



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Expresión de dos variantes alélicas de la S-RNasa de
Nicotiana glauca recombinantes en *Escherichia coli***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA

Aldo Fabián Gariglio Rangel

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz



Ciudad Universitaria, junio de 2022



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Aldo Fabián Gariglio Rangel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309067199

2. Datos del tutor

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dr. James Enrique González Flores

4. Datos del sinodal 2

Dra. María Sandra Cabrera Benítez

5. Datos del sinodal 3

Dra. Sara Frías Vázquez

6. Datos del sinodal 4

Dr. Luis Robledo Arratia

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de dos variantes alélicas de la *S-RNasa* de *Nicotiana glauca* recombinantes
en *Escherichia coli*
64 pp.
2022

Dedicatoria

A mi mamá por ser la cómplice de mis sueños, por siempre hacerme confiar en mis capacidades, por su solidaridad en mis esfuerzos, y por todo el cariño en mis momentos difíciles. Gracias por todo lo que has hecho para que mi camino sea más agradable.

A mi papá por haber sembrado en mí el amor a la Biología Molecular y por su ejemplo como profesionista, pero sobre todo por su cariño, por hacer todo lo que está en sus manos para ayudarme en diferentes ámbitos de mi vida, y por su preocupación para que sea una persona independiente, perseverante y exitosa tanto a nivel personal como profesional.

A mi hermana por todo su cariño, su comprensión y su complicidad.

A Frida, Louis, Carmen, Carlos, Víctor y Germán, por su apoyo académico pero sobre todo por estar conmigo en mis mejores y en mis peores momentos, pasando por alto mis fallos y acompañándome siempre con cariño, además de confiar en mi capacidad y motivarme a seguir mis sueños.

A Julián por los ánimos que me dio para realizar este proyecto.

A María, por su apoyo y por todos los buenos momentos que compartimos durante la carrera.

A Lenin, por su apoyo y su cariño incondicional, por confiar en mí y por los buenos momentos que ha compartido conmigo.

A Javier, quien me ha apoyado académicamente en muchos momentos, señalándome mis errores cuando ha sido necesario, cuyas lecciones atesoro, y quien también me ha brindado su valiosa amistad.

También quiero agradecer a los profesores que he tenido durante toda mi formación académica, que imparten clases con un genuino interés de transmitir su conocimiento y contribuir al crecimiento de sus estudiantes.

Y finalmente a la UNAM, la cual ha sido una institución que me ha permitido desarrollarme no sólo académicamente, sino también como persona. Desde el inicio ha sido un espacio de tolerancia, que me ha dado todas las oportunidades de ser un excelente profesionista, sin sobreponer la calidad y eficiencia a la libertad de elegir mis metas y la forma en cómo conseguirlas.

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, a la Dra. Margarita Collazo Ortega, a la Dra. Karina Jiménez Durán, al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, a la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos y a la Dra. Sonia Vázquez Santana, profesores responsables del Taller de Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes, quienes dieron seguimiento a lo largo de gran parte de este trabajo, aportando ideas y ayudando a mejorar.

Al Dr. Felipe Cruz García y a todo su equipo del laboratorio del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, por su apoyo en la realización de este trabajo, en especial a la Dra. Yuridia Cruz González Zamora, por su asesoría y asistencia técnica.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos, por su valioso apoyo y asistencia técnica en las instalaciones del Invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM.

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, por su ayuda y su valiosa asistencia técnica.

Al Biól. André Zaragoza por toda la ayuda que me brindó durante la realización de este trabajo, por su paciencia al enseñarme las técnicas de biología molecular y compartirme sus tips, pero igualmente por su amistad, que hizo más grata mi estancia en el laboratorio.

Al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, por permitirme unirme al laboratorio, y por su confianza en mi capacidad para desarrollar este proyecto.

Resumen

El 90% de las angiospermas son hermafroditas, lo que podría significar que se favorece la autofecundación sobre la fecundación cruzada. Esto llevaría a la endogamia y, con ello, a la reducción de la variabilidad genética en las poblaciones, afectando una de las ventajas biológicas que provee la reproducción sexual. Sin embargo, a lo largo de su evolución, las angiospermas han desarrollado diversos mecanismos que evitan la autopolinización y, por lo tanto, promueven la fecundación cruzada. Dentro de estos mecanismos se encuentran los sistemas de autoincompatibilidad gametofítica y esporofítica. En la autoincompatibilidad gametofítica, el crecimiento del polen se inhibe en el pistilo cuando el haplotipo S del polen coincide con uno de los dos alelos S del pistilo. La especificidad de reconocimiento del alelo S específico está regulada por el *locus* multialélico S. En este *locus* se encuentran tanto la determinante S femenina, que se expresa específicamente en el pistilo, como la determinante S masculina, que es exclusiva del polen. En *Nicotiana glauca*, el gen de la determinante S femenina codifica una glicoproteína con actividad de ribonucleasa, la S-RNasa.

Para que el mecanismo de rechazo del polen en una cruce incompatible se lleve a cabo de manera adecuada, se requieren de otros genes no ligados al *locus* S. Uno de estos genes codifica la NaTrxh, que es una tiorredoxina tipo *h* que reduce a la S-RNasa. Esta reducción provoca que su actividad de ribonucleasa incremente al menos siete veces y resulta ser esencial para el rechazo del polen alelo S específico.

Si bien se conoce la estructura terciaria de la S-RNasa, en específico de la variante alélica S_{F11}, es de interés del laboratorio conocer el cambio conformacional que se produce cuando es reducida por la NaTrxh, es decir, la conformación necesaria para la respuesta de incompatibilidad. El presente trabajo tiene como objetivo probar a *E. coli* como posible sistema de expresión de las S_{A2} y S_{C10}-RNAsas recombinantes en forma soluble. De esta manera se podrá establecer un protocolo de expresión y purificación de las proteínas recombinantes para así continuar con las variantes que posean la conformación "hiperactiva". Para ello se realizó la clonación de los cDNA que codifican dichas ribonucleasas en diferentes vectores de expresión con el fin de lograr una expresión eficiente de las mismas.

Se determinó que las mejores condiciones para lograr este objetivo fueron la expresión de las variantes alélicas S_{A2} y S_{C10} en el vector de expresión pMCSG53 en células de *E. coli* pGro7. Sin embargo, los resultados también sugieren que será mucho mejor probar otro sistema heterólogo de sobreexpresión, como lo es *Nicotiana tabacum*.

Índice

.....	1
Introducción.....	1
Barreras a la autofecundación en las angiospermas	1
Identificación de una ribonucleasa (S-RNasa) como la determinante S femenina en Solanaceae	2
Mecanismo de acción de las S-RNasas	3
Factores no ligados al locus S necesarios para la respuesta de AI	4
Características generales de las S-RNasas	6
La regulación redox de la S-RNasa es fundamental para la respuesta de AI	8
Justificación.....	10
Hipótesis.....	10
Objetivo	10
Materiales y métodos.....	12
Amplificación por PCR del cDNA que codifica la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa maduras	12
Clonación de las secuencias que codifican la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa en pMCSG53 en células de E. coli XL10-GOLD	15
Clonación de las secuencias que codifican la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa en pMAL-p5x en células de E. coli XL10-GOLD	20
Sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en la cepa de E. coli BL21(RIL) clonadas en los plásmidos pMCSG53 y pMAL-p5x	23
Sobreexpresión de S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa recombinantes en células de E. coli pGro7.....	24
Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes	24
Resultados	26
Generación de las construcciones pMCSG53: S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa.....	26
Sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en la cepa de E. coli BL21(RIL) clonadas en el plásmido pMCSG53.....	30
Clonación de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en el plásmido pMAL-p5X.....	33
Sobreexpresión de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa en células de E. coli pGro7	38
Discusión.....	42
Importancia de la obtención de las S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasas recombinantes.....	42
Sobreexpresión de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa codificadas en el plásmido pMCSG53 en células de E. coli BL21(RIL).....	44
Sobreexpresión de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa codificadas en el plásmido pMAL-p5x en células de E. coli BL21 (RIL).....	47
Sobreexpresión de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa en células de E. coli pGro7	49
Conclusiones y perspectivas	50
APÉNDICE 1 (protocolos).....	56

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa	56
Preparación de células quimiocompetentes de E. coli	56
Transformación de E. coli por choque térmico.....	57
Análisis de las proteínas por SDS-PAGE y ensayo réplica tipo Western-blot	57
APÉNDICE 2 (soluciones de trabajo)	58
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1) – 100 mL.....	58
Amortiguador apilador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL.....	58
Amortiguador de glicina para SDS-PAGE 10X (1L)	58
Amortiguador de muestra 6X (SDS-PAGE)	58
Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 10X (1 L)	58
Amortiguador separador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL.....	58
Amortiguador TAE (tris – ácido acético – EDTA) 50X (1 L)	58
Amortiguador de transferencia (Western- blot) 1L	59
Medio LB (Luria-Bertani) – 1L.....	59
Solución de bloqueo (inmunodetección).....	59

Índice de tablas

		Página
Tabla 1	Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las diferentes amplificaciones por PCR	14
Tabla 2	Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las secuencias de las S_{A2} - y la S_{C10} -RNAsas	14
Tabla 3	Condiciones de PCR para la amplificación de la secuencias de cDNA de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa	15
Tabla 4	Mezclas de reacción para LIC	16
Tabla 5	Mezcla de reacción de Tempasa	17
Tabla 6	Condiciones de PCR para la amplificación de la secuencias de cDNA de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa	17

Índice de figuras

		Página
Figura 1	Incompatibilidad esporofítica	4
Figura 2	Estructura de los dominios conservados de las S-RNasas de eudicotiledóneas	7
Figura 3	Estrategia experimental	11
Figura 4	Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa	12
Figura 5	Mapa del plásmido pMCSG53	18
Figura 6	Mapa de las construcciones pMCSG53: S_{A2^-} -RNasa y pMCSG53: S_{C10^-} -RNasa	19
Figura 7	Mapa del plásmido pMAL-p5x	21
Figura 8	Mapa de las construcciones pMAL-p5x: S_{A2^-} -RNasa y pMAL-p5x: S_{C10^-} -RNasa	22
Figura 9	Análisis por electroforesis de la amplificación por PCR del cDNA de los alelos S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa	26
Figura 10	Análisis por electroforesis de la segunda amplificación de S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa	27
Figura 11	Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de la clonación de la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasas en el plásmido pMCSG53	28
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión de los plásmidos pMCSG53- S_{A2} y pMCSG53- S_{C10} con las enzimas de restricción <i>NdeI</i> o <i>EcoRI</i>	29
Figura 13	Secuencias de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasas y de las clonas generadas en el plásmido PMCSG53	30
Figura 14	Ensayo de sobreexpresión de las proteínas S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa a partir de extractos de proteína total de <i>E. coli</i> BL21(RIL) con los plásmidos pMCSG53: S_{A2^-} -RNasa-1, y pMCSG53: S_{C10^-} -RNasa-2 o pMCSG53: S_{C10^-} -RNasa-4	31
Figura 14	Ensayo de sobreexpresión por IPTG de las proteínas S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa expresadas en células de <i>E. coli</i> BL21(RIL) cultivadas a 37° C, separando la fracción soluble (FS) de la insoluble (FI)	32
Figura 16	Ensayo de sobreexpresión de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa a 16°C	33
Figura 17	Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de las amplificaciones de las secuencias S_{A2^-} -RNasa y S_{C10^-} -RNasa	34
Figura 18	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de amplificación pMAL-p5X, S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa digeridos por <i>NotI</i> y <i>HindIII</i>	35
Figura 19	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos obtenidos de las colonias transformantes con los plásmidos pMAL-p5X: S_{A2} y pMAL-p5X: S_{C10^-} -RNasa	36
Figura 20	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos provenientes de S_{A2^-} -4 y S_{C10^-} -27 digeridos con <i>NdeI</i> + <i>EcoRI</i>	37
Figura 21	Ensayo de SDS-PAGE de extractos de proteínas de clonas pMAL-p5X: S_{A2} y pMAL-p5X: S_{C10} en células de <i>E. coli</i> BL21(RIL)	38
Figura 22	Ensayo de SDS-PAGE de las proteínas sobreexpresadas por	39

Figura 23	bacterias <i>E. coli</i> pGro7 con el vector pMCSG53-S _{A2} Ensayo de SDS-PAGE de las proteínas sobreexpresadas por bacterias <i>E. coli</i> pGro7 con el vector pMCSG53-S _{C10} . La banda de 63 kDa corresponde a la chaperona GroEL	39
Figura 24	Ensayo de SDS-PAGE de la expresión de S _{A2} -RNasa en diferentes tiempos utilizando células de <i>E. coli</i> con el vector pMAL-p5X	40
Figura 25	Ensayo de SDS-PAGE de la expresión de S _{C10} en diferentes tiempos utilizando células de <i>E. coli</i> con el vector pMAL-p5X	41

Introducción

Barreras a la autofecundación en las angiospermas

Cerca del 90% de las especies de angiospermas son hermafroditas, es decir, en una misma flor se encuentra tanto al androceo (verticilo reproductivo masculino) como al gineceo (verticilo reproductivo femenino) funcionales (Barrett y Hough, 2012), es decir son flores bisexuales. Si bien la autofecundación confiere ventajas para la sobrevivencia de las especies sésiles como lo son las plantas, también tiene desventajas porque se reduce la variabilidad genética a lo largo de las generaciones, lo que se conoce como depresión endogámica (Rea y Nasrallah, 2008).

En las plantas se han desarrollado mecanismos que evitan la autofecundación promoviendo a su vez la fecundación cruzada (Rea y Nasrallah, 2008). Entre estos mecanismos se encuentran: la dicogamia (cuando la dehiscencia de las anteras y la receptividad del estigma no ocurren al mismo tiempo), la hercogamia (cuando la posición del estigma se separa físicamente de las anteras), la expresión sexual (monoicismo, dioicismo y las diferentes combinaciones) y la autoincompatibilidad (AI).

La AI es una barrera genética a la autofecundación. Es un sistema de reconocimiento y discriminación entre el polen "propio" y el "no propio" para rechazar al polen propio (Rea y Nasrallah, 2008). Se define como la incapacidad de una planta hermafrodita fértil para producir cigotos después de la autopolinización (De Nettancourt, 1977).

Los sistemas de AI son de dos tipos: los homomórficos, que es cuando los tipos de apareamiento o los grupos de apareamiento son morfológicamente similares y solo pueden distinguirse mediante pruebas de apareamiento; y los heteromórficos, en los que puede haber dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales (Darwin, 1877; Stevens y Murray, 1982). De los homomórficos existen diferentes tipos de incompatibilidad, los cuales sólo pueden ser determinados por la compatibilidad entre diferentes individuos. Por el contrario, en los heteromórficos hay de dos a tres tipos de incompatibilidad, en los cuales se presentan diferentes posiciones de las partes florales (también llamadas plantas heterostiladas) y la morfología de la flor generalmente indica el tipo de incompatibilidad. La heterostilia es un ejemplo de polimorfismo que controla genéticamente la morfología de la flor. En plantas

distílicas, la mitad de las plantas tienen flores con estilos largos y estambres cortos, mientras que la otra mitad tiene el arreglo contrario; este sistema de incompatibilidad asegura que las plantas con estilos largos solo puedan ser fecundadas por polen proveniente de anteras en estambres largos y las de estilos cortos de polen de anteras en estambres cortos (Charlesworth, 2010).

La especificidad en el reconocimiento y rechazo del polen propio en los sistemas de AI de especies homomórficas está determinada por los haplotipos de un solo *locus* multialélico de reconocimiento, denominado *locus* S (sterility) (Rea y Nasrallah, 2008). Este *locus* presenta entre el 39% y el 98% de identidad en su secuencia (Kheyr-Pour *et al.*, 1990), lo cual determina los haplotipos S. El *locus* S consta de al menos dos genes: el que determina la especificidad alélica en el pistilo y el que la determina en el polen (Rea y Nasrallah, 2008). La base genética del reconocimiento del polen puede ser gametofítica o esporofítica.

En la AI gametofítica, la polinización es bloqueada cuando el haplotipo S en el polen (gametofito y, por lo tanto, haploide) coincide con uno de los dos alelos S del pistilo (Franklin-Tong y Franklin, 2003; De Nettancourt, 1977). En la AI esporofítica, la incompatibilidad está determinada por el genotipo S de la planta que produjo al polen (*i.e.* el esporofito; diploide) (Newbigin *et al.*, 1993; Nasrallah y Nasrallah, 1993). Dentro del sistema de AI gametofítica se han identificado dos mecanismos diferentes: uno basado en las S-RNasas, presente en las familias Solanaceae, Plantaginaceae y Rosaceae, y otro propio de la familia Papaveraceae (Franklin-Tong y Franklin, 2003; McClure y Franklin-Tong, 2006).

Identificación de una ribonucleasa (S-RNasa) como la determinante S femenina en Solanaceae

En *Nicotiana glauca* (Solanaceae) se observó que ciertas glicoproteínas estilares cosegregan con el fenotipo de AI, de ahí que se les denominó glicoproteínas S. Esto permitió la clonación e identificación del cDNA que codifica estas glicoproteínas básicas (Anderson *et al.*, 1986). La glicoproteína S₂ cuenta con un péptido señal y se expresa exclusivamente en el pistilo (Anderson *et al.*, 1986). Se determinó que las glicoproteínas S son homólogas a un conjunto de ribonucleasas de hongos conocidas como RNasas T2 (McClure *et al.*, 1989). Posteriormente, se demostró que en el rechazo del polen propio en *N. glauca*, el RNA del tubo

polínico se degrada por acción de estas enzimas, por lo que a las glicoproteínas S se les denominó S-RNasas (McClure *et al.*, 1990). Si bien las proteínas de diferentes haplotipos S, aunque varían poco con respecto a su masa molecular, sus patrones de glicosilación son diferentes (Jahnen *et al.*, 1989; Woodward *et al.*, 1989); sin embargo, la glicosilación no participa en la especificidad alélica en la respuesta del rechazo del polen alelo S específico.

A partir de líneas transgénicas de *Nicotiana* y *Petunia* se demostró que la S-RNasa es la única determinante del lado del pistilo que determina la especificidad alélica S (Murfett *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1994). Mientras que la expresión de una S-RNasa en plantas cuyo alelo S es diferente al de su genotipo genera una ganancia de función al poder rechazar polen con haplotipo igual al de la secuencia introducida (Lee *et al.*, 1994); la supresión de la S-RNasa causa la pérdida de la capacidad para rechazar el polen con un haplotipo S específico (Murfett *et al.*, 1994). Con esto se demostró que la S-RNasa es la determinante femenina en el sistema de AI gametofítico en Solanaceae y, por lo tanto, la responsable del rechazo del polen alelo S específico.

Mecanismo de acción de las S-RNasas

El arresto del crecimiento de los tubos polínicos se lleva a cabo entre el tercio superior y la mitad del estilo, lo cual ocurre, en promedio, dentro de las primeras 48 h después de la interacción polen-estigma (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Mediante experimentos marcando a la S-RNasa con ^3H se determinó que entra a los tubos polínicos de forma intacta y por tanto mantiene su actividad enzimática citotóxica (Gray *et al.*, 1991). A partir de ensayos de inmunolocalización se determinó que las S-RNasas entran a los tubos polínicos tanto en cruza incompatibles como compatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). La evidencia celular indica que, al ingresar las S-RNasas al tubo polínico, se compartimentalizan en una vacuola, la cual en una cruce compatible se mantiene y en una incompatible se degrada, liberando así a las S-RNasas para que lleven a cabo el efecto citotóxico sobre el tubo polínico incompatible (Goldraij *et al.*, 2006).

La actividad de ribonucleasa de la S-RNasa es esencial para que esta proteína lleve a cabo su función en el mecanismo de rechazo del polen incompatible. Las plantas S_1S_2 tienen la capacidad de rechazar el polen con haplotipos S_1 y S_2 , pero permiten el crecimiento del tubo

polínico cuando el polen tiene un haplotipo diferente (**Figura 1**). En el trabajo de Huang *et al.* (1994) se observó que cuando se expresa al gen S_3 -RNasa con el codón de la posición 93 que codifica histidina, que está implicado en la catálisis, reemplazado por un codón de asparagina, en plantas de *P. inflata* S_1S_2 , la proteína S_3 -RNasa mutante (cuya actividad de ribonucleasa estaba totalmente abolida) se encontró en los mismos niveles de expresión que en los de plantas S_1S_3 y S_2S_3 ; sin embargo, no tuvo la capacidad de rechazar el polen S_3 . Con esto se demostró que para que se lleve a cabo el rechazo del polen incompatible, es necesaria la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.

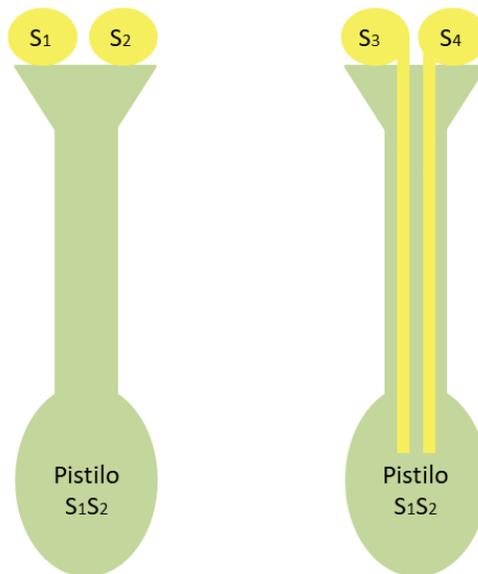


Figura 1. Incompatibilidad esporofítica. El pistilo de un esporofito con genotipo S_1S_2 tiene la capacidad de rechazar el polen con haplotipo S_1 y S_2 , pero permite el crecimiento de los haplotipos S_3 y S_4 .

Factores no ligados al *locus* S necesarios para la respuesta de AI

Existen factores que se requieren para el rechazo del polen alelo S específico no ligados al *locus* S, los cuales se conocen como genes modificadores (McClure *et al.*, 1999; Zhang y Xue, 2008). Hasta la fecha se han identificado cinco genes modificadores cuya participación esencial en la AI está demostrada. Cuatro de estos genes son por parte del pistilo: *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), *120K*, (Hancock *et al.*, 2005), *NaStEP* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013) y *NaTrxh* (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020); y uno por parte del polen: *NaSIP* (García-Valencia *et al.*, 2017).

El primer gen modificador que se identificó fue *HT-B* (McClure *et al.*, 1999). La *HT-B* es una proteína específica de estilos que se expresa en la especie AI *N. alata* pero no en la autocompatible *N. plumbaginifolia* (McClure *et al.*, 1999). Las plantas de *N. alata* con la expresión de *HT-B* suprimida presentan una reducción en la capacidad para rechazar el polen incompatible (McClure *et al.*, 1999) sin afectar la expresión de la S-RNasa ni su incorporación al tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006). No se conoce la función de *HT-B*, pero se sabe que también se incorpora a los tubos polínicos tanto compatibles como incompatibles. De manera interesante, mientras que se degrada en polen de cruza compatibles, se mantiene en el de incompatibles, y al parecer está de alguna manera involucrada con la estabilidad de la vacuola que contiene a las S-RNasas en los tubos polínicos (Goldraij *et al.*, 2006).

La degradación/estabilización de *HT-B* dependiendo de la crusa (compatible o incompatible, respectivamente) aparentemente depende de la regulación de la actividad de alguna proteasa del tubo polínico que aún no ha sido identificada (Goldraij *et al.*, 2006; Jiménez-Durán *et al.*, 2003; Cruz-Zamora *et al.*, 2020). Sin embargo, se identificó a *NaStEP*, el cual codifica una proteína con actividad de inhibidor de proteinasas tipo Kunitz que se expresa de manera específica en los estilos de plantas AI de *Nicotiana* (Busot *et al.*, 2008; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). *NaStEP* contiene la secuencia NPIVL de direccionamiento vacuolar. Esta proteína muestra localización vacuolar en los estigmas sin polinizar. Después de la polinización, se localiza en el exudado estigmático, lo cual se presenta a la par de la perforación de la pared celular estigmática, aparentemente liberándose el contenido vacuolar al apoplasto (Busot *et al.*, 2008) para posteriormente incorporarse al citosol del tubo polínico (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Al suprimir la expresión de la *NaStEP* por RNAi, el fenotipo de AI se pierde, indicando su función esencial como gen modificador en el sistema de AI y, de manera interesante, se observa que en ausencia de *NaStEP*, *HT-B* se degrada en cruza tanto compatibles como incompatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Además de la posible función de evitar la degradación de *HT-B* en cruza compatibles, *NaStEP* bloquea un canal dependiente de voltaje en la membrana interna mitocondrial por lo que de alguna manera también participa en el proceso de muerte celular programada que posiblemente ocurre en los tubos polínico incompatibles (Cruz-Zamora *et al.*, 2020). Sin embargo, los mecanismos por los cuales este factor modificador participa en la AI de *Nicotiana* aún no están tan claros.

Otra proteína involucrada y esencial para la AI en *N. alata* es 120K. Es una arabino-galactoproteína abundante en el tejido de transmisión estilar que interacciona *in vitro* con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2005) y entra a los tubos polínicos (Goldraij *et al.*, 2006).

Mediante ensayos de silenciamiento por RNAi se determinó que esta proteína es necesaria para el rechazo del polen alelo S específico, pero sin implicaciones en el crecimiento del tubo polínico (Hancock *et al.*, 2005) ni en el ingreso de la S-RNasa a los mismos, en donde se asocia a los márgenes de las vacuolas que contienen a las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006). La 120K interactúa con la NaPCCP, que a su vez se une con fosfatidil inositol-3-fosfato. La NaPCCP se asocia con la membrana plasmática del tubo polínico y con compartimientos internos (Lee *et al.*, 2009). Dado que el fosfatidil inositol-3-fosfato está implicado en la endocitosis y en el transporte de membrana, la NaPCCP podría contribuir con el direccionamiento de las proteínas de pistilo en el polen (McClure *et al.*, 2011).

El otro gen modificador del estilo, *NaTrxh*, codifica una tiorredoxina tipo *h* (Trxh) que se expresa en varios órganos de *N. alata*, pero especialmente abundante en tejidos florales incluyendo pétalos, ovarios y estilos, y también está presente, aunque en menor nivel, en anteras, sépalos y hojas (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Su mRNA es más abundante en estilos de especies autoincompatibles (*N. alata* y *N. bonariensis*), así como en aquellas con un entorno genético de AI (*N. alata* cv. BT y *N. longiflora*) que en *N. plumbaginifolia*, que es autocompatible (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011; Torres-Rodríguez *et al.*, 2020;). A nivel de proteína sólo se detecta en especies autoincompatibles, sugiriendo un papel en el rechazo del polen (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Torres-Rodríguez *et al.*, 2020), así como la existencia de un mecanismo de regulación traduccional en especies autocompatibles. La participación de la NaTrxh en el rechazo del polen alelo S específico se demostró posteriormente con las evidencias que más adelante se describirán.

Características generales de las S-RNasas

El gen que codifica la S-RNasa es altamente polimórfico (Kheyr-Pour *et al.*, 1990), codifica una proteína con péptido señal, la cual se expresa fuertemente y de manera específica en el estilo y estigma desde dos o tres días antes de la antesis, alcanzando su máxima expresión en la antesis (McClure, 1999). El punto isoeléctrico de las S-RNasas se encuentra entre 6.2 (S₃-RNasa) y 8.8 (S₂-RNasa) (Bredemeijer y Blaas, 1981). Los análisis de las secuencias de las S-RNasas indican que contienen cinco regiones conservadas (C1 a C5), que representan alrededor de 40 residuos de aminoácidos en una S-RNasa común, y dos regiones hipervariables (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1991; **Figura 2**). Las regiones C2 y C3 contienen los dos residuos de histidina implicados en la catálisis (His31 e His91 de la S₆RNasa), y los demás contribuyen al cuerpo hidrofóbico de la molécula (Ishimizu *et al.*, 1995; Kawata *et al.*,

1988). El cambio de posición de ciertas regiones variables de las S-RNasas irrumpió las funciones de reconocimiento y rechazo del polen incompatible (Zurek *et al.*, 1997; Kao y McCubbin, 1996), sugiriendo que son las regiones que intervienen con el reconocimiento y rechazo del polen alelo S específico.

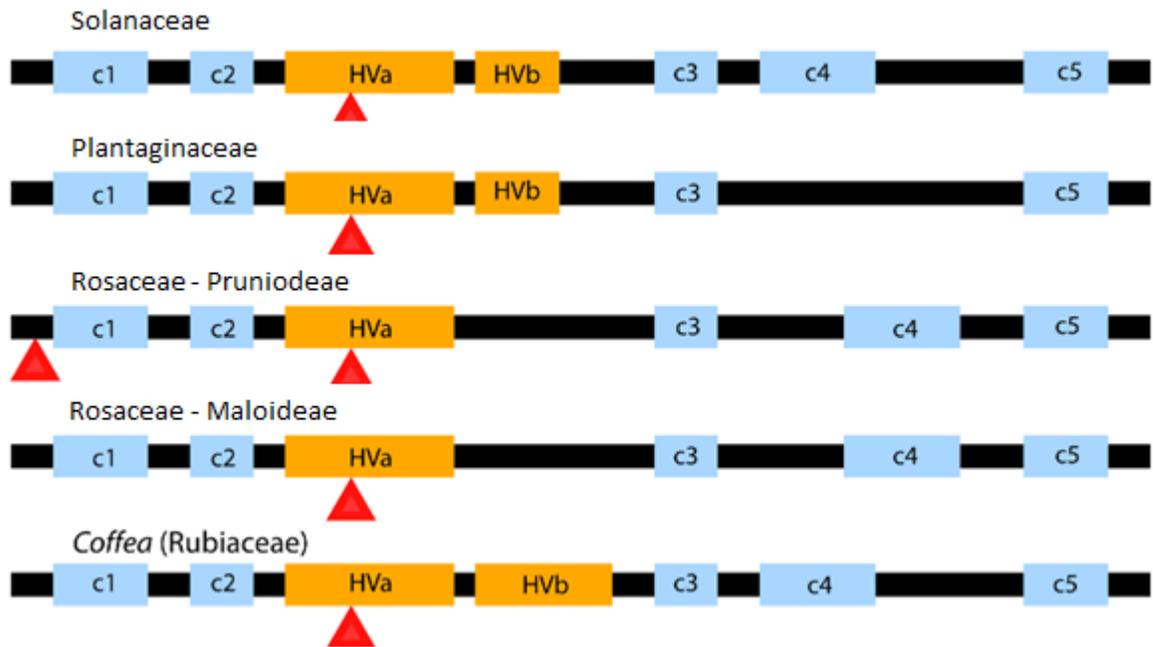


Figura 2. Estructura de los dominios conservados de las S-RNasas de eudicotiledóneas. Los triángulos rojos indican intrones. Figura modificada de Nowat *et al.* (2011).

Las S-RNasas contienen de ocho a diez residuos de cisteína, a partir de los cuales se forman cuatro puentes disulfuro. Por ejemplo, la S_{F11} -RNasa de *N. alata* contiene nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho forman puentes disulfuro (Cys16-Cys21, Cys46-Cys94, Cys153-Cys186 y Cys169-Cys180), y uno (Cys95) queda libre (Ida *et al.*, 1991). Por otro lado, la S_{C10} -RNasa de *N. alata* contiene 10 residuos de cisteína, de los cuales Cys77 y Cys95 permanecen libres, y los otros forman cuatro puentes disulfuro (Cys16-Cys21, Cys45-Cys94, Cys155-Cys185 y Cys168-Cys179) (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Recientemente, se demostró que la actividad catalítica de la S-RNasa está bajo una regulación redox que resulta fundamental para la respuesta de incompatibilidad. Su actividad basal de ribonucleasa en *N. alata* no es suficiente para que se produzca el efecto citotóxico sobre el polen incompatible. Para lograrlo, debe ser reducida por la NaTrxh, lo cual claramente ocurre *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Esta reducción resulta en un incremento de la actividad de ribonucleasa de al menos 7 veces y, de manera interesante, solo ocurre sobre

uno de los cuatro puentes disulfuro (Cys155-Cys185 de la S_{C10}-RNasa) (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

La regulación redox de la S-RNasa es fundamental para la respuesta de AI

La NaTrxh se expresa en varios órganos de *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) y contiene una extensión en el N-terminal que es importante para su secreción, aunque no posee un péptido señal clásico (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Experimentos de inmunolocalización muestran que la NaTrxh se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar, en donde colocaliza con la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

La S-RNasa presenta actividad de ribonucleasa al ser purificada a partir de estilos de *N. alata*. Su reducción por la NaTrxh (la cual reduce específicamente el puente que se forma entre los residuos Cys155-Cys185), produce que dicha actividad incremente siete veces. Esta interacción/reducción es específica porque no ocurre con una tiorredoxina de *Escherichia coli*. Además, la reducción de la S-RNasa con ditioneitol (DTT) abate la actividad de ribonucleasa de la proteína (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Es posible que el nivel basal de actividad de la S-RNasa no sea suficiente para evitar el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles, como se observa en ensayos *in vivo* de polinización con polen incompatible en plantas híbridas que expresan una variante de la NaTrxh sin actividad redox (sus residuos Cys del sitio activo están reemplazados por serina) (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Una posibilidad es que la función principal de la S-RNasa no reducida es la interacción S específica con la determinante S masculina, SLF, para determinar la compatibilidad de la cruce y que el bajo nivel de actividad presentado sin la reducción no es suficiente para degradar el RNA en tubos polínicos incompatibles (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Esto se apoya con el hecho de que al tubo polínico ingresan tanto las S-RNasas compatibles como las incompatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006) y aunque tengan cierto nivel de actividad, éste no es suficiente para causar el arresto del crecimiento del tubo polínico inmediatamente (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Dado que el puente disulfuro entre los residuos Cys155-Cys185 de la S_{C10}-RNasa está conservado en todas las S-RNasas (Anderson *et al.*, 1989) y se localiza lejos del sitio activo, posiblemente no participa en la determinación de la conformación

de la región catalítica, lo cual podría ser la razón por la cual la S-RNasa presenta actividad catalítica independientemente de la reducción por la NaTrxh (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Justificación

La reducción de la S-RNasa por la NaTrxh provoca un incremento de al menos siete veces en su actividad de ribonucleasa, lo cual es esencial para que ocurra el rechazo del polen alelo S específico en una cruce incompatible en *N. alata*. Esta reducción ocurre en uno de los cuatro puentes disulfuro que las S-RNasas contienen en su estructura terciaria, por lo que es importante conocer cuál es el cambio conformacional que provoca este incremento en su actividad. Para lograr esto, es necesario tener a la S-RNasa en su conformación reducida por la NaTrxh, lo cual solo será posible por medio de la expresión de la proteína recombinante con los residuos de cisteína involucrados en el puente disulfuro blanco de la NaTrxh sustituidos por serina, mimetizando así el estado reducido. Sin embargo, para ello, primero se necesita clonar el gen de la S-RNasa y lograr expresar a la proteína recombinante en su condición silvestre, por lo que se debe empezar por un sistema heterólogo sencillo, como lo es *E. coli*.

Hipótesis

Si se ha logrado la expresión de diferentes S-RNasas de *Anthrimum* en *E. coli*, entonces también será posible la expresión en este sistema procarionte de dos S-RNasas recombinantes de *N. alata* en forma soluble.

Objetivo

Probar a *E. coli* como posible sistema de expresión de las S_{A2} y S_{C10}-RNasas recombinantes en forma soluble.

Estrategia experimental

En la **Figura 3** se engloba la estrategia experimental que se siguió para la expresión de las S_{A2} y S_{C10} -RNAsas recombinantes en *E. coli*. El procedimiento de cada paso se detalla más adelante en Materiales y métodos.

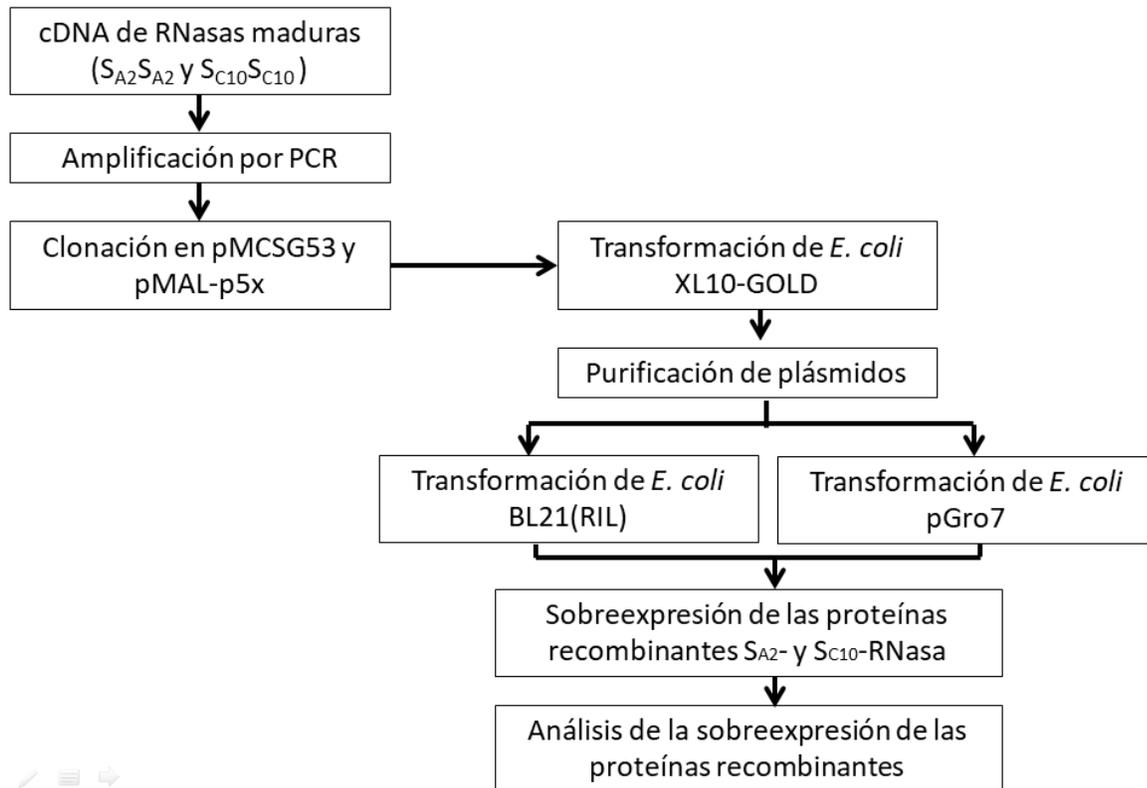


Figura 3. Estrategia experimental. Diagrama de flujo de la metodología que se siguió para la expresión de la S_{A2} - y S_{C10} -RNAsas recombinantes en *E. coli*.

Materiales y métodos

Amplificación por PCR del cDNA que codifica la S_{A2} y la S_{C10}-RNasa maduras

El laboratorio del Dr. Felipe Cruz-García (Facultad de Química, UNAM) nos proporcionó el cDNA sintetizado a partir de mRNA total de estilos de flores en anthesis de *N. alata* S_{A2}S_{A2} y de *N. alata* S_{C10}S_{C10}. A partir de estos cDNAs se amplificó por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el que corresponden a las secuencias que codifica la S_{A2}-RNasa y la S_{C10}-RNasa maduras, es decir, sin el péptido señal (**Figura 4**). Los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de ambos cDNA, además de amplificar la secuencia que codifica la proteína madura, contienen una extensión en el extremo 5' que permitió su clonación en el plásmido pMCSG53, como se describirá más adelante (SA2-F y SA2-R para la SA2-RNasa; SC10-F y SC10-R para la S_{C10}-RNasa; **Tabla 1**).

a)

```

atgcttaattcacagattacgtcagctggtctcttcttctgcttttcgctctttctccatt 60
1  M L N S Q I T S A V L F L L F A L S P I
tatgggtgattttgattacatgcaactcgtttttaacatggccggcatcattttgtaccct 120
21  Y G D F D Y M Q L V L T W P A S F C Y P
aaaaatTTTTgtagcagaatagctccaaaaaactttacgattcatgggctttggccggac 180
41  K N F C S R I A P K N F T I H G L W P D
aaggtgCGCGGACgtctgcagttctgcacttccgaaaagtatgtaaactttgcaaggat 240
61  K V R G R L Q F C T S E K Y V N F A Q D
agtcctatactcgatgatctggaccaccactggatgcaattaaagtaccatcgcgacttc 300
81  S P I L D D L D H H W M Q L K Y H R D F
ggtttagaaaaatcaatctctggagaggtcaataccaaaagcatggaacgtgttgatt 360
101 G L E N Q F L W R G Q Y Q K H G T C C I
ccgcgctataatcagatgcaatatttttactagctatgagactaaaagataagtttgat 420
121 P R Y N Q M Q Y F L L A M R L K D K F D
cttttgcaactctcagaactcatggaattactcctggaacaaagcatacatttaatgaa 480
141 L L A T L R T H G I T P G T K H T F N E
acccgatgCCATcaagacggttactaatcaagtggatccggacctgaagtgcgtcgaa 540
161 T R D A I K T V T N Q V D P D L K C V E
catatcaaaaggggtacgggaactatatgagataggcatatgttttaccgccgacggccgat 600
181 H I K G V R E L Y E I G I C F T P T A D
agttttttccatgtcctcacagtaacacatgtgatgaaacgggcattacgaagatttg 660
201 S F F P C P H S N T C D E T G I T K I L
ttccgacgatga 672
221 F R R -

```

b)

```

gcattcgagtacatgcaactggtgttacaatggccaacagctttttgccacaccactccc 60
1  A F E Y M Q L V L Q W P T A F C H T T P
tgcaaaaagaattgcaacaactttacaatccatgggctttggccggataacgtgagcaca 120
21  C K R I P N N F T I H G L W P D N V S T
actctcaattactgCGCTGCCAAAGAAAactttaaaaatatagaagatgacacgaaaaaa 180
41  T L N Y C A A K E N F K N I E D D T K K
gatgatctatataaacgctggccagacctaacaccgcagaaacatattgtaagcaacat 240
61  D D L Y K R W P D L T T A E T Y C K Q H
caaaatcttgagacatgaatataataagcacggaaaagtgtgttcagagagctacaac 300
81  Q N F W R H E Y N K H G K C C S E S Y N
cgagaacaatattttgatattagccatggccttaaagacaagtttgatctttgtcatct 360
101 R E Q Y F D L A M A L K D K F D L L S S
ttgagaaatcacggaattattcctggaaggggaatgaaatacaccgttcagaaaatcaat 420
121 L R N H G I I P G R G M K Y T V Q K I N
agcaccatcaagaaaataactcaagggatcctaacctgtcatgactaaaggaataatg 480
141 S T I K K I T Q G Y P N L S C T K G I M
gaacttggtgagataggcatatgtttcactcgatggttaaaaatgtaattaattgtcct 540
161 E L V E I G I C F D S M V K N V I N C P
catccaagacatgcaaacctacgggaagtaatgagattaagtttccatga 591
181 H P K T C K P T G S N E I K F P -

```

Figura 4. Secuencia de nucleótidos y de aminoácidos de la S_{A2}-RNasa (número de acceso NCBI: U45957) (a) y de la S_{C10}-RNasa (número de acceso NCBI: U45959) (b). En negritas se indica el péptido señal; resaltado en azul, el sitio de restricción *EcoRI*; resaltado en gris, el sitio de restricción *NdeI*; en cursivas, las secuencias en donde se alinean los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar el cDNA correspondiente; el codón GCA de la S_{C10}-RNasa (subrayado) al clonarse en pMCSG53 se substituyó por GCC que también codifica alanina.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las diferentes amplificaciones por PCR. En negritas se muestran los primeros codones de cada una de las secuencias de los alelos. Subrayados se muestran los codones de término para ambos alelos. En cursivas se muestra el sitio de restricción de *NotI* (para pMAL_SRN-F) y el de *HindIII* (para pMAL_SRN-R).

Nombre	Tamaño (b)	Secuencia (5' a 3')	T _m (°C)
SA2-F	51	TACTTCCAATCCAATGCC GAT TTTGGATTACATGCAACTC GTTTTAACATGG	65.4
SA2-R	46	TTATCCACTTCCAATGTTATCGTCGGAACAAAATCTTCG TAATGCC	64.5
SC10-F	46	TACTTCCAATCCAATGCC TT CGAGTACATGCAACTGGT GTTACAAT	66.1
SC10-R	48	TTATCCACTTCCAATGTTATGGAAACTTAATCTCATTAC TTCCCGTAG	62.7
pMAL_SRN-F	38	AAGGAAAAAAGCGGCCGCCACCATCATCATCATTC	66.6
pMAL_SRN-R	27	CCCAAGC TT CCGTTATCCACTTCCAAT	60.8
pMCSG53-F	33	ATTGGAAGTGGATAACGGATCCGAATTCGAGCT	63.5
pMCSG53-R	35	ATTGGATTGGAAGTACAGGTTCTCGGTACCCAGAT	63.9

Para la amplificación de los cDNA de ambas S-RNasas por PCR se utilizó la mezcla de reacción *Platinum SuperFi* (Invitrogen), la cual contiene una DNA polimerasa de alta fidelidad en el amortiguador de reacción junto con la mezcla de los dNTPs (**Tabla 2**). En la **Tabla 3** se muestran las condiciones de PCR que se usaron para amplificar las secuencias que codifican las formas maduras de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa.

Tabla 2. Mezcla de reacción para la amplificación por PCR de las secuencias de las S_{A2}- y la S_{C10}-RNasas.

Componente	Volumen (μl)
SuperFi Master Mix (2x)	12.5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	1.25
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	1.25
DNA molde	0.5
Agua, libre de nucleasas	9.5

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias de cDNA de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	10 s	35
Alineamiento	60	10 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	5 min	1

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (teñidos con SYBR Green) y se purificaron a partir del mismo gel (Apéndice 1) para su clonación en pMCSG53 como más adelante se describirá.

Para clonar las secuencias de ambas S-RNasas en el vector de expresión pMAL-p5X se utilizaron como molde las construcciones moleculares que se generaron en pMCSG53 y los oligonucleótidos pMAL_SRN-F y pMAL_SRN-R (Tabla 1) con las condiciones que se muestran en las Tablas 2 y 3. Los productos de dicha amplificación se analizaron por electroforesis y se purificaron a partir del gel (Apéndice 1).

Clonación de las secuencias que codifican la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa en pMCSG53 en células de *E. coli* XL10-GOLD

Para generar las construcciones moleculares pMCSG53:S_{A2}-RNasa y pMCSG53:S_{C10}-RNasa se utilizó la metodología conocida como clonación independiente de ligasa (LIC) (Aslanidis y de Jong, 1990). Para ello fue necesario amplificar por PCR el plásmido pMCSG53 utilizando la mezcla de reacción *Platinum SuperFi* (Tabla 2) y los oligonucleótidos pMCSG53-F y pMCSG53-R (Tabla 1). Las condiciones de reacción se muestran en la Tabla 3 con la modificación de que en los ciclos de amplificación el tiempo de extensión fue de 2.5 min. El producto de la amplificación se analizó por electroforesis y se purificó a partir del gel (Apéndice 1).

La generación de extremos monocatenarios (15 b de longitud) tanto en el vector como en los insertos, complementarios entre sí, se logró por la actividad de exonucleasa 3'-5' de la T4 DNA polimerasa. En el caso del plásmido, la mezcla de reacción contiene dGTP, mientras que la de los insertos (producto de la amplificación que se describe en el apartado anterior) contiene dCTP (**Tabla 4**). La reacción con la T4 DNA polimerasa se realizó a 12°C por 15 min, y finalmente, la enzima se inactivó con una incubación a 75°C por 20 min.

Debido a la presencia de los extremos monocatenarios de 15 nucleótidos, la circularización ocurre espontáneamente al mezclar el inserto (de la S_{A2}- o de la S_{C10}-RNasa) con el vector. Se tomaron 3 µl de cada una de las reacciones y se mezclaron para transformar bacterias XL10-GOLD de *E. coli* con 5 µl de dicha mezcla. Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (100 µg/ml). La transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* XL10-GOLD se realizó mediante choque térmico (Apéndice 1). Cabe mencionar que las moléculas circulares resultantes no requieren la reacción de ligado *in vitro* para permitir una transformación bacteriana eficiente (Aslanidis y de Jong, 1990).

Tabla 4. Mezclas de reacción para generar los extremos monocatenarios tanto en el vector como en los insertos.

Componente	Volumen (µl)
Buffer de reacción (10x)	2.5
dGTP (1 mM) ^a / dCTP (1 mM) ^b	2.5
DNA	1.5
T4 DNA polimerasa (New England BioLabs)	0.3
Agua	18.2

(a) La mezcla de reacción para el plásmido contiene dGTP; mientras que para el inserto dCTP (b).

Para corroborar la clonación de los insertos, se seleccionaron cinco colonias transformantes y se crecieron en medio Luria-Bertani (LB) con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml (LB-Amp). De cada cultivo se tomaron 0.5 µl y se usaron directamente como molde para la mezcla de reacción de amplificación por PCR (**Tabla 5**), los oligonucleótidos SA2-F y SA2-R

para S_{A2} -RNasa, y SC10-F y SC10-R para S_{C10} -RNasa (**Tabla 1**) y las condiciones para esta reacción se muestran en la **Tabla 6**. Finalmente, los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 5. Mezcla de reacción para PCR usando *Tempase Master Mix* (Ampliqon).

Componente	Volumen (μ l)
Tempase Master Mix (2x)	5.0
Oligonucleótido sentido (10 μ M)	0.5
Oligonucleótido antisentido (10 μ M)	0.5
DNA molde	0.5
Agua, libre de nucleasas	3.5

Tabla 6. Condiciones de PCR para la amplificación de la secuencias de cDNA de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa a partir de células en medio LB-Amp.

Paso	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo	No. de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	30 s	30
Alineamiento	60	30 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	1	1

Para corroborar que los plásmidos contuvieran los insertos correspondientes a cada alelo de la S-RNasa, se purificó el DNA plasmídico (protocolo descrito en el Apéndice 1) de dos colonias con cada una de las construcciones generadas en pMCSG53 (pMCSG53: S_{A2} -RNasa y pMCSG53: S_{C10} -RNasa) y se digirieron con las enzimas de restricción *Nde*I y *Eco*RI por separado.

El plásmido pMCSG53 contiene un sitio de restricción *Not*I, uno *Eco*RI y uno *Nde*I flanqueando la región en donde se integran los insertos (**Figura 5**). Por otro lado, la S_{A2} -RNasa contiene un sitio de restricción de *Nde*I (**Figura 1a**), mientras que la S_{C10} -RNasa contiene un sitio de

restricción de *EcoRI* y uno de *NdeI* (**Figura 1b**). Con base en los mapas de las construcciones esperadas (**Figura 6a y b**), la digestión con *NdeI* produciría dos fragmentos en ambas construcciones (pMCSG53:S_{A2}-RNasa: 4833 y 584 pb; pMCSG53:S_{C10}-RNasa: 4830 y 569 pb), y la digestión con *EcoRI* linearizaría al plásmido pMCSG53:S_{A2}-RNasa y produciría dos fragmentos (4853 y 546 pb) sobre pMCSG53:S_{C10}-RNasa, corroborando y distinguiendo así la clonación de las dos variantes alélicas.

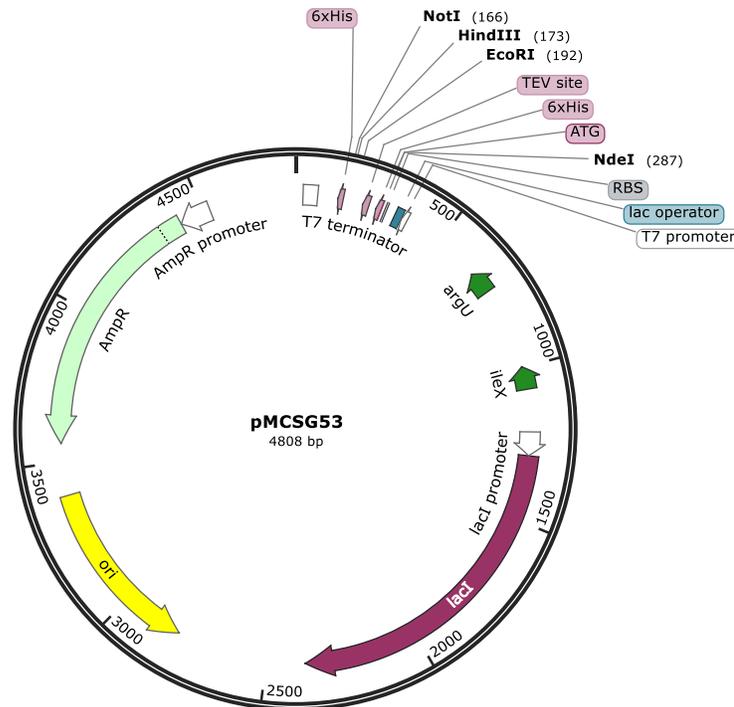


Figura 5. Mapa físico del plásmido pMCSG53. Es un vector de 4808 pb que para la selección de las células transformantes contiene el gen de resistencia a ampicilina (AmpR). El sitio de clonación se encuentra entre el promotor y el terminador T7, quedando así la expresión del gen de interés bajo el promotor T7, regulado por el operador *lac*. Dependiendo de lo que se desee, el gen de interés podría codificar una proteína con una etiqueta de 6 histidinas (6xHis) hacia el amino o el carboxilo terminal. En caso de que quede en el amino terminal, la etiqueta puede eliminarse por la proteasa TEV, cuyo sitio de corte está codificado río abajo de la etiqueta 6xHis. Fuente: Argonne National Laboratory.

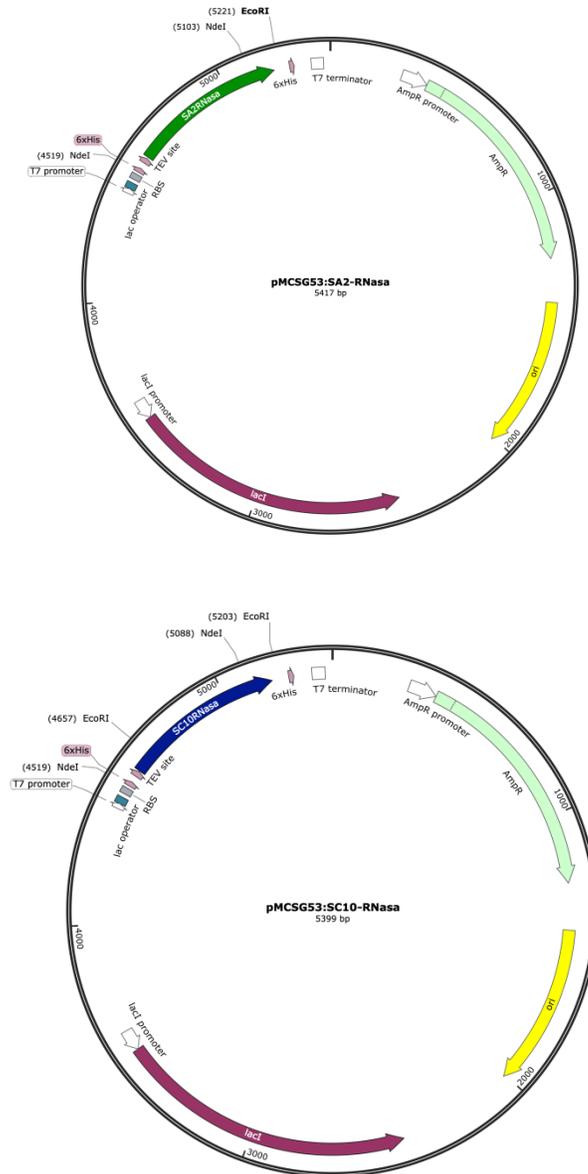


Figura 6. Mapas físicos de las construcciones generadas para la clonación de las S-RNasas (a: pMCSG53:SA₂-RNasa; y b: pMCSG53:SC₁₀-RNasa). a. Se indican los dos sitios de restricción *NdeI* (uno interno a 511 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido y otro a 73 pb río arriba del gen) y uno de *EcoRI* (a 23 pb río abajo del gen). b. Se indican los dos sitios de restricción *NdeI* (uno interno a 499 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido y otro a 70 pb río arriba del gen) y dos de *EcoRI* (uno interno a 68 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido y otro a 23 pb río abajo del gen).

Finalmente, se obtuvo la secuencia de una clona de pMCSG53:S_{A2}-RNasa y de una de pMCSG53:S_{C10}-RNasa, las cuales se compararon con las secuencias reportadas para cada una en la base de datos del Gene Bank del NCBI (U45957 correspondiente a la S_{A2}-RNasa, y U45959 correspondiente a la S_{C10}-RNasas).

Clonación de las secuencias que codifican la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa en pMAL-p5x en células de *E. coli* XL10-GOLD

Para generar las construcciones moleculares pMAL-p5x:S_{A2}-RNasa y pMAL-p5x:S_{C10}-RNasa se amplificaron las secuencias S_{A2}- y S_{C10}-RNasa por PCR usando como molde a las secuencias correspondientes clonadas en el vector pMCSG53. Para amplificarlas se utilizaron los oligonucleótidos pMAL_SRN-F y pMAL_SRN-R (**Tabla 1**). En ambos casos se utilizó la mezcla de reacción de la **Tabla 2** y las condiciones de PCR de la **Tabla 3**.

Tanto los productos de amplificación como el plásmido pMAL-p5x se digirieron con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII* y se purificaron para llevar a cabo la reacción de ligado. Para la reacción de ligado, tanto para S_{A2}-RNasa como para S_{C10}-RNasa, se hizo una mezcla de reacción con el plásmido linealizado y el inserto digerido en una proporción 1:3 con 1 µl de T4 DNA ligasa (1 U/µl) en el amortiguador de reacción (20 µl de volumen final), y se incubó por 12-16 h a 22°C. Se utilizaron 5 µl de la reacción de ligado para la transformación células de *E. coli* XL10-GOLD mediante choque térmico (Apéndice 1). Las células transformantes se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (100 µg/ml).

Para corroborar la clonación de los insertos se seleccionaron cinco colonias transformantes y se crecieron en medio LB-Amp. De cada cultivo se tomaron 0.5 µl y se usaron como molde para la mezcla de reacción de amplificación por PCR (**Tabla 3**), se usaron los oligonucleótidos pMAL_SRN-F y pMAL_SRN-R (**Tabla 1**) para ambos alelos y se siguieron las condiciones de PCR de la **Tabla 4**. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Para corroborar que los plásmidos contuvieran los insertos correspondientes a cada alelo de la S-RNasa, se purificó el DNA plasmídico (protocolo descrito en el Apéndice 1) de dos colonias con cada una de las construcciones generadas en pMAL-p5x (pMAL-p5x:S_{A2}-RNasa y pMAL-p5x:S_{C10}-RNasa) y se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *EcoRI*

simultáneamente. De acuerdo con el mapa de pMAL-p5x (**Figura 7**) y de las construcciones pMAL-p5x:S_{A2}-RNasa (**Figura 8a**) y pMAL-p5x:S_{C10}-RNasa (**Figura 8b**), esta doble digestión linealizaría al plásmido vacío, de pMAL-p5x:S_{A2}-RNasa se esperarían dos fragmentos (5805 y 599 pb) y tres fragmentos (5802, 431 y 153 pb) de la construcción pMAL-p5x:S_{C10}-RNasa.

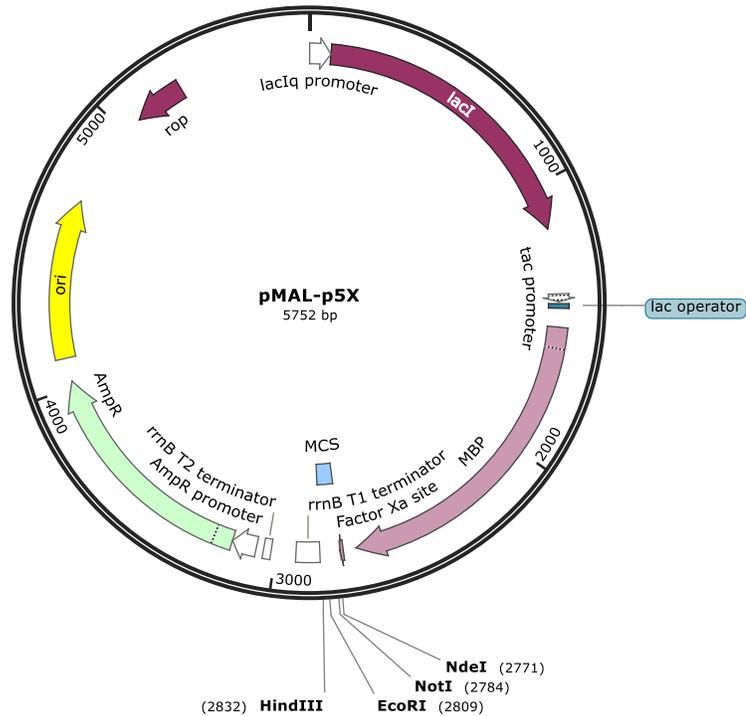


Figura 7. Mapa físico del vector pMAL-p5x. Es un plásmido de 5752 pb que para la selección de las células transformantes contiene el gen de resistencia a ampicilina (*AmpR*). Este vector está diseñado para producir la proteína de interés fusionada a la proteína de unión a maltosa (MBP), la cual se puede liberar mediante la proteasa Factor Xa. El sitio de clonación se encuentra entre la MBP y el terminator *rrnB* T1. La transcripción del gen de fusión está controlada por el promotor inducible “*tac*” (P_{tac}), por lo que la expresión basal de éste se minimiza al unir el represor Lac al operador *lac*, que se encuentra río abajo de P_{tac} . Secuencia obtenida de New England Biolabs.

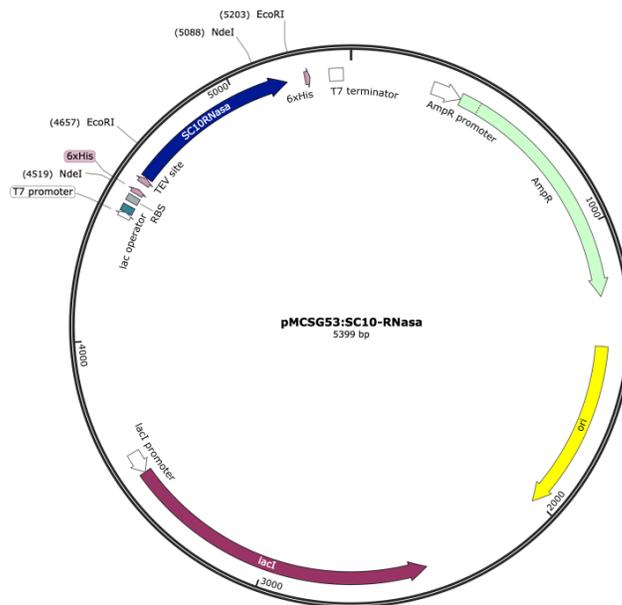
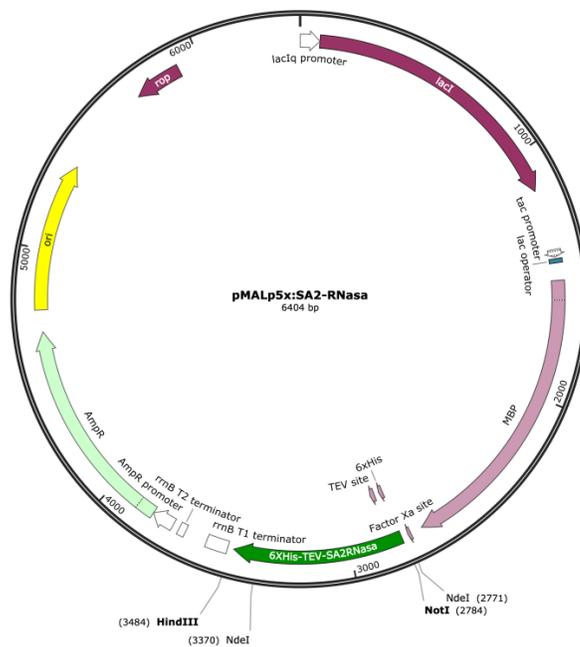


Figura 8. Mapas físicos de las construcciones generadas en pMAL-p5x con S_{A2} -RNasa y S_{C10} -RNasa. a. pMAL-p5x: S_{A2} -RNasa indicando los dos sitios de restricción *NdeI* (uno interno a 511 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido y otro a 68 pb río arriba del gen). b. pMAL-p5x: S_{C10} -RNasa, indicando los dos sitios de restricción *NdeI* (uno interno a 499 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido y otro a 85 pb río arriba del gen) y uno de *EcoRI* (interno a 68 pb a partir del codón que corresponde al primer aminoácido).

Sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2}- y S_{C10}-RNasa en la cepa de *E. coli* BL21(RIL) clonadas en los plásmidos pMCSG53 y pMAL-p5x

Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21(RIL) por choque térmico (Apéndice 1) con las construcciones pMCSG53:S_{A2}-RNasa, pMAL-p5x:S_{A2}-RNasa, pMCSG53:S_{C10}-RNasa y pMAL-p5x:S_{C10}-RNasa purificadas a partir de las colonias de *E. coli* XL10-GOLD que mostraron tener las secuencias adecuadamente.

Para inducir la sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2}- y S_{C10}-RNasa, ya sea clonadas en pMCSG53 o en pMAL-p5x, se siguió el protocolo que a continuación se describe:

1. Inocular 5 ml de 2xYTA (Apéndice 2) con ampicilina (100 µg/ml) e incubar a 37°C con agitación por 12-16 h (precultivo).
2. Inocular 30 ml de 2xYTA con ampicilina (100 µg/ml) en un matraz de 125 ml con 300 µl del precultivo e incubar a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5.
3. Agregar 30 µl de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 100 mM (concentración final: 0.1 mM) y continuar la incubación por 3 h a 37°C o por 20 h a 16°C.
4. Centrifugar a 8,000 rpm por 10 min a 4°C y decantar.
5. Resuspender el botón celular con 1.5 ml de amortiguador salino de fosfatos (PBS) previamente enfriado a 4°C. El botón resuspendido se almacenó a -70°C hasta su uso.

La extracción de las proteínas totales de células bacterianas se hizo con el siguiente protocolo:

1. Si las células se almacenaron a -70°C, se deben descongelar a temperatura ambiente manteniéndolas siempre en frío.
2. Lisar las células por sonicación.
3. Agregar tritón X-100 al 20% para una concentración final del 1% e incubar en hielo con agitación por 30 min.
4. Centrifugar a 10,000 rpm por 10 min 4°C.
5. Transferir el sobrenadante (fracción soluble) a un tubo nuevo, y resuspender el botón (fracción insoluble) con 1.5 ml de PBS previamente enfriado a 4°C. Ambas fracciones se pueden almacenar a -70°C hasta su uso.

Sobreexpresión de S_{A2}- y S_{C10}-RNasa recombinantes en células de *E. coli* pGro7

Utilizando las construcciones de ambas variantes alélicas de la S-RNasa en los vectores pMCSG53 y pMAL-p5X se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* pGro7 mediante choque térmico. Esta cepa contiene el plásmido pGro7 que contiene los genes que codifican las chaperonas GroEL y GroES, cuya expresión está regulada por el promotor de *AraBAD*, el cual se induce con L-arabinosa. De esta forma, se siguió el mismo protocolo de sobreexpresión que se detalla en el apartado anterior, con la excepción de que el precultivo es en medio 2xYTA con ampicilina (100 µg/ml) y cloranfenicol (34 µg/ml). Para la sobreexpresión se utilizó medio 2xYTA con ampicilina (100 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml) y L-arabinosa (0.5 mg/ml), y una vez alcanzada la DO₆₀₀ de 0.5, se agregó IPTG a una concentración final de 0.1 mM.

Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes

Las proteínas del extracto total primero se solubilizaron en amortiguador de muestra [amortiguador 6X: Tris-HCl 0.28 M, pH 6.8, glicerol al 30% (v/v), dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% (p/v), ditionitrotol (DTT) 0.5 M y azul de bromofenol al 0.0012 % (p/v)] y se desnaturalizaron por incubación a 95°C por 10 min. Después se atemperaron y se cargaron en geles de poliacrilamida al 12.5% con SDS (SDS-PAGE) (preparación de geles descrita en el Apéndice 2) y se realizó la electroforesis.

Una vez concluida la electroforesis, las proteínas de los geles fueron teñidas con azul brillante de Coomassie. Para los ensayos de Western-blot, al finalizar el SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de polivinil difluoruro (PVDF). Para esto, al finalizar la electroforesis se lavó el gel con agua destilada y se sumergió en amortiguador de transferencia (Apéndice 2) con agitación suave por 10 min. Se hizo la electrotransferencia a la membrana utilizando el sistema semiseco a 10V por 30 min. Posteriormente, la inmunodetección de las proteínas recombinantes se realizó utilizando los anticuerpos primarios anti-6xHis (policlonal; 1:10,000), anti-S_{A2}-RNasa (policlonal; 1:5,000) y anti-S_{C10}-RNasa (monoclonal; 1:5,000). Ambos anticuerpos para las S-RNasas fueron donados por el laboratorio del Dr. Felipe Cruz García (Facultad de Química, UNAM).

El protocolo que se siguió para la inmunodetección de las proteínas recombinantes es el que se muestra a continuación:

1. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (leche descremada al 5% y Tween-20 al 0.1% en PBS) por 1 h con agitación suave a temperatura ambiente.
2. Retirar la solución de bloqueo y agregar el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo e incubar con agitación suave por 12-16 h a 4 °C.
3. Retirar la solución con el anticuerpo primario y lavar la membrana con PBS dos veces. El primer lavado de 5 min y el segundo de 10 min a temperatura ambiente.
4. Agregar el anticuerpo secundario (anti-conejo para los primarios policlonales y anti-ratón para el monoclonal; ambos con fosfatasa alcalina conjugada) diluido en solución de bloqueo (1:10,000) e incubar al menos por 1 h con agitación suave a temperatura ambiente.
5. Retirar la solución del anticuerpo secundario y lavar 3 veces con PBS por 10 min cada lavado.
6. Incubar con amortiguador alcalino (Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5, NaCl 0.1 M y MgCl₂ 0.05 M) por 10 min con agitación suave a temperatura ambiente.
7. Agregar los sustratos de la fosfatasa alcalina [18.75 mg/mL cloruro de azul de nitro tetrasolio (NBT), 9.4 mg/mL de sal de toluidina de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en 67% de DMSO] e incubar hasta la aparición de las bandas.
8. Detener la reacción de revelado lavando la membrana con agua desionizada.

Resultados

Generación de las construcciones pMCSG53: S_{A2} - y S_{C10} -RNasa

Debido a que el gen de la S-RNasa en todas sus variantes alélicas contiene al menos un intrón, se decidió clonar las secuencias que codifican la proteína madura de los alelos S_{A2} y S_{C10} de la S-RNasa de *N. alata* a partir del cDNA de estilos de *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ y $S_{C10}S_{C10}$, respectivamente. Estas secuencias se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos diseñados para la clonación de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa en pMCSG53 (Tabla 1). Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (Figura 9). El tamaño esperado del producto del alelo S_{A2} es de 603 pb, mientras que el del alelo S_{C10} es de 588 pb.

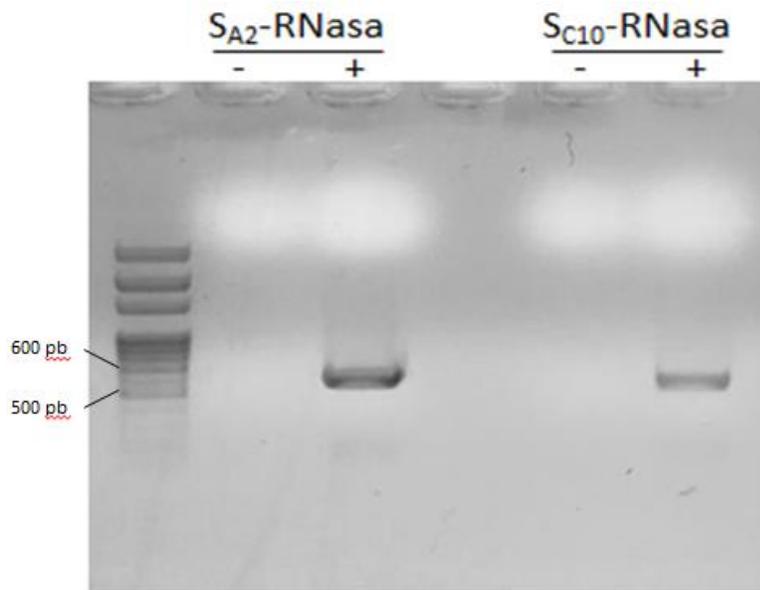


Figura 9. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de los productos de la amplificación por PCR del cDNA de los alelos S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa (+). Para los controles (-) no se les agrega el cDNA total a la mezcla de reacción.

Se purificó el producto de la amplificación por PCR a partir del gel. Sin embargo, la cantidad de los productos de la amplificación no fue suficiente, por lo que se utilizaron como molde para una segunda reacción de amplificación. El resultado se analizó por electroforesis en gel de agarosa (Figura 10) y el DNA se purificó del gel.

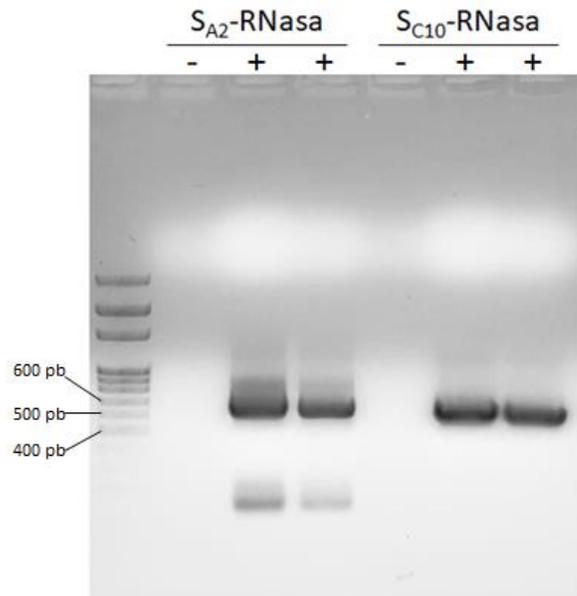


Figura 10. Análisis por electroforesis de la segunda amplificación de los cDNA de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa tomando como molde los productos de amplificación de la **Figura 9**. Como controles (-) se utilizó la mezcla de reacción sin agregar DNA molde.

Para generar los plásmidos $pMCS:S_{A2}$ -RNasa y $pMCS:S_{C10}$ -RNasa se siguió el protocolo LIC, como se describe en Materiales y métodos, y con ellos se transformó *E. coli* XL10GOLD por choque térmico. De las colonias transformantes se probaron cinco correspondientes a cada alelo (**Figura 11**), las cuales se evaluaron por PCR, utilizando los oligonucleótidos SA2-F y SA2-R para la S_{A2} -RNasa, y SC10-F y SC10-R para la S_{C10} -RNasa (**Tabla 1**).

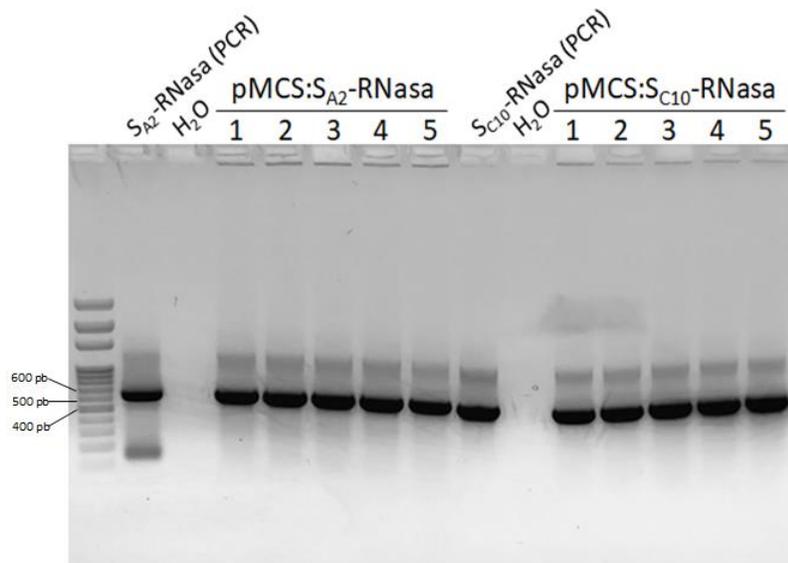


Figura 11. Corroboración de la clonación de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasas en el plásmido pMCSG53 (pMCS: S_{A2} -RNasa y pMCS: S_{C10} -RNasa, respectivamente) a partir de 5 colonias de cada una (1-5). $S_{A2/C10}$ -RNasa (PCR): control en el que el molde que se utilizó fue el producto de PCR purificado y que se usó para generar los insertos para la clonación en pMCSG53; H_2O : control en el que no se agregan células ni DNA a la mezcla de reacción.

Para corroborar que los plásmidos contienen los insertos de los alelos S_{A2} y S_{C10} de la S-RNasa, se purificó el DNA plasmídico de dos colonias de cada una y se analizaron por digestión con las enzimas *NdeI* o *EcoRI* (**Figura 12**). Tanto en la construcción pMCSG53: S_{A2} -RNasa como en la pMCSG53: S_{C10} -RNasa hay dos sitios de restricción *NdeI* flanqueando el inserto (**Figura 6**), por lo que se espera que al digerir con esta enzima de restricción se libere un fragmento de 584 pb y 569 pb de cada una de las construcciones, respectivamente (**Figura 12a**). La secuencia de la S_{A2} -RNasa no contiene sitios de restricción *EcoRI*, mientras que la secuencia de la S_{C10} -RNasa contiene uno (**Figura 1**). Por otro lado, el plásmido pMCSG53 presenta un sitio de restricción de *EcoRI* por lo que con la digestión con dicha enzima se espera que en el primer caso se vea una banda que corresponde al plásmido recombinante linealizado y en el segundo, una banda de 4853 pb y otra de 546 pb (**Figura 12b**).

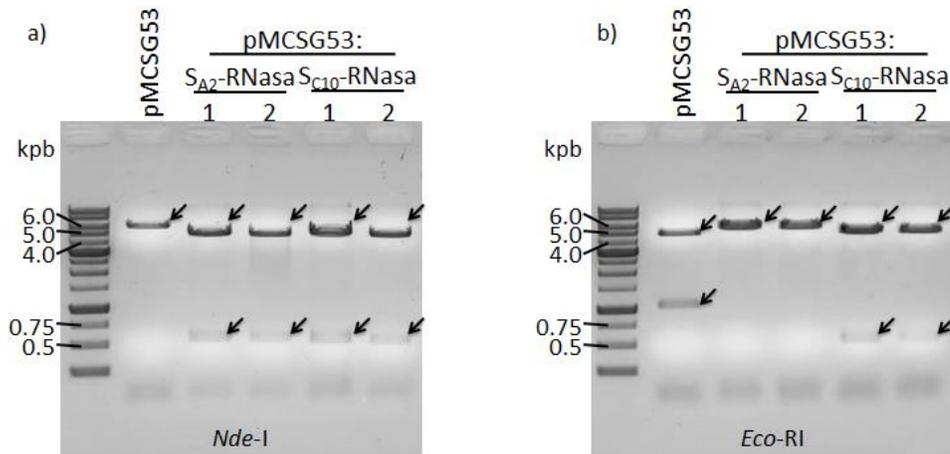


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de la digestión de los plásmidos pMCSG53- S_{A2} y pMCSG53- S_{C10} con las enzimas de restricción *Nde*I o *Eco*RI. a) Digestión con *Nde*I; el primer carril presenta la digestión del plásmido pMCSG53 vacío, los carriles 2 y 3 presentan la digestión del plásmido pMCSG53- S_{A2} , y los carriles 4 y 5 presentan la digestión del plásmido pMCSG53- S_{C10} . b) Digestión con *Eco*RI; el primer carril presenta la digestión del plásmido pMCSG53 vacío, los carriles 2 y 3 presentan la digestión del plásmido pMCSG53- S_{A2} , y los carriles 4 y 5 presentan la digestión del plásmido pMCSG53- S_{C10} .

Los resultados de las **Figuras 11** y **12** indican que se clonaron ambas variantes alélicas en el plásmido pMCSG53, por lo que finalmente se obtuvieron las secuencias y se compararon con las reportadas en la base de datos. Las secuencias de la colonia 1 de la S_{A2} -RNasa y de la colonia 4 de la S_{C10} -RNasa no mostraron ninguna mutación (**Figura 13**), por lo que con ellas se continuó el trabajo.

```

SA2RNasa -----GATTTTGATTACATGCAACTCGTTTTAACATGGCCGGCATCATTTTGTTACCCTAAAAATTTTGTAGCAGAAATAGCTCAA 82
SA2.1 TACTTCCAAATCCAAATGCGGATTTGATTACATGCAACTCGTTTTAACATGGCCGGCATCATTTTGTTACCCTAAAAATTTTGTAGCAGAAATAGCTCAA 100
*****

SA2RNasa AAAACTTTACGATTTCATGGGCTTTGGCCGGACAAGGTGCGCGGACGCTGCGAGTTCTGCACCTCCGAAAAAGTATGTAACCTTTGCACAGGATAGTCCCTAT 182
SA2.1 AAAACTTTACGATTTCATGGGCTTTGGCCGGACAAGGTGCGCGGACGCTGCGAGTTCTGCACCTCCGAAAAAGTATGTAACCTTTGCACAGGATAGTCCCTAT 200
*****

SA2RNasa ACTCGATGATCTGGACCACCACCTGGATGCAATTAAGTACCATGCGACTTCGGTTTAGAAAATCAATTTCTCTGGAGAGGTCAATACAAAAGCATGGA 282
SA2.1 ACTCGATGATCTGGACCACCACCTGGATGCAATTAAGTACCATGCGACTTCGGTTTAGAAAATCAATTTCTCTGGAGAGGTCAATACAAAAGCATGGA 300
*****

SA2RNasa ACGTGTGTATTCCGGCTATAATCAGATGCAATATTTTTACTAGCTATGAGACTAAAAGATAAGTTTGATCTTTTGGCAACTCTCAGAACTCATGGAA 382
SA2.1 ACGTGTGTATTCCGGCTATAATCAGATGCAATATTTTTACTAGCTATGAGACTAAAAGATAAGTTTGATCTTTTGGCAACTCTCAGAACTCATGGAA 400
*****

SA2RNasa TTACTCCTGGAAACAAGCATACTTAATGAAACCCGAGATGCCATCAAGACGGTTACTAATCAAGTGGATCCGGACCTGAAAGTGGCTGGAACATATCAA 482
SA2.1 TTACTCCTGGAAACAAGCATACTTAATGAAACCCGAGATGCCATCAAGACGGTTACTAATCAAGTGGATCCGGACCTGAAAGTGGCTGGAACATATCAA 500
*****

SA2RNasa AGGGGTACGGGAACCTATAGATAGGCATAATTTTACCOCGACGGCCGATAGTTTTTTCATGTCTCACAGTAACACATGTGATGAAACGGGCATT 582
SA2.1 AGGGGTACGGGAACCTATAGATAGGCATAATTTTACCOCGACGGCCGATAGTTTTTTCATGTCTCACAGTAACACATGTGATGAAACGGGCATT 600
*****

SA2RNasa ACGAAGATTTTGTTCGGACGATGA----- 606
SA2.1 ACGAAATTTTGTTCGGACGATAACATTGGAAGTGGATAA 640
*****

SC10RNasa -----GCATTCGAGTACATGCAACTGGTTTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCCTCCCTGCAAAASAATTCCCAAACTTTA 85
SC10.4 TACTTCCAAATCCAAATGCGCTTCGAGTACATGCAACTGGTTTACAATGGCCAACAGCTTTTTGCCACACCCTCCCTGCAAAASAATTCCCAAACTTTA 100
*****

SC10RNasa CAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACTCTCAATTAAGTCCGCTGCCAAAGAAAACCTTAAAAATATAGAAGTGCACGAAAAAAGATGA 185
SC10.4 CAATCCATGGGCTTTGGCCGGATAACGTGAGCACAACTCTCAATTAAGTCCGCTGCCAAAGAAAACCTTAAAAATATAGAAGTGCACGAAAAAAGATGA 200
*****

SC10RNasa TCTATATAAACGCTGGCCAGACCTAACACCAGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCAAAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGCAGGAAAGTGTGT 285
SC10.4 TCTATATAAACGCTGGCCAGACCTAACACCAGCAGAAACATATTGTAAGCAACATCAAAATTTCTGGAGACATGAATATAATAAGCAGGAAAGTGTGT 300
*****

SC10RNasa TCAGAGAGCTACAACCGAGAACAAATTTTGATTTAGCCATGGCCTTAAAAGACAAGTTTGATCTTTTGTTCATCTTTGAGAAATCACGGAATATTCCTG 385
SC10.4 TCAGAGAGCTACAACCGAGAACAAATTTTGATTTAGCCATGGCCTTAAAAGACAAGTTTGATCTTTTGTTCATCTTTGAGAAATCACGGAATATTCCTG 400
*****

SC10RNasa GAAGGGGAATGAAATACACCGTTTCAGAAAATCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACCTAAAGGAATATGGAAC 485
SC10.4 GAAGGGGAATGAAATACACCGTTTCAGAAAATCAATAGCACCATCAAGAAAATAACTCAAGGGTATCCTAACCTGTCATGCACCTAAAGGAATATGGAAC 500
*****

SC10RNasa TGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTAATTGTCCTCATCCCAAGACATGCAAACTACGGGAAGTAAAGATTAAAGTTT 585
SC10.4 TGTGGAGATAGGCATATGTTTCGACTCGATGGTTAAAAATGTAATTAATTGTCCTCATCCCAAGACATGCAAACTACGGGAAGTAAAGATTAAAGTTT 600
*****

SC10RNasa CCATGA----- 591
SC10.4 CCATACATTGGAAGTGGATAA 622
*****

```

Figura 13. Secuencias de la S_{A2} - y S_{C10} -RNasas y de las construcciones generadas con el plásmido pMCSG53. Subrayado se muestran las secuencias complementarias a los oligonucleótidos; en verde, el sitio de restricción *NdeI*; en rojo, el sitio de restricción *EcoRI*; y en morado, los sitios con variaciones pero que son mutaciones silenciosas. Códigos de acceso: U45957 (S_{A2} -RNasa) y U45959 (S_{C10} -RNasa).

Sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2} - y S_{C10} -RNasa en la cepa de *E. coli* BL21(RIL) clonadas en el plásmido pMCSG53

Teniendo confirmada que las secuencias de los plásmidos fueran las correctas, con los plásmidos pMCSG53: S_{A2} -RNasa de la colonia 1 (pMCSG53: S_{A2} -RNasa-1) y pMCSG53: S_{C10} -RNasa de las colonias 2 y 4 (pMCSG53: S_{C10} -RNasa-2 y pMCSG53: S_{C10} -RNasa-4, respectivamente) se transformaron células de *E. coli* BL21(RIL). A partir de éstas se hicieron

los ensayos de sobreexpresión utilizando IPTG (0.1 mM) como inductor. La sobreexpresión de las proteínas recombinantes primero se analizó a partir de proteínas totales de las bacterias por medio de SDS-PAGE y Western-blot. Tanto para S_{A2} -RNasa-1 como para S_{C10} -RNasa-4 se observaron en el SDS-PAGE bandas gruesas a la altura de entre 20 y 25 kDa (la masa esperada es de 28 para la S_{A2} -RNasa y de 24 para la S_{C10} -RNasa) a las 4 h de la inducción de la expresión con IPTG (**Figura 14a**), lo que no ocurrió con la S_{C10} -RNasa-2. Con el ensayo de inmunodetección se confirmó que ambas, la S_{A2} -RNasa-1 y la S_{C10} -RNasa-4, se sobreexpresaron (**Figura 14b**). Usando el anticuerpo anti-6xHis se detectó principalmente una banda que corresponde tanto a la S_{A2} -RNasa-1 como a la S_{C10} -RNasa-4 (entre los 20 y los 25 kDa), pero no para la S_{C10} -RNasa-2. Con el anticuerpo anti- S_{A2} -RNasa se detectó principalmente una banda que corresponde a la S_{A2} -RNasa y que corresponde a la misma que se inmunodetectó con el anticuerpo anterior. Con el anti- S_{C10} -RNasa se detectó sólo una banda a la misma altura que con el anticuerpo anti-6xHis, en el extracto de la colonia 4, y que por lo tanto corresponde a la S_{C10} -RNasa. Por esta razón, para los demás ensayos se utilizaron las clonas pMCSG53: S_{A2} -RNasa-1 y pMCSG53: S_{C10} -RNasa-4.

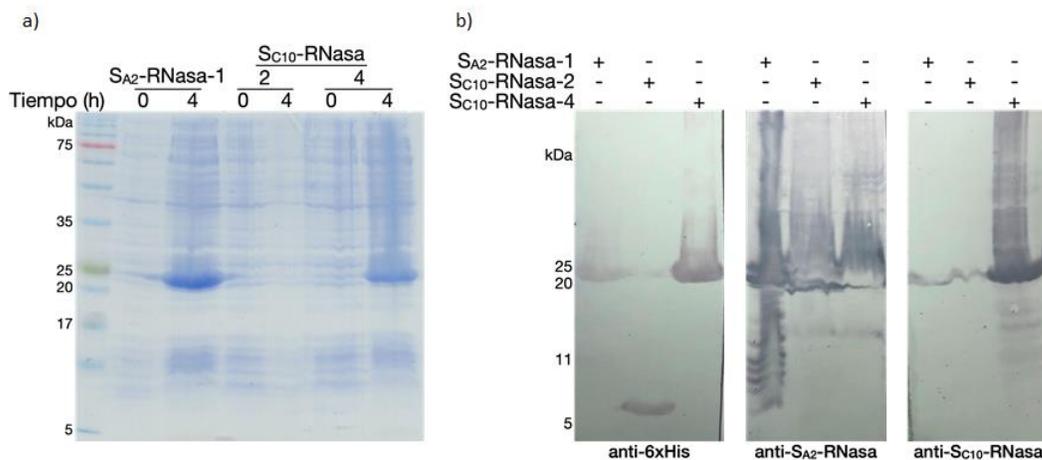


Figura 14. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas S_{A2} - y S_{C10} -RNasa a partir de extractos de proteína total de *E. coli* BL21(RIL) con los plásmidos pMCSG53: S_{A2} -RNasa-1, y pMCSG53: S_{C10} -RNasa-2 o pMCSG53: S_{C10} -RNasa-4 por SDS-PAGE. a) Extractos de proteína total (tinción con azul de Coomassie) a las 0 y a las 4 h de inducción. b) Inmunodetección de las proteínas recombinantes con diferentes anticuerpos (anti-6xHis, anti- S_{A2} -RNasa y anti- S_{C10} -RNasa) en extractos obtenidos a las 4 h de inducción.

Una vez confirmado que las células de *E. coli* BL21(RIL) transformantes sobreexpresan a las proteínas recombinantes, se analizó si se encuentran como proteínas solubles o insolubles. Para esto, después de las 4 h de inducción, las células resuspendidas en PBS se lisaron por sonicación y se centrifugaron, separando así las fracciones soluble (FS) e insoluble (FI), y se

analizaron por SDS-PAGE y Western-blot. Las bandas de aproximadamente 25 kDa que corresponden a la S_{A2} - o a la S_{C10} -RNasa se observan tanto teñidas con azul de Coomassie (**Figura 15a**) como en el ensayo de inmunodetección con los anticuerpos anti- S_{A2} -RNasa (**Figura 15b**) y anti- S_{C10} -RNasa (**Figura 15c**), respectivamente, en la fracción insoluble. Ninguna de estas bandas se observa en las fracciones insoluble ni soluble de los extractos de proteína de células sin transformar.

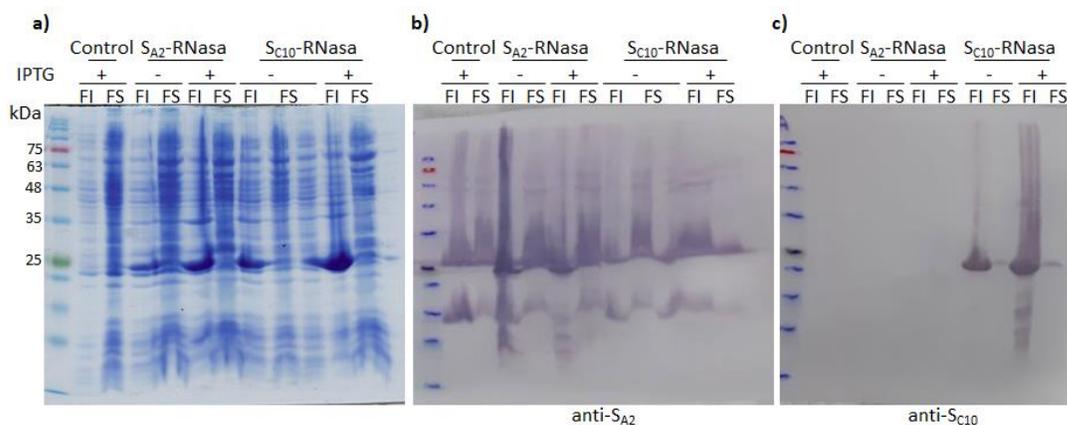


Figura 15. Análisis de la solubilidad de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa recombinantes. Las proteínas se sobreexpresaron en *E. coli* BL21(RIL) y se separó la fracción soluble (FS) de la insoluble (FI). a) Análisis electroforético por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12.5% de las fracciones de proteínas obtenidas después de la inducción por IPTG de las clonas de *E. coli* BL21(RIL) pMCSG53: S_{A2} y pMCSG53: S_{C10} -RNasa. b) Ensayo de Western blot utilizando anticuerpos anti- S_{A2} -RNasa. c) Ensayo de Western blot utilizando anticuerpos anti- S_{C10} -RNasa. En los carriles Control se muestran los extractos de proteínas de *E. coli* BL21(RIL) que fueron tratados con IPTG, pero que no contienen al plásmido pMCSG53. Los carriles (+) representan tratamientos con IPTG, mientras que los carriles (-) no presentan dicho inductor.

Las proteínas recombinantes S_{A2} - y S_{C10} -RNasa fueron insolubles, indicando un plegamiento incorrecto. Además de presentar una conformación no activa (Villaverde y Carrió, 2003), dificultaría en gran medida su purificación, y por lo tanto la obtención de su estructura cristalográfica. Una manera para evitar que las proteínas recombinantes estén en los cuerpos de inclusión es sobreexpresarlas a 16°C para evitar la rápida síntesis de las mismas. En la **Figura 16** se presenta el análisis por SDS-PAGE y por Western-blot de las fases insoluble y soluble de células cuya sobreexpresión se realizó a 16°C por 20 h. Las bandas que corresponden a la S_{A2} - y a la S_{C10} -RNasa recombinantes se observaron en la fracción insoluble (**Figura 16**).

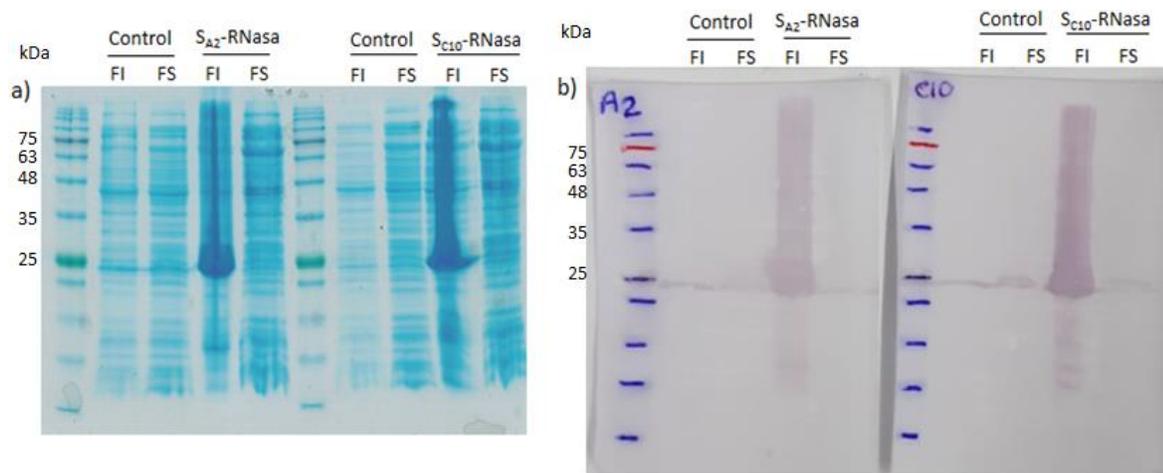


Figura 16. Ensayo de sobreexpresión de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa a 16°C . a) SDS-PAGE de los extractos de proteínas en gel de poliacrilamida al 12.5%, distinguiendo la fase insoluble (FI) de la soluble (FS). b) Western blot de los extractos de proteínas, distinguiendo la fase insoluble (FI) de la soluble (FS). Los controles son extractos de proteína total a partir de células transformantes (con S_{A2^-} o S_{C10^-} -RNasa, respectivamente), sin inducir la expresión con IPTG.

Clonación de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en el plásmido pMAL-p5X

Debido a que las proteínas recombinantes obtenidas a partir de las secuencias clonadas en el vector pMCSG53 se localizaron en la fracción insoluble aun cuando su sobreexpresión se indujo a 16°C , se decidió utilizar el vector pMAL-p5X (**Figura 7**). A partir de este plásmido, la proteína de interés se fusiona al extremo carboxilo de la proteína de unión a maltosa (MBP), que contiene una secuencia líder que la dirige al periplasma de la bacteria.

Las secuencias que codifican la S_{A2^-} y la S_{C10^-} -RNasa se amplificaron por PCR con los oligonucleótidos pMAL_SRN-F y pMAL_SRN-R (**Tabla 1**) usando como molde a las secuencias correspondientes clonadas en el vector pMCSG53 (**Figura 17**). Estos oligonucleótidos se alinean río arriba (sentido) y río abajo (antisentido) de las secuencias codificantes, por lo que son secuencias que comparten ambas construcciones. Tanto los productos de amplificación como el vector pMAL-p5x se digirieron con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII* para después llevar a cabo la reacción de ligado y finalmente, transformar células de *E. coli* XL10-GOLD. Los productos de PCR se confirmaron por

electroforesis en gel de agarosa (**Figura 9**) dando como resultado bandas de 693 y 675 pb, correspondientes a las secuencias S_{A2} -RNasa y S_{C10} -RNasa, respectivamente.

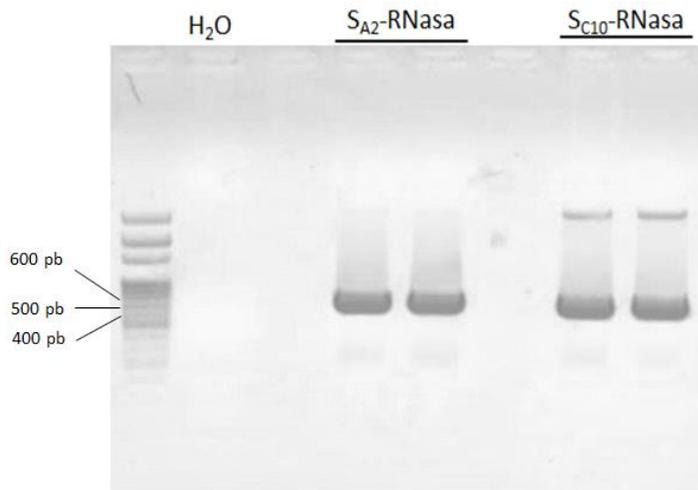


Figura 17. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de las amplificaciones por PCR de las secuencias S_{A2} -RNasa y S_{C10} -RNasa, utilizando los oligonucleótidos necesarios para su clonación en pMAL-p5x.

En la **Figura 18** se muestra el análisis por electroforesis en gel de agarosa del vector pMAL-p5X linealizado y de los productos de PCR digeridos con las enzimas de restricción *NotI* y *HindIII*, cargando el mismo volumen de cada uno.

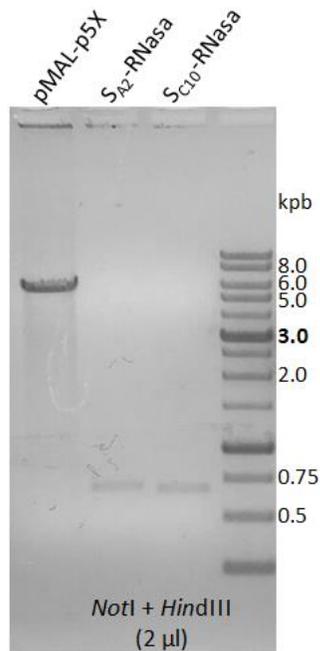


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del plásmido pMAL-p5X y de los insertos S_{A2}- y S_{C10}-RNasa digeridos con *NotI* y *HindIII*. De cada uno se cargaron 2 µl para estimar el volumen a utilizar en la posterior reacción de ligado.

Los fragmentos se ligaron al vector pMAL-p5X para generar las construcciones pMAL-p5X:S_{A2}-RNasa y pMAL-p5X:S_{C10}-RNasa, con las que se transformó *E. coli* XL10-GOLD, y se seleccionaron a las resistentes a ampicilina 100 µg/ml. De las células transformantes sólo una colonia de cinco analizadas mostró tener el plásmido con el inserto que corresponde a la secuencia de la S_{A2}-RNasa (pMAL-p5X:S_{A2}-RNasa-4; **Figura 19a**), y una de 30 mostró tener el de la S_{C10}-RNasa (pMAL-p5X:S_{C10}-RNasa-27; **Figura 19c**).

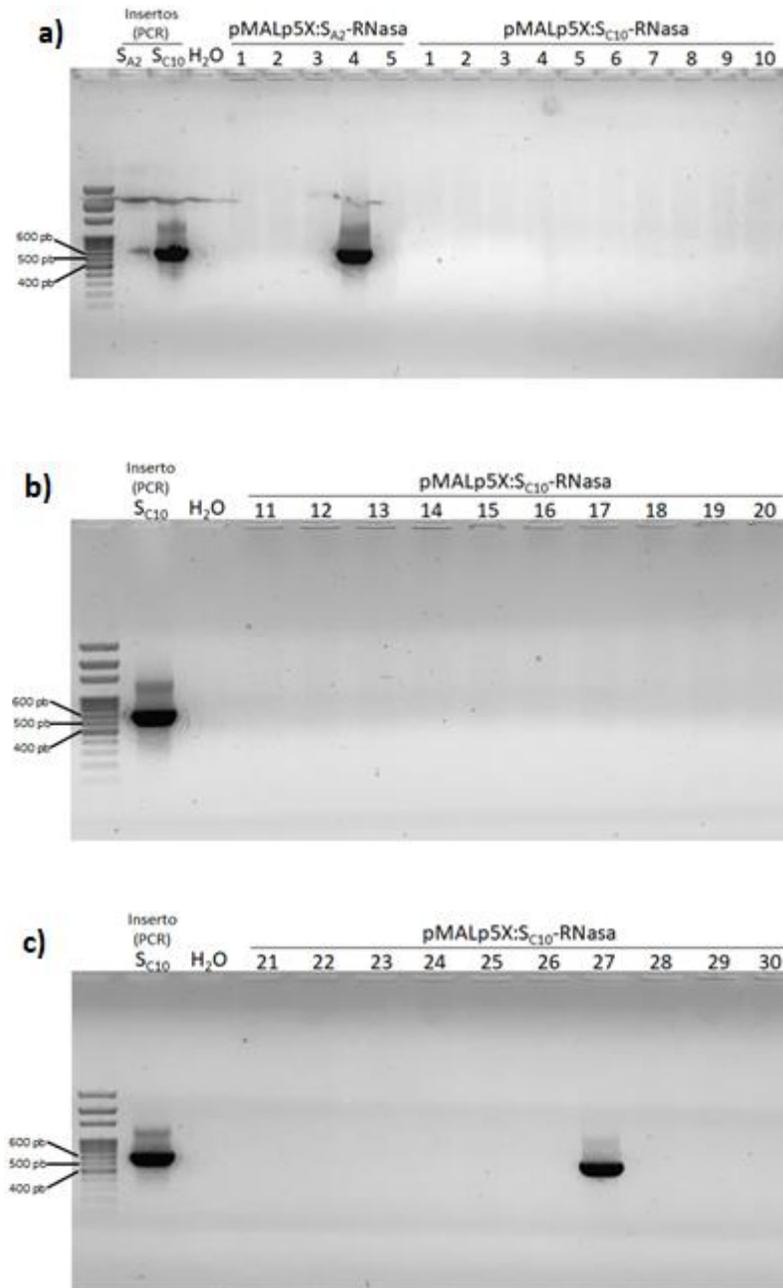


Figura 19. Análisis por electroforesis en gel de agarosa al 1% de las construcciones pMAL-p5X: S_{A2} y pMAL-p5X: S_{C10} obtenidas de las colonias transformantes. a) Los primeros cinco carriles corresponden a las colonias 1 a 5 de las bacterias *E. coli* transformadas con pMAL-p5X: S_{A2} , mientras que los últimos diez carriles corresponden a las colonias 1 a 10 de las bacterias *E. coli* transformadas con pMAL-p5X: S_{C10} . b) Carriles correspondientes a las colonias 11 a 20 de las bacterias *E. coli* transformadas con pMAL-p5X: S_{C10} . c) Carriles correspondientes a las colonias 21 a 30 de las bacterias *E. coli* transformadas con pMAL-p5X: S_{C10}

Los plásmidos pMAL-p5X:S_{A2}-RNasa-4 y pMAL-p5X:S_{C10}-RNasa-27 se purificaron a partir de las bacterias y se analizaron por doble digestión (*Nde*I + *Eco*RI). En el caso de la S_{A2}-RNasa, se esperaban dos fragmentos de esta doble digestión, uno de 5805 pb y otro de 599 pb; en el de la S_{C10}-RNasa se esperaban tres, uno de 5802, uno de 431 y otro de 153 pb. Al separar por electroforesis los productos de la doble digestión de ambos plásmidos se obtuvo el resultado esperado (**Figura 20**).

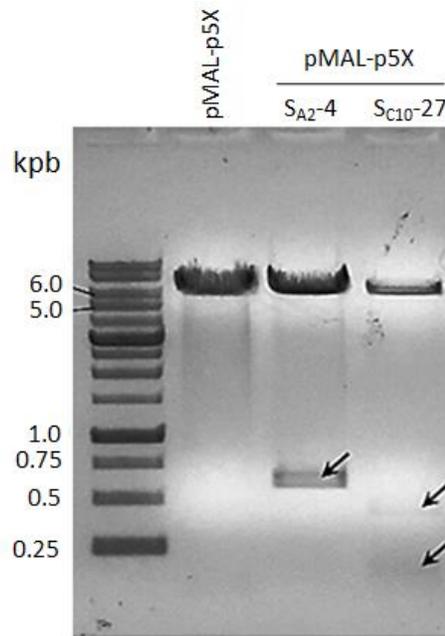


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos provenientes de pMAL-p5X:S_{A2}-RNasa-4 y pMAL-p5X:S_{C10}-RNasa-27 digeridos con *Nde*I + *Eco*RI.

Teniendo confirmado que ambos alelos están clonados en el vector pMAL-p5X, con estas construcciones se transformaron células de *E. coli* BL21(RIL) para llevar su sobreexpresión.

La sobreexpresión de las proteínas recombinantes se realizó a 37°C. Los extractos de proteína (separados en fases soluble e insoluble) se analizaron por SDS-PAGE (**Figura 21**). En el gel se observaron para la S_{A2}-RNasa bandas de 63 kDa, aproximadamente, tanto en la fracción insoluble como en la soluble a las 3 h de inducción. Lo mismo ocurrió para la S_{C10}-RNasa. Sin embargo, por inmunodetección se demostró que la S_{A2}-RNasa fusionada a MBP se encuentra en la fracción insoluble (datos del laboratorio no mostrados).

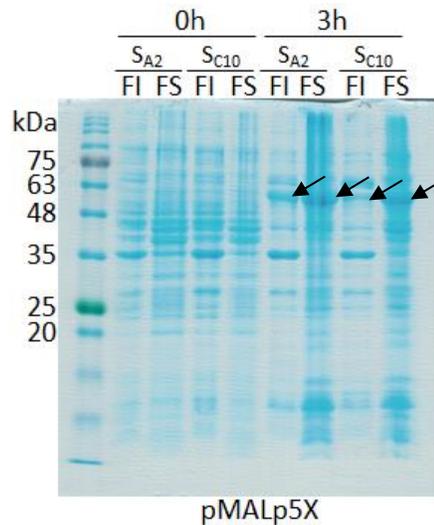


Figura 21. Ensayo de SDS-PAGE de extractos de proteínas de clones pMAL-p5X:SA₂ y pMAL-p5X:SC₁₀ en células de *E. coli* BL21(RIL).

Sobreexpresión de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa en células de *E. coli* pGro7

Las S-RNasas recombinantes se localizaron en los cuerpos de inclusión a pesar de estar fusionadas a una proteína altamente soluble (MBP) y dirigirse al periplasma. Esto se puede deber a un mal plegamiento de las S-RNasas mismas. Por lo tanto, se sobreexpresaron en la cepa de *E. coli* pGro7, que contiene un plásmido que codifica las chaperonas GroEL y GroES, cuya expresión está regulada por el promotor *araBAD*. Este promotor se induce con L-arabinosa, de tal manera que para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes de interés se utiliza L-arabinosa e IPTG.

Se generaron cuatro líneas transformantes de células de *E. coli* pGro7 con las siguientes construcciones: (1) pMCSG53:SA₂-RNasa-1; (2) pMCSG53:SC₁₀-RNasa-4; (3) pMAL-p5X:SA₂-RNasa-4; y (4) pMAL-p5X:SC₁₀-RNasa-27.

En las **Figuras 22 y 23** se muestra el análisis por SDS-PAGE de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes clonadas en el vector pMCSG53 en *E. coli* pGro7. A lo largo del ensayo de sobreexpresión se tomaron alícuotas cada 30 min a partir de la inducción. En la **Figura 22** se observa que una banda a la altura de los 25 kDa aproximadamente, presumiblemente la S_{A2}-RNasa, aparece tanto en la fracción insoluble como en la soluble a partir de los 60 min de inducción y cuya intensidad incrementa a lo largo del tiempo. Sin

embargo, en todos los casos, claramente es más abundante la proteína en la fracción insoluble. Este resultado fue similar al sobreexpresar a la S_{C10} -RNasa (**Figura 23**).

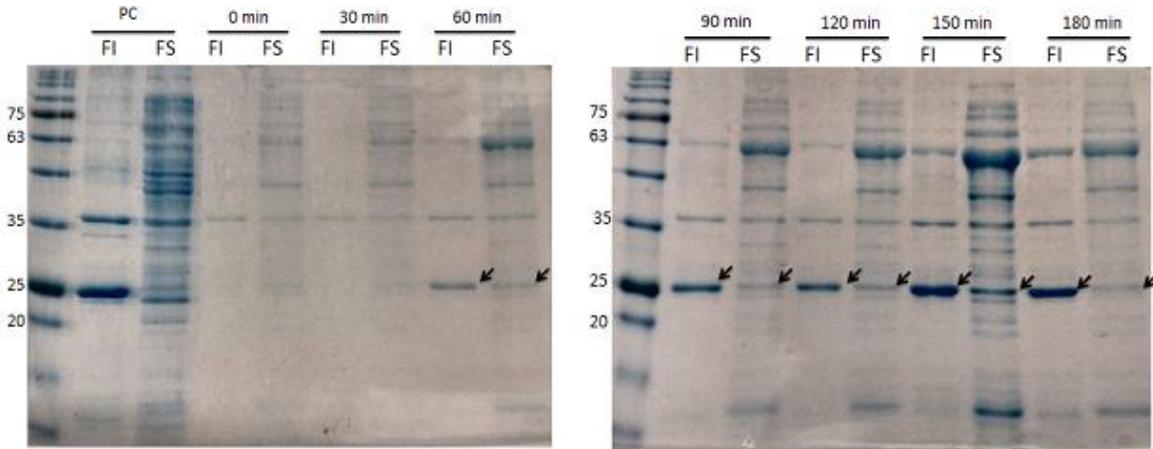


Figura 22. Análisis por SDS-PAGE de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* pGro7 con el vector pMCSG53- S_{A2} a diferentes tiempos. FI: fracción insoluble; FS: fracción soluble.

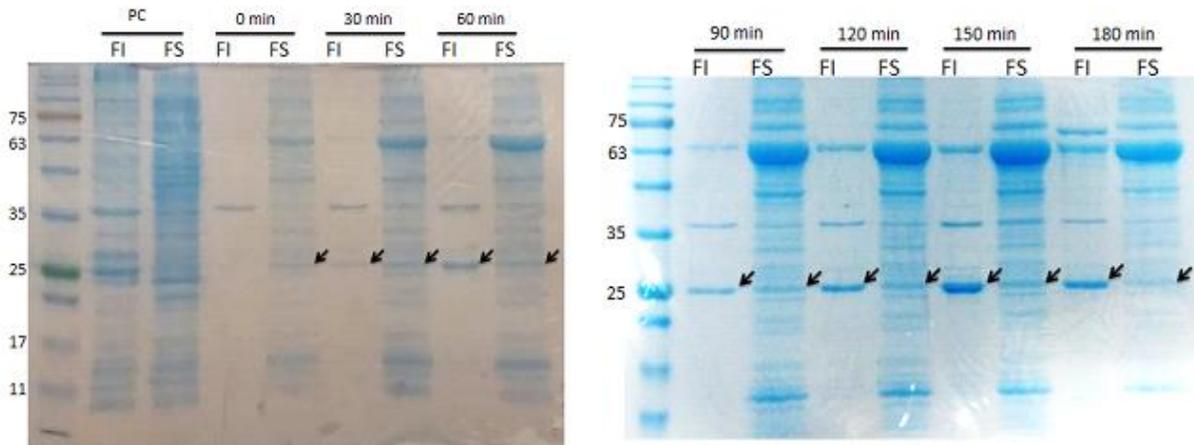


Figura 23. Ensayo de SDS-PAGE de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* pGro7 con el vector pMCSG53- S_{C10} a diferentes tiempos. La banda de 63 kDa corresponde a la chaperona GroEL. FI: fracción insoluble; FS: fracción soluble.

Debido a que con el vector pMCSG53 tanto la S_{A2} - como la S_{C10} -RNasa quedaron como proteínas insolubles, se realizó la sobreexpresión de las mismas pero clonadas en el vector pMAL-p5X. En la **Figura 24** se muestra el análisis por SDS-PAGE de un ensayo de sobreexpresión de la S_{A2} -RNasa a partir del vector pMAL-p5x, y se observa que la proteína de

fusión (MBP-S_{A2}-RNasa = 68.5 kDa) se sobreexpresa a partir de la inducción con IPTG en mayor cantidad conforme pasa el tiempo. Además, esta proteína se encuentra prácticamente sólo en la fracción soluble. En la **Figura 25** se muestra un ensayo de inducción de la sobreexpresión de S_{C10}-RNasa a partir del vector pMAL-p5x, y se observa de igual manera que la proteína de fusión (CSD+MBP=65.28 kDa) se induce a partir del IPTG de forma más abundante conforme pasa el tiempo, además de que la proteína se encuentra prácticamente sólo en la fracción soluble.

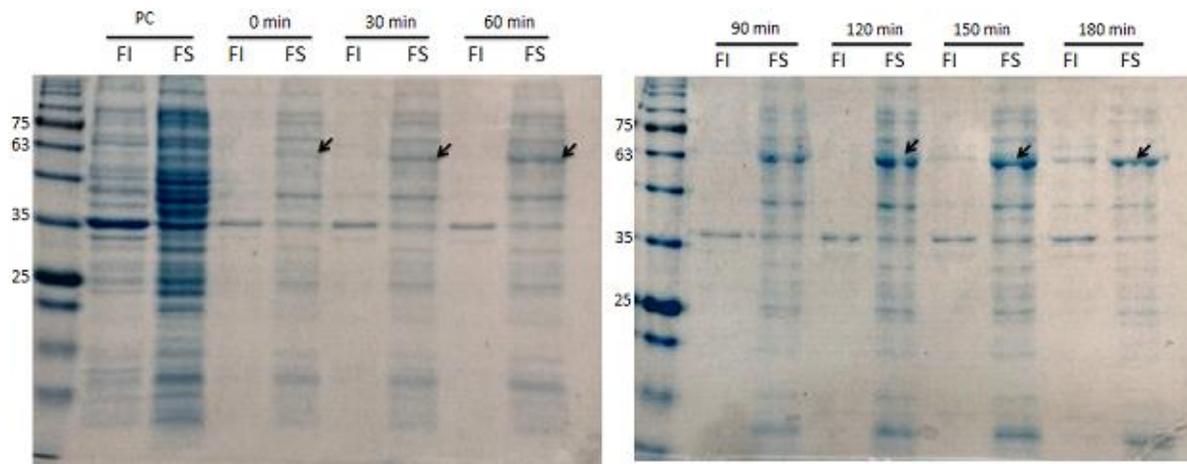


Figura 24. Ensayo de SDS-PAGE de la expresión de S_{A2}-RNasa en diferentes tiempos utilizando células de *E. coli* con el vector pMAL-p5X. a) En los primeros dos carriles se cargaron las fases insoluble y soluble del precultivo, mientras que en el resto de los carriles se muestran las fracciones insoluble y soluble desde el minuto cero después de la inducción con IPTG, hasta los 60 minutos. b) Los carriles muestran las fracciones insoluble y soluble desde los 90 minutos después de la inducción con IPTG, hasta los 180 min.

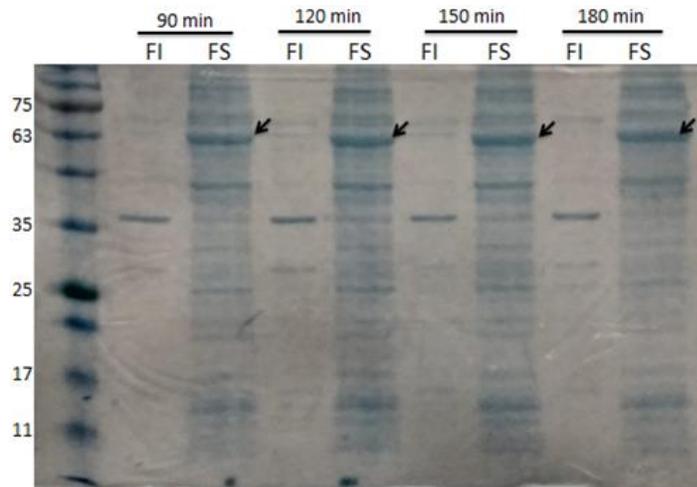


Figura 25. Ensayo de SDS-PAGE de la expresión de S_{C10} en diferentes tiempos utilizando células de *E. coli* con el vector pMAL-p5X. Los carriles muestran las fracciones insoluble y soluble desde los 90 minutos después de la inducción, hasta los 180 minutos.

Discusión

Importancia de la obtención de las S_{A2}- y S_{C10}-RNAsas recombinantes

La disponibilidad de una proteína recombinante, idéntica a su contraparte natural afín en propiedades químicas y biológicas, es una herramienta poderosa para el estudio de la molécula misma (Notomista *et al.*, 1999). Además, en el caso de que la proteína tenga propiedades biológicamente relevantes, la estandarización de un proceso de producción de la proteína recombinante proporciona una fuente más fácil y abundante para diversos análisis bioquímicos, así como para su posible uso comercial (Notomista *et al.*, 1999).

Las bacterias, en especial *E. coli*, son organismos muy utilizados para la producción de proteínas recombinantes, no sólo para la producción a gran escala sino también para trabajos de proteómica y de genética funcional estructural (Yokohama, 2003).

La tecnología de DNA recombinante en estos organismos tiene ya varias décadas, con lo cual se ha desarrollado una gran diversidad de vectores de clonación y de expresión y un amplio espectro de cepas mutantes y procedimientos mutagénicos que permiten la adecuación genética necesaria para cada proceso (Villaverde y Carrió, 2003). Sin embargo, las bacterias son incapaces de llevar a cabo la mayoría de las modificaciones postraduccionales que generalmente son necesarias para el correcto funcionamiento de las proteínas eucariontes.

Por otro lado, las proteínas heterólogas son más propensas a ser degradadas (Enfors, 1992), o bien presentarse en forma insoluble y en estado no funcional, como lo son los cuerpos de inclusión, los cuales son agregados estructuralmente complejos que se forman por la deposición incorrecta de polipéptidos o el mal plegamiento de éstos (Villaverde y Carrió, 2003).

El mal plegamiento es un problema común al expresar proteínas multiméricas, que tienen varios puentes disulfuro y/o contienen grupos prostéticos. Afortunadamente, las bacterias también presentan una gran plasticidad fisiológica que puede utilizarse para mejorar el plegamiento de las proteínas heterólogas, como son la coexpresión de proteínas de plegamiento accesorias (ya sean homólogas o heterólogas), la optimización de las condiciones de crecimiento y el uso de proteínas de fusión (Georgiou y Valax, 1996).

Existen diversas proteínas que, aun presentando puentes disulfuro en su estructura, se han expresado con éxito en *E. coli*. Por ejemplo, con la coexpresión de la proteína DsbC, que es una oxidasa de *E. coli*. (Shevchik, Condemine, y Robert-Baudouy, 1994), se logró la expresión de proteínas heterólogas con puentes disulfuro presentando el 100% de actividad biológica. Entre dichas proteínas se encuentran la fosfatasa alcalina PhoA, la hormona de crecimiento humano hGH, la glucosa-1-fosfatasa Agp, la fracción Fab de anticuerpo anti CD-18 humano, la proteína B rica en cisteína de *Helicobacter pylori*, entre otras (Berkmen, 2012). Las S-RNasas, que son las proteínas que pretendemos obtener en este trabajo, están presentes en concentraciones altas (entre 10 y 50 mg/ml) en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo de las especies de solanáceas (Roalson, 2003), lo cual facilita mucho su purificación. Sin embargo, este trabajo forma parte de un proyecto cuyo objetivo es comparar la estructura terciaria de la variante silvestre de la S-RNasa con una mutante en la que los residuos Cys155 y Cys185, en el caso de la S_{C10}-RNasa madura, y Cys156 y Cys189, en el de la S_{A2}-RNasa madura, sean reemplazados por serina, teniendo así la conformación resultante de la reducción por la NaTrxh y cuya actividad de ribonucleasa es siete veces mayor (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Esta comparación permitirá conocer el cambio estructural necesario para el incremento de dicha actividad, el cual es esencial para el rechazo del polen alelo S específico (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Si bien las S-RNasas son altamente polimórficas, existen cinco regiones conservadas (C1 a C5). C1 y C2 son muy similares a las de otras ribonucleasas. Las regiones C1, C4 y C5 son hidrofóbicas y probablemente no participan en la actividad de ribonucleasa, lo cual sugiere que los residuos que las conforman corresponden al núcleo hidrofóbico de las S-RNasas (Ioerger *et al.*, 1991). En las S-RNasas existen también 19 sitios con alta variabilidad, lo cuales posiblemente están involucrados en la función de reconocimiento en el sistema de autoincompatibilidad basado en S-RNasas. Dentro de éstos, hay dos regiones, HVa y HVb, que concentran la hipervariabilidad. Ambas regiones contienen 12 de los 19 residuos hipervariables y son las regiones más hidrofílicas de las S-RNasas, lo cual concuerda con su posible papel en el reconocimiento del polen alelo S específico (Ioerger *et al.*, 1991).

A partir de la estructura cristalográfica obtenida se determinó que de los nueve residuos de cisteína que contiene la S_{F11}-RNasa (conservados en muchas S-RNasas), se forman cuatro puentes disulfuro (Cys16-Cys21, Cys46-Cys94, Cys153-Cys186 y Cys169-Cys180), quedando libre el residuo Cys95 (Ida *et al.*, 1991).

La S_{C10}-RNasa de *N. alata* contiene 10 residuos de cisteína y el alineamiento con la S_{F11}-RNasa sugiere que, aunque Cys16-Cys21, Cys45-Cys94, Cys155-Cys185 y Cys168-Cys179 están unidos por enlaces disulfuro, Cys77 y Cys95 permanecen libres (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). La pérdida de la actividad de ribonucleasa de la S_{C10}-RNasa después de la reducción inespecífica de las cisteínas por DTT, contrasta con el efecto positivo sobre la actividad de la ribonucleasa después del tratamiento con NaTrxh, en donde el puente disulfuro Cys155-Cys185 es el único blanco de esta tiorredoxina (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Sobreexpresión de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa codificadas en el plásmido pMCSG53 en células de *E. coli* BL21(RIL)

Primero se llevó a cabo la sobreexpresión de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa en células de *E. coli* BL21(RIL), clonadas en el plásmido pMCSG53. Las proteínas recombinantes traducidas a partir de este vector contienen en su extremo amino una etiqueta de seis histidinas (6xHis) seguido por la secuencia que es reconocido por la proteasa TEV. De esta manera, las proteínas recombinantes se purifican por afinidad en una columna de zinc y se puede eliminar la etiqueta 6xHis por un corte proteolítico, dejando así a la proteína con únicamente dos a tres aminoácidos extra en su extremo amino. La expresión de las S-RNasas recombinantes se presentó mayoritariamente de forma insoluble (**Figuras 13 y 14**), lo cual indica que las proteínas presentaron un mal plegamiento, es decir, diferente al nativo, y que posiblemente se encuentren formando cuerpos de inclusión (CI). Los CI son proteínas densas, esféricas y agregadas, formadas principalmente en el citosol de procariontes debido a la sobreexpresión de proteínas heterólogas (Kumar, 2011; Krachmarova *et al.*, 2020).

Aunque aún no se comprenden completamente los mecanismos que conducen a la formación de los CI, se han explorado diferentes posibilidades a partir de datos empíricos (Ramón *et al.*, 2014). Se considera a la formación de CI en bacterias como una respuesta celular general relacionada con la presencia de proteínas mal plegadas en la célula y como una vía para el control de la agregación de éstas (Ramón *et al.*, 2014). En un análisis matemático (De Groot y Ventura, 2010; citado en Ramón *et al.*, 2014) se determinó que la propensión a la agregación de las proteínas está asociada a su longitud, conformación, localización, función y abundancia. Otros factores que afectan la agregación de proteínas recombinantes en bacterias son la temperatura y la tasa de crecimiento, la fusión a etiquetas de solubilización, al uso de codones

específicos, disponibilidad de tRNA y la optimización general de codones (Rosano y Ceccarelli, 2009).

Los CI también pueden contener cantidades variables de proteínas plegadas de forma nativa o proteínas parcialmente plegadas que pueden adquirir su conformación nativa incluso si se encuentran dentro de un CI (Gonzalez-Montalban *et al.*, 2008). De esta forma, los CI se componen de proteínas en diferentes estados de conformación, desde proteínas mal plegadas hasta proteínas en su conformación nativa. Además, la agregación y la desagregación ocurren simultáneamente *in vivo* en bacterias productoras de proteínas recombinantes (Carrio y Villaverde, 2002).

Para que la proteína recombinante sea funcional, la mayoría de las biomoléculas deben adoptar una estructura tridimensional definida denominada plegamiento nativo o conformación nativa. El plegamiento de las proteínas comienza cuando las proteínas se sintetizan en los ribosomas y pasa a través de intermediarios estructurales antes de alcanzar el estado nativo. Estos intermediarios, incluidos los confórmers mal plegados, normalmente exponen residuos hidrofóbicos que regularmente están en una posición interna en la estructura nativa de las proteínas. Tales superficies hidrofóbicas son propensas a desencadenar la agregación con otras proteínas mal plegadas. Asimismo, parece haber una preferencia por la coagregación del mismo tipo de proteína (Tyedmers *et al.*, 2010).

Para solucionar el problema derivado de la formación de los CI hay que analizar dos factores que pudieran estar influyendo en la dificultad para obtener a las S-RNasas recombinantes en su forma soluble. Primero, la estructura cristalográfica de la S_{F11}-RNasa indica la presencia de cuatro puentes disulfuro, los cuales se localizan lejos del sitio activo, y un grupo tiol libre (Ida *et al.*, 2001). Al no formarse correctamente los puentes disulfuro, que dan estabilidad a las proteínas, las proteínas heterólogas podrían estar adoptando una estructura desfavorable para su solubilización.

Segundo, las S-RNasas son proteínas glicosiladas, con diferentes N-glicosilaciones unidas al Asn28 (Woolward *et al.*, 1992; Ida *et al.*, 2001). La ausencia de glicosilación de las proteínas recombinantes podría disminuir su solubilidad. La glicosilación aumenta la solubilidad de las proteínas debido a que aumenta el número de posibles interacciones entre la superficie de la glicoproteína y las moléculas del disolvente circundantes debido a una mayor área de superficie accesible al mismo causada por la presencia de los polisacáridos (Solá y

Grienbenow, 2009). Sin embargo, nos inclinamos a pensar que el factor más importante en la incapacidad de las S-RNasas para solubilizarse es un plegamiento incorrecto de las mismas, particularmente pensamos que los puentes disulfuro de las S-RNasas nativas no se están formando en las proteínas heterólogas, o al menos no en una conformación correcta.

Otra posibilidad por la cual las proteínas heterólogas se están agregando en cuerpos de inclusión es que las células de *E. coli* activan un mecanismo para neutralizar la actividad de ribonucleasa de la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa. Las ribonucleasas juegan un papel clave en el metabolismo del RNA (Makarov y Ilinskaya, 2003). Las RNasas fúngicas K-sarcina, restrictocina, Asp-f1 y mitogilina se conocen como ribotoxinas, las cuales inactivan a los ribosomas eucariontes mediante la escisión de un solo enlace fosfodiéster en el rRNA 28S (García-Ortega *et al.*, 2001). Las ribotoxinas se encuentran entre los inhibidores más potentes de la traducción porque la hidrólisis de dicho enlace fosfodiéster suprime tanto la unión del aminoacil-tRNA dependiente del factor de elongación 1 como la unión del factor de elongación 2 a los ribosomas dependiente de GTP (García-Ortega *et al.*, 2001).

Existe un reporte en el que se sobreexpresan tres variantes alélicas de la S-RNasa (S_2 , S_3 y S_5) de *Anthirrinum* en *E. coli* clonadas en el vector de expresión pET-15b y como resultado las proteínas poseen actividad de ribonucleasa (Yanh y Xue, 2000), por lo que se asume que son solubles. Sin embargo, en este trabajo no se menciona el rendimiento, por lo que la eficiencia del protocolo no es clara.

En otro trabajo se describe la sobreexpresión heteróloga de la RNasa onconasa a partir de células de *E. coli* (Notomista *et al.*, 1999). En los primeros ensayos, al igual que en trabajo que aquí se reporta, también obtuvieron la proteína de interés en la fracción insoluble del lisado celular, por lo que se dedujo que se encontraba formando cuerpos de inclusión. Este problema se resolvió diluyendo las muestras en fosfato de potasio 0.1 M, pH 7.8, EDTA 10 mM, seguido de una incubación por 12 h a temperatura ambiente con una mezcla redox de cisteamina 3 mM y cistamina 0.6 mM. Esto hace evidente que es muy probable que la S_{A2} - y la S_{C10} -RNasa recombinantes no contienen un plegamiento nativo debido a un mal arreglo de sus puentes disulfuro.

Otro caso de expresión heteróloga de un tipo de ribonucleasa, es el de la RNasa A, que también se agrega en CI (Sakono *et al.*, 2004). En el reporte se desarrolla un sistema llamado redoblaje mediado por micelas reversas, el cual consiste en tres pasos: solubilización,

renaturalización y extracción. En las micelas generadas por el surfactante aerosol OT (bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio) se solubilizan los cuerpos de inclusión, y se forman micelas con proteínas individuales y una pequeña fracción de agua. Como resultado, las micelas proveen un ambiente reducido para el replegamiento espontáneo de las proteínas al reducir las interacciones intermoleculares entre ellas. Adicionalmente, la cosolubilización de GroEL aumenta la eficiencia del replegamiento de las proteínas. Por último, se extraen las proteínas correctamente plegadas al quitar el agua al adicionar acetona.

Aunque se podría continuar con los tratamientos propuestos y ya realizados con ribonucleasas recombinantes (Notomista *et al.*, 1999; Sakono *et al.*, 2004), es algo a lo que no se quiere recurrir porque el objetivo a mediano plazo del proyecto es lograr la estructura del cristal de estas S-RNasas por difracción de rayos X, para lo cual se debe tener la certeza que todas las biomoléculas tienen la conformación adecuada.

Sobreexpresión de la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa codificadas en el plásmido pMAL-p5x en células de *E. coli* BL21 (RIL)

Para solucionar el problema del posible plegamiento incorrecto de las S-RNasas y/o su posible efecto citotóxico sobre la bacteria, se clonaron las secuencias correspondientes a ambas en el plásmido pMAL-p5x, el cual permitió fusionar a la S_{A2}- y a la S_{C10}-RNasa con la proteína de unión a maltosa (MBP). La MBP codificada en este vector contiene una secuencia señal N-terminal que la dirige al periplasma. La fusión a MBP es una estrategia que se utiliza comúnmente para evitar que las proteínas heterólogas formen agregados insolubles. La MBP es el “potenciador de solubilidad” más utilizado y más estudiado (Waugh, 2016).

Las S-RNasas de los pistilos entran a los tubos polínicos, en donde, después de una señalización, actúan como citotoxinas degradando el RNA e inhiben su crecimiento (McClure *et al.*, 1990). Es muy probable que la actividad citotóxica de las S-RNasas perturbe la fisiología celular de *E. coli* al expresarlas, por lo que posiblemente activen algún mecanismo que les permita recuperar su homeostasis. Este mecanismo podría ser el responsable de transformar a las proteínas recombinantes en una forma no funcional, formándose así los CI que observamos en los diferentes ensayos de sobreexpresión. Las proteínas potenciadoras de solubilidad tienen la capacidad de aumentar la solubilidad de las “proteínas pasajeras” (las

proteínas a las cuales se fusiona), lo cual en muchos casos también permite que las proteínas se plieguen en su conformación biológicamente activa (Waugh, 2016). El mecanismo por el cual la fusión a MBP potencia el plegamiento correcto de las proteínas pasajeras no tiene consenso. Un modelo propone que la MBP funciona como chaperona, uniéndose de forma reversible a la proteína fusionada, evitando así la autoasociación y agregación, siendo la iteración de ciclos de unión y desunión con ella lo que permiten que la proteína pasajera evolucione a su conformación correcta (Waugh, 2016).

Por otro lado, el direccionamiento al periplasma también es una estrategia que ayuda a solubilizar algunas proteínas heterólogas. El periplasma es el compartimiento que se encuentra entre la membrana interna y la externa de las bacterias Gram negativas (Miller y Salama, 2018), como lo es *E. coli*. El ambiente en el periplasma es oxidativo, lo cual favorece la oxidación de las cisteínas y la consiguiente formación de puentes disulfuro (Arts *et al.*, 2015). La oxidación de las cisteínas también se ve favorecida por la presencia de proteínas tipo oxidorreductasas, como DsbA o DsbC (Arts *et al.*, 2015). Además, de esta manera, las S-RNasas no estarían en el citosol y, por lo tanto, el RNA bacteriano no estaría disponible para su hidrólisis.

La DsbA promueve la formación de puentes disulfuro en las proteínas que ingresan al periplasma, al oxidar los residuos de cisteína consecutivos en la secuencia proteica (Kadokura y Beckwith, 2009; citado en Arts *et al.*, 2015), por lo que en las proteínas que requieren puentes disulfuro entre cisteínas no consecutivas, la DsbA genera puentes disulfuro incorrectos. La DsbC, en contraste, promueve tanto la formación de puentes disulfuro entre cisteínas no consecutivas (por lo que puede corregir los puentes disulfuro generados por DsbA) como la isomerización de proteínas heterólogas con múltiples puentes disulfuro, como la RNasa A (Hiniker y Bardwell, 2004; citado en Arts *et al.*, 2015). En el caso de la S_{A2}⁻ y la S_{C10}-RNasas, los puentes disulfuro se forman en algunos casos por cisteínas consecutivas y en otros por cisteínas no consecutivas (como el que es blanco de la NaTrxh), por lo que la presencia de DsbA y DsbC serían de gran utilidad para favorecer el correcto plegamiento de las mismas.

En los ensayos de sobreexpresión de las S_{A2}⁻ y S_{C10}-RNasa fusionadas a MBP en células de *E. coli* BL21(RIL) se obtuvieron resultados similares a los ensayos sin la fusión, es decir, las proteínas heterólogas se encontraron mayoritariamente en forma insoluble. El plegamiento no siempre se produce de forma espontánea, sino que en algunos casos requiere de otros

factores in vivo que están ausentes in vitro. Estos factores adicionales podrían ser chaperonas bacterianas (Waugh, 2016). El estudio realizado por Raran-Kurussi y Waugh (2012) indica que si bien las chaperonas DnaJ, DnaK y Tig no parecen tener un efecto significativo en la promoción del plegamiento correcto de las proteínas pasajeras, las chaperonas GroEL y GroES sí tienen una influencia considerable en el plegamiento de las mismas, al menos en proteínas con una masa molecular de hasta 81 kDa.

Sobreexpresión de la S_{A2}⁻ y la S_{C10}-RNasa en células de *E. coli* pGro7

Debido a lo anteriormente discutido, el siguiente paso fue probar la sobreexpresión de las S-RNasas en su versión simple (*i.e.* clonadas en el plásmido pMCSG53) o como proteínas de fusión a MBP (*i.e.* clonadas en el vector pMAL-p5x) en la cepa de *E. coli* pGro7. Esta cepa contiene un plásmido que expresa las chaperonas GroEL y GroES. La coexpresión de las proteínas heterólogas y dichas chaperonas es una estrategia comúnmente utilizada para potenciar el plegamiento de las primeras. La expresión de las S-RNasas clonadas en el plásmido pMCSG53 permitió obtener una mayor cantidad de las proteínas heterólogas en la fracción soluble respecto a los ensayos anteriores. Sin embargo, la cantidad de proteínas heterólogas en la fracción insoluble siguió siendo predominante (**Figuras 21 y 22**).

La expresión de las proteínas heterólogas clonadas en el plásmido pMAL-p5X generó resultados positivamente prometedores. En los ensayos de SDS-PAGE se logró distinguir una banda de 63 kDa, aproximadamente, en la fracción soluble que incrementa con el tiempo (**Figuras 23 y 24**). A la misma altura se presenta una banda en la fracción insoluble, pero ésta es muy tenue, lo cual podría indicar que las proteínas heterólogas estén concentradas en la fracción soluble. A pesar de ello, la banda de 63 kDa no indica necesariamente que las S_{A2}⁻ y S_{C10}-RNasas estén mayoritariamente en la fracción soluble, pues las chaperonas GroEL tienen una masa molecular similar. Por lo tanto, será necesario demostrar que las proteínas de fusión MBP-S-RNasa están efectivamente en la fracción soluble por inmunodetección en ensayos tipo Western-blot utilizando los anticuerpos correspondientes.

Conclusiones

Las S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNAsas sobreexpresadas en células de *E. coli* BL21(RIL), clonadas en el plásmido pMCSG53, se presentaron mayoritariamente de forma insoluble, indicando que su conformación fue diferente a la nativa, y que posiblemente se encontraban formando cuerpos de inclusión.

La sobreexpresión de las mismas secuencias clonadas en el plásmido pMAL-p5x (en el cual las RNAsas están fusionadas a la MBP) mediante células de *E. coli* BL21(RIL) generó resultados similares que estando en pMCSG53, ya que la mayor parte de la proteína recombinante se encontró en la fracción insoluble.

Por el contrario, la sobreexpresión de dichas proteínas en células de *E. coli* pGro7, que coexpresan las chaperonas GroEL y GroES, generó resultados prometedores. Al utilizar al vector pMCSG53 para sobreexpresar las proteínas recombinantes se obtuvo una mayor cantidad en la fracción soluble respecto a los ensayos anteriores; sin embargo, la cantidad de proteína recombinante en la fracción insoluble siguió siendo predominante. Por otro lado, su expresión clonadas en el plásmido pMAL-p5X generó resultados positivos. Al utilizar este plásmido se logró distinguir en los ensayos de SDS-PAGE una banda de 63 kDa, que se va incrementando conforme aumenta el tiempo de inducción. Esta banda posiblemente corresponde a las proteínas recombinantes S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNAsas aunque no puede descartarse la posibilidad de que sea la chaperona GroEL, la cual tiene masa molecular similar.

Perspectivas

La formación de cuerpos de inclusión en los ensayos realizados en este trabajo implica la obtención de cantidades reducidas de las proteínas recombinantes en una forma utilizable, o bien la necesidad de aplicar técnicas intensivas en trabajo. Estas complicaciones no solo se deben a la estructura compleja de estas enzimas sino también al posible efecto citotóxico que pueden tener sobre la célula al ser capaces de degradar el RNA.

Existen cepas de *E. coli*, como la BL21-AI, en las que la sobreexpresión de las proteínas de interés no solo se induce con IPTG, sino también con L-arabinosa porque el gen de la T7-RNA polimerasa, enzima que transcribe al gen de interés, se encuentra en el locus *araB*, por lo que su expresión está regulada por el promotor *araBAD*. Esto, en cierta medida, evita la expresión basal del gen de interés y por lo tanto permite un mayor control de su expresión, permitiendo así evadir el efecto citotóxico de la proteína recombinante. Por ello, será conveniente intentar con esta cepa la expresión de las S-RNasas.

Finalmente, la opción más drástica pero efectiva es cambiar a un sistema de expresión eucarionte, de preferencia una planta. *N. tabacum* es un excelente modelo que puede servir para este objetivo. La sobreexpresión de proteínas heterólogas en *N. tabacum* tiene la ventaja de evitar la formación de cuerpos de inclusión, evitar la necesidad de agregar etiquetas de fusión (pueden alterar la estructura de la proteína y atraer una mayor carga de regulación) (Nausch *et al.*, 2012), además de que permite realizar modificaciones postraduccionales comunes de los eucariontes, tales como la glicosilación y la formación de puentes disulfuro (Ma *et al.*, 2003). Adicionalmente, *N. tabacum* es susceptible a ingeniería genética y existen numerosas estrategias de expresión disponibles (Tremblay *et al.*, 2010). Para este objetivo, se propone clonar los genes de las S-RNasas bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S y así tener a las S-RNasas heterólogas disponibles a partir de cualquier tejido, especialmente de uno fácil para su extracción y purificación, como las hojas.

Bibliografía

- Ai, Y., Singh, A., Coleman, C., Ioerger, T., Kheyr-Pour, A., y Kao, T. (1990). Self-incompatibility in *Petunia inflata*: isolation and characterization of cDNAs encoding three S-allele-associated proteins. *Sexual Plant Reproduction*, 3(2).
- Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S.-L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P.J., Haley, J.D., Penschow, J.D., Niall, H.D., Tregear, G.W., Coghlan, J.P., Crawford, R.J., y Clarke, A.E. (1986). Cloning of cDNA for a stelar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature* 321: 38–44.
- Arts, I. S., Gennaris, A., y Collet, J.-F. (2015). Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Letters*, 589(14), 1559–1568.
- Aslanidis, C., y de Jong, P. J. (1990). Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Research*, 18(20), 6069–6074.
- Ávila-Castañeda, A., Juárez-Díaz, J., Rodríguez-Sotres, R., Bravo-Alberto, C. E., Ibarra-Sánchez, C., Zavala-Castillo, A., Cruz-Zamora, Y., Martínez-Castillo, L.P., Márquez-Guzmán, J., y Cruz-García, F. (2014). A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro. *BMC Plant Biology*, 14(1), 147.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 240–251.
- Barrett, S.C.H. y Hough, J. (2012). Sexual dimorphism in flowering plants. *Journal of Experimental Botany*, 64(1), 67–82.
- Bredemeijer, G. M. M., y Blaas, J. (1981). S-specific proteins in styles of self-incompatible *Nicotiana glauca*. *Theoretical and Applied Genetics*, 59(3), 185–190.
- Busot, G. Y., McClure, B., Ibarra-Sánchez, C. P., Jiménez-Durán, K., Vázquez-Santana, S., y Cruz-García, F. (2008). Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue. *Journal of Experimental Botany*, 59(11), 3187–3201.
- Carrío, M. M., y Villaverde, A. (2002). Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies. *J. Biotechnol.* 96, 3–12.
- Cruz-Zamora, Y., Nájera-Torres, E., Noriega-Navarro, R., Torres-Rodríguez, M. D., Bernal-Gracida, L. A., García-Valdés, J., Juárez-Díaz, J.A., y Cruz-García, F. (2020). NaStEP, an essential protein for self-incompatibility in *Nicotiana glauca*, performs a dual activity as a proteinase inhibitor and as a voltage-dependent channel blocker. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151, 352–361.
- Darwin C.R. (1877). *The different forms of flowers on plants of the same species*. London: John Murray.
- De Groot, N. S., y Ventura, S. (2010). Protein aggregation profile of the bacterial cytosol. *PLoS ONE* 5:e9383.
- De Nettancourt, D. (1977). "Incompatibility in Angiosperms." Springer-Verlag, Berlin.
- Enfors, S.-O. (1992). Control of in vivo proteolysis in the production of recombinant proteins. *Trends in Biotechnology*, 10, 310–315.
- Franklin-Tong, N.V. E., y Franklin, F. C. H. (2003). Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Trends in Plant Science*, 8(12), 598–605.
- García-Ortega, L., Lacadena, J., Mancheño, J. M., Oñaderra, M., Kao, R., Davies, J., y Gavilanes, J. G. (2001). Involvement of the amino-terminal β -hairpin of

the Aspergillus ribotoxins on the interaction with membranes and nonspecific ribonuclease activity. *Protein Science*, 10(8), 1658–1668.

- García-Valencia, L.E., Bravo-Alberto, C.E., Wu, H.-M., Rodríguez-Sotres, R., Cheung A.Y., y Cruz-García F. (2017). SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol.* 175, 1105–1120.
- Georgiou, G., y Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), 190–197.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vázquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T.E., Cruz-García, F., y McClure, B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, 439(7078), 805–810.
- Gonzalez-Montalban, N., Natalello, A., Garcia-Fruitos, E., Villaverde, A., y Doglia, S. M. (2008). In situ protein folding and activation in bacterial inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* 100, 797–802.
- Gray, J.E., McClure, B.A., Böning, I., Anderson, M.A., y Clarke, A.E. (1991). Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata* (S-RNase) on in vitro-grown pollen tubes. *The Plant Cell* 3: 271–283.
- Hancock N., Kent L., y McClure B. (2005). The 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* 43, 716–723
- Hiniker, A. y Bardwell, J.C. (2004) In vivo substrate specificity of periplasmic disulfide oxidoreductases. *J. Biol. Chem.* 279, 12967–12973.
- Huang S, Lee H-S, Karunanandaa B, y Kao T-H. (1994). Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection of self-pollen. *The Plant Cell* 6: 1021–1028.
- Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A.E., Sakiyama, F., y Sato, M. (2001). The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Journal of Molecular Biology*, 314(1), 103–112.
- Ioerger, T. R., Gohlke, J. R., Xu, B., y Kao, T.-H. (1991). Primary structural features of the self-incompatibility protein in solanaceae. *Sexual Plant Reproduction*, 4(2).
- Ishimizu T, Miyagi M, Norioka S, Liu Y-H, Clarke AE, y Sakiyama F. (1995). Identification of histidine-31 and cysteine-95 in the active site of self-incompatibility associated S₆-RNase in *Nicotiana alata*. *Journal of Biochemistry* 118: 1007–1013.
- Jahnen, W., Batterham, M.P., Clarke, A.E., Moritz, R.L., y Simpson, R.J. (1989). Identification, isolation, and N-terminal sequencing of style glycoproteins associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *The Plant Cell* 1: 493–499.
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G., y Cruz-García, F. (2013). NaStEP: A Proteinase Inhibitor Essential to Self-Incompatibility and a Positive Regulator of HT-B Stability in *Nicotiana alata* Pollen Tubes. *PLANT PHYSIOLOGY*, 161(1), 97–107.
- Juárez-Díaz, J. A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J., y Cruz-García, F. (2005). A Novel Thioredoxin_h Secreted in *Nicotiana alata* and Reduces S-RNase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3418–3424.
- Kadokura, H., y Beckwith, J. (2009). Detecting Folding Intermediates of a Protein as It Passes through the Bacterial Translocation Channel. *Cell*, 138(6), 1164–1173.
- Kao, T.-H., y McCubbin, A.G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self-pollen to prevent inbreeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 93: 12059–12065.
- Kawata Y, Sakiyama F, Tamaoki H. (1988). Amino acid sequence of ribonuclease T₂ from *Aspergillus oryzae*. *European Journal of Biochemistry* 176: 683–697.

- Kheyr-Pour, A., Bintrim, S., Ioerger, T., Remy, R., Hammond, S., y Kao, T. (1990). Sequence diversity of pistil S-proteins associated with gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Sexual Plant Reproduction*, 3(2).
- Krachmarova, E., Ivanov, I., y Nacheva, G. (2020). Nucleic acids in inclusion bodies obtained from *E. coli* cells expressing human interferon-gamma. *Microbial Cell Factories*, 19(1).
- Kumar, D. (2011). Protein Refolding/Renaturation. *Comprehensive Biotechnology*, 765–784.
- Lee, H.-S., Huang, S., y Kao, T.-H. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* 367: 560–563.
- Lee, C.B., Kim, S., y McClure, B. (2009). A pollen protein, NaPCCP, that binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiology* 149: 791– 802.
- Luu, D.-T., Qin, K., Morse, D. y Cappadocia, M. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* 407, 649–651 (2000).
- Ma, J. K.-C., Drake, P. M. W., y Christou, P. (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(10), 794–805.
- Makarov, A. y Ilinskaya, O.N. (2003). Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets. *FEBS Letters* 540, 15-20.
- McClure, B. A., y Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*, 224(2), 233–245.
- McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A., y Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, 347(6295), 757–760.
- McClure, B., Mou, B., Canevascini, S., y Bernatzky, R. (1999). A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13548–13553.
- McClure, B., Cruz-García, F., y Romero, C. (2011). Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Annals of Botany*, 108(4), 647–658.
- Miller, S. I., y Salama, N. R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLOS Biology*, 16(1), e2004935.
- Murfett, J., Atherton, T.L., Mou, B., Gasser, C.S., y McClure, B.A. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*. 367, 563–566.
- Nasrallah, J.B., and Nasrallah, E. (1993). Pollen-stigma signaling in the sporophytic self-incompatibility response. *Plant Cell*, 5, 1325-1335.
- Nausch, H., Mikschofsky, H., Koslowski, R., Meyer, U., Broer, I., y Huckauf, J. (2012). High-Level Transient Expression of ER-Targeted Human Interleukin 6 in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS ONE*, 7(11), e48938.
- Newbigin, E. (1993). Gametophytic Self-Incompatibility Systems. *THE PLANT CELL ONLINE*, 5(10), 1315–1324.
- Notomista, E., Cafaro, V., Fusiello, R., Bracale, A., D’Alessio, G., y Di Donato, A. (1999). Effective expression and purification of recombinant onconase, an antitumor protein. *FEBS Letters*, 463(3), 211–215.
- Nowak, M. D., Davis, A. P., Anthony, F., y Yoder, A. D. (2011). Expression and Trans-Specific Polymorphism of Self-Incompatibility RNases in *Coffea (Rubiaceae)*. *PLoS ONE*, 6(6), e21019.
- Ramón, A., Señorale-Pose, M., y Marín, M. (2014). Inclusion bodies: Not that bad.... *Frontiers in Microbiology*, 5.
- Raran-Kurussi, S., Waugh, D.S. (2012). The ability to enhance the solubility of its fusion partners is an intrinsic property of maltose-binding protein but their folding is either spontaneous or chaperone-mediated. *PLoS One*, 7: e49589.
- Roalson, E. (2003). S-RNases and sexual incompatibility: structure, functions, and evolutionary perspectives. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3), 490–506.

- Rosano, G. L., y Ceccarelli, E. A. (2009). Rare codon content affects the solubility of recombinant proteins in a codon bias-adjusted *Escherichia coli* strain. *Microb. Cell Fact.* 8, 41.
- Rea, A. C., y Nasrallah, J. B. (2008). Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *The International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 627–636.
- Sakono, M., Kawashima, Y. -m., Ichinose, H., Maruyama, T., Kamiya, N., y Goto, M. (2004). Direct Refolding of Inclusion Bodies Using Reversed Micelles. *Biotechnology Progress*, 20(6), 1783–1787.
- Shevchik, V. E., Condemine, G., y Robert-Baudouy, J. (1994). Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemii* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *The EMBO Journal*, 13(8), 2007–2012.
- Solá, R. J., y Griebenow, K. (2009). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(4), 1223–1245.
- Stevens, V.A.M., y Murray, B.G. (1982). Studies on heteromorphic self-incompatibility systems: Physiological aspects of the incompatibility system of *Primula obconica*. *Theoretical and Applied Genetics*, 61(3), 245–256.
- Torres-Rodríguez, M. D., Cruz-Zamora, Y., Juárez-Díaz, J. A., Mooney, B., McClure, B. A., y Cruz-García, F. (2020). NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *The Plant Journal*.
- Tremblay, R., Wang, D., Jevnikar, A.M., y Ma, S. (2010) Tobacco, a highly efficient green bioreactor for production of therapeutic proteins. *Biotechnology Advances* 28 (2):214-221.
- Tyedmers, J., Mogk, A., Y Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(11), 777–788.
- Villaverde, A., y Carrió, M. (2003). *Biotechnology Letters*, 25(17), 1385–1395.
- Waugh, D.S. (2016). The remarkable solubility-enhancing power of *Escherichia coli* maltose-binding protein. *Postępy Biochemii* 62(3). 377-382.
- Whitehouse, H. L. K. (1950). Multiple-allelomorph incompatibility of pollen and style in the evolution of the angiosperms. *Ann. Botan. New Series* 14, 198-216.
- Woodward, J.R., Bacic, A., Jahnen, W., y Clarke, A. (1989). N-Linked glycan chains on S-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell* 1: 511– 514.
- Woodward, J. R., Craik, D., Dell, A., Khoo, K.-H., Munro, S. L. A., Clarke, A. E., y Bacic, A. (1992). Structural analysis of the N-linked glycan chains from a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Glycobiology*, 2(3), 241–250.
- Yang, H., y Xue, Y. (2000). Expression of self-incompatibility ribonucleases of *Antirrhinum* in *Escherichia coli*. *Chinese Science Bulletin*, 45(6), 512–515.
- Yokoyama, S. (2003). Protein expression systems for structural genomics and proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7: 39–43.
- Zhang, Y. y Xue, Y. (2008) *Molecular Biology of S-RNase-Based Self-Incompatibility*. En: Frankin-Tong, V.E. *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity and Mechanisms*. Heidelberg: Springer.
- Zurek, D.M., Mou, B., Beecher, B., y McClure, B. (1997). Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition. *The Plant Journal* 11: 797–808.

APÉNDICE 1 (protocolos)

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

Se utilizó el kit de miniprep de la marca Qiagen, cuyo protocolo es el siguiente:

1. Cortar el gel de agarosa alrededor de la banda que corresponde al producto de amplificación con un bisturí limpio y pesarlo en un microtubo de 1.5 ml.
2. Agregar 3 volúmenes de amortiguador QG (tiocianato de guanidina 5.5 M, Tris-HCl 20 mM, pH 6.6) por cada volumen de gel, considerando que 100 mg de gel corresponden a 100 μ l de amortiguador.
3. Incubar a 50°C por 10 min mezclando vigorosamente cada 2 a 3 min para facilitar la disolución del gel.
4. Agregar 1 volumen de isopropanol (100 mg de gel equivalen a 100 μ l) a la muestra y mezclar por inversión.
5. Colocar una columna en un tubo de colecta de 2 ml y aplicar la muestra a la misma
6. Centrifugar por 1 min a 13,000 rpm. Descartar el fluido recuperado y colocar la columna en el mismo tubo de colecta. Para muestras mayores a 800 μ l, solo se rellena la columna y se centrifuga de nuevo.
7. Eliminar los posibles residuos de agarosa agregando 500 μ l de amortiguador QG a la columna y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm, descartar el fluido y colocar la columna en el mismo tubo de colecta.
8. Lavar el DNA unido a la columna con 750 μ l de amortiguador PE (NaCl 20 mM, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 y 80% de etanol) a la columna y centrifugar por 1 min a 13,000 rpm, descartar el fluido y colocar la columna en el mismo tubo de colecta.
9. Eliminar el exceso de etanol y amortiguador centrifugando la columna por 1 min adicional.
10. Colocar la columna en un microtubo limpio y estéril de 1.5 ml y eluir el DNA agregando 10 μ l de agua desionizada estéril en el centro de la columna. Incubar por 1 min a temperatura ambiente y centrifugar 2 min a 13,000 rpm.

Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

1. Crecer células de *E. coli* en 10 mL de medio líquido LB (LB) por 12 h a 37°C.
2. Inocular 5 mL del precultivo en 50 mL de LB fresco, incubar a 37°C hasta alcanzar una *DO*₆₀₀ de 0.5.
3. Centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4 °C, decantar el sobrenadante
4. Resuspender el botón celular en 5 mL de CaCl₂ 100mM estéril e incubar por 15 min a 4 °C. Repetir el paso 3 y 4 dos veces más.
5. Resuspender el botón celular en 5 mL de una solución estéril que contenga CaCl₂ 50 mM y glicerol al 20 %.
6. Hacer alícuotas de 45 μ L y conservar a -80 °C hasta su uso.

Transformación de *E. coli* por choque térmico

1. Descongelar en hielo una alícuota de 100 μ l de células quimiocompetentes (Apéndice 1 (protocolo de cómo hacer células competentes)).
2. Agregar de 1 a 3 μ l del DNA con el que se quiere transformar y mezclar con la punta de la pipeta cuidadosamente.
3. Incubar en hielo por 20-30 min.
4. Incubar a 42°C por 40 s y pasar inmediatamente a hielo (5 min)
5. Agregar 600 μ l de medio Luria Bertani (LB) con glucosa 20 mM.
6. Incubar a 37°C con agitación por 1 h.
7. Centrifugar a 13,000 rpm por 30 s y decantar dejando un sobrenadante de aproximadamente 50 μ l
8. Resuspender las células y sembrar en medio LB-agar selectivo.
9. Incubar a 37°C por 16 h.

Análisis de las proteínas por SDS-PAGE y ensayo réplica tipo Western-blot

Las proteínas de los extractos crudos fueron separadas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12.5%. Esta técnica consiste en solubilizar las proteínas en un amortiguador de muestra, el cual contiene como agente desnaturizante dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2.5% y como agente reductor al ditionitrito (DTT) al 0.1 M. Para lograr la desnaturización completa de las proteínas, las mezclas se incubaron a 95°C por 5 minutos. Por último, las muestras se dejan a temperatura ambiente y se cargan en el gel. De esta manera, ni la estructura tridimensional ni su punto isoeléctrico influyen en su migración electroforética, por lo que sólo se separan según su masa molecular.

Para que las proteínas que migraron en el gel sean accesibles a los anticuerpos, éstas se deben transferir a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por electrotransferencia. El protocolo seguido fue el siguiente:

1. Al finalizar la electroforesis, lavar el gel sumergiéndolo en agua desionizada con agitación suave por 30 s y eliminar el agua.
2. Equilibrar el gel sumergiéndolo en amortiguador de transferencia por 10 – 15 min con agitación suave
3. Mientras se equilibra el gel, la membrana de PVDF se activa sumergiéndola en metanol al 50% por 20 s e inmediatamente se lava con agua desionizada (sumergir por 2 min con agitación).
4. Equilibrar la membrana por 2 – 3 min en amortiguador de transferencia con agitación suave
5. Colocar los siguientes componentes equilibrados/empapados en amortiguador de transferencia en el orden indicado sobre el ánodo: (1) papel filtro; (2) membrana PVDF; (3) gel de poliacrilamida; y (4) papel filtro.
6. Colocar el cátodo sobre los componentes de la transferencia y aplicar 10 V por 20 min en el caso de un gel y 20 V por 25 min en el caso de dos transferencias simultáneas.

APÉNDICE 2 (soluciones de trabajo)

Acrilamida:bis-acrilamida (29:1) – 100 mL

- Acrilamida 29 g
- Bis-acrilamida 1.0 g
- Aforar a 100 mL y esterilizar por filtración con membrana de 0.45 µm dediámetro de poro

Amortiguador apilador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL

- Tris 6.06 g
- Ajustar el pH a 6.8
- SDS al 20% 2 ml
- Aforar a 100 mL

Amortiguador de glicina para SDS-PAGE 10X (1L)

- Tris 30 g
- Glicina 144 g
- SDS 10 g

Amortiguador de muestra 6X (SDS-PAGE)

- Tris-HCl 0.28M, pH 6.8
- Glicerol al 30% (v/v)
- SDS al 1% (m/v)
- DTT 0.5 M
- Azul de bromofenol al 0.0013% (m/v)
- Hacer alícuotas y almacenar a -70 °C

Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 10X (1 L)

- NaCl 80.0628 g
- KCl 2.013 g
- Na₂HPO₄·7H₂O 11.527 g
- NaH₂PO₄·H₂O 1.9318 g

*Ajustar a pH 7.3 y esterilizar

Amortiguador separador (SDS-PAGE, glicina) – 100 mL

- Tris 18.17g
- Ajustar a pH 8.8
- SDS al 20% 2 ml
- Aforar a 100 mL

Amortiguador TAE (tris – ácido acético – EDTA) 50X (1 L)

- Tris: 242g
- Ácido acético glacial hasta llegar al pH deseado
- 100 ml de EDTA 0.5 M, pH 8.0

Amortiguador de transferencia (Western- blot) 1L

- Amortiguador de glicina 10X 100ml
- Metanol 200 ml
- Aforar a 1L

Medio LB (Luria-Bertani) – 1L

- Triptona 10 g
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g

*Esterilizar por autoclave

Solución de bloqueo (inmunodetección)

- Leche en polvo descremada 5%
- Tween-20 0.1%
- Disolver en PBS