termotolerancia de *A. tequilana* de manera directa, hay que recordar que las plantas son organismos sésiles que están expuestos a diversos tipos de estrés biológico y abiótico, entre los que destaca el estrés calórico (Al-Whaibi, 2011). La respuesta al estrés calórico en plantas también involucra diferentes mecanismos a nivel fisiológico, bioquímico y molecular. El calor y la sequía son las principales condiciones de estrés que afectan el desarrollo y metabolismo de estos organismos (Hasanuzzaman *et al.*, 2013). A nivel molecular también son las familias de proteínas como los Hsf, las HSP, las sHSP y las chaperoninas las involucradas en la respuesta al estrés calórico en plantas (Al-Whaibi, 2011) y los agaves no son la excepción (Luján *et al.*, 2009). Por ello, encontrar que la mayehuelina, una RIP tipo I, está involucrada en la respuesta al calor de plantas no sólo genera nueva evidencia acerca de su rol, sino que también genera nuevas incógnitas en el mecanismo y la evolución de la respuesta al estrés calórico en plantas.

7.0 CONCLUSIÓN:

Se expresó una versión de mayehuelina fusionada al epítipo V5 y una cola de histidinas mediante la transformación de células de *S. cerevisiae* con el vector pYES-DEST2-*Mayehuelina::V5::His*. La fusión mayehuelina::V5::his no fue tóxica, ya que no hubo disminución en el crecimiento de los cultivos líquidos de las células transformantes comparado con células control. Los ensayos y el análisis para observar si esta proteína de fusión afectó la termotolerancia inducida y basal de *S. cerevisiae*, mostraron únicamente un aumento significativo en la termotolerancia basal. Por lo tanto, este trabajo presenta la primera evidencia que apoya la hipótesis de que la mayehuelina, una RIP tipo I, podría estar relacionada al estrés calórico.

8.0 PERSPECTIVAS:

Aunque este trabajo muestra que la fusión mayehuelina está involucrada en el estrés calórico, todavía es necesario dilucidar si la mayehuelina no fusionada tiene éstos mismos efectos, así como el mecanismo de acción y su posible actividad N-glicosidasa. Por lo que se sugieren otros ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Sería interesante evaluar el papel *in vivo* de la mayehuelina en la respuesta de defensa ante otros tipos de estrés, como el estrés oxidativo, la desecación, el frío, etc., además del ya realizado con calor. En cuanto a los ensayos *in vitro*, el primero sería realizar diferentes pruebas con proteínas desnaturalizadas y HSP para evaluar si la mayehuelina es capaz de re-solubilizar y/o re-naturalizar dichas proteínas; y el segundo sería realizar pruebas con ribosomas para observar si la mayehuelina es capaz de inhibir la síntesis proteica.

Aunque en levadura, la mayehuelina mostró un efecto sobre la termotolerancia, también es importante confirmar esto en planta, por lo que se debe expresar y evaluar el efecto de la mayehuelina, ya sea en *Arabidopsis thaliana*, en protoplastos o en la misma planta de *A. tequilana*.

Por otro lado, es importante confirmar los resultados de este trabajo con la construcción de la mayehuelina madura, por lo que se debe obtener un plásmido correctamente construido, transformarlo y expresarlo en la cepa W303-1a para validar el rol de la mayehuelina en la resistencia al estrés calórico de *S. cerevisiae*. Cabe destacar que también se sugiere construir plásmidos incorporando las regiones N- y C- terminal de holo-mayehuelina para evaluar su posible envío al retículo endoplásmico y analizar si esto interfiere con su rol en el estrés calórico observado en los ensayos de termotolerancia basal.

9.0 LITERATURA CITADA:

- Al-Whaibi, M. H. (2011). Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University - Science*, 23(2), 139–150.
- Angiosperm Phylogeny Group, The. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105-121.
- Barbieri, L., Battelli, M. G., Stirpe, F., Sperimentale, P., Bologna, U., y Giacomo, V. S. (1993). Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1154, 237–282.
- Battelli, M., Citores, L., Buonamici, L., Ferreras, J., De Benito, F., Stirpe, F., y Girbés, T. (1997). Toxicity and cytotoxicity of nigrin b, a two-chain ribosome-inactivating protein from *Sambucus nigra*: comparison with ricin. *Archives of Toxicology*, 71(6), 360–364.
- Bolognesi, A., Bortolotti, M., Maiello, S., Battelli, M., y Polito, L. (2016). Ribosome-Inactivating Proteins from Plants: A Historical Overview. *Molecules*, 21(12), 1627.
- Botstein, D., y Fink, G. R. (2011). Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology. *Yeastbook Perspectives*, 189(3), 695–704.
- Carzaniga, R., Sinclair, L., Fordham-skeiton, A. P., Harris, N., y Croy, R. R. D. (1994). Cellular and subcellular distribution of saporins , type-1 ribosome-inactivating proteins , in soapwort (*Saponaria officinalis L.*). *Planta*, 194(4), 461–470.
- Chaudhry, B., Müller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J. (1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant Journal*, 6(6), 815–824.

- Chen, H. Y., Foo, L. Y., y Loke, W. K. (2015). Abrin and Ricin: Understanding Their Toxicity, Diagnosis, and Treatment. *Biological Toxins and Bioterrorism, Toxinology*, 79–102.
- Chiou, J., Li, X., Remacha, M., Ballesta, J. P. G., y Tumer, N. E. (2008). The ribosomal stalk is required for ribosome binding, depurination of the rRNA and cytotoxicity of ricin A chain in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology*, 70(6), 1441–1452.
- Choi, A. K., Wong, E. C., Lee, K. M., y Wong, K. B. (2015). Structures of Eukaryotic Ribosomal Stalk Proteins and its Complex with Trichosanthin, and their Implications in Recruiting Ribosome-Inactivating Proteins to the Ribosomes. *Toxins*, 7(3), 638–647.
- Choudhary, N., Kapoor, C., y Lodha, M. ((2008). Cloning and expression of antiviral / ribosome-inactivating protein from *Bougainvillea xbuttiana*. *Journal of Biosciences*, 33(1), 91–101.
- De Virgilio, M., Lombardi, A., Caliandro, R., y Fabbrini, M. (2010). Ribosome-Inactivating Proteins: From Plant Defense to Tumor Attack. *Toxins*, 2(11) 2699–2737.
- Di, R., Kyu, E., Shete, V., Saidasan, H., Kahn, P. C., y Tumer, N. E. (2011). Identification of amino acids critical for the cytotoxicity of Shiga toxins 1 and 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicon*, 57(4), 525–539.
- Duina, A., Miller, M., y Keeny, J. (2014). Budding Yeast for Budding Geneticists: A Primer on the *Saccharomyces cerevisiae* Model System. *Genetics*, 197(1), 33–48.
- Endo, Y., y Wool, I. G. (1982). The site of action of alpha-sarcin on eukaryotic ribosomes. The sequence at the alpha-sarcin cleavage site in 28 S ribosomal ribonucleic acid. *Journal of Biological Chemistry*, 257(15), 9054-9060.

- Fedyaeva, A. V., Stepanov, A. V., Lyubushkina, I. V., Pobezhimova, T. P., Rikhvanov, E. G. (2014). Heat shock induces production of reactive oxygen species and increases inner mitochondrial membrane potential in winter wheat cells. *Biochemistry*, 79(11), 1202-1210.
- Fermani, S., Tosi, G., Farini, V., Polito, L., Falini, G., Ripamonti, A., y Bolognesi, A. (2009). Structure/function studies on two type 1 ribosome inactivating proteins: Bouganin and lychnin. *Journal of Structural Biology*, 168(2), 278–287.
- Ferreras, J., Citores, L., Iglesias, Jiménez, P., y Girbés, T. (2011). Use of Ribosome-Inactivating Proteins from Sambucus for the Construction of Immunotoxins and Conjugates for Cancer Therapy. *Toxins*, 3(5), 420–441.
- Ferreras, M., Citores, L., Iglesias, R., Jiménez, P., y Girbés, T. (2010). Sambucus Ribosome-Inactivating Proteins and Lectins. *Toxic Plant Proteins*, 18, 107–131.
- Folch-Mallol, J. L., Martínez, L. M., Casas, S. J., Yang, R., Martínez-Anaya, C., López, L., Hernández, A. y Nieto-Sotelo, J. (2004). New roles for CDC25 in growth control, galactose regulation and celular differentiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 150(9), 2865-2879.
- Gadadhar, S., y Karande, A. A. (2013). Abrin Immunotoxin: Targeted Cytotoxicity and Intracellular Trafficking Pathway. *PLoS ONE*, 8(3), 1–11.
- Gao, C., Jiang, B., Wang, Y., Liu, G., y Yang, C. (2012). Overexpression of a heat shock protein (ThHSP18.3) from *Tamarix hispida* confers stress tolerance to yeast. *Molecular Biology Reports*, 39(4), 4889–4897.
- Gao, C., Wang, Y., Jiang, B., Liu, G., Yu, L., Wei, Z., y Yang, C. (2011). A novel vacuolar membrane H⁺-ATPase c subunit gene (ThVHAc1) from *Tamarix hispida* confers tolerance to several abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 957–963.

- Gietz, R. D., y Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96.
- Girbés, T., Ferreras, J. M., Arias, F. J., Stirpe, F. (2004). Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome-inactivating proteins in plants, fungi and bacteria. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 4(5), 461-76.
- Good-Avila, S. V, Souza, V., Gaut, B. S., y Eguiarte, L. E. (2006). Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae). *PNAS*, 103(24), 9124–9129.
- Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Alam, M. M., Roychowdhury, R., y Fujita, M. (2013). Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 9643–9684.
- Haslbeck, M., Braun, N., Stromer, T., Richter, B., Model, N., Weinkauff, S., y Buchner, J. (2004). Hsp42 is the general small heat shock protein in the cytosol of *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 23(3), 638–649.
- Haslbeck, M. y Vierling, E. (2015). A First Line of Stress Defense: Small Heat Shock Proteins and Their Function in Protein Homeostasis. *Journal of Molecular Biology*, 427(7), 1537-1548.
- Hernández-Bermúdez, F. (2018). Estudios en *Agave tequilana* y en otras especies de la familia Agaveaceae, de la expresión en distintos órganos de la planta y en respuesta al calor de la mayahuelina, una RIP tipo I. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Hovarth, A., Riezman, H. (1994). Rapid Protein Extraction from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 10(10), 1305-1310.
- Il-Sum, K., Young-Saeng, K., Ho-Sung, Y. (2012). Rice ASR1 Protein with Reactive Oxygen Species Scavenging and Chaperone-like Activities

Enhances Acquired Tolerance to Abiotic Stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and Cells*, 33(3), 285-293.

Jamieson, D. J. (1998). Oxidative Stress Responses of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1511-1527.

Jayaraj, R., y Smooker, P. M. (2009). So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. *The Open Veterinary Science Journal*, 3(1), 28–34.

Jeong, M. J., Park, S. C., Kwon, H. B., y Byun, M. O. (2000). Isolation and Characterization of the Gene Encoding Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 278(1), 192–196.

Jiang, C., Xu, J., Zhang, H., Zhang, X., Shi, J., Li, M., y Ming, F. (2009). A cytosolic class i small heat shock protein, RchHSP17.8, of *Rosa chinensis* confers resistance to a variety of stresses to *Escherichia coli*, yeast and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 32(8), 1046–1059.

Lam, S. K., y Ng, T. B. (2001). First Simultaneous Isolation of a Ribosome Inactivating Protein and an Antifungal Protein from a Mushroom (*Lyophyllum shimeji*) Together with Evidence for Synergism of their Antifungal Effects. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 393(2), 271–280.

Lapadula, W. J., Marcet, P. L., Mascotti, M. L., Sánchez-Puerta, M. V., Jury-Ayub, M. (2017). Metazoan ribotoxin genes acquired by Horizontal Gene Transfer. *Scientific Reports*, 12(7), 1863-1873.

Lapadula, W. J., Sánchez-Puerta, M. V., y Jury-Ayub, M. (2013). Revising the Taxonomic Distribution, Origin and Evolution of Ribosome Inactivating Protein Genes. *PLoS ONE*, 8(9), 1–8.

- Li, X. P., Baricevic, M., Saidasan, H., y Tumer, N. E. (2007). Ribosome depurination is not sufficient for ricin-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Infection and Immunity*, 75(1), 417–428.
- Lin, J., Zhou, X., Wang, J., Jiang, P., y Tang, K. (2010). Purification and Characterization of Curcin, a Toxic Lectin from the Seed of *Jatropha curcas*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 40(2), 107–118.
- Lindquist S. y Kim G. (1996). Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 5301-5306.
- Liu, R. S., Wei, G., Yang, Q., He, W., y Liu, W. (2002). Cinnamomin, a type II ribosome-inactivating protein, is a storage protein in the seed of the camphor tree (*Cinnamomum camphora*). *The Biochemical Journal*, 362(3), 659–663.
- Liu, R., Yang, J., y Liu, W. (2002). Isolation and enzymatic characterization of lamjapin, the first ribosome-inactivating protein from cryptogamic algal plant (*Laminaria japonica* A). *European Journal of Biochemistry*, 269(19), 4746–4752.
- Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G., Nieto-Sotelo, J. (2017a). A rapid and reliable method for protein extraction from succulent plants for proteomic analysis. *The Protein Journal*, 36(4), 308-321.
- Lledías, F., Hernández, F., Rivas, V., García-Mendoza, A., Cassab, G., Nieto-Sotelo, J. (2017b). A rapid and reliable method for protein extraction from succulent plants for proteomic analysis. *The Protein Journal*, 36(6), 523.
- Luján, R., Lledías, F., Martínez, L. M., Barreto, R., Cassab, G. I., y Nieto-Sotelo, J. (2009). Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant, Cell & Environment*, 32(12), 1791–1803.

- Martínez-Hernández, A., Mena-Espino, M., Herrera-Estrella, A., y Martínez-Hernández, P. (2010). Construcción de bibliotecas de ADNc y análisis de expresión génica por RT-PCR en agaves. *Revista Latinoamericana de Química*, 38(1), 21–44.
- May, K. L., Yan, Q., y Tumer, N. E. (2013). Targeting ricin to the ribosome. *Toxicon*, 69, 143–151.
- Milo, R., y Phillips, R. (2015). Cell biology by the numbers. Connecticut, Estados Unidos. *Garland Science*.
- Morano, K. A., Grant, C. M., y Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195.
- Narayanan, S., Surendranath, K., Bora, N., Surolia, A. y Karande, A. A. (2005). Ribosome inactivating proteins and apoptosis. *FEBS Letters*, 579(6), 1324–1331.
- Nielsen, K., y Boston, R. S. (2001). Ribosome-Inactivating proteins: A Plant Perspective. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 785–816.
- Pacheco, A., Pereira, C., Almeida, M. J., y Sousa, M. J. (2009). Small heat-shock protein Hsp12 contributes to yeast tolerance to freezing stress. *Microbiology*, 155(6), 2021–2028.
- Peumans, W. J., Hao, Q., y Van Damme, E. J. (2001). Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal*, 15(9), 1493–1506.
- Peumans, W. J., y Van Damme, E. J. (2010). Evolution of Plant Ribosome-Inactivating Proteins. *Lord J. M., Hartley M. R. (eds) Toxic Plant Proteins*. Springer, Heidelberg, 1–26.

- Praekelt, U. M., y Meacock, P. (1990). HSP12, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Molecular & General Genetics*, 223(1), 97–106.
- Reyes, A. G., Geukens, N., Gutschoven, P., De Graeve, S., De Mot, R., Mejía, A., y Anné, J. (2010). The *Streptomyces coelicolor* genome encodes a type I ribosome-inactivating protein. *Microbiology*, 156(10), 3021–3030.
- Reyes, S. (2014). Expresión de la mayehuelina de *Agave tequilana*, proteína similar a las RIP tipo I, en células de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas.
- Schrot, J., Weng, A., y Melzig, M. F. (2015). Ribosome-Inactivating and Related Proteins. *Toxins*, 7(5), 1556–1615.
- Schleif R. F. y Wensink, P. C. (1981). *Practical Methods in Molecular Biology*. (New York: Springer-Verlag).
- Severino, V., Paiardini, A., Pascarella, S., Parente, A., y Chambery, A. (2009). Structural analysis of toxic volkensin, a type 2 ribosome inactivating protein from *Adenia volkensis* Harm (Kilyambiti plant): Molecular modeling and surface analysis by computational methods and limited proteolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45(4), 407–413.
- Shi, W., Mak, A., Wong, K., y Shaw, P. (2016). Structures and Ribosomal Interaction of Ribosome-Inactivating Proteins. *Molecules*, 21(11), 1588-1601.
- Shi, X., Khade, P., Sanbonmatsu, K., y Simpson, J. (2013). Functional Role of the Sarcin-Ricin Loop of the 23S rRNA in the Elongation Cycle of Protein Synthesis. *Journal of Molecular Biology*, 419(3), 125–138.
- Spooner, R. A., y Lord, J. M. (2015). Ricin Trafficking in Cells. *Toxins*, 7(1), 49–65.
- Stirpe, F. (2004). Ribosome-inactivating proteins. *Toxicon*, 44(4), 371-383.

- Stirpe, F., Barbieri, L., Gorini, P., Valbonesi, P., Bolognesi, A., y Polito, L. (1996). Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Letters*, 382(3), 309–312.
- Stirpe, F., y Battelli, M. (2006). Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(16), 1850–1866.
- Stirpe, F., Gasperi-Campani, A., Barbieri, L., Falasca, A., Abbondanza, A., y Stevens, W. A. (1983). Ribosome-inactivating proteins from the seeds of *Saponaria officinalis* L. (soapwort), of *Agrostemma githago* L. (corn cockle) and of *Asparagus officinalis* L. (asparagus), and from the latex of *Hura crepitans* L. (sandbox tree). *Biochemistry*, 216(3), 617–625.
- Touloupakis, E., Gessmann, R., Kavelaki, K., y Christofakis, E. (2006). Isolation, characterization, sequencing and crystal structure of charybdin, a type 1 ribosome-inactivating protein from *Charybdis maritima* agg. *The FEBS Journal*, 273(12), 2684–2692.
- Vashist, S., Cushman, M. y Shorter, J. (2010). Applying Hsp104 to protein-misfolding disorders. *Biochemistry and Cell Biology*, 88(1), 1–13.
- Verghese, J., Abrams, J., Wang, Y., y Morano, K. (2012). Biology of the Heat Shock Response and Protein Chaperones: Budding Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a Model System. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(2), 115–158.
- Vivanco, J. M., Savary, B. J., y Flores, H. E. (1999). Characterization of Two Novel Type I Ribosome-Inactivating *Mirabilis expansa*. *Plant Physiology*, 119(4), 1447–1456.
- Vivanco, J. M. y Tumer, N. E. (2003). Translation Inhibition of Capped and Uncapped Viral RNAs Mediated by Ribosome-Inactivating Proteins. *Phytopathology*, 93(5), 588-595.

- Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von der Lieth, C. W., y Berger, M. R. (2006). Identification and characterization of rioximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia americana*. *FASEB Journal*, 20(8), 1194–1196.
- Walsh, M. J., Dodd, J. E., Hautbergue, G. M., (2013). Ribosome-inactivating proteins: Potent poisons and molecular tools. *Virulence*, 4(8), 774–784.
- Wang, C. T., Jetzt, A. E., Cheng, J. S., y Cohick, W. S. (2011). Inhibition of the Unfolded Protein Response by Ricin A-Chain Enhances Its Cytotoxicity in Mammalian Cells. *Toxins*, 3(5), 453–468.
- Wang, H., y Ng, T. B. (2001). Isolation and characterization of velutin, a novel low-molecular weight ribosome-inactivating protein from winter mushroom (*Flammulina velutipes*) fruiting bodies. *Life Sciences*, 68(18), 2151–2158.
- Wang, H. X, y Ng, T. B. (2000). Flammulin: A novel ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the winter mushroom *Flammulina velutipes*. *Biochemistry and Cell Biology*, 78(6), 699–702.
- Xue, T., Li, X., Zhu, W., Wu, C., Yang, G. y Zheng, C. (2009). Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 339-349.
- Zdor, R. E. (2016). Brewing Bokashi: Strengthening Student Skills in Dilution Theory through Fermentation Analysis. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 17(2), 294–296.

10.0 TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS:

Tabla S1. Cuantificación de las clonas de las construcciones pYES-DEST52-Mayehuelina (R1) y pYES-DEST52-Mayehuelina::V5::His (R2-2) proporcionadas por Sandi Reyes (Reyes, 2014).

| <i>Clona</i> | <i>Dilución 1:10 (ng/μL)</i> | <i>Total (ng/μL)</i> |
|--------------|----------------------------------|--------------------------|
| R1-1 | 25 | 250 |
| R1-2 | 55 | 550 |
| R1-3 | 15 | 150 |
| R1-4 | 70 | 700 |
| R1-5 | 60 | 600 |
| R2-1 | 45 | 450 |
| R2-2 | 25 | 250 |
| R2-3 | 65 | 650 |
| R2-4 | 25 | 250 |

Tabla S2. Cuantificación de proteínas desnaturalizadas de *A. tequilana*. Cada fila representa un ensayo independiente por triplicado. En la celda inferior derecha se muestra la cantidad promedio obtenida de proteína.

| <i>Absorción 660nm</i> | | | | | <i>μg/μL</i> |
|--------------------------|------------|------------|------------|----------|--------------|
| | Medición 1 | Medición 2 | Medición 3 | Promedio | |
| Proteína Desnaturalizada | 0.204 | 0.201 | 0.201 | 0.202 | 18.53 |
| | 0.152 | 0.155 | 0.153 | 0.153 | 13.81 |
| | 0.127 | 0.132 | 0.127 | 0.129 | 11.58 |
| | 0.185 | 0.184 | 0.185 | 0.185 | 16.93 |
| | 0.183 | 0.180 | 0.182 | 0.182 | 16.61 |
| | | | | | 15.49 |

Tabla S3. Cuantificación de proteínas nativas de *A. tequilana*. Cada fila representa un ensayo independiente por triplicado. En la celda inferior derecha se muestra la cantidad promedio obtenida de proteína.

| Absorción 660nm | | | | | $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ |
|------------------------|------------|------------|------------|----------|---|
| | Medición 1 | Medición 2 | Medición 3 | Promedio | |
| Proteína Nativa | 0.207 | 0.208 | 0.204 | 0.206 | 18.91 |
| | 0.181 | 0.181 | 0.182 | 0.181 | 16.58 |
| | 0.237 | 0.236 | 0.235 | 0.236 | 21.79 |
| | | | | | 19.03 |

Tabla S4. Cuantificación de los anticuerpos anti-mayehuelina (anticuerpo primario). La medición se llevó a cabo en el *Nanodrop 2000* de *Thermoscientific* mediante absorción a 280 nm. Cada fila representa un ensayo independiente por triplicado y en la celda inferior derecha se muestra la cantidad promedio obtenida de proteína.

| ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | | |
|---|------------|------------|------------|--------------|
| | Medición 1 | Medición 2 | Medición 3 | Promedio |
| Anticuerpo | 41 | 106 | 56 | 67.66 |
| | 60 | 50 | 50 | 53.33 |
| | 66 | 90 | 70 | 75.33 |
| | | | | 65.44 |

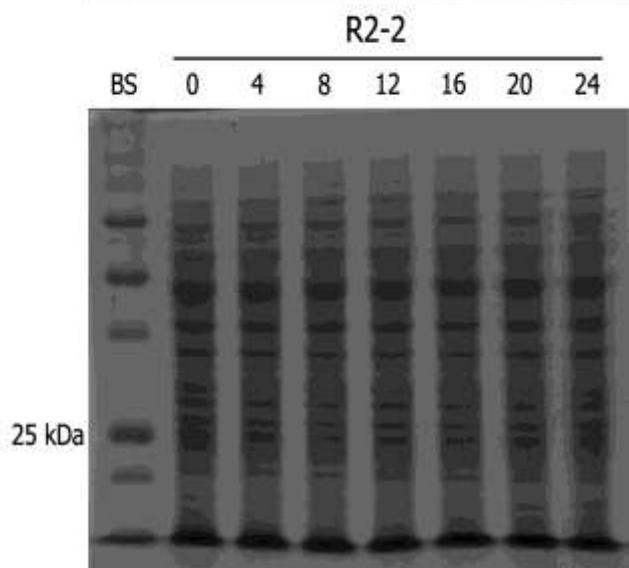
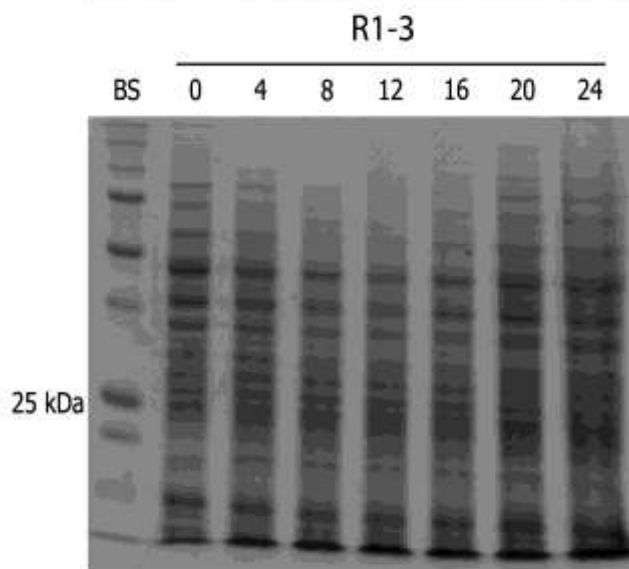
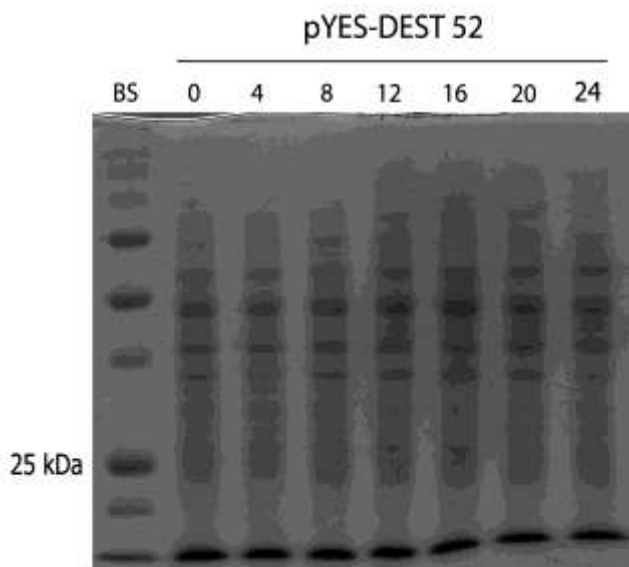


Figura S1. SDS-PAGE de las proteínas extraídas de cultivos de levadura obtenidos de la inducción con galactosa. a) Transformante con el plásmido vacío. b) Transformante con la construcción pYES-DEST52-*Mayhuelina* [R1-3]. c) Transformante con la construcción pYES-DEST52-*Mayhuelina::V5::His* [R2-2] En cada panel se muestra el tiempo (horas) de inducción y el marcador molecular (BS) que corresponde al producto *Precision Plus Protein All Blue Standards* de Biorad

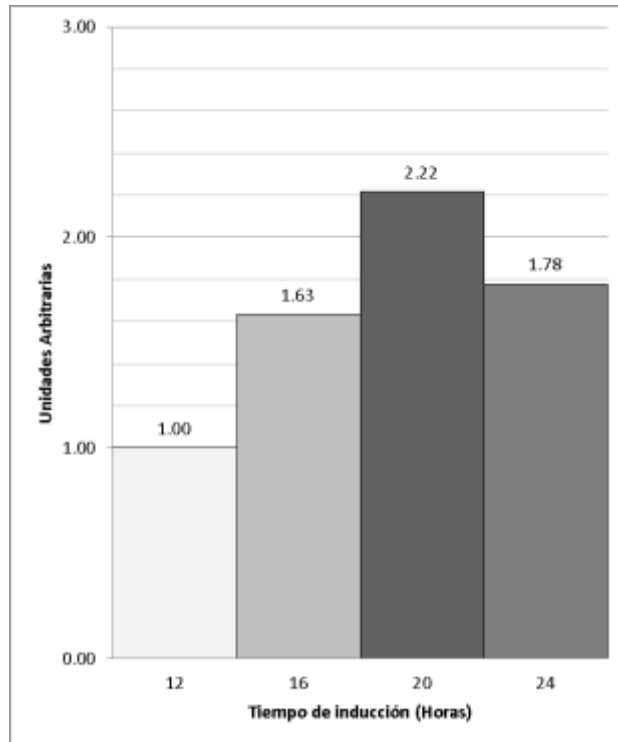


Figura S2. Densitometría de la inducción de la mayahuilina de la transformante pYES-DEST52-*Mayahuilina::V5::His* realizado con el escáner *Epson Perfection V500 Photo* de *Epson* y el programa *ImageJ* versión 1.50 de *NIH*.

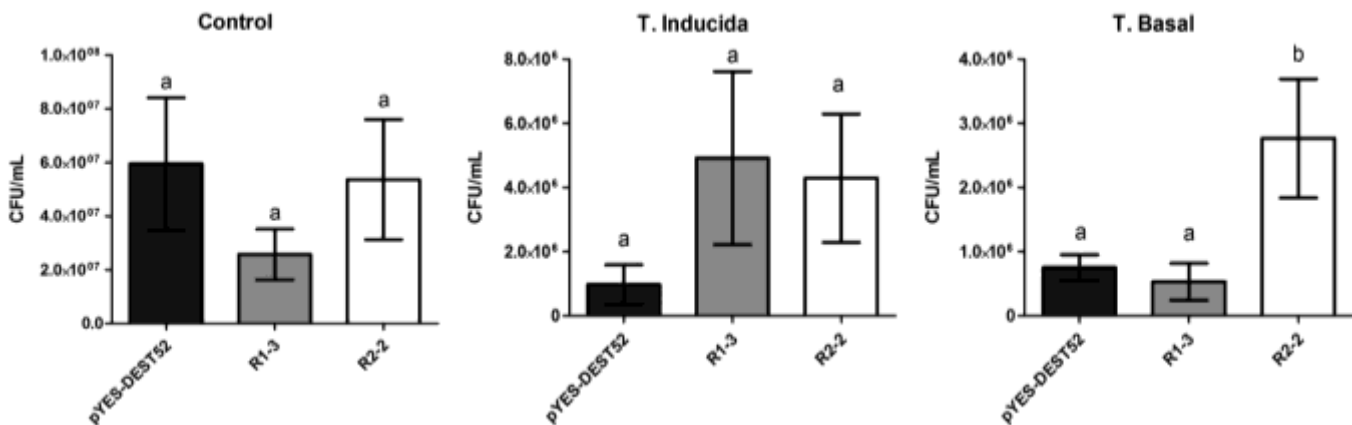


Figura S3. Evaluación de la termotolerancia de todas las transformantes después de ser inducidas en medio con galactosa. Panel izquierdo) Muestra las CFU de cultivos no chocados con calor. Panel centro) Muestra los cultivos chocados a 37°C y posteriormente a 50°C. Panel derecho) Muestra los cultivos chocados directamente a 50°C. Las barras muestran el promedio con su desviación estándar. Las barras con letras diferentes indican que las diferencias entre las muestras son estadísticamente significativas.

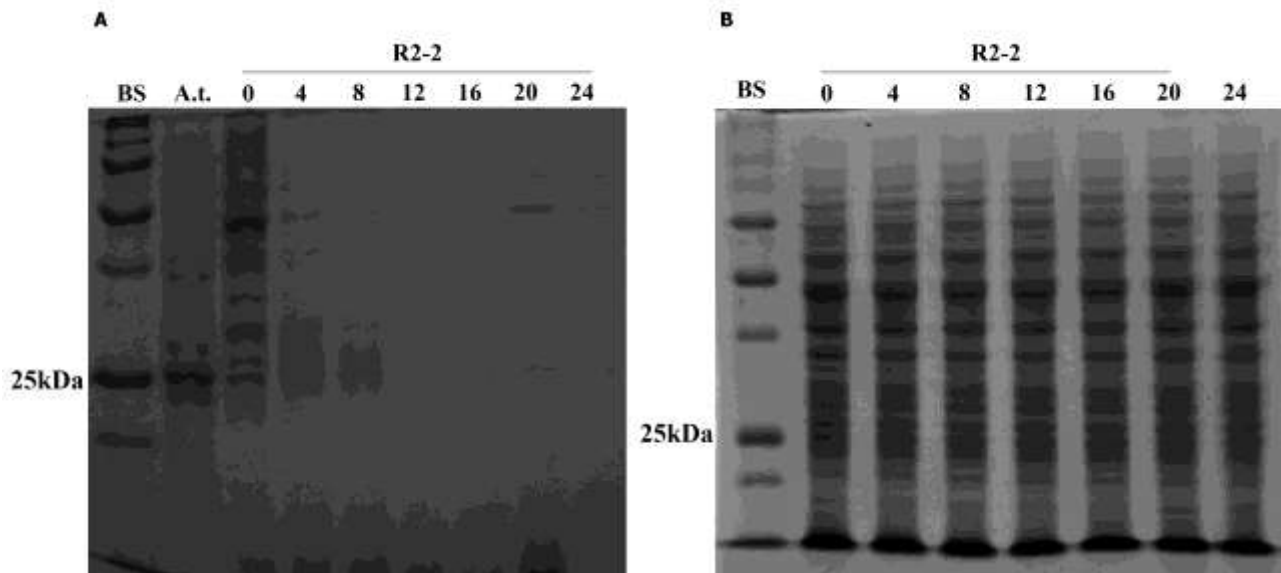


Figura S4. SDS-PAGE de proteínas totales de la transformante pYES-DEST52-*Mayehuelina::V5:His* [R2-2]. A) Protocolo empleado por Reyes (Reyes, 2014). B) Protocolo de Horvath y Riezman (Horvath y Riezman, 1994).

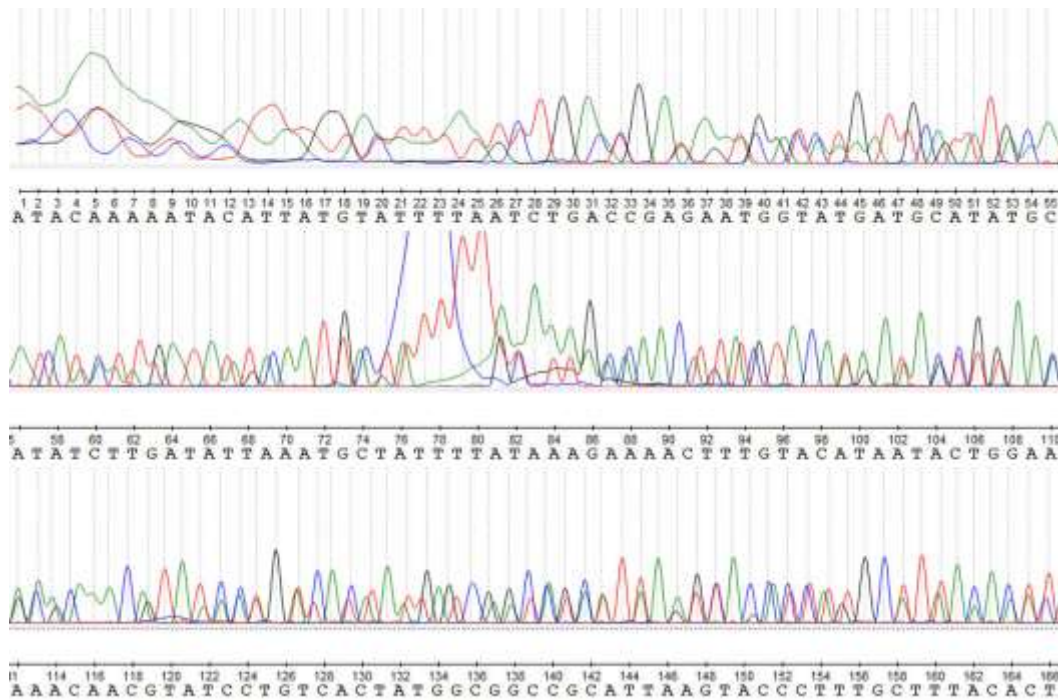


Figura S5. Cromatograma de la secuenciación de la clona R1-3 de los primeros 166 pb, incluyendo el inicio la secuenciación. Se observa que la calidad de la secuencia es baja.

11.0 ANEXO:

Medio YPDA 1X

| | |
|---|---------|
| Extracto de levadura (<i>bacto-yeast</i>) | 1 % |
| Peptona | 2 % |
| Glucosa (dextrosa) | 2 % |
| Agar | 2 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |
| Agua destilada | |

Medio SD + suplementos 1X

| | |
|------------------------------------|---------|
| Glucosa (dextrosa) | 2 % |
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 0.67 % |
| Agar | 2 % |
| Leucina | 0.009 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |
| Histidina | 0.002 % |
| Triptófano | 0.002 % |
| Uracilo | 0.002 % |
| Agua destilada | |

Medio SD Ura⁻ 1X

| | |
|------------------------------------|---------|
| Glucosa (dextrosa) | 2 % |
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 0.67 % |
| Agar | 2 % |
| Leucina | 0.009 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |
| Histidina | 0.002 % |
| Triptófano | 0.002 % |
| Agua destilada | |

Medio SD Trp⁻ 1X

| | |
|------------------------------------|---------|
| Glucosa (dextrosa) | 2 % |
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 0.67 % |
| Agar | 2 % |
| Leucina | 0.009 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |
| Histidina | 0.002 % |
| Uracilo | 0.002 % |
| Agua destilada | |

Medio SD Leu⁻ 1X

| | |
|------------------------------------|---------|
| Glucosa (dextrosa) | 2 % |
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 0.67 % |
| Agar | 2 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |

| | |
|----------------|---------|
| Histidina | 0.002 % |
| Triptófano | 0.002 % |
| Uracilo | 0.002 % |
| Agua destilada | |

Medio SGal Ura⁻ 1X

| | |
|------------------------------------|---------|
| Galactosa | 2 % |
| Base nitrogenada de levadura (YNB) | 0.67 % |
| Leucina | 0.009 % |
| Adenina hemisulfatada | 0.004 % |
| Histidina | 0.002 % |
| Triptófano | 0.002 % |
| Agua destilada | |

TAE 1X

| | |
|-----------------------|-------|
| Tris Base | 40 mM |
| Ácido acético glacial | 20 mM |
| EDTA | 2 mM |
| Agua destilada | |

TE 1X

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-Cl, pH 7.5 | 10 mM |
| EDTA, pH 8.0 | 1 mM |
| Agua destilada | |

Buffer de lisis A

| | |
|-----------------|--------|
| Triton X-100 | 2 % |
| SDS | 1 % |
| NaCl | 100 mM |
| Tris-Cl, pH 8.0 | 10 mM |
| EDTA, pH 8.0 | 1 mM |
| Agua destilada | |

Buffer de extracción A 1X

| | |
|------------------------------|----------|
| Tris-Cl, pH 7.2 | 200 mM |
| NaCl | 20 mM |
| EDTA, pH 8.0 | 2 mM |
| β-mercaptoetanol | 0.5 % |
| 10X COMPLETE® cocktail Roche | 16 mg/mL |
| Agua destilada | |

Buffer de extracción B 1X

| | |
|------------------------------|----------|
| Tris-Cl, pH 8.0 | 50 mM |
| 10X COMPLETE® cocktail Roche | 16 mg/mL |
| Agua destilada | |

Buffer de proteínas nativas 1X

| | |
|-----------------|-------|
| Tris-Cl, pH 8.8 | 50 mM |
| Glicerol | 8 % |
| Agua destilada | |

Laemmli 5X

| | |
|-------------------------|--------|
| Tris-Cl, pH 6.8 | 250 mM |
| SDS | 10 % |
| β -mercaptoetanol | 20 % |
| Glicerol | 40 % |
| Agua destilada | |

Solución A

| | |
|--|-----|
| Na ₂ CO ₃ (carbonato de sodio) | 2 % |
| Agua destilada | |

Solución B

| | |
|---------------------------------------|-------|
| CuSO ₄ + 5H ₂ O | 0.5 % |
| Citrato de sodio | 1 % |
| Agua destilada | |

Solución C

Solución A + Solución B (50:1)

Solución D

| | |
|-----------------------|------|
| Fenol Folin-Ciocalteu | 67 % |
| Agua destilada | |

Gel Separador P

| | |
|--|---------|
| Acrilamida 30 % + Bis-acrilamida 0.8 % | 26.66 % |
| Tris 1M, pH 8.8 | 37.5 % |
| Persulfato de amonio al 1% | 4.84 % |
| TEMED | 0.064 % |
| Agua destilada | |

Gel Concentrador P

| | |
|--|---------|
| Acrilamida 30 % + Bis-acrilamida 0.8 % | 11.99 % |
| Tris 1M, pH 8.8 | 11.99 % |
| Persulfato de amonio al 1% | 4.84 % |
| TEMED | 0.23 % |
| Agua destilada | |

Buffer de corrida P

| | |
|----------------|--------|
| Tris Base | 25 mM |
| Glicina | 190 mM |
| Agua destilada | |

Solución de Comassie

| | |
|-----------------------|-------|
| Comassie Blue R-250 | 0.1 % |
| Ácido acético glacial | 10 % |
| Etanol | 40 % |
| Agua destilada | |

Solución desteñidora

| | |
|-----------------------|------|
| Ácido acético glacial | 10 % |
| Etanol | 40 % |
| Agua destilada | |

PBS 10X

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 1.37 M |
| KCl | 27 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 100 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 17.6 mM |
| Agua destilada | |
| Ajustar el pH a 7.4 | |

Gel separador A

| | |
|--|---------|
| Acrilamida 30 % + Bis-acrilamida 0.8 % | 40 % |
| Tris 1M, pH 8.8 | 37.48 % |
| SDS al 10% | 1 % |
| Persulfato de amonio al 1% | 4.84 % |
| TEMED | 0.06 % |
| Agua destilada | |

Gel concentrador A

| | |
|--|---------|
| Acrilamida 30 % + Bis-acrilamida 0.8 % | 12.47 % |
| Tris 1M, pH 8.8 | 12.47 % |
| SDS al 10% | 1 % |
| Persulfato de amonio al 1% | 4.84 % |
| TEMED | 0.24 % |
| Agua destilada | |

Buffer de corrida A

| | |
|----------------|---------|
| Tris Base | 25 mM |
| Glicina | 190 mM |
| SDS | 3.47 mM |
| Agua destilada | |

Buffer de transferencia

| | |
|----------------|--------|
| Tris Base | 25 mM |
| Glicina | 190 mM |
| Isopropanol | 20 % |
| Agua destilada | |

Solución de bloqueo

Leche en polvo semidescremada Svelty® 5 %
TBST 1X

TBST 10X

Tris base 10 mM
NaCl 1.5 M
Tween 20 0.5 %
Agua destilada