



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Expresión de la S-RNasa en *Escherichia coli* y generación
de la variante S-RNasa(C155S/C185S) para su expresión
en *Nicotiana tabacum*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

EMILIO GARCÍA TORRES CAFFAREL

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ

Ciudad Universitaria, CD. MX.
2024





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno

Emilio García Torres Caffarel
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
420004255

2. Datos del tutor

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky

4. Datos del sinodal 2

Dra. Lilian González Segura

5. Datos del sinodal 3

Dra. Arline Fernández Silva

6. Datos del sinodal 4

Dr. Marco Tulio Solano De la Cruz

7. Datos del trabajo escrito

Expresión de la S-RNasa en *Escherichia coli* y generación de la variante S-RNasa(C155S/C185S) para su expresión en *Nicotiana tabacum*
71 pp.
2024

Agradecimientos académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por asistir a mi formación profesional al brindarme el mejor espacio posible para estudiar la carrera de biología.

Un agradecimiento especial al Dr. Javier Andrés Juárez Díaz por aceptarme en su grupo de trabajo y confiar en mí para realizar este proyecto, así como por toda la asistencia técnica y el asesoramiento que recibí de su parte.

Al Ból. Andre Zaragoza Gómez, por su valiosa asistencia técnica y amplio apoyo en la elaboración de este trabajo.

Al laboratorio del Dr. Felipe Cruz García en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química por el apoyo en la realización de este trabajo. A la Dra. Yuridia Cruz González Zamora, por su valiosa asistencia técnica.

A la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos, por su asistencia técnica en el Invernadero de la Facultad de Ciencias.

A la M. en C. Ma. Teresa de Jesús Olivera Flores y todo el equipo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CVT), por su asistencia técnica y los servicios proporcionados para el cultivo de tejidos.

A la Dra. Lilia Angélica Bernal Gracida, por su asistencia técnica en la técnica de diálisis.

A la Dra. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda, por su asistencia técnica en el sonicado.

A la Dra. Sandra Rios Carrasco, por su asistencia técnica en los ensayos de actividad de ribonucleasa.

A los profesores responsables del Taller de *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, la Dra. Karina Jiménez Durán, el Dr. Javier Andrés Juárez Díaz, la M. en C. Laura Patricia Olgún Santos y la Dra. Sonia Vázquez Santana, por sus continuas revisiones y críticas al trabajo.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento del proyecto IN207823: "Cambio estructural en la S-RNasa después de la reducción de un puente disulfuro específico por la NaTrxh y su impacto en el aumento de actividad de ribonucleasa".

Agradecimientos personales

Agradezco a mis padres por fomentar en mí la dedicación y el trabajo duro en lo que me apasiona, que me han apoyado siempre con mis estudios, que me han acompañado en las buenas y en las malas, y que siempre están ahí para mí. Agradezco a mi hermano Gerardo por tantas experiencias que hemos vivido juntos, así como por ser una inspiración de vida para mí. También agradezco a mis abuelos por acompañarme durante todo este tiempo. Siempre agradeceré a mi abuelin por regalarme el libro más útil de toda mi carrera –el *Lehninger*– y a mi abuela por estudiar la carrera de biología conmigo.

Agradezco a Javier Andrés Juárez Díaz por ser un gran asesor, por ser alguien fundamental durante mi formación y, sobre todo, por su amistad. También agradezco a mis compañeros del laboratorio Andre –el mejor “jajdista”–, Damaris –la mejor falsa bióloga–, Derek, Rodrigo –mi “hermano” académico–, Óscar –el hombre mosca– e Isaac. En especial agradezco a Andre por enseñarme tanto –dentro y fuera del laboratorio– y por ser tan gran amigo. Y a Rodrigo por permitirme enseñarle lo poco que sabía y por siempre hacer que estar en el laboratorio fuese más divertido.

Agradezco a todas las amistades que formé en el conjunto E de la Facultad de Química. A mis amigas del laboratorio 104 Sandra, Jules, Mariana y Keren. A Yuridia, por siempre darse el tiempo de ayudarme y siempre ser tan agradable mientras lo hacía. A Ávila-Castañeda, por cambiar su opinión sobre mí a pesar de sonicar mal. Y a Delia, quien me ha hecho tan feliz durante los últimos meses de mi licenciatura.

Finalmente, agradezco a todos aquellos cuyo trabajo sustenta al mío y a todas las personas que me han enseñado.

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
1 INTRODUCCIÓN	8
1.1 RIBONUCLEASAS DE LA FAMILIA T2	8
1.2 LAS T2 RNASAS DE PLANTAS	11
1.3 LAS S-RNASAS	12
2 ANTECEDENTES.....	15
3 OBJETIVOS	16
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1 EXPRESIÓN DE LA S-RNASE EN <i>E. COLI</i>	16
4.1.1 Sobreexpresión de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en la cepa de <i>E. coli</i> BL21-AI	16
4.1.2 Sobreexpresión de una S-RNasa inactiva en <i>E. coli</i>	18
4.1.3 Sobreexpresión de la S_{C10^-} -RNasa en la cepa de <i>E. coli</i> SHuffle T7.....	18
4.1.4 Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes	19
4.1.5 Solubilización de la S-RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión	19
4.1.6 Renaturalización de la S-RNasa recombinante solubilizada a partir de cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i>	20
4.1.7 Ensayo de actividad de ribonucleasa	20
4.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>NICOTIANA TABACUM</i>	21
4.2.1 Amplificación de las secuencias genómicas de la S_{C10^-} -RNasa y la S_{C10^-} -RNasa(H31N) y su clonación en pJET1.2.....	21
4.2.2 Clonación de las secuencias genómicas S_{C10^-} -RNasa y S_{C10^-} -RNasa(H31N) en el vector de entrada pENTR4	24
4.2.3 Clonación de las secuencias genómicas S_{C10^-} -RNasa y S_{C10^-} -RNasa(H31N) en el vector binario pK2GW726	
4.2.4 Mutagénesis sitio-dirigida para el reemplazo de los residuos de cisteína 155 y 185 por serina en la S_{C10^-} -RNasa y la S_{C10^-} -RNasa(H31N).....	28
4.2.5 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las S_{C10^-} -RNasa, S_{C10^-} -RNasa(H31N), S_{C10^-} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10^-} -RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7.....	30
4.2.6 Generación de líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> con las secuencias S_{C10^-} -RNasa, S_{C10^-} -RNasa(H31N), S_{C10^-} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10^-} -RNasa(H31N/C155S/C185S) bajo el promotor 35S.....	30
5 RESULTADOS	32
5.1 EXPRESIÓN DE LA S-RNASE EN <i>E. COLI</i>	32
5.1.1 Sobreexpresión de la S_{A2^-} y S_{C10^-} -RNasa en la cepa de <i>E. coli</i> BL21-AI	32
5.1.2 Sobreexpresión de una S-RNasa inactiva en <i>E. coli</i>	34
5.1.3 Sobreexpresión de la S_{C10^-} -RNasa en la cepa de <i>E. coli</i> SHuffle T7.....	35
5.1.4 Renaturalización de la S-RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión de <i>E. coli</i>	36
5.2 GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>N. TABACUM</i>	38
5.2.1 Amplificación de las secuencias genómicas de la S_{C10^-} -RNasa y la S_{C10^-} -RNasa(H31N) y su clonación en pJET1.2.....	38
5.2.2 Clonación de las secuencias genómicas de la S_{C10^-} -RNasa y la S_{C10^-} -RNasa(H31N) en el vector de entrada pENTR4	39
5.2.3 Clonación de las secuencias genómicas de la S_{C10^-} -RNasa y la S_{C10^-} -RNasa(H31N) en el vector binario pK2GW7	41
5.2.4 Generación de las variantes S_{C10^-} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10^-} -RNasa(H31N/ C155S/C185S) por mutagénesis sitio-dirigida.....	43
5.2.5 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con S_{C10^-} -RNasa, S_{C10^-} -RNasa(H31N), S_{C10^-} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10^-} -RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7.....	44

5.2.6	Generación de líneas transgénicas de <i>N. tabacum</i> :: <i>S_{C10}-RNasa</i> , :: <i>S_{C10}-RNasa(H31N)</i> , :: <i>S_{C10}-RNasa(C155S/C185S)</i> y :: <i>S_{C10}-RNasa(H31N/C155S/C185S)</i>	45
6	DISCUSIÓN	47
6.1	SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES <i>S_{A2}</i> - Y <i>S_{C10}</i> -RNASA EN <i>E. COLI</i>	47
6.2	RENATURALIZACIÓN DE LA <i>S_{A2}</i> -RNASA RECOMBINANTE A PARTIR DE CUERPOS DE INCLUSIÓN DE <i>E. COLI</i>	49
6.3	GENERACIÓN DE LÍNEAS TRANSGÉNICAS DE <i>N. TABACUM</i> QUE EXPRESEN LA VARIANTE <i>S_{C10}</i> -RNASA(C155S/C185S) 50	
6.4	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS S-RNASAS Y PROPUESTAS PARA SOBREEXPRESARLA	52
6.5	IMPORTANCIA DE LA S-RNASE EN SU CONFORMACIÓN REDUCIDA	52
7	CONCLUSIONES	54
8	PERSPECTIVAS	55
9	REFERENCIAS	56
	APÉNDICE 1	65
	APÉNDICE 2	69

Expresión de la S-RNasa en *Escherichia coli* y generación de la variante S-RNasa(C155S/C185S) para su expresión en *Nicotiana tabacum*

RESUMEN

La citotoxicidad de la S-RNasa en el tubo polínico como resultado de una cruz incompatible depende de la reducción específica por la NaTrxh de uno de sus puentes disulfuro. Esto se debe a que, como resultado de dicha reacción, su actividad de ribonucleasa incrementa alrededor de siete veces. Conocer cuál es el cambio conformacional que provoca dicho incremento aportará información sobre cómo la reducción, lejana del sitio activo, afecta su actividad catalítica, entendiendo bioquímicamente la causa del aumento de su actividad. Para ello es necesario contar con una S-RNasa que se encuentre en su conformación reducida por la NaTrxh de manera estable y en grandes cantidades. Para esto, en este trabajo se buscó obtener a la proteína recombinante con los residuos de cisteína implicados – Cys155 y Cys185 de la S_{C10}-RNasa– en el puente disulfuro blanco de la NaTrxh reemplazados por serina.

En primer lugar, tras sobreexpresar distintas variantes de la S-RNasa en *E. coli*, se observó que, en todos los casos, las proteínas recombinantes se localizaron en los cuerpos de inclusión. Posteriormente, se buscó solubilizar y replegar la proteína recombinante S_{A2}-RNasa a partir de los cuerpos de inclusión. Aunque se logró solubilizar a la proteína recombinante, tras la fase de replegamiento no se observó ninguna actividad de ribonucleasa; esto indica que dicho replegamiento no fue exitoso.

Debido a estos resultados, se inició la estrategia de sobreexpresión en un sistema eucarionte vegetal, *Nicotiana tabacum*. Para esto, en este trabajo se generaron las construcciones moleculares necesarias y se transformaron explantes de hoja mediante la infección con *Agrobacterium tumefaciens*. Con esto, se generaron las herramientas para la futura sobreexpresión de la S-RNasa en una conformación reducida por la NaTrxh.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Ribonucleasas de la familia T2

Las ribonucleasas (RNAsas) se definen ampliamente como enzimas hidrolíticas que degradan al RNA (Egami y Nakamura, 1969). Se clasifican por su mecanismo de reacción, su estructura, sus relaciones evolutivas, su sustrato o el producto que generan (MacIntosh, 2011). En este trabajo son de interés las RNAsas de la familia T2, a la cual pertenecen las S-RNAsas (Luhtala y Parker, 2010). Históricamente, las T2 RNAsas se agrupan por su similitud con la RNasa T2 de *Aspegillus oryzae* (Sato y Egami, 1957; Deshpande y Shankar, 2002). Estas endorribonucleasas son fosfodiesterasas que cortan RNA de cadena sencilla (ssRNA) (Luhtala y Parker, 2010) y producen mono- u oligonucleótidos con un fosfato 3' terminal mediante un intermediario de fosfato cíclico 2',3' (MacIntosh, 2011). Se distinguen de otras RNAsas similares –familias de la T1 RNasa y de la RNasa A– por su tamaño de 24 a 36 kDa (cadenas polipeptídicas de alrededor de 200 residuos aminoácidos); por su pH óptimo, que se encuentra en un rango ácido de 4.0 a 6.0; y por su amplia distribución, habiéndose descrito en hongos, plantas, animales, protistas, bacterias y virus (Irie, 1999; Deshpande y Shankar, 2002).

Aunque históricamente se utilizaron otros parámetros bioquímicos, actualmente las T2 RNAsas se agrupan por su similitud estructural (Fig. 1; Luhtala y Parker, 2010). Todas estas enzimas presentan una estructura tipo ($\alpha + \beta$) –que contienen segmentos con hélices α y hebras β , aunque estos no se mezclan sino que tienden a segregarse en la cadena polipeptídica (Levitt y Chothia, 1976)– y contienen al menos 6 hélices α y 7 hebras β (Deshpande y Shankar, 2002). Las T2 RNAsas conservan estructuralmente 3 hélices alfa (α_2 , α_3 y α_4) y 6 hebras β , resaltando una hoja plegada β central de 4 hebras β antiparalelas – β_1 , β_2 , β_4 y β_5 – (Rodríguez *et al.*, 2008). En su centro, las T2 RNAsas contienen residuos hidrofóbicos que se localizan en posiciones similares (Deshpande y Shankar, 2002; Rodríguez *et al.*, 2008). También se han identificado dos sitios de unión al sustrato, denominados B1 y B2, que mediante interacciones hidrofóbicas unen, respectivamente, las bases nitrogenadas de los sitios 5' y 3' del enlace que va a ser escindido (Luhtala y Parker, 2010). También, es necesario mencionar que la mayoría de estas enzimas son glicoproteínas. El contenido de la fracción glicosídica es variable y pueden estar tanto N- como O-glicosiladas (MacIntosh, 2011).

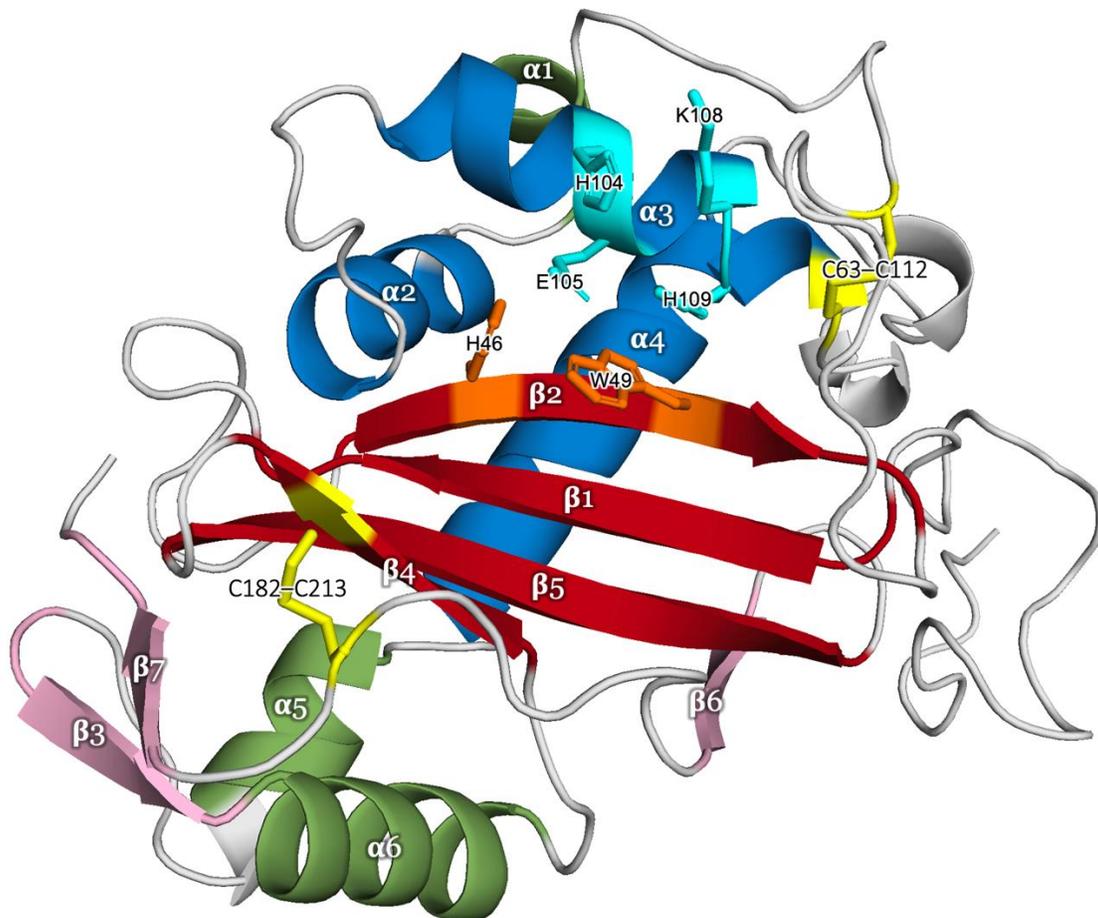


Figura 1. Estructura terciaria de una T2 RNasa, la RNasa Rh (*Rhizopus niveus*). Se muestra la estructura tipo ($\alpha + \beta$) característica de las T2 RNasas. En este caso son 6 hélices α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) y 7 hebras β ($\beta 1$ - $\beta 7$). La hoja plegada central conservada se conforma por las hebras $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 4$ y $\beta 5$ (rojo). Las hélices α conservadas son $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (azul). También se muestran los residuos de importancia catalítica de los segmentos CAS I (anaranjado) y CAS II (cian); así como los puentes disulfuro conservados entre las T2 RNasas (amarillo). Esta figura se generó en PyMOL (versión 2.5.4) utilizando la RNasa Rh (PDB 1BOL) como molde.

Otros elementos ampliamente conservados entre las T2 RNasas son los residuos de cisteína y los puentes disulfuro que forman. Aunque el número de puentes disulfuro es variable (MacIntosh, 2011), dos de ellos están conservados en todas las T2 RNasas y se consideran esenciales para su estructura y función (Irie, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). Estos puentes se forman entre Cys63-Cys112 y Cys182-Cys213 en el caso de la RNasa Rh de *Rhizopus niveus* (Kurihara *et al.*, 1996). Mientras que en las T2 RNasas de plantas y animales hay cuatro puentes disulfuro conservados, en hongos se conservan cinco (Irie, 1999; Tanaka *et al.*, 2000). La estructura de la RNasa I de *Escherichia coli* –EcrNasa I– ha permitido inferir que las T2 RNasas bacterianas tienen cuatro puentes disulfuro, siendo solo uno de ellos común a las demás T2 RNasas –aunque los demás están cercanos a los puentes disulfuro en eucariontes– (Rodríguez *et al.*, 2008).

En cuanto a su mecanismo de reacción, las T2 RNAsas, en un primer paso de transforforilación, producen un intermediario de fosfato cíclico 2',3', seguido de un paso de hidrólisis, en el cual se forma y libera un 3'monorrribonucleótido (Figura 2; Irie, 1999; Deshpande y Shankar, 2002). Estas enzimas contienen dos segmentos conservados de aminoácidos en el sitio activo (sitios CAS) que contienen, entre otros, a los aminoácidos de importancia catalítica: His46 y Trp49 en CAS I; e His104, Glu105, Lys108 e His109 en CAS II (posiciones en la RNasa Rh). Los motivos CAS I y CAS II se localizan, respectivamente, en la hebra $\beta 2$ y la hélice $\alpha 3$ (Figura 1; Kurihara *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2000), que están totalmente conservadas entre las T2 RNAsas (Rodríguez *et al.*, 2008).

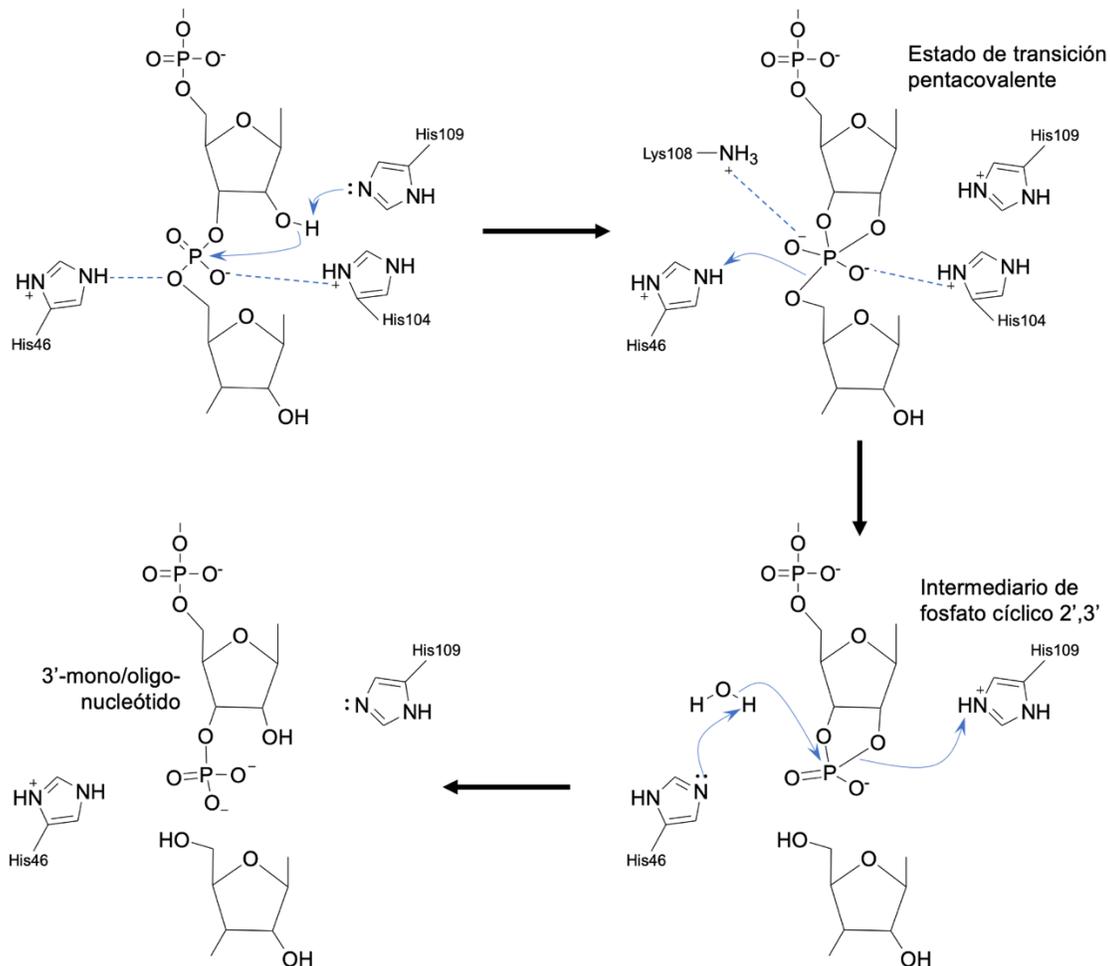


Figura 2. Mecanismo de reacción general ácido-base de las T2 RNAsas. Se muestran los pasos de transforforilación e hidrólisis involucrados en la degradación del RNA. En el paso de transforforilación las histidinas 46 y 109 actúan como ácido y base general, respectivamente. Durante la misma, en el estado de transición se observa la formación de un intermediario pentacovalente, el cual se estabiliza por la lisina 108 y la histidina 104. Subsecuentemente, en la reacción de hidrólisis se invierten los papeles de las histidinas catalíticas: His46 actúa como base general y His109 como ácido general. Al finalizar la reacción, se libera un mono- u oligonucleótido con un fosfato en el extremo 3' (modificado de Irie *et al.*, 1994; 1997).

1.2 Las T2 RNAsas de plantas

El estudio de las T2 RNAsas de plantas comenzó tras el descubrimiento de las S-RNAsas, las cuales inicialmente se identificaron en *Nicotiana glauca* como glicoproteínas asociadas al locus *S* (Anderson *et al.*, 1986) y posteriormente se caracterizaron como T2 RNAsas (McClure *et al.*, 1989). Estas proteínas se expresan en el pistilo, poco antes de la antesis, llegando a su máximo nivel de expresión en esta etapa (Anderson *et al.*, 1986); están involucradas en impedir la autofecundación en el sistema de autoincompatibilidad (AI) basado en S-RNAsas –el cual se describirá más adelante– (Lee *et al.* 1994; Murfett *et al.*, 1994). Además de las S-RNAsas, cuya importancia biológica radica en la reproducción, se han identificado otras T2 RNAsas en plantas conocidas como RNAsas *S-like* (Green, 1994). Éstas últimas participan en una gran variedad de procesos, como lo son la respuesta a deficiencia de fosfato, la senescencia, la respuesta a daño mecánico y el mantenimiento general (Löffler *et al.*, 1992; Taylor *et al.*, 1993; Kariu *et al.*, 1998; Hillwig *et al.*, 2011). Otro aspecto estudiado es la localización celular de las T2 RNAsas vegetales, que se han identificado tanto siendo secretadas como en el citoplasma –encontrándose en vacuolas, cloroplastos, mitocondrias, núcleo, retículo endoplásmico o polirribosomas– (Green, 1994; MacIntosh *et al.*, 2010; MacIntosh y Castandet, 2020).

Diversos estudios filogenéticos dividen a la familia de las T2 RNAsas vegetales en tres clases. La clase III contiene a las S-RNAsas y las clases I y II a las RNAsas *S-like* (Igic y Kohn, 2001; Hillwig *et al.*, 2010; MacIntosh *et al.*, 2010; Ramanauskas e Igić, 2017; Lv *et al.*, 2022). En cuanto a su origen, mientras que las clases I y II surgieron en las algas verdes y angiospermas, respectivamente, la clase III es exclusiva de las eudicotiledóneas (Lv *et al.*, 2022). Una distinción importante entre las S-RNAsas (clase III) y las RNAsas *S-like* (clases I y II) se presenta en su estructura primaria, donde se encuentran patrones de aminoácidos característicos de las S-RNAsas o de las RNAsas *S-like*; interesantemente, algunos de estos patrones se encuentran en los sitios CAS (Vieira *et al.*, 2008). Estudios genómicos de las secuencias codificantes de las T2 RNAsas vegetales indican que el número de copias e intrones concuerda con sus clases filogenéticas (Igic y Kohn, 2001; MacIntosh *et al.*, 2010; Ramanauskas e Igić, 2017). Las secuencias de la clase I contienen de 1 a 3 intrones, las de la clase II 8 intrones y las de la clase III contienen –en su mayoría– un solo intrón (Ramanauskas e Igić, 2017). También, el punto isoeléctrico (pI) de estas proteínas es informativo para su clasificación (Ramanauskas e Igić, 2017): las RNAsas de las clases I y II tienen valores ácidos –alrededor de 5.5–; la clase III presenta valores mucho más básicos –alrededor de 9–.

Otras características importantes de la clase I incluyen su especificidad en expresión –tejido-específica y en condiciones de estrés– y las repetidas ocasiones en las que han perdido su actividad de ribonucleasa a lo largo de la evolución. Por otro lado, la clase II de RNAsas *S-like* se conforma por genes que se encuentran en todas las plantas y que se expresan constitutivamente (MacIntosh *et al.*, 2010). Otro elemento importante de las RNAsas de la clase II es que poseen una extensión C-terminal con aminoácidos cargados o polares, la cual es responsable de su localización intracelular, ya sea en el retículo endoplásmico o en la

vacuola. Esta extensión está ausente en las RNAsas de la clase I, que se localizan en el apoplasto (Floyd *et al.*, 2017).

1.3 Las S-RNAsas

La gran mayoría de las RNAsas de la clase III se han estudiado extensamente debido a su participación en el rechazo al polen propio, fenómeno conocido como autoincompatibilidad (AI). La AI es un mecanismo genético que impide que una planta hermafrodita fértil produzca cigotos al autopolinizarse (de Nettancourt, 1977). Este mecanismo está genéticamente regulado por el *locus* multialélico *S*, que contiene a las determinantes *S* femenina (expresada en pistilo) y masculina (expresada en polen). Es mediante la interacción entre ambas determinantes *S* que se reconoce y rechaza el polen propio (cruza incompatible), permitiendo el crecimiento y fecundación del polen no propio (cruza compatible) (de Nettancourt, 2001).

El sistema de AI basado en S-RNAsas es uno de los tres sistemas de AI más estudiados hasta el momento (Goring *et al.*, 2022). Se ha identificado como responsable de la AI en las familias Solanaceae, Plantaginaceae, Rubiaceae, Rosaceae, Rutaceae y Cactaceae (Vieira *et al.*, 2008; Ramanauskas e Igić, 2017; Ramanauskas e Igić, 2021). En este sistema, la determinante *S* femenina codifica a la S-RNasa (McClure *et al.*, 1989; Lee *et al.* 1994; Murfett *et al.*, 1994), mientras que la determinante *S* masculina codifica a un grupo de proteínas denominadas SLF (*S-locus F-box*) (Lai *et al.*, 2002; Sijacic *et al.*, 2004; Kubo *et al.*, 2010).

En el sistema de AI basado en S-RNAsas, las S-RNAsas funcionan como citotoxinas que degradan el RNA de los tubos polínicos (TP) de cruza incompatible, inhibiendo su crecimiento (McClure *et al.*, 1990). La expresión de las S-RNAsas ocurre durante la maduración de la flor, llegando a su máximo en la antesis. Esta expresión se da principalmente en la porción superior del estilo, donde se secretan a la matriz extracelular del tejido de transmisión (Anderson *et al.*, 1986; Cornish *et al.*, 1987). Esto permite que entren en contacto con los TP, los cuales las incorporan indiscriminadamente –tanto al polen propio como al no propio– (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Dentro de los TP, las S-RNAsas permanecen compartimentalizadas en vacuolas (Goldraij *et al.*, 2006). En el caso de las cruza incompatible, las vacuolas se degradan y liberan a las S-RNAsas al citosol, de manera que ejercen su efecto citotóxico. En el caso de cruza compatible, la citotoxicidad de las S-RNAsas se evita, por una parte, al no degradarse las vacuolas –por lo que las S-RNAsas se quedan secuestradas– (Goldraij *et al.*, 2006) y, por otra, con la participación de la determinante *S* masculina (SLF). En este último caso, SLF promueve la degradación de las S-RNAsas no propias por la vía del proteosoma 26S mediada por ubiquitina (Qiao *et al.*, 2004; Hua y Kao, 2006; Kubo *et al.*, 2010).

Además de las características generales de las T2 RNAsas mencionadas previamente, las S-RNAsas presentan ciertas características estructurales distintivas (Figura 3). El reemplazo de una S-RNasa con la EcRNasa I –otra T2 RNasa– no es suficiente para que ocurra la respuesta

de AI, por lo que es claro que algunas de estas características podrían ser adaptaciones específicas para su participación en el rechazo del polen propio (Beecher *et al.*, 1998).

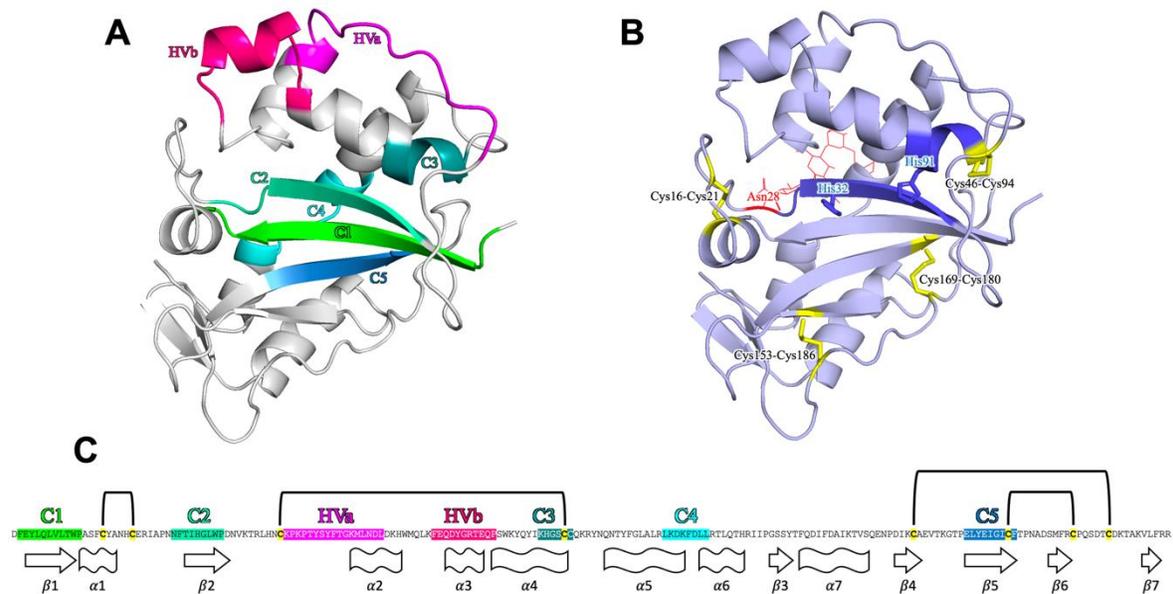


Figura 3. Estructura de la S_{F11} -RNasa, ejemplificando a la de las S-RNasas. **A.** Estructura tridimensional donde se muestran en diferentes colores las cinco regiones conservadas (C1, C2, C3, C4 y C5) y las dos regiones hipervariables (HVa y HVb) de las S-RNasas. **B.** Estructura tridimensional donde se observa: (1) el sitio de glicosilación, con la cadena glicosídica unida a la Asn28 (rojo); (2) los sitios conservados CAS I y CAS II (azul oscuro), en donde están las histidinas catalíticas His32 e His91; y (3) los residuos de cisteína (amarillo) involucrados en los cuatro puentes disulfuro conservados en todas las S-RNasas. **C.** Secuencia de la S_{F11} -RNasa; las regiones conservadas e hipervariables se encuentran resaltadas con los mismos colores que en A. En amarillo se indican los ocho residuos de cisteína involucrados en los puentes disulfuro conservados (conexiones por líneas en la parte superior de la secuencia). Debajo de la secuencia también se indican diferentes elementos de la estructura secundaria presente en la proteína ($\beta 1$ - $\beta 7$, $\alpha 1$ - $\alpha 7$). Esta figura se generó utilizando la S_{F11} -RNasa (PDB 1I00) como molde.

Al comparar la secuencia de aminoácidos de las distintas S-RNasas, se observa que su estructura primaria contiene cinco regiones altamente conservadas (C1, C2, C3, C4 y C5) y dos altamente variables (HVa y HVb) (Ioerger *et al.*, 1991; Tsai *et al.*, 1992; Fig. 3A). Las regiones C2 y C3 se sobrelapan con los motivos CAS I y CAS II, respectivamente, conservados en todas las T2 RNasas (Green, 1994; Vieira *et al.*, 2008). Las regiones C1, C4 y C5 son hidrofóbicas y en ellas se encuentran residuos que forman parte del núcleo hidrofóbico de estas proteínas (Ioerger *et al.*, 1991). Por otro lado, las regiones hipervariables –HVa y HVb– son las regiones más hidrofílicas de las S-RNasas (Ioerger *et al.*, 1991) y en la estructura terciaria se encuentran contiguas y expuestas al solvente (Ida *et al.*, 2001; figura 3A); esto sugiere un papel en la interacción entre estas regiones hipervariables y la determinante S masculina (Matton *et al.*, 1997). Es importante notar que las S-RNasas de las rosáceas

difieren en algunos aspectos de aquellas de las solanáceas. En primer lugar, no poseen una región C4 propiamente homóloga a la que se encuentra en Solanaceae; sin embargo, poseen una región conservada (RC4) en una posición similar (Sassa *et al.*, 1996; Ushijima *et al.*, 1998). Además, las S-RNasas de Rosaceae poseen una sola región hipervariable, RHV, que se encuentra en una posición similar a la región HVa de Solanaceae (Ushijima *et al.*, 1998). En las S-RNasas de Rosaceae se ha observado que, a pesar de que se encuentra expuesta al solvente (Matsuura *et al.*, 2001), la región hipervariable no es suficiente para el rechazo del polen alelo S específico (Zisovich *et al.*, 2004).

Las S-RNasas son glicoproteínas cuyas cadenas glicosídicas son de composición variable (Woodward *et al.*, 1989; Broothaerts *et al.*, 1991), lo que sugiere una participación en la interacción con la determinante S masculina (Woodward *et al.*, 1989). Sin embargo, al eliminar la fracción glicosídica de una S-RNasa, no se ve afectada su actividad de ribonucleasa ni su efectividad en la respuesta de AI (Broothaerts *et al.*, 1991; Karunanandaa *et al.*, 1994). Aun así, todas las S-RNasas de las solanáceas conservan un sitio putativo de N-glicosilación en la primera posición de la región conservada C2 (Ioerger *et al.*, 1991; Fig. 3B). En Rosaceae, las S-RNasas conservan su sitio putativo de N-glicosilación en la región RC4 – en vez del presentado en Solanaceae– (Ushijima *et al.*, 1998).

Además de las regiones conservadas, existen otros aminoácidos perfectamente conservados entre todas las S-RNasas. Tal es el caso de los ocho residuos de cisteína, cuya conservación indica una importancia estructural y funcional (Ioerger *et al.*, 1991; Ishimizu *et al.*, 1996). Respecto a las posiciones relativas de estas cisteínas, hay dos entre las regiones C1 y C2, una justo antes de la región HVa, una en la región C3, una antes de la región C5, una se encuentra en la región C5 y las últimas dos se encuentran después de esta misma región (Ioerger *et al.*, 1991; Green, 1994; Ushijima *et al.*, 1998; Vieira *et al.*, 2008; Fig. 3B y 3C). Diversos estudios muestran que las S-RNasas presentan cuatro puentes disulfuro que se conservan estructuralmente, tanto en su secuencia de aminoácidos como en su estructura tridimensional (Ishimizu *et al.*, 1996; Oxley y Bacic, 1996; Ida *et al.*, 2001; Matsuura *et al.*, 2001). Además de las cisteínas que participan en puentes disulfuro, en Solanaceae es posible encontrar cisteínas libres; una de ellas –Cys95 en la S₆-RNasa de *Nicotiana glauca*– se encuentra ampliamente distribuida entre las S-RNasas (Ishimizu *et al.*, 1996; Oxley y Bacic, 1996).

2 ANTECEDENTES

Además de las determinantes *S*, es necesaria la participación de otros genes para que la respuesta de AI ocurra de manera adecuada. En el caso del sistema de AI basado en S-RNasas, uno de estos genes es *NaTrxh*, que codifica a una tiorredoxina *h* del subgrupo II que se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión en el estilo, mostrando una colocalización con las S-RNasas en *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Estudios *in vitro* muestran que existe una fuerte interacción entre la NaTrxh y la S-RNasa, además de que la S-RNasa es blanco de reducción por la NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Por medio de experimentos de pérdida de función, en el que se expresó en híbridos *Nicotiana plumbaginifolia* X *N. alata* una NaTrxh con su sitio activo no funcional, se demostró que su actividad de oxidorreductasa es esencial para que ocurra el rechazo del polen del alelo *S* específico (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Este efecto se explica con el hecho de que la reducción por la NaTrxh produce un incremento de siete veces en la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Es necesario aclarar que la NaTrxh reduce a la S-RNasa de manera muy específica, ya que únicamente reduce uno de sus puentes disulfuro, que en el caso de la S_{C10} -RNasa corresponde al que se forma entre Cys155 y Cys185 (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). También, la reducción de la S-RNasa se da solamente por acción de la NaTrxh y no por otras tiorredoxinas (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Esto probablemente se deba a las extensiones N- y C-terminales en la NaTrxh, las cuales le confieren su especificidad y afinidad por la S-RNasa. En particular, se ha observado que la extensión N-terminal es necesaria para la reducción de la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014; Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Es interesante resaltar que el puente disulfuro blanco de reducción se encuentra conservado, no solo entre las S-RNasas, sino en todas las RNasas de la familia T2 (Irie, 1999; Tanaka *et al.*, 2000).

El aumento de actividad catalítica en la S-RNasa indica cambios conformacionales en su estructura (Gutteridge y Thornton, 2004), razón por la cual en el laboratorio se buscan identificar dichos cambios mediante la resolución de la estructura de una variante de la S_{C10} -RNasa que mantenga la conformación reducida por la NaTrxh. Se propone que esta variante sea la S_{C10} -RNasa(C155S/C185S), la cual posee los residuos de cisteína involucrados en el puente disulfuro blanco de reducción por la NaTrxh sustituidos por serina, con lo cual se estaría simulando la estructura de la S_{C10} -RNasa reducida en el puente disulfuro blanco de la NaTrxh. En este trabajo se buscó, por un lado, expresar a la S-RNasa funcional en *E. coli* y, por otro lado, obtener la variante S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) para la generación de líneas transgénicas de *N. tabacum* que la expresen constitutivamente. De este modo se podrán purificar estas proteínas para realizar su análisis tanto enzimático como estructural mediante la difracción de rayos X. Esto permitirá observar los cambios conformacionales que experimentan las S-RNasas al ser reducidas por la NaTrxh y comprender lo que involucra el incremento en su actividad de ribonucleasa.

3 OBJETIVOS

Objetivo general

Generar las herramientas biológicas que permitan obtener a la S-RNasa recombinante funcional.

Objetivos particulares

- Sobreexpresar a la S_{C10} - y S_{A2} -RNasa en las cepas de *E. coli* BL21-AI y SHuffle T7.
- Evaluar la solubilización y renaturalización de la S_{A2} -RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión.
- Generar líneas transgénicas con la secuencia S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) bajo la regulación del promotor constitutivo 35S.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Expresión de la S-RNasa en *E. coli*

4.1.1 Sobreexpresión de la S_{A2} - y S_{C10} -RNasa en la cepa de *E. coli* BL21-AI

Se decidió utilizar la cepa de *E. coli* BL21-AI, ya que favorece lo que se conoce como “expresión contenida”, es decir, reduce la expresión de genes potencialmente tóxicos –como el de la *S-RNasa*–. Esto se logra ya que la cepa contiene una inserción cromosómica del gen que codifica a la T7 RNA polimerasa en el locus *araB* del operón *araBAD* –eliminando al gen *araB*–, de modo que la expresión basal de la T7 RNA polimerasa permanece muy baja y sólo es inducible por L-arabinosa (Narayanan *et al.*, 2011). Dado que los vectores de expresión utilizados –pMCSG53 y pMALp5x– contienen el gen de interés río abajo del promotor T7, su expresión se debe de inducir añadiendo L-arabinosa –para expresar la T7 RNA polimerasa– e isopropil tiogalactósido (IPTG) –para expresar el gen de interés–. Para sobreexpresar la S-RNasa recombinante, se utilizaron las variantes alélicas S_{A2} y S_{C10} . Las secuencias del cDNA de dichas variantes se obtuvieron y clonaron en los vectores pMCSG53 y pMALp5x previamente en el laboratorio (Gariglio-Rangel, 2022). Por lo tanto, ya se contaba con las construcciones pMCS: S_{A2} -RNasa, pMAL: S_{A2} -RNasa y pMAL: S_{C10} -RNasa (Figura 4).

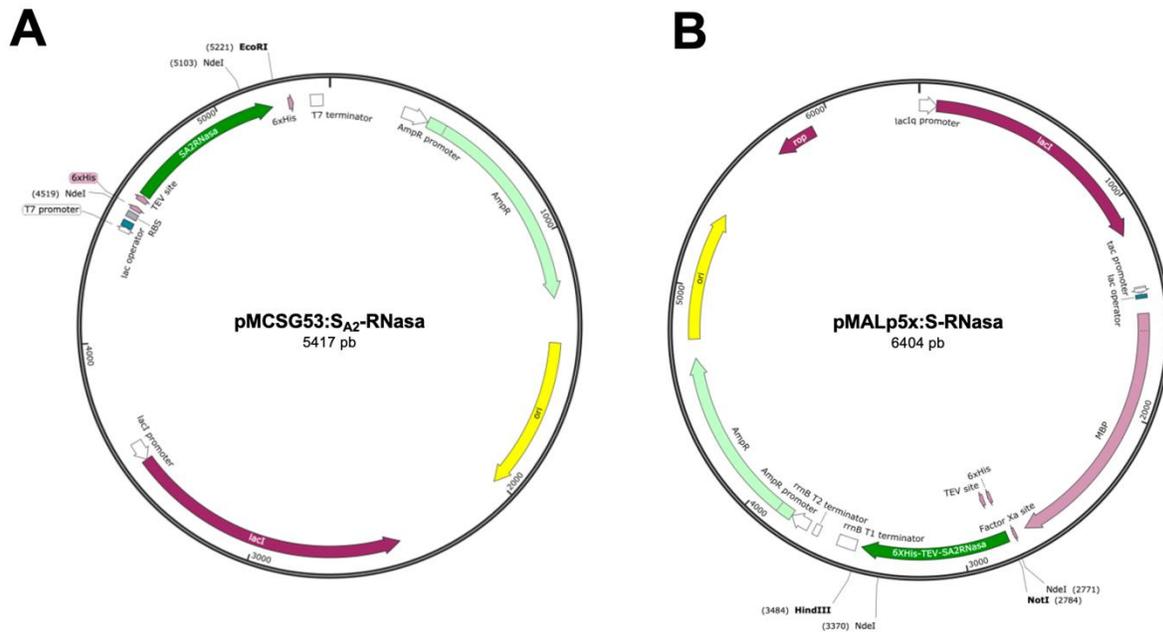


Figura 4. Mapas físicos de las construcciones que se generaron para la expresión de la S-RNasa recombinante en *E. coli* BL21-AI. **A.** pMCS:SA₂-RNasa. En esta construcción, el gen de la SA₂-RNasa se encuentra clonado entre el promotor T7 y el terminador T7 y se le añadió una etiqueta de seis histidinas (6xHis). El gen de interés queda bajo la regulación del promotor T7, que está regulado por el operador *lac*. El vector contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR), lo que permite seleccionar células transformantes con dicho antibiótico. **B.** Construcciones pMAL:S-RNasa. Las construcciones pMAL:SA₂-RNasa y pMAL:SC₁₀-RNasa se ejemplifican únicamente con pMAL:SA₂-RNasa ya que, en ambas, el gen de interés –la SA₂-RNasa o SC₁₀-RNasa– se encuentra clonado entre la proteína de unión a maltosa (MPB) y el terminador T1. El gen de interés, que se encuentra como proteína de fusión a MPB, queda bajo la regulación del promotor *tac*, que está regulado por el operador *lac*. El vector contiene un gen de resistencia a ampicilina (AmpR). Tomado de Gariglio-Rangel (2022).

Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* BL21-AI (Invitrogen) mediante choque térmico (Apéndice 1) con las construcciones pMCS:SA₂-RNasa, pMAL:SA₂-RNasa y pMAL:SC₁₀-RNasa. En el caso de las tres construcciones, las células transformantes se seleccionaron con ampicilina (100 µg/mL) y se aisló una colonia para su posterior sobreexpresión.

El protocolo para la sobreexpresión de las proteínas recombinantes se describe a continuación:

1. Inocular un precultivo en 5 mL de medio 2xYTA (Apéndice 2), adicionado con ampicilina (100 µg/mL) e incubar a 37 °C con agitación (225 rpm) por 12-16 h.
2. Inocular 65 mL de medio 2xYTA con ampicilina (100 µg/mL) con 650 µL del precultivo e incubar a 37 °C con agitación (225 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5 – 0.7.

3. Inducir la expresión del gen de interés con 0.2% de L-arabinosa e IPTG 0.1 mM y continuar la incubación a 37 °C por 3 h (en algunos casos, como se indica, se incubó a 16°C por 24 h).
4. Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm por 10 min a 4 °C, decantar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 3.25 mL de amortiguador de fosfatos salino (PBS) (Apéndice 2) enfriado a 4 °C. La suspensión se almacenó a -70 °C hasta su uso.

La extracción de las proteínas totales de las células bacterianas se realizó mediante sonicación, con base en el siguiente protocolo:

1. Lisar las células por sonicación manteniéndolas en hielo (células resuspendidas en PBS –paso 4 del protocolo anterior–). Se realizaron pulsos de 10 s con intervalos de 10 s entre cada uno durante 3 min.
2. Agregar tritón X-100 al 20% (v/v) a una concentración final del 1% y mezclar suavemente.
3. Incubar en hielo con agitación suave por 30 min y centrifugar a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C.
4. Recuperar el sobrenadante (*fase soluble*) y resuspender el botón en 3.25 mL de PBS (*fase insoluble*). Ambas fases se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

4.1.2 Sobreexpresión de una S-RNasa inactiva en *E. coli*

Considerando la posibilidad de que la S-RNasa recombinante se exprese de forma insoluble en *E. coli* debido a su citotoxicidad como ribonucleasa, se realizó la expresión de una S-RNasa sin dicha actividad. La construcción previamente generada en el laboratorio pMCS:SA₂-RNasa(H93R), que contiene una variante inactiva de la SA₂-RNasa (con una de las histidinas catalíticas, His93, reemplazada por arginina), se usó para transformar células quimiocompetentes de la cepa de *E. coli* BL21-AI mediante el protocolo descrito en el apéndice 1. La sobreexpresión se realizó mediante los protocolos previamente descritos, incubando el cultivo a 37 °C durante 3 h una vez inducida la expresión. La extracción de proteína total se realizó por sonicación mediante los protocolos previamente descritos.

4.1.3 Sobreexpresión de la SC₁₀-RNasa en la cepa de *E. coli* SHuffle T7

La cepa de *E. coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) está diseñada para promover la formación de puentes disulfuro en el citosol mediante la expresión constitutiva de una copia cromosomal de la disulfuro isomerasa DsbC. Por lo tanto, esta cepa resultó prometedora para la expresión de la S-RNasa recombinante que contiene cuatro puentes disulfuro. Se transformaron células quimiocompetentes de *E. coli* SHuffle T7 Express mediante choque térmico (Apéndice 1) con las construcciones pMCS:SC₁₀-RNasa y pMAL:SC₁₀-RNasa. En ambos casos las células transformantes se seleccionaron con ampicilina (100 µg/mL). La sobreexpresión se realizó a 37 °C por 3 h y la extracción de proteínas se realizó mediante sonicación.

4.1.4 Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes

Todos los extractos de proteína total se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) como se describe en el apéndice 1. Una vez concluida la electroforesis, se tiñeron las proteínas en los geles con azul brillante de Coomassie. Para los ensayos tipo Western-blot, al finalizar el SDS-PAGE, se realizó una electrotransferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa como se describe en el apéndice 1. Posteriormente, para la inmunodetección de las proteínas recombinantes (Apéndice 1), se utilizaron como anticuerpos primarios: anti-6xHis (policlonal; 1:10,000), anti-S_{A2}-RNasa (policlonal; 1:5,000) o anti-S_{C10}-RNasa (monoclonal; 1:5,000), según el caso de la proteína recombinante expresada, y se revelaron por la actividad de la fosfatasa alcalina acoplada al anticuerpo secundario (anti-conejo para los policlonales y anti-ratón para el monoclonal).

4.1.5 Solubilización de la S-RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión

En otro intento por obtener a la S-RNasa recombinante funcionalmente activa a partir de *E. coli*, se sobreexpresó la S_{A2}-RNasa para solubilizarla y replegarla. Para ello se utilizó la construcción pMCS:S_{A2}-RNasa (Figura 4B) para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* BL21-AI. Para la sobreexpresión, la extracción de las proteínas totales y la separación de la fase insoluble se siguió el mismo protocolo que se describió anteriormente. La fase insoluble, sin embargo, se resuspendió en 25 mL de amortiguador LEW (Apéndice 2). Se lavó tres veces con 25 mL de amortiguador LEW (centrifugando a 8000 rpm por 5 min a 4 °C entre cada lavado) y finalmente, se resuspendió en 10 mL de amortiguador LEW.

La solubilización de la fase insoluble se realizó de la siguiente forma:

1. Centrifugar a 4,600 rpm (10,000 x g) por 30 min a 4 °C y descartar el sobrenadante.
2. Resuspender en 5 mL de amortiguador de columna (Apéndice 2) e incubar con agitación por 60 min a 37 °C.
3. Centrifugar a 4,600 rpm (10,000 x g) por 30 min a 20 °C y recuperar el sobrenadante sin alterar el botón.
4. Filtrar la muestra con una membrana con poros de 0.45 µm.

Para purificar la proteína recombinante se utilizó la resina Protino Ni-TED (Macherey-Nagel), siguiendo el protocolo que a continuación se describe:

1. Lavar con 25 volúmenes cama (vc) de H₂O.
2. Equilibrar con 4 vc de amortiguador de columna (Apéndice 2).
3. Cargar la muestra y dejar fluir por gravedad, recolectando la fracción no unida.
4. Lavar con 3 vc de amortiguador de columna.
5. Lavar con 2 vc de amortiguador de columna + imidazol 20 mM.
6. Eluir con 9 vc de amortiguador de columna + imidazol 250 mM y recuperar fracciones de 1 mL.

Todas las fracciones recolectadas se analizaron por SDS-PAGE (Apéndice 1). Una vez concluida la electroforesis, se realizó la tinción de los geles con azul brillante de Coomassie.

4.1.6 Renaturalización de la S-RNasa recombinante solubilizada a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*

Una vez purificada la S_{A2}-RNasa solubilizada, se favoreció su renaturalización mediante una diálisis gradual/escalonada. Se dializó 1 mL de muestra contra 250 mL de PBS con etilenglicol al 20% (v/v) y 2-mercaptoetanol 5 mM con concentraciones decrecientes de urea en PBS (6 M, 5 M, 4 M, 3 M, 2.5 M, 2 M, 1.5 M, 1 M, 0.5 M y 0 M). Cada diálisis se realizó por 12 h a 4 °C. Una vez finalizado este proceso, se cuantificó la concentración de proteínas de la muestra recuperada y se midió su actividad de ribonucleasa (ver apartado 4.1.7).

4.1.7 Ensayo de actividad de ribonucleasa

El correcto plegamiento de la S_{A2}-RNasa se determinó indirectamente mediante la evaluación de su actividad de ribonucleasa. Para este ensayo, lo primero que se hizo fue contar con el sustrato –RNA de *Torula* tipo VI (Sigma-Aldrich)– limpio y puro con el siguiente protocolo:

1. Disolver 0.5 g de RNA de *Torula* tipo VI en 4 mL de dH₂O y agregar hidróxido de amonio por goteo poco a poco.
2. Precipitar el RNA agregando 0.5 mL de acetato de amonio 10 M y 2.5 mL de isopropanol. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 min a 4 °C.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender el RNA en 1.5 mL de dH₂O
4. Repetir los pasos 1-3 dos veces más.
5. Agregar lentamente 2 mL de LiCl 8 M frío hasta que se forme un precipitado y agitar.
6. Centrifugar a 2,500 rpm por 10 min y resuspender el botón en 2 mL de dH₂O.
7. Agregar 2 mL de fenol:cloroformo:alcohol-isoamílico (25:24:1) y agitar suavemente por 5 min.
8. Centrifugar a 4,000 rpm por 10 min.
9. Repetir los pasos 7-8 dos veces más.
10. Precipitar el RNA con 1 mL de acetato de amonio 10 M y 5 mL de isopropanol frío. Mezclar y centrifugar a 4,000 rpm por 10 min.
11. Resuspender en 4 mL de dH₂O y repetir el paso 10 sin resuspender en agua.
12. Lavar el botón con etanol 95%
13. Lavar el botón con etanol absoluto
14. Secar el botón con vacío.

Utilizando como sustrato al RNA previamente lavado, se realizó el ensayo de actividad como se describe a continuación:

1. Enfriar tubos de 1.5 mL en hielo.
2. Añadir a cada tubo 200 µL de amortiguador de actividad (fosfato de potasio 0.1 M (pH 7), KCl 0.05 M, glicerol 25%, RNA purificado 4 mg/mL) frío.
3. Añadir 200 ng ó 1 µg de la S_{A2}-RNasa replegada. Mezclar por vórtex e incubar inmediatamente a 37 °C por 15 min.
4. Añadir a cada tubo 40 µL de solución de paro (ácido fosfotúngstico 0.75%, HClO₄ 25%) previamente enfriada en hielo. Agitar por vórtex y dejar precipitando en hielo por 15 min.

- Centrifugar a máxima velocidad por 20 min a 4 °C. Tomar 50 µL del sobrenadante y diluirlo 1:10 antes de leer la absorbancia a 260 nm.

Como control positivo de este ensayo se utilizó la RNasa A (Jena Bioscience) y como control negativo, no se añadió ninguna ribonucleasa.

4.2 Generación de líneas transgénicas de *Nicotiana tabacum*

4.2.1 Amplificación de las secuencias genómicas de la *Sc10-RNasa* y la *Sc10-RNasa(H31N)* y su clonación en pJET1.2

Para la expresión de la *Sc10-RNasa* en *N. tabacum* se utilizó su secuencia genómica, la cual codifica a la proteína inmadura (*i.e.* con péptido señal) e incluye un intrón de 99 pb entre las posiciones 232 y 330, así como esta misma secuencia pero que codifica una variante catalíticamente no funcional, la *Sc10-RNasa(H31N)*. Ambas secuencias, *Sc10-RNasa* y *Sc10-RNasa(H31N)*, se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de las construcciones preexistentes pUC57:(ChiP)*Sc10-RNasa* y pUC57:(ChiP)*Sc10-RNasa(H31N)*, respectivamente (proveídas por el laboratorio del Dr. Felipe Cruz García, Facultad de Química, UNAM). Los oligonucleótidos empleados –gSc10-F, en sentido, y gSc10-R, en antisentido– (Tabla 1) flanquean las secuencias de la *Sc10-RNasa* y la *Sc10-RNasa(H31N)* con un sitio *KpnI* en el extremo 5' y un sitio *XhoI* en el 3'. Para la amplificación por PCR se usó una DNA polimerasa de alta fidelidad (Platinum SuperFi, Invitrogen). Los componentes de esta reacción se muestran en la tabla 2 y sus condiciones en la tabla 3.

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para las distintas reacciones de PCR. Subrayados y en cursivas se muestran los sitios de restricción *KpnI* en el oligonucleótido gSc10-F, y *XhoI* en el gSc10-R. Subrayado y resaltado en rojo se muestra el codón y el nucleótido que se sustituye con los oligonucleótidos C155S-A, C155S-B, C185S-A y C185S-B.

Nombre	Secuencia	Tm (°C)
gSc10-F	5' CGG <u>GGTACCATGCTTA</u> ACTCACCGCTCACATCAG 3'	66.6
gSc10-R	5' CCG <u>CTCGAGTCATGGAA</u> ACTTAATCTCATTACTTCCCGTAGG 3'	65.3
pK2-F	5' CGGCCGCACTAGTGATATCA 3'	56.8
pJET-F	5' CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC 3'	60.0
pJET-R	5' AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG 3'	60.0
C155S-A	5' CAAGGGTATCCTAACCTGT <u>CA</u> CTAAAGGAATAATGG 3'	–
C155S-B	5' CCATTATTCCTTTAGTG <u>G</u> ATGACAGGTTAGGATACCCCTTG 3'	–
C185S-A	5' CCTCATCCCAAGACAT <u>C</u> CAAACCTACGGGAAGT 3'	–
C185S-B	5' ACTTCCCGTAGGTTT <u>G</u> ATGTCTGGGATGAGG 3'	–

Tabla 2. Componentes de la PCR para amplificar las secuencias *Sc10-RNasa* y *Sc10-RNasa(H31N)* usando la mezcla de reacción DNA polimerasa Platinum SuperFi (Invitrogen).

Componentes	Volumen (µL)
Master Mix (2X)	12.5

Oligonucleótido sentido (10μM)	1.25
Oligonucleótido antisentido (10μM)	1.25
DNA molde	0.5
H ₂ O	9.5
Total	25

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de la secuencia *S_{C10}-RNasa* y la *S_{C10}-RNasa(H31N)* usando la mezcla de reacción *DNA polimerasa Platinum SuperFi* (Invitrogen).

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98	30 s	1
Desnaturalización	98	10 s	
Alineamiento	67	10 s	35
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (teñido con bromuro de etidio) y se purificaron a partir del mismo gel (Apéndice 1). Los fragmentos de DNA purificado –tanto de *S_{C10}-RNasa* como de *S_{C10}-RNasa(H31N)*– se ligaron por separado al vector de clonación pJET1.2 (Figura 5) con la reacción que se describe en la tabla 4. Cada reacción se incubó a 22 °C por 12-16 h y se tomaron 5 μL para transformar células quimiocompetentes XL10 Gold (como se describe en el apéndice 1), seleccionando a las transformantes con ampicilina (100 μg/mL).

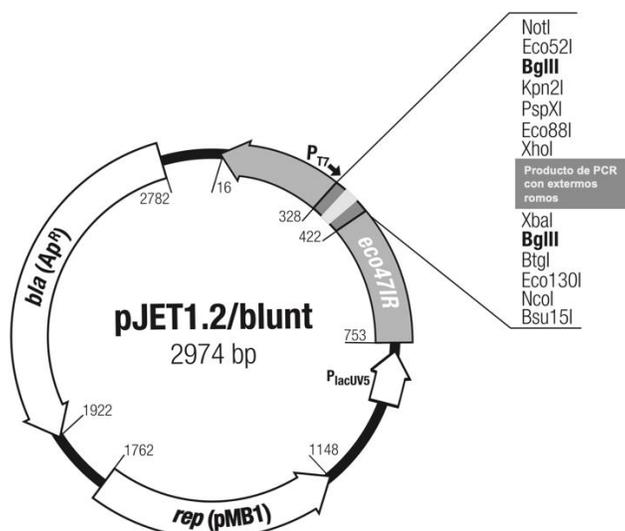


Figura 5. Mapa físico del vector pJET1.2. En este plásmido se clonaron los genes *S_{C10}-RNasa* y *S_{C10}-RNasa(H31N)*. El gen de interés es clonado como producto de PCR con extremos romos, como se muestra. El plásmido contiene un gen de resistencia a ampicilina [*bla* (Ap^R)], con lo que se

seleccionaron las células transformantes. Modificado del manual *CloneJET PCR Cloning Kit* de Thermo Scientific.

Tabla 4. Reacción de ligado para clonar los insertos $-S_{C10-RNasa}$ y $S_{C10-RNasa}(H31N)-$ en el vector pJET1.2. Para esta reacción se utilizó el *Kit de clonado de PCR CloneJET* (Thermo Scientific). La reacción se preparó en hielo.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador de reacción 2X	5
Inserto	1
pJET1.2	0.5
H ₂ O	3
T4 DNA ligasa	0.5
Total	10

Para corroborar la clonación de pJET:S_{C10}-RNasa en *E. coli*, se seleccionaron 10 colonias transformantes y se crecieron en medio LB con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12-16 h. De cada cultivo se tomaron 0.5 μL como molde para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos gSc10-F y gSc10-R (Tabla 1); los componentes y condiciones de estas reacciones se describen en las tablas 5 y 6, respectivamente. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se aisló una colonia transformante y se purificó su DNA plasmídico (Apéndice 1). Este mismo procedimiento se realizó para la corroboración de la clonación de la construcción pJET:S_{C10}-RNasa(H31N).

Tabla 5. Componentes de un ensayo de PCR de colonia para amplificar la secuencia genómica $S_{C10-RNasa}$, usando la mezcla de reacción *DNA Polimerasa TEMPase Hot Start* (Ampliqon).

Componentes	Volumen (μL)
Master Mix (2X)	5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.5
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.5
DNA molde	0.5
H ₂ O	3.5
Total	10

Tabla 6. Condiciones de un ensayo de PCR de colonia para la amplificación de la secuencia genómica $S_{C10-RNasa}$, usando la mezcla de reacción *DNA Polimerasa TEMPase Hot Start* (Ampliqon).

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	30 s	

Alineamiento	65	30 s	30
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	5 min	1

Para analizar la secuencia de los genes *S_{C10}-RNasa* y *S_{C10}-RNasa(H31N)* clonados en pJET, los insertos se secuenciaron a partir de las construcciones pJET:*S_{C10}-RNasa* y pJET:*S_{C10}-RNasa(H31N)*, respectivamente, haciendo uso del servicio de la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, Instituto de Biotecnología, UNAM. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos pJET-F y pJET-R (Tabla 1), los cuales son complementarios en regiones del pJET1.2 que flanquean al gen de interés. Las secuencias se alinearon en Clustal Omega con la secuencia genómica de la *S_{C10}-RNasa* reportada en GenBank (U45959.1).

4.2.2 Clonación de las secuencias genómicas *S_{C10}-RNasa* y *S_{C10}-RNasa(H31N)* en el vector de entrada pENTR4

Para la expresión de los genes de interés en *N. tabacum* se utilizó el vector binario pK2GW7, que más adelante se describirá. Para insertar dichos genes en este plásmido, deben clonarse previamente en un vector de entrada, como lo es pENTR4 (Invitrogen) (Figura 6).

La clonación de los genes *S_{C10}-RNasa* y *S_{C10}-RNasa(H31N)* en pENTR4 se realizó mediante digestión y ligado utilizando los sitios de restricción *Kpn*I y *Xho*I, que previamente se añadieron a los genes de interés (Tabla 1). Se digirieron los plásmidos pENTR4, pJET:*S_{C10}-RNasa* y pJET:*S_{C10}-RNasa(H31N)* con las enzimas de restricción *Kpn*I y *Xho*I, como se describe en la tabla 7.

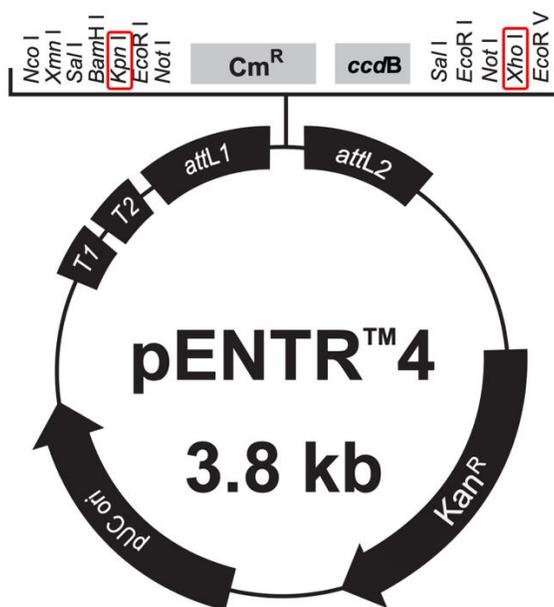


Figura 6. Mapa físico del vector pENTR4. En este vector de entrada se clonaron los genes *S_{C10}-RNasa* y *S_{C10}-RNasa(H31N)*. El gen de interés se clonó como producto de una reacción de digestión con *Kpn*I

+ *Xho*I (encerrados en rojo sus sitios de restricción) que también se usaron para digerir pENTR4. También se muestran los dos locus *att*L (*att*L1, *att*L2) que flanquean el sitio donde se inserta el gen de interés, y el gen de resistencia a kanamicina (Kan^R). Modificado del manual *Gateway*® *pENTR*TM *Dual Selection Vectors* de Invitrogen.

Tabla 7. Reacción de doble digestión utilizando el *Sistema de clonado de enzimas de restricción Anza* (Invitrogen). La reacción se preparó a temperatura ambiente. Cada reacción se incubó a 37 °C por 15 min.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador Anza 10X	2
DNA	5
Enzima 1	1
Enzima 2	1
H ₂ O	11
Total	20

Los productos de las reacciones de digestión se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% (teñido con bromuro de etidio) y se purificó el DNA de las bandas (Apéndice 1) de 759 pb a partir de las digestiones de pJET:Sc₁₀-RNasa y pJET:Sc₁₀-RNasa(H31N); y de 2,280 pb de la digestión de pENTR4. Los fragmentos de DNA purificado de *Sc*₁₀-*RNasa* y *Sc*₁₀-*RNasa*(H31N) se ligaron al fragmento, también purificado, del vector pENTR4 (Tabla 8). Cada reacción se incubó a 22 °C por 10 min y se tomaron 5 μL para transformar células quimiocompetentes XL10 Gold (Apéndice 1), usando LB-agar con kanamicina (50 μg/mL) como agente de selección.

Tabla 8. Reacción de ligado de extremos cohesivos. Para esta reacción se utilizó la *T4 DNA ligasa* (Thermo Scientific). La reacción se preparó en hielo.

Componente	Volumen (μL)
Amortiguador DNA Ligasa 10X T4	2
Inserto	2
Vector linealizado	1
H ₂ O	14.6
T4 DNA ligasa	0.4
Total	10

Para corroborar la clonación de pENTR:Sc₁₀-RNasa en *E. coli*, se seleccionaron 10 colonias transformantes y se crecieron en medio LB con kanamicina (100 μg/mL) durante 12-16 h. De cada cultivo se tomaron 0.5 μL como molde para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos gSc₁₀-F y gSc₁₀-R (Tabla 1); los componentes y condiciones de estas reacciones se describen en las tablas 5 y 6, respectivamente. Los productos de la

amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se aisló una colonia transformante y se purificó su DNA plasmídico (Apéndice 1). Este mismo procedimiento se realizó para identificar una colonia transformante para la construcción pENTR:Sc10-RNasa(H31N).

La integridad de las construcciones pENTR:Sc10-RNasa y pENTR:Sc10-RNasa(H31N) se corroboró mediante un ensayo de restricción, en el que cada construcción se sometió a dos digestiones con distintos pares de enzimas de restricción: por un lado, *KpnI* + *XhoI*, y por otro *EcoRI* + *NdeI* (los componentes y condiciones se describen en la tabla 7). Los fragmentos de estos ensayos de restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

4.2.3 Clonación de las secuencias genómicas *Sc10-RNasa* y *Sc10-RNasa(H31N)* en el vector binario pK2GW7

Las secuencias genómicas *Sc10-RNasa* y *Sc10-RNasa(H31N)* se transfirieron de pENTR4 hacia pK2GW7 mediante reacciones de recombinación tipo *LR*. Esto gracias a que el vector de entrada pENTR4 contiene los sitios *attL* (Figura 6) y el vector destino pK2GW7 a los sitios *attR* (Figuras 7 y 8). El sistema de recombinación *LR* –mediado por las proteínas Int, IHF y Xis– lleva a cabo la reacción $attL + attR \rightarrow attB + attP$ quedando los sitios *attB* en el vector destino (Landy, 1989; Hartley *et al.*, 2000; figura 8). De este modo, se generaron las construcciones pK2:Sc10-RNasa y pK2:Sc10-RNasa(H31N). Cada reacción de recombinación se preparó como se indica en la tabla 9 y se incubó a 25 °C durante 1 h. Transcurrido este tiempo, se añadió 1 µL de proteinasa K (Invitrogen) y se incubó a 37 °C por 10 min. Se utilizaron 5 µL de la reacción para transformar células quimiocompetentes XL10 Gold (Apéndice 1), las cuales se crecieron en un medio selectivo de LB-agar con espectinomicina (50 µg/mL).

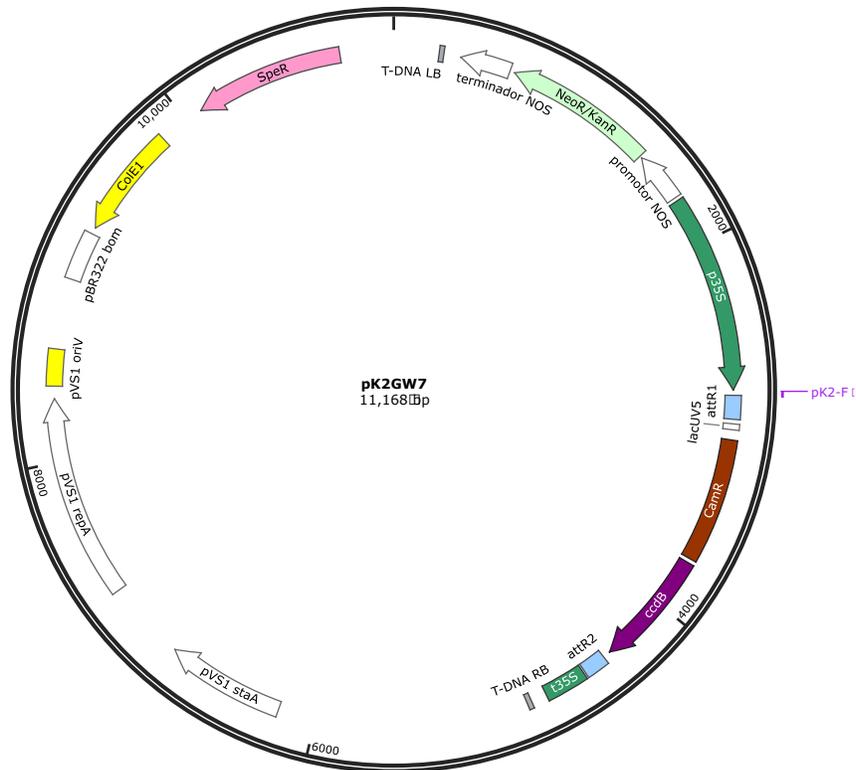


Figura 7. Mapa físico del vector pK2GW7. Este vector contiene una región de T-DNA, que es la que se transfiere a las células vegetales, delimitada por los bordes derecho e izquierdo (T-DNA LB y T-DNA RB, respectivamente; en gris). En el T-DNA están los dos sitios *attR* (*attR1*, *attR2*, en azul) que permiten la recombinación con un vector con los sitios compatibles *attL*; entre estos sitios se encuentra un gen de resistencia a cloranfenicol (Cam^R, en marrón) y el gen letal *ccdB* (en violeta) – que serán eliminados al ocurrir la recombinación con pENTR4–. Flanqueando los sitios *attR* están el promotor y terminador del 35S (*p35S* y *t35S*, respectivamente, en verde) –que dirigen la expresión del gen de interés–. Contiene también un gen de resistencia a espectinomicina en bacteria (Sm^R, en rosa) y un gen de resistencia a kanamicina en planta (NeoR/KanR, en verde pálido). El vector posee dos orígenes de replicación (en amarillo): el origen de replicación de *E. coli* (*ColE1*) y el origen de replicación de *Agrobacterium* (*pVST1*). En pK2GW7 se clonaron los genes *Sc10-RNasa* y *Sc10-RNasa(H31N)*, quedando estos entre los sitios *attR1* y *attR2*. También se muestra el sitio donde se alinea el oligonucleótido pK2-F (Tabla 1).

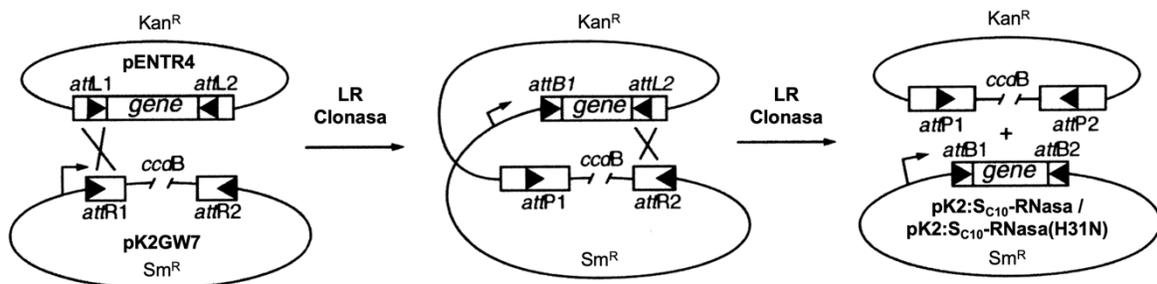


Figura 8. Subclonación de un gen desde el vector de entrada (pENTR4) hasta el vector destino (pK2GW7). Nótese que las construcciones resultantes pK2:Sc₁₀-RNasa y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N) contienen sitios *attB* y resistencia a espectinomicina (Sm^R). Modificado de Hartley *et al.*, 2000.

Tabla 9. Reacción de recombinación LR. Para esta reacción se utilizó a la *clonasa LR* (Invitrogen). Esta reacción se realizó dos veces y en ambas el vector destino fue pK2GW7; sin embargo, el vector de entrada fue distinto: en un caso se utilizó la construcción pENTR:Sc₁₀-RNasa y en otro pENTR:Sc₁₀-RNasa(H31N). En ambos casos, la reacción se preparó a temperatura ambiente.

Componente	Volumen (μL)
Mix LR clonasa	2
Vector de entrada	2
Vector destino	1
Amortiguador TE	5
Total	10

Para corroborar la clonación de pK2:Sc₁₀-RNasa en *E. coli*, se seleccionaron 5 colonias transformantes y se crecieron en medio LB con espectinomicina (50 μg/mL) durante 12-16 h. De cada cultivo se tomaron 0.5 μL como molde para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos gSc₁₀-F y gSc₁₀-R (Tabla 1); los componentes y condiciones de estas reacciones se describen en las tablas 5 y 6, respectivamente. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente, se aisló una colonia transformante y se purificó su DNA plasmídico (Apéndice 1). Este mismo procedimiento se realizó para identificar una colonia transformante para la construcción pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N).

Para comprobar la integridad de las construcciones pK2:Sc₁₀-RNasa y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N) purificadas se crecieron las colonias aisladas pK2:Sc₁₀-RNasa 4 y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N) 4 en LB con espectinomicina (50 μg/mL) durante 12-16 h. De cada cultivo se tomaron 0.5 μL como molde para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos pK2-F y gSc₁₀-R (Tabla 1); los componentes de estas reacciones se describen en la tabla 5 y las condiciones se describen en la tabla 6, excepto que la temperatura de alineamiento fue de 57 °C. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.2.4 Mutagénesis sitio-dirigida para el reemplazo de los residuos de cisteína 155 y 185 por serina en la Sc₁₀-RNasa y la Sc₁₀-RNasa(H31N)

Las sustituciones para producir los reemplazos C155S y C185S se generaron en las secuencias genómicas de la Sc₁₀-RNasa y Sc₁₀-RNasa(H31N). Esto se realizó mediante dos reacciones de mutagénesis sitio-dirigida por PCR, en las que se sustituyeron los nucleótidos de los codones codificantes para las cisteínas 155 y 185 de modo que codifiquen serina. Estas reacciones se realizaron de manera secuencial: (1) se mutó la guanina 629 a citosina; y (2) se mutó la guanina 719 a citosina; en ambos casos se sustituyó un codón TGC que codifica cisteína a un codón TCC que codifica serina. Se realizaron dos reacciones de mutagénesis secuenciales: primero para la mutación C155S y luego para la mutación C185S. Para la primera mutagénesis –C155S– se utilizaron como molde las construcciones pK2:Sc₁₀-RNasa y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N) y los oligonucleótidos C155S-A y C155S-B (Tabla 1), se

preparó cada reacción como se indica en la tabla 10 y se sometió a los ciclos térmicos descritos en la tabla 11.

Tabla 10. Componentes de la reacción de mutagénesis sitio-dirigida por PCR (*QuickChange mutagenesis kit*, Agilent). Los reactivos se agregaron en el orden en que aparecen.

Componentes	Volumen (μL)
Amortiguador de reacción 10X	2.5
DNA	0.5
Oligonucleótido sentido (10 μM)	0.65
Oligonucleótido antisentido (10 μM)	0.65
dNTP mix	0.5
QuickSolution	0.75
H ₂ O	18.95
QuickChange Lightning Enzyme	0.5
Total	25

Tabla 11. Condiciones de PCR para la reacción de mutagénesis sitio-dirigida por PCR (*QuickChange mutagenesis kit*, Agilent).

Paso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	20 s	
Alineamiento	60	10 s	18
Extensión	68	5.5 min	
Extensión final	68	5 min	1

Al finalizar, a cada reacción de mutagénesis se le añadió 1 μL de *DpnI* y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min para digerir el DNA molde. Se utilizaron 5 μL de cada reacción para transformar células quimiocompetentes XL10 Gold (Apéndice 1), las cuales se crecieron en medio LB-agar con espectinomicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se aisló una colonia de cada transformación, se crecieron en medio LB con espectinomicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 12-16 h y se purificó su DNA plasmídico (Apéndice 1). De este modo se obtuvieron las construcciones pK2:S_{C10}-RNasa(C155S) y pK2:S_{C10}-RNasa(H31N/C155S).

Para la segunda mutagénesis se siguieron los mismos pasos que en la primera; sin embargo, en este caso se tomaron como molde las construcciones resultado de la primera mutagénesis –pK2:S_{C10}-RNasa(C155S) y pK2:S_{C10}-RNasa(H31N/C155S)–. Se utilizaron los oligonucleótidos C185S-A y C185S-B (Tabla 1). Los componentes y condiciones de estas reacciones de mutagénesis se describen en las tablas 10 y 11, respectivamente. Al finalizar, las reacciones se trataron con *DpnI* como se describió anteriormente y se usaron 5 μL de cada reacción para transformar células quimiocompetentes XL10 Gold (Apéndice 1),

seleccionadas con espectinomicina (50 µg/mL). Se aisló una colonia de cada transformación, se crecieron en medio LB con espectinomicina (50 µg/mL) durante 12-16 h y se purificó su DNA plasmídico (Apéndice 1). De este modo se obtuvieron las construcciones pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S).

Para corroborar la presencia de las mutaciones en las construcciones pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S), se obtuvo su secuencia con el servicio de secuenciación de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las secuencias se alinearon en Clustal Omega con la secuencia genómica de la Sc₁₀-RNasa reportada en GenBank (U45959.1).

4.2.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con las Sc₁₀-RNasa, Sc₁₀-RNasa(H31N), Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7

Se transformaron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* por choque térmico (Apéndice 1) con las siguientes construcciones purificadas: pK2:Sc₁₀-RNasa, pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N), pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S); la selección de células transformantes fue con rifampicina (100 µg/mL) + espectinomicina (50 µg/mL). Para corroborar la correcta transformación de *A. tumefaciens* se crecieron 3 colonias –de cada transformación– en medio LB con rifampicina (100 µg/mL) + espectinomicina (50 µg/mL) durante 12-16 h. De cada cultivo se tomaron 0.5 µL como molde para las reacciones de amplificación por PCR, utilizando los oligonucleótidos gSc₁₀-F y gSc₁₀-R (Tabla 1); los componentes y condiciones de estas reacciones se describen en las tablas 5 y 6, respectivamente. Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

4.2.6 Generación de líneas transgénicas de *N. tabacum* con las secuencias Sc₁₀-RNasa, Sc₁₀-RNasa(H31N), Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S) bajo el promotor 35S

Para generar líneas transgénicas de *N. tabacum*, se utilizó el método de infección mediada por *Agrobacterium*, en el cual el T-DNA de las construcciones generadas se transfiere a la planta. La región de T-DNA contiene el gen de resistencia a kanamicina y el gen por expresar –las variantes de Sc₁₀-RNasas– regulado por los promotores y terminadores 35S del virus del mosaico de la coliflor (Figura 7). Se realizaron cuatro transformaciones de *N. tabacum* independientes, cada una con una distinta construcción [pK2:Sc₁₀-RNasa, pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N), pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S)]. En cada evento de transformación se siguió el siguiente protocolo:

1. Crecer un precultivo de *A. tumefaciens* transformante en 5 mL de medio LB + rifampicina (100 µg/mL) + espectinomicina (50 µg/mL) a 28 °C durante 24 h con agitación.
2. Utilizar 200 µL del precultivo para inocular 40 mL de LB + rifampicina (100 µg/mL) + espectinomicina (50 µg/mL).

3. Incubar a 28 °C con agitación hasta que alcance una OD₆₀₀ de 0.5 – 0.8.
4. Centrifugar el cultivo a 5,000 rpm por 10 min en dos tubos cónicos de polipropileno de 50 mL.
5. Resuspender cada botón celular en 40 mL de medio NaP₆-4 (Apéndice 2) líquido con acetosiringona 4 mg/L.
6. Cortar hojas jóvenes de *N. tabacum* y lavarlas con agua desionizada estéril con ketoconazol (50 mg/L) + terbinafina (30 mg/L), en agitación durante 15 min.
7. Lavar las hojas con agua estéril por 1 min.
8. Desinfectar las hojas con hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) 6% + Tween 20 + Microdyn.
 - a. Por cada 250 mL de H₂O agregar 2 gotas de Tween 20 y 15 gotas de Microdyn.
9. Mantener en agitación durante 8 min.
10. Realizar 5 lavados de 2 min con agua desionizada estéril.
11. Con un bisturí estéril se eliminan los márgenes y la nervadura central de cada hoja.
12. Cortar cuadros de 1 cm² aproximadamente, realizando pequeñas heridas en la superficie.
13. Colocar los fragmentos en la solución bacteriana durante 20-30 min, agitando recurrentemente.
14. Remover el exceso de solución colocando los cuadros de hoja sobre papel absorbente estéril.
15. Transferir los fragmentos de hoja (explantes) al medio NaP₆-4 sólido con acetosiringona, orientados con el envés hacia arriba.
16. Los cultivos se incubaron en oscuridad por 3 días a 24 °C.

Transcurridos los tres días de incubación se observó el crecimiento de *A. tumefaciens* en la periferia de los explantes por lo que estos se cocultivaron de la siguiente manera:

1. Lavar los explantes durante 15 min con medio NaP₆-4 líquido con antibióticos (cefotaxima 100 mg/L + vancomicina 100 mg/L).
2. Secar los explantes colocándolos en papel absorbente estéril.
3. Colocar los explantes, con el envés hacia arriba, en placas con medio NaP₆-4 sólido con kanamicina (150 µg/mL) y antibióticos (cefotaxima 100 mg/L + vancomicina 100 mg/L).
4. Los cultivos se incubaron con fotoperíodo de 18:6 h a 24 °C.

Los explantes se continuaron subcultivando en medio NaP₆-4 sólido con kanamicina (150 µg/mL), cefotaxima (100 mg/L) y vancomicina 100 mg/L cada 15 días. Los explantes en los que se observó la formación de callo se transfirieron a un medio NaP₆-4 sólido con kanamicina en el que se modificó la concentración de ANA (ácido 1-naftilacético) a 0.3 mg/L. Posteriormente, se individualizaron diversas plantas a partir de los explantes que mostraron formación de brotes.

5 RESULTADOS

5.1 Expresión de la S-RNasa en *E. coli*

5.1.1 Sobreexpresión de la S_{A2}- y S_{C10}-RNasa en la cepa de *E. coli* BL21-AI

Se expresaron dos variantes alélicas –S_{A2} y S_{C10}– de la S-RNasa recombinantes de *N. alata* en la cepa de *E. coli* BL21-AI a 37 °C. Esta cepa permite expresar genes potencialmente tóxicos al estar la T7 RNA polimerasa regulada por el promotor *araBAD* (inducible por L-arabinosa), lo que reprime la expresión basal del gen de interés (Narayanan *et al.*, 2011). Se sobreexpresó a la S_{A2}-RNasa a partir de la construcción pMCS:S_{A2}-RNasa, dando como resultado a la proteína recombinante con una etiqueta de seis histidinas (6xHis) en su extremo amino. En el caso de las proteínas recombinantes a partir de las construcciones pMAL:S_{A2}-RNasa y pMAL:S_{C10}-RNasa, las S-RNasas se expresaron como proteínas de fusión a la proteína de unión a maltosa (MBP), con un péptido señal que la dirige hacia el periplasma de *E. coli*, además de que en teoría aumenta su solubilidad.

Al sobreexpresar tanto a la S_{C10}-RNasa como la S_{A2}-RNasa clonadas en pMALp5x, ambas proteínas recombinantes se localizaron en la fase insoluble/cuerpos de inclusión (Figura 9A y 9B). Lo mismo ocurrió cuando se sobreexpresó la S_{A2}-RNasa clonada en el plásmido pMCSG53 (Figura 9C). En todos estos experimentos las S-RNasas se encontraron de manera predominante en la fase insoluble, aunque fue posible detectar bandas más tenues en la fase soluble (Figura 9). Nótese que, al expresarse, la S_{A2}- y la S_{C10}-RNasa en pMALp5x, se observaron bandas definidas de un tamaño menor a las esperadas (Figura 9A y 9B), lo que indica que la proteína de fusión no es del todo estable.

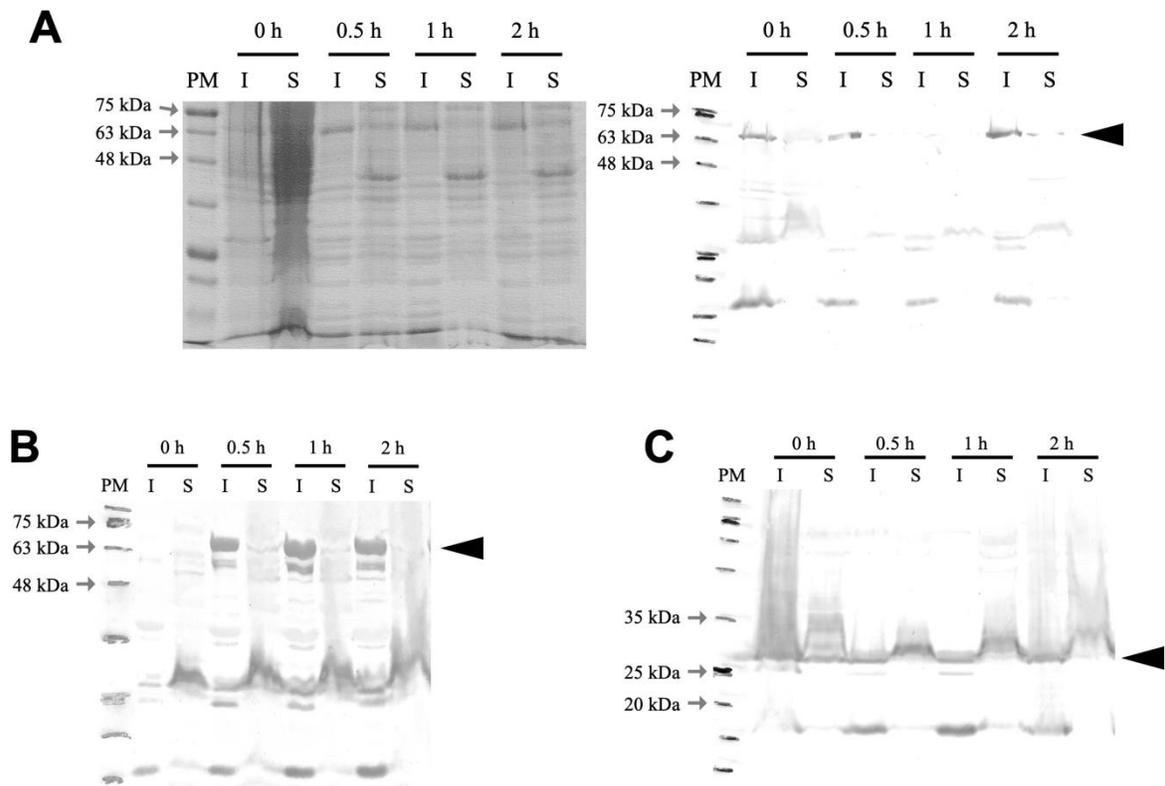


Figura 9. Análisis por SDS-PAGE y Western-blot de la sobreexpresión de las S-RNasas a 37 °C en la cepa de *E. coli* BL21-AI. **A.** Expresión con la construcción pMAL:S_{C10}-RNasa. A la izquierda se muestra el análisis por SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie y a la derecha se muestra una inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-S_{C10}-RNasa en un ensayo tipo Western-blot. **B.** Análisis por inmunodetección de la S_{A2}-RNasa –clonada en pMALp5x– con anticuerpos policlonales anti-6xHis en un ensayo tipo Western-blot. **C.** Análisis por inmunodetección de la S_{A2}-RNasa –clonada en pMCSG53– con anticuerpos policlonales anti-6xHis en un ensayo tipo Western-blot. Las flechas indican la altura a la que se espera la migración de la proteína de interés (A = 66 kDa; B = 69 kDa; C = 26 kDa). PM: marcador de peso molecular; I: fase insoluble; S: fase soluble.

Adicionalmente, se sobreexpresó a la S_{A2}-RNasa –clonada en pMCSG53– a una temperatura de 16 °C, por debajo de la óptima de 37 °C. Sin embargo, este enfoque siguió resultando en la localización de la proteína recombinante en cuerpos de inclusión (Figura 10). En este experimento toda la proteína recombinante se encontró en la fase insoluble.

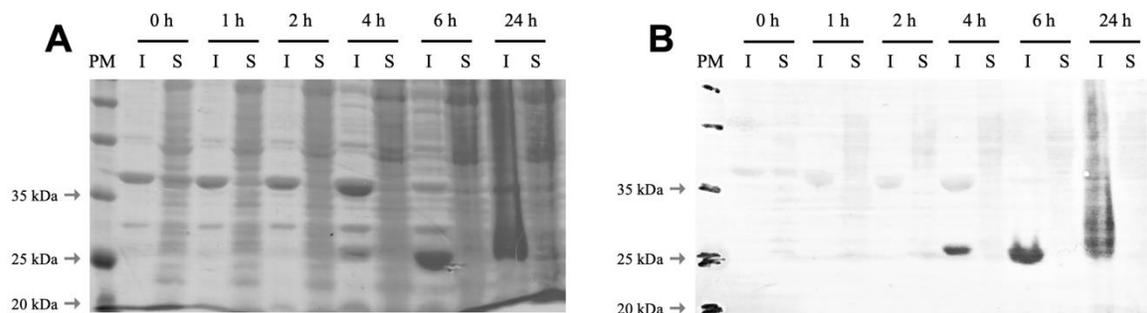


Figura 10. Análisis de la sobreexpresión de la S_{A2} -RNasa a 16 °C en la cepa *E. coli* BL21-AI. **A.** Análisis por SDS-PAGE; tinción con azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-6xHis en un ensayo tipo Western-blot. La S_{A2} -RNasa se encuentra a una altura esperada de 26 kDa. PM: marcador de peso molecular; I: fase insoluble; S: fase soluble.

5.1.2 Sobreexpresión de una S-RNasa inactiva en *E. coli*

Pensando en el posible efecto citotóxico que la S-RNasa recombinante pudiera ejercer sobre *E. coli*, se buscó expresar una variante inactiva de la misma, es decir, una S_{A2} -RNasa en la cual la histidina catalítica His93 es sustituida por arginina. La variante S_{A2} -RNasa(H93R), clonada en pMCSG53, se expresó en *E. coli* BL21-AI. Sin embargo, aún al expresar a esta variante, se observó a la proteína en la fase insoluble (Figura 11). Esto sugiere que el problema radica en la estructura de la enzima más que en el posible efecto citotóxico que pudiese ejercer.

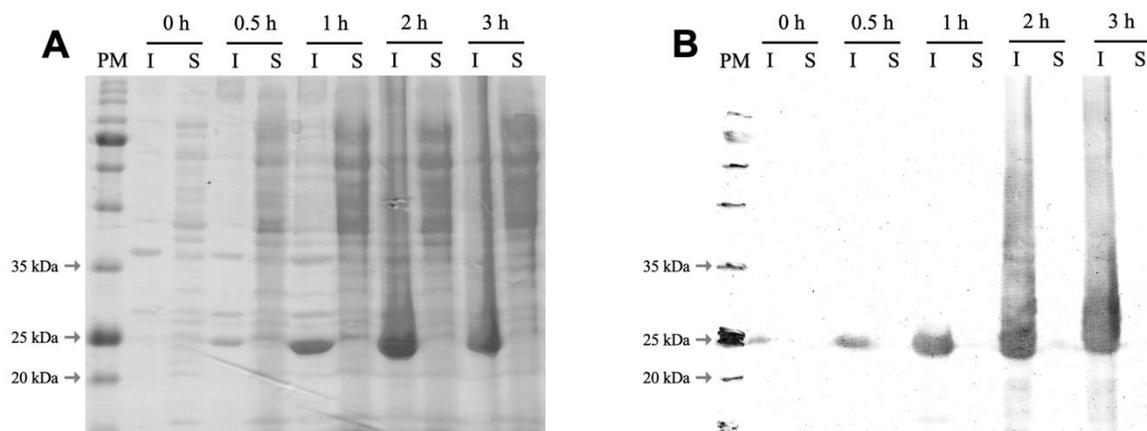


Figura 11. Análisis por SDS-PAGE (**A**) y ensayo tipo Western-blot (**B**) de la sobreexpresión de la S_{A2} -RNasa(H93R) a 37 °C. **A.** Tinción con azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección con anticuerpos policlonales anti-6xHis en un ensayo tipo Western-blot. La S_{A2} -RNasa(H93R) se encuentra a la altura esperada de 26 kDa. PM: marcador de peso molecular; I: fase insoluble; S: fase soluble.

5.1.3 Sobreexpresión de la S_{C10} -RNasa en la cepa de *E. coli* SHuffle T7

Debido a que la S-RNasa contiene cuatro puentes disulfuro que son fundamentales para su estructura, se decidió utilizar la cepa *E. coli* SHuffle T7 porque promueve la formación de estos enlaces en el citosol. Sin embargo, al sobreexpresar a la S_{C10} -RNasa –clonada en pMCSG53 y en pMALp5x– se observó que la gran mayoría de la proteína se encuentra en la fase insoluble (Figura 12). También se observó que la proteína de fusión MBP- S_{C10} -RNasa no es del todo estable, pues como resultado de la electroforesis se detectaron bandas que migraron a la altura esperada para la S_{C10} -RNasa (Figura 12).

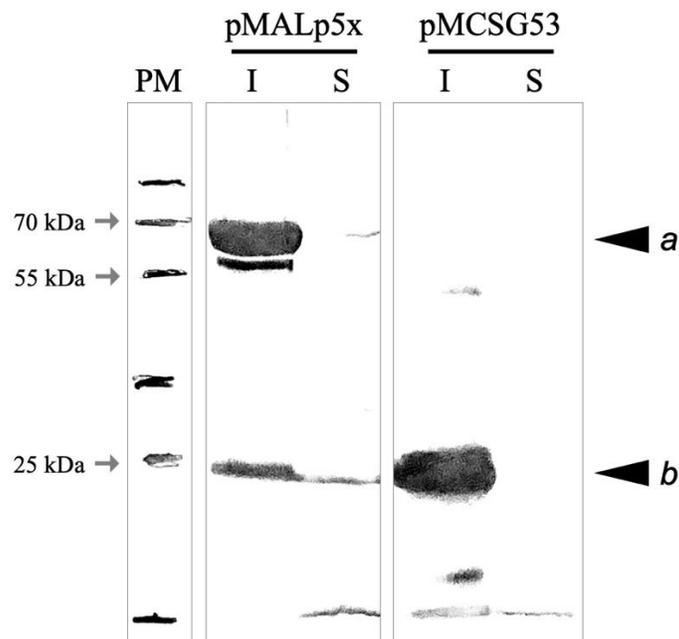


Figura 12. Análisis por inmunodetección en ensayos tipo Western-blot de la sobreexpresión de la S_{C10} -RNasa en la cepa *E. coli* SHuffle T7. Análisis por inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti- S_{C10} -RNasa para la expresión de la S_{C10} -RNasa. Se observa el patrón de expresión de la S_{C10} -RNasa clonada tanto en el vector pMALp5x como en vector pMCSG53. Las flechas indican la altura a la cual se espera la migración de las proteínas de interés: 66 kDa para la proteína de fusión MBP- S_{C10} -RNasa. (flecha *a*) y 23 kDa para la S_{C10} -RNasa (flecha *b*). PM: marcador de peso molecular; I: fase insoluble; S: fase soluble.

5.1.4 Renaturalización de la S-RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*

Al sobreexpresar a la S_{A2}-RNasa en *E. coli* –y como era de esperar–, se localizó en cuerpos de inclusión. Por lo tanto, se aisló y lavó la fase insoluble. Las proteínas contenidas en esta fase se solubilizaron con urea 8 M como agente caotrópico y, adicionalmente, como agente reductor, 2-mercaptoetanol 25 mM. Una vez solubilizadas, la S_{A2}-RNasa se purificó por cromatografía de afinidad con base en su etiqueta 6xHis con la resina Protino Ni-TED (Figura 13A).

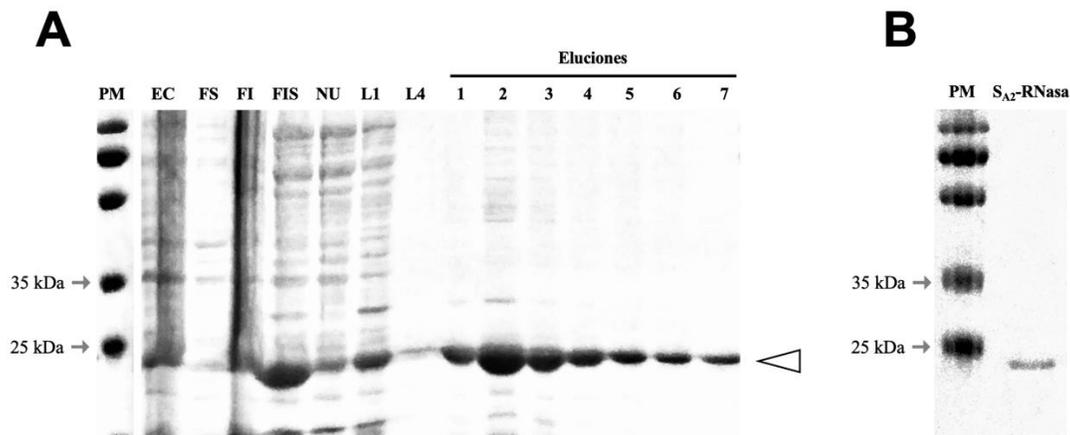


Figura 13. A. Solubilización, reducción y purificación de la S_{A2}-RNasa aislada a partir de cuerpos de inclusión. La flecha indica la altura a la que se encuentra la S_{A2}-RNasa. **B.** La S_{A2}-RNasa no se precipitó tras replegarse mediante diálisis. Se observa una sola banda, sin contaminantes de mayor peso molecular. PM: marcador de peso molecular; EC: extracto crudo; FS: fase soluble; FI: fase insoluble; FIS: fase insoluble solubilizada con urea; UN: fracción no unida; L1: primer lavado; L4: cuarto lavado.

Tras replegar las fracciones que contenían a la S_{A2}-RNasa purificada (fracciones 4 a 7 de la figura 13A), eliminando la urea y disminuyendo la concentración de 2-mercaptoetanol, no se observó ninguna precipitación de la proteína y se analizó por SDS-PAGE (Figura 13B). Sin embargo, tras someterla a un ensayo de actividad de ribonucleasa, no se observó ninguna actividad con respecto al control negativo, tanto agregando 200 ng como 1 µg de la proteína (Figura 14). La RNasa A (200 ng) funcionó como control positivo y corroboró el correcto funcionamiento del ensayo de actividad.

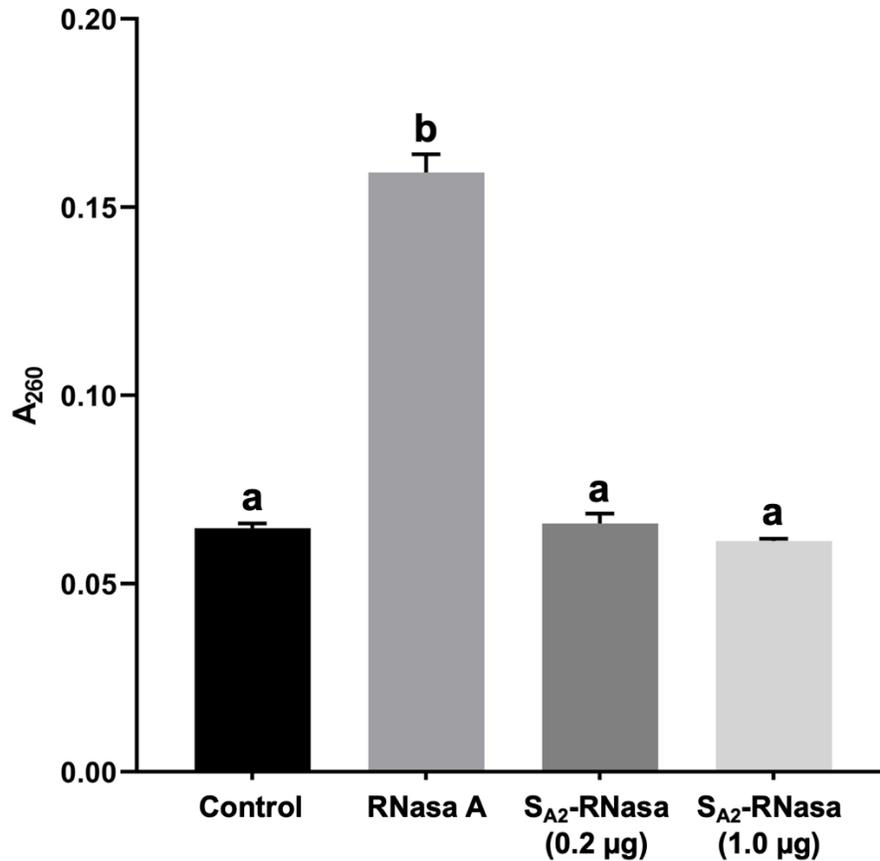


Figura 14. Ensayo de actividad de ribonucleasa de la S-RNasa solubilizada y renaturalizada. Tras solubilizar y replegar a la S_{A2}-RNasa no se detectó actividad de ribonucleasa. La absorbancia a 260 nm (A₂₆₀) es proporcional a la cantidad de RNA degradado tras incubar la reacción sin RNasas (Control), con la RNasa A (0.2 µg), usada como control positivo, y con 0.2 µg o 1 µg de la S_{A2}-RNasa replegada. Las letras (a, b) indican las diferencias significativas, determinadas por ANOVA seguida por comparaciones múltiples de Tukey (P < 0.05; n = 3; barras de error estándar).

5.2 Generación de líneas transgénicas de *N. tabacum*

5.2.1 Amplificación de las secuencias genómicas de la *Sc*₁₀-RNasa y la *Sc*₁₀-RNasa(H31N) y su clonación en pJET1.2

Para clonar las secuencias genómicas de las *Sc*₁₀-RNasa, *Sc*₁₀-RNasa(H31N), *Sc*₁₀-RNasa(C155S/C185S) y *Sc*₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S) en el vector binario pK2GW7, fue necesario amplificar por PCR las secuencias genómicas de la *Sc*₁₀-RNasa y la *Sc*₁₀-RNasa(H31N) usando como molde las construcciones pUC57:(ChiP)*Sc*₁₀-RNasa y pUC57:(ChiP)*Sc*₁₀-RNasa(H31N), respectivamente, y los oligonucleótidos gSc10-F y gSc10-R. Los productos de las reacciones se analizaron por electroforesis (Figura 15A), se purificaron del gel y se clonaron en el vector de clonación pJET1.2. En la figura 15B se muestra el análisis por PCR de cinco colonias de cada una.

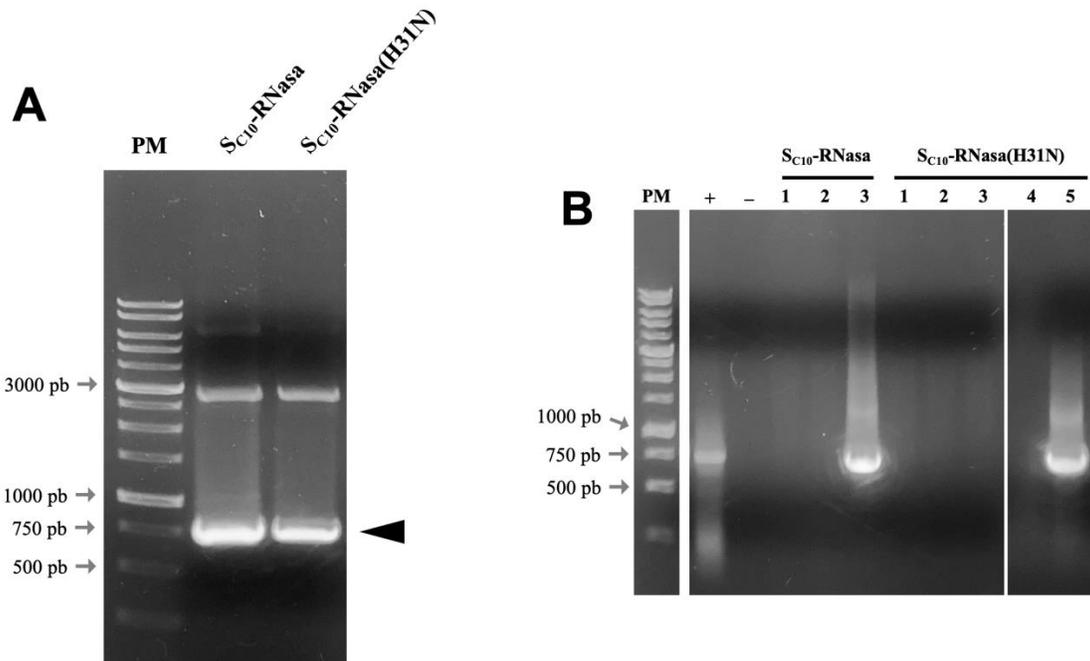


Figura 15. Amplificación y clonación de la *Sc*₁₀-RNasa y *Sc*₁₀-RNasa(H31N) en pJET1.2. **A.** Amplificación de la *Sc*₁₀-RNasa y la *Sc*₁₀-RNasa(H31N) genómicas mediante PCR. La flecha indica la banda de la secuencia genómica de la *Sc*₁₀-RNasa (758 pb). **B.** Ensayo de PCR de colonias para corroborar las colonias transformantes. Con base en el resultado, se aislaron las colonias pJET:*Sc*₁₀-RNasa 3 y pJET:*Sc*₁₀-RNasa(H31N) 5. PM: marcador de peso molecular; +: control positivo; -: control negativo.

Ya clonadas en pJET1.2, se obtuvo la secuencia tanto de *Sc*₁₀-RNasa como de *Sc*₁₀-RNasa(H31N). Al analizarlas, se observó que tanto la *Sc*₁₀-RNasa como la *Sc*₁₀-RNasa(H31N) contienen al intrón y que, a excepción de la mutación puntual en la base 157 que da como resultado al codón que codifica Asp-31 en la *Sc*₁₀-RNasa(H31N) en lugar de histidina, ninguna presenta variaciones respecto a la secuencia reportada en GenBank (U45959.1) (Figura 16).

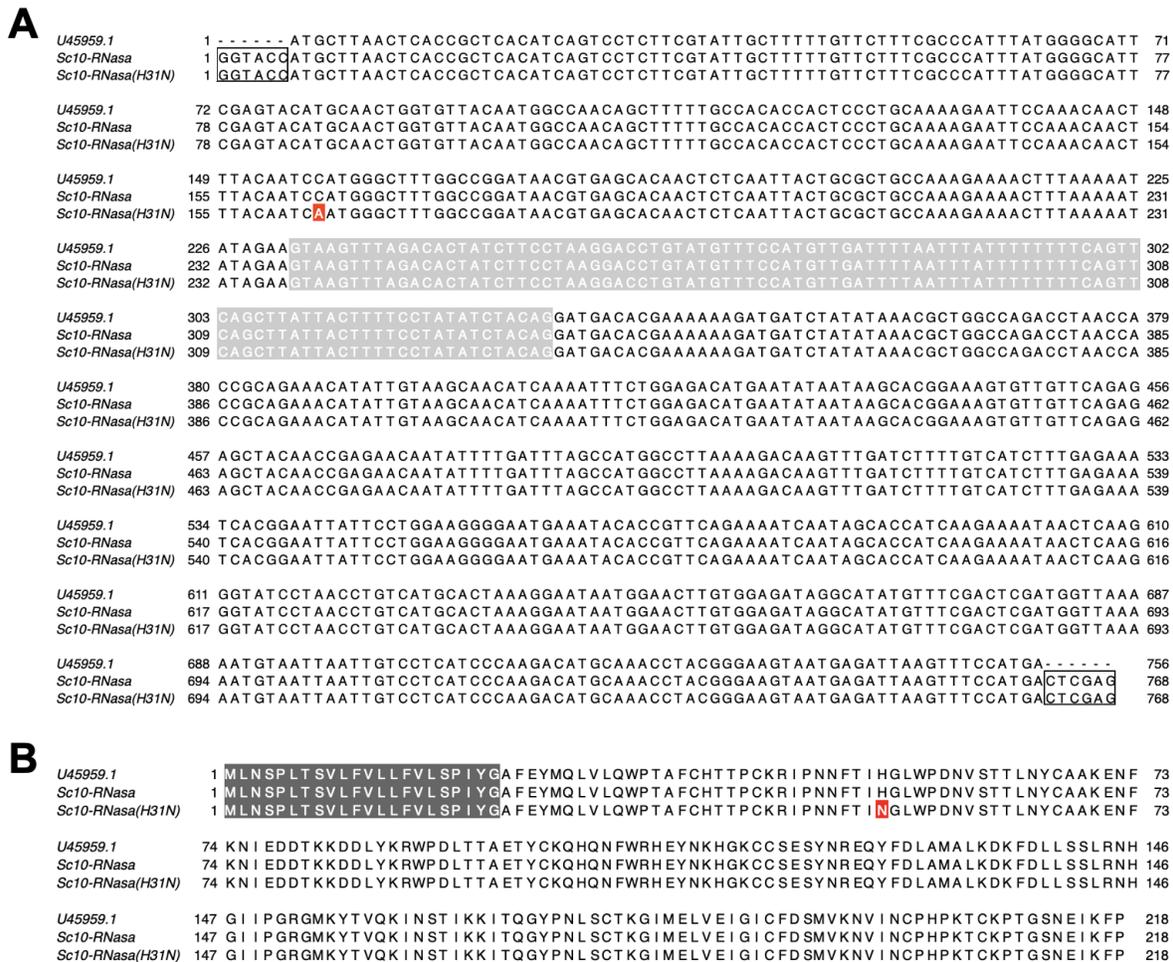


Figura 16. Análisis por alineamiento de las secuencias de la *Sc10-RNasa* y la *Sc10-RNasa(H31N)* clonadas en pJET1.2 con la reportada en GenBank (U45959.1). **A.** Alineamiento a nivel de nucleótidos. El intrón de la secuencia genómica se indica sombreado; resaltado en rojo se muestra la mutación puntual en *Sc10-RNasa(H31N)*; encerrados se muestran los sitios *KpnI* (extremo 5') y *XhoI* (extremo 3') añadidos a las secuencias en las reacciones de amplificación para su clonación. **B.** Alineamiento a nivel de aminoácidos. Sombreado en gris se indica el péptido señal de la *Sc10-RNasa*; resaltado en rojo se muestra la mutación que sustituye a la histidina 31 por asparagina. La numeración no considera al péptido señal (22 residuos).

5.2.2 Clonación de las secuencias genómicas de la *Sc10-RNasa* y la *Sc10-RNasa(H31N)* en el vector de entrada pENTR4

A partir de las construcciones pJET:*Sc10-RNasa* y pJET:*Sc10-RNasa(H31N)*, la *Sc10-RNasa* y la *Sc10-RNasa(H31N)* se liberaron del plásmido por doble digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* (Figura 17) y se ligaron al fragmento de 2.28 kb, producto de la doble digestión de pENTR4 con las mismas enzimas (Figura 17), generando así las construcciones pENTR:*Sc10-RNasa* y pENTR:*Sc10-RNasa(H31N)* (Figura 18A). Esto se confirmó de dos formas:

1) mediante un ensayo de PCR de colonia (Figura 18B); y 2) mediante un ensayo de restricción. En este último se realizaron dos digestiones de las construcciones: a) *KpnI* + *XhoI*, donde se liberaron los fragmentos esperados de 2280 y 758 pb; y b) *EcoRI* + *NdeI*, donde se liberaron los fragmentos esperados de 2508 y 530 pb (Figura 18C).

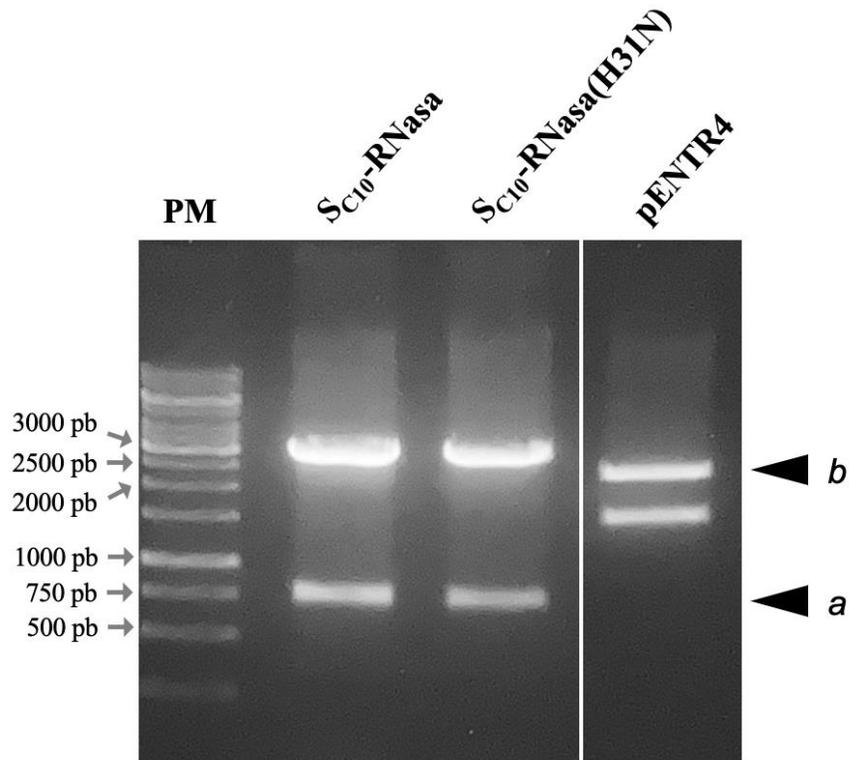


Figura 17. Digestión de pENTR4, pJET: S_{C10} -RNasa y pJET: S_{C10} -RNasa(H31N). Se realizó una doble digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *XhoI* como se describe en la tabla 7. Los fragmentos correspondientes a la S_{C10} -RNasa y S_{C10} -RNasa(H31N) (758 pb, flecha a) se ligaron al fragmento de pENTR4 que contiene los sitios *attL* (2280 pb, flecha b), generando las construcciones pENTR: S_{C10} -RNasa y pENTR: S_{C10} -RNasa(H31N). PM: marcador de peso molecular.

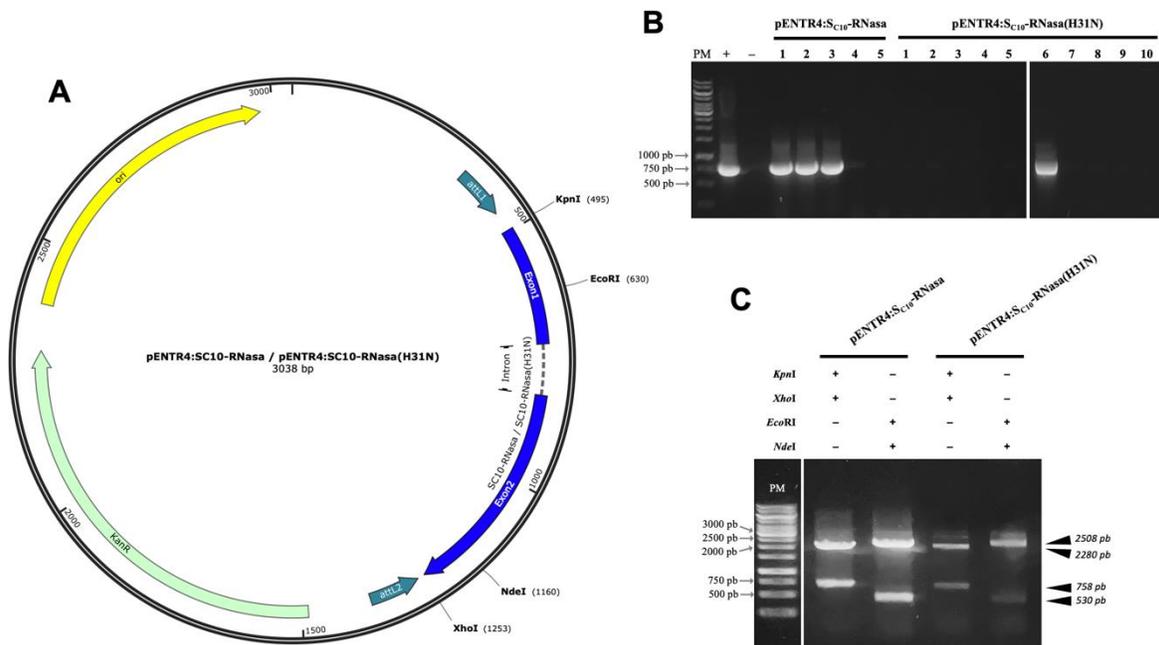


Figura 18. Clonación de la S_{C10} -RNasa y S_{C10} -RNasa(H31N) en pENTR4. **A.** Mapa físico de las construcciones pENTR: S_{C10} -RNasa y pENTR: S_{C10} -RNasa(H31N). El vector contiene un gen de resistencia a kanamicina (KanR) y dos sitios *attL* (*attL1*, *attL2*) que flanquean al gen de interés – S_{C10} -RNasa o S_{C10} -RNasa(H31N)–. La región flanqueada por los sitios *attL* será transferida al vector destino pK2GW7. También se observa la posición de los sitios de restricción *KpnI*, *XhoI*, *EcoRI* y *NdeI*. **B.** Ensayo de PCR de colonia para confirmar las colonias transformantes. Se observa amplificación del tamaño esperado para la secuencia genómica de la S_{C10} -RNasa (758 pb). Se aislaron las colonias pENTR: S_{C10} -RNasa 1 y pENTR: S_{C10} -RNasa(H31N) 6. PM: marcador de peso molecular; +: control positivo; -: control negativo. **C.** Ensayos de restricción doble de las construcciones purificadas pENTR: S_{C10} -RNasa 1 y pENTR: S_{C10} -RNasa(H31N) 6. Las flechas indican los tamaños esperados producto de las digestiones con *KpnI* + *XhoI* (2280 + 758 pb) y *EcoRI* + *NdeI* (2508 + 530 pb). PM: marcador de peso molecular.

5.2.3 Clonación de las secuencias genómicas de la S_{C10} -RNasa y la S_{C10} -RNasa(H31N) en el vector binario pK2GW7

El vector de entrada pENTR4 contiene los sitios *attL* (Figura 6), que son compatibles con los sitios *attR* del vector destino pK2GW7 (Figura 7). Mediante una reacción de recombinación LR se transfirieron las secuencias genómicas de la S_{C10} -RNasa y la S_{C10} -RNasa(H31N) desde pENTR4 hacia pK2GW7, generándose las construcciones pK2: S_{C10} -RNasa y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N) (Figura 19). Las colonias transformantes se seleccionaron por su resistencia a espectinomomicina y la presencia del gen de interés mediante amplificaciones por PCR de colonia (Figura 20A). Posteriormente, se purificó el plásmido de las colonias pK2: S_{C10} -RNasa 4 y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N) 4. Adicionalmente, se realizó un ensayo de amplificación por PCR de colonia para corroborar la integridad de las construcciones pK2: S_{C10} -RNasa 4 y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N) 4 (Figura 20B). Para este ensayo se utilizó al oligonucleótido sentido pK2-F (Tabla 1), que se alinea río arriba del sitio *attL1* en el vector pK2GW7, y al oligonucleótido

antisentido gSc10-R (Tabla 1), que se alinea con la secuencia genómica de la *Sc10-RNasa* (el sitio de alineamiento de ambos oligonucleótidos se indica en la figura 19).

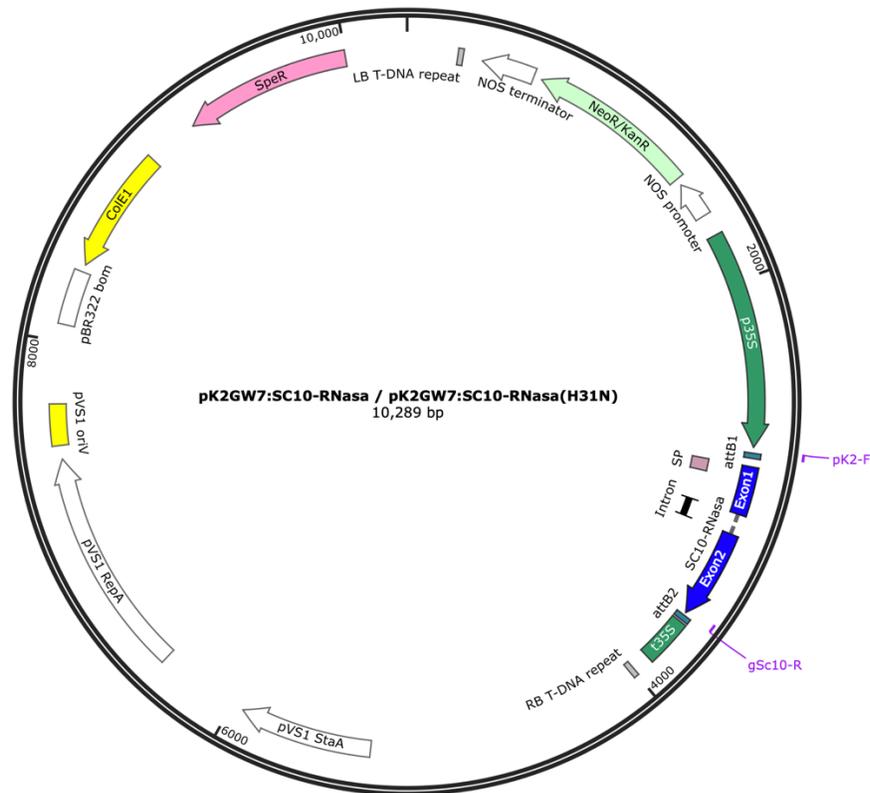


Figura 19. Mapa físico de las construcciones pK2:SC₁₀-RNasa y pK2:SC₁₀-RNasa(H31N). El vector incluye en el T-DNA: los bordes derecho e izquierdo (LB y RB, respectivamente, en gris); los sitios *attB* (*attB1*, *attB2*, en cian); el promotor y terminador del 35S (*p35S*, *t35S*, en verde); y la secuencia genómica *Sc10-RNasa* o *pK2:Sc10-RNasa(H31N)*. También se muestra el sitio de anclaje de los oligonucleótidos pK2-F y gSc10-R.

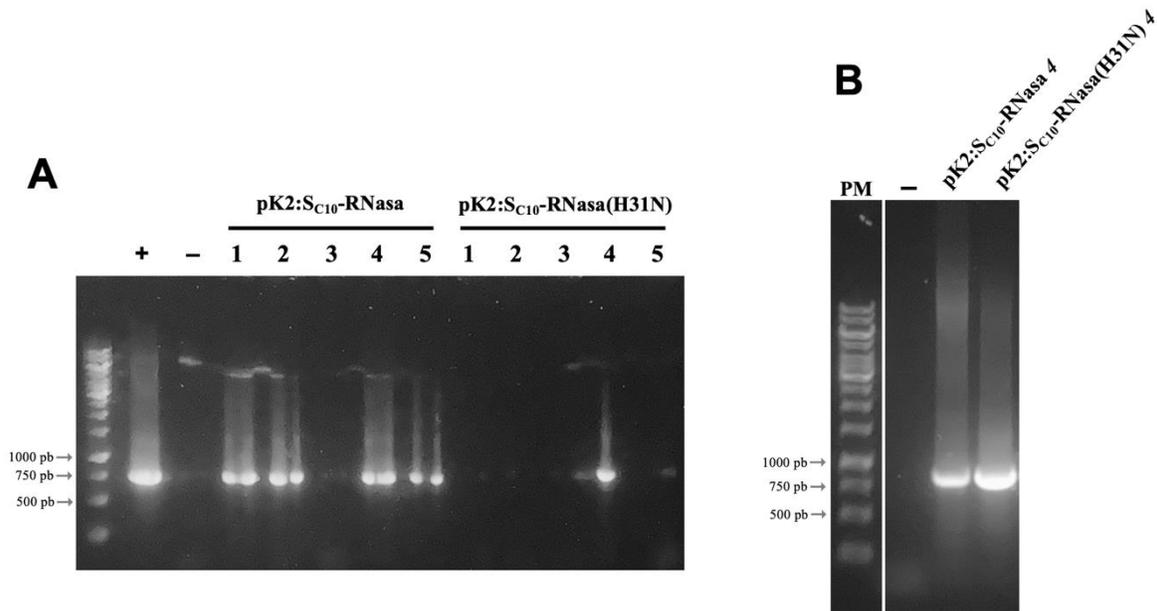


Figura 20. Clonación de la secuencia genómica de la S_{C10} -RNasa y S_{C10} -RNasa(H31N) en pK2GW7. **A.** Ensayo de PCR de colonia para corroborar las colonias transformantes. Con base en el resultado, se aislaron las colonias pK2: S_{C10} -RNasa 4 y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N) 4. **B.** Ensayo de amplificación de PCR de las construcciones pK2: S_{C10} -RNasa 4 y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N) 4 con los oligonucleótidos pK2-F y gSc10-R. Se observa amplificación del tamaño esperado para la secuencia genómica de la S_{C10} -RNasa (758 pb). PM: marcador de peso molecular; +: control positivo; -: control negativo.

5.2.4 Generación de las variantes S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10} -RNasa(H31N/C155S/C185S) por mutagénesis sitio-dirigida

Las sustituciones necesarias para que los codones correspondientes a la Cys155 y a la Cys185 codifiquen un residuo de serina cada uno, se hicieron por mutagénesis sitio-dirigida mediante amplificaciones por PCR. El molde para producir la mutación C155S fue la construcción pK2: S_{C10} -RNasa, que contiene la secuencia genómica desde el codón de inicio hasta el de término, incluyendo al péptido señal y un intrón. El producto –pK2: S_{C10} -RNasa(C155S)– se clonó en *E. coli* XL10 Gold, se purificó y se utilizó como molde para generar la mutación C185S, que también se clonó en la misma cepa, dando como resultado la construcción pK2: S_{C10} -RNasa(C155S/C185S). Asimismo, se generó una secuencia que codifica a la S-RNasa con ambas mutaciones pero que sería inactiva por tener una de las histidinas catalíticas (His31) reemplazada por asparagina. Ésta se logró utilizando el mismo protocolo, pero como primer molde para las mutagénesis sitio-dirigida por PCR, se utilizó la construcción pK2: S_{C10} -RNasa(H31N); el resultado fue la construcción pK2: S_{C10} -RNasa(H31N/C155S/C185S). Las secuencias S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) y S_{C10} -RNasa(H31N/C155S/C185S) se obtuvieron y se alinearon con la secuencia genómica de la S_{C10} -RNasa (Figura 21). Se corroboró que ambas construcciones presentan las mutaciones correspondientes y ningún otro cambio en su secuencia.

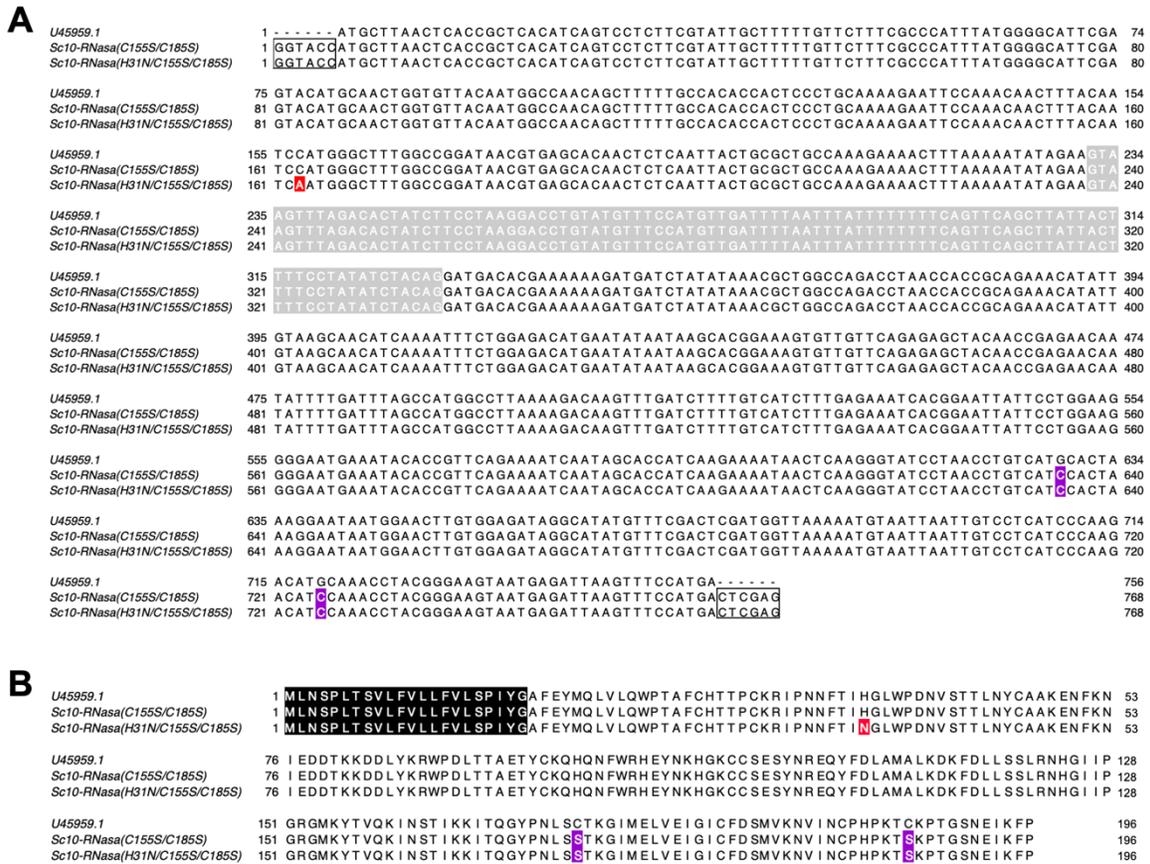


Figura 21. Secuencias de la *Sc10*-RNasa(C155S/C185S) y la *Sc10*-RNasa(H31N/C155S/C185S). **A.** Alineamiento a nivel de nucleótidos entre la *Sc10*-RNasa reportada (número de acceso U45959.1) y la *Sc10*-RNasa(C155S/C185S) y *Sc10*-RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7. Sombreado en gris se indica el intrón de la secuencia genómica de la *Sc10*-RNasa; resaltado en rojo se muestra la mutación que sustituye un codón de His por uno de Asn; resaltados en violeta las mutaciones que sustituyen codones de Cys por codones de Ser; encerrados se muestran los sitios *KpnI* (extremo 5') y *XhoI* (extremo 3'). La numeración usada es la de U45959.1. **B.** Alineamiento a nivel de aminoácidos entre la *Sc10*-RNasa reportada (U45959.1) y la *Sc10*-RNasa(C155S/C185S) y *Sc10*-RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7. Se muestran las mutaciones H31N (rojo) y C155/185S (violeta). La numeración no considera al péptido señal (22 residuos; negro).

5.2.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con *Sc10*-RNasa, *Sc10*-RNasa(H31N), *Sc10*-RNasa(C155S/C185S) y *Sc10*-RNasa(H31N/C155S/C185S) clonadas en pK2GW7

Uno de los métodos más eficientes para transformar *N. tabacum* es mediante la infección de explantes de hoja con *A. tumefaciens* (Hwang *et al.*, 2017).

Para la transferencia del transgén mediada por *A. tumefaciens*, se transformaron células quimiocompetentes de *A. tumefaciens* por el método de choque térmico (Apéndice 1) con las construcciones pK2:*Sc10*-RNasa, pK2:*Sc10*-RNasa(H31N), pK2:*Sc10*-RNasa(C155S/C185S) y

pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S), por separado. La transformación con cada construcción se corroboró mediante ensayos de PCR de colonia (Figura 22) y se aisló una colonia transformante por cada construcción.

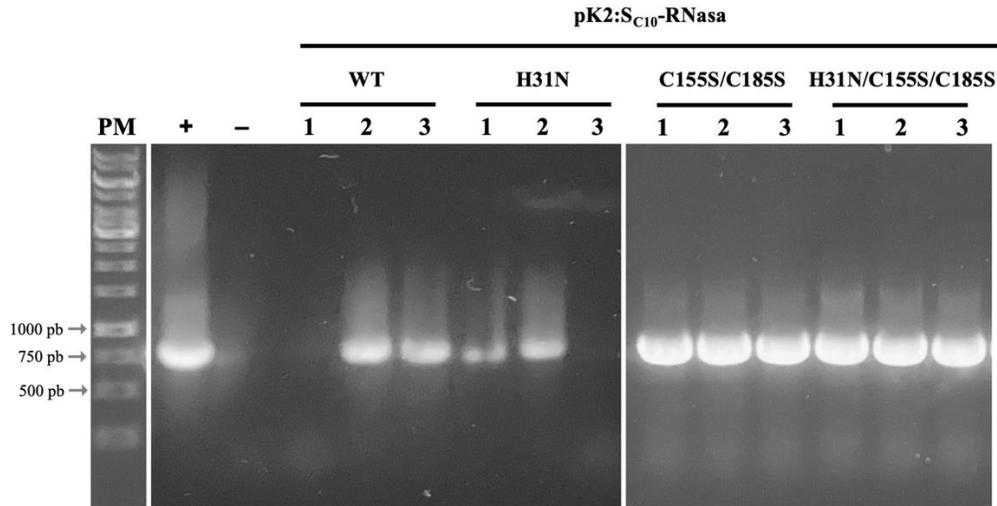


Figura 22. Análisis por electroforesis de la amplificación de los insertos por PCR de colonias de *A. tumefaciens* transformantes. Se aislaron las colonias pK2:Sc₁₀-RNasa 2, pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N) 2, pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) 2 y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S) 1. Se observa amplificación del tamaño esperado para la secuencia genómica de la Sc₁₀-RNasa (758 pb). PM: marcador de peso molecular; +: control positivo; -: control negativo.

5.2.6 Generación de líneas transgénicas de *N. tabacum*::Sc₁₀-RNasa, ::Sc₁₀-RNasa(H31N), ::Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y ::Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S)

Se buscó generar cuatro grupos de líneas transgénicas de *N. tabacum*, de modo que cada uno exprese una variante distinta de la Sc₁₀-RNasa: 1) la proteína silvestre Sc₁₀-RNasa; 2) la variante inactiva Sc₁₀-RNasa(H31N); 3) la variante hiperactiva Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S); y 4) la variante inactiva con conformación hiperactiva Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S). Se realizaron cuatro eventos de transformación de *N. tabacum* infectando explantes de hoja con cultivos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones pK2:Sc₁₀-RNasa, pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N), pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S).

Posterior al evento de transformación se eliminó a *A. tumefaciens* con diferentes antibióticos y se seleccionaron los explantes portadores del transgén con kanamicina (150 µg/mL). Los explantes comenzaron a subcutlivarse desde junio de 2023 y en algunos de los explantes transformados con la Sc₁₀-RNasa y la Sc₁₀-RNasa(H31N) se observó la formación de callo y de brotes (Figura 23A-B). Sin embargo, en los explantes transformados tanto con la pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) como con la pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S), no se observaron callos ni brotes (Figura 23C-D).

A**C****B****D**

Figura 23. **A.** Explantes de la transformación con pK2:Sc₁₀-RNasa. **B.** Explantes de la transformación con pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N). **C.** Ejemplo representativo de los explantes transformados con pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S). **D.** Ejemplo representativo de los explantes transformados con pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S).

6 DISCUSIÓN

6.1 Sobreexpresión de las proteínas recombinantes S_{A2} - y S_{C10} -RNasa en *E. coli*

Una parte importante de este trabajo fue la sobreexpresión de la S-RNasa recombinante en *E. coli*. En todos estos experimentos se observó que las S-RNasas se localizaron en la fase insoluble. Esto coincide con experimentos previamente realizados en el laboratorio, en los que, al sobreexpresarse en las cepas de *E. coli* BL21(RIL) y pGro7, las S-RNasas recombinantes también se localizaron en la fase insoluble (Gariglio-Rangel, 2022). La presencia de proteínas sobreexpresadas en la fase insoluble es indicativo de que se encuentran en cuerpos de inclusión (Kane y Hartley, 1988). Los cuerpos de inclusión (CI) se forman en *E. coli* cuando se expresa algún gen heterólogo y/o que contenga mutaciones que afecten la conformación nativa de las proteínas que codifican.

Los CI consisten en un agregado de proteínas sin las modificaciones postraduccionales que pudiesen requerir o de un plegamiento incorrecto durante su traducción; esto conlleva a que las proteínas presenten una actividad baja o nula (Tsumoto *et al.*, 2003). Aunque los agregados se forman –sobre todo– cuando hay una sobreproducción de proteína (van den Berg *et al.*, 1999), también se forman en condiciones normales en células de *E. coli*. En estas condiciones asisten en el control de calidad de las proteínas, mediante proteasas y chaperonas (Villaverde y Mar Carrió, 2003; Ventura y Villaverde, 2006).

La solubilidad de una proteína recombinante no es predecible, ya que puede estar afectada por múltiples factores (Villaverde y Mar Carrió, 2003). Sin embargo, algunos de ellos han sido alterados para evitar la agregación de la proteína de interés (Villaverde y Mar Carrió, 2003). En su conjunto, los resultados reportados por Gariglio-Rangel (2022) así como en este trabajo, abordan varios de los factores involucrados en la formación de CI, como son la temperatura, la reducción en la tasa de expresión, la optimización en el uso de codones, o la coexpresión de chaperonas (Villaverde y Mar Carrió, 2003). Aun así, cuando se modificaron estos factores se observó continuamente que las S-RNasas recombinantes se alojaron en CI (Figuras 15-16 y figuras 22-23 en Gariglio-Rangel, 2022).

Lo primero que se puede aclarar mediante los experimentos realizados es que la agregación de las S-RNasas en *E. coli* no se debe a su citotoxicidad sino más bien a su complejidad estructural. Esto puede inferirse a partir de la expresión de la S_{A2} -RNasa(H93R). La mutación H93R elimina a un aminoácido catalítico de la S-RNasa, por lo que pierde su actividad de ribonucleasa (McCubbin *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando se sobreexpresó la S_{A2} -RNasa(H93R) se encontró en CI (Figura 11). Dado que no es su citotoxicidad, la estructura misma de la proteína podría ser la causa de su agregación al expresarse en *E. coli*. Esto probablemente se deba a las modificaciones postraduccionales que poseen las S-RNasas, que dificultan que se expresen de manera soluble en *E. coli* (Bhatwa *et al.*, 2021).

Un factor posiblemente involucrado en la localización de las S-RNasas en CI es la presencia de cuatro puentes disulfuro en su estructura terciaria (Irie, 1999). Es probable que, al expresarse, la S-RNasa recombinante forme CI debido a que el ambiente reductor del citosol

no favorece la formación de puentes disulfuro (Lilie *et al.*, 1998; Singh y Panda, 2005). Para intentar solucionar a este problema, se sobreexpresó la S_{C10}-RNasa en la cepa de *E. coli* SHuffle T7 (New England Biolabs). Esta cepa favorece la formación de puentes disulfuro en el citosol. Sin embargo, la S_{C10}-RNasa se volvió a encontrar en CI cuando se expresó en *E. coli* SHuffle T7 (Figura 12). Otra alternativa para resolver este problema fue sobreexpresar las S_{A2}- y S_{C10}-RNasas en el vector pMALp5x, que envía a la proteína de interés hacia el periplasma de la bacteria debido que se expresa como proteína de fusión a la MBP con un péptido señal. Sin embargo, todos los ensayos de sobreexpresión de este tipo resultaron en la localización de las S-RNasas recombinantes en CI (Figuras 9A-B). Esto concuerda con el hecho de que, aunque generalmente los CI se localizan en el citosol, también se han encontrado en el espacio periplásmico (Chan *et al.*, 1996; Arié *et al.*, 2006). Es necesario mencionar aquí que Choi *et al.* (2000) reportaron proteínas recombinantes que, a pesar de encontrarse en CI periplásmicos, al inducirse su expresión con IPTG 1 mM, pudieron solubilizarse con una concentración de IPTG de 0.01 mM. En los experimentos realizados en este trabajo, la concentración utilizada de IPTG siempre fue de 0.1 mM. Por lo tanto, la posibilidad de expresar exitosamente a la S-RNasa recombinante utilizando una concentración más baja de IPTG no puede ser descartada.

La coexpresión de chaperonas puede mejorar la solubilidad de las proteínas recombinantes (Villaverde y Mar Carrió, 2003), por lo que se sobreexpresaron las S_{A2}- y S_{C10}-RNasas en la cepa de *E. coli* pGro7, que coexpresa a las chaperonas GroES y GroEL. En estos experimentos, las S-RNasas recombinantes también se encontraron en CI (Gariglio-Rangel, 2022). Esto podría explicarse porque se ha sugerido que la chaperona GroEL –coexpresada por la cepa pGro7– en realidad favorecería la formación de cuerpos de inclusión al actuar como generadora de núcleos de agregación (Carrió y Villaverde, 2003).

La temperatura es otro factor que afecta la formación de CI, aunque de manera indirecta. Al disminuir la temperatura del cultivo, la tasa de crecimiento de *E. coli* se ralentiza y, con ello, también la tasa de expresión; de este modo se ha logrado mejorar la solubilidad de algunas proteínas recombinantes (Cabilly, 1989). Aún así, en este trabajo se observó que el efecto de la temperatura sobre la agregación de las S-RNasas es nulo. Se observó claramente que al sobreexpresar estas proteínas a una temperatura de 16 °C –por debajo de la temperatura óptima de 37 °C– también se obtiene a la S-RNasa recombinante en CI (Figura 10). Estos resultados corroboran los experimentos realizados por Gariglio-Rangel (2022), donde se expresaron las S_{A2}- y S_{C10}-RNasas en la cepa de *E. coli* BL21(RIL) a 16 °C durante 20 h.

Todos los experimentos de sobreexpresión llevados a cabo en el laboratorio apuntan hacia una enorme dificultad para expresar la S-RNasa con una conformación nativa en *E. coli*. Sin embargo, es necesario señalar los reportes que existen sobre la expresión en *E. coli* de T2 RNasas recombinantes, como lo son la S₃-RNasa de *Pyrus pyrifolia* (Gamage *et al.*, 2000), las S₂-, S₄- y S₅-RNasas de *Antirrhinum* (Yang y Xue, 2000), la RNasa MC1 de *Momordica charantia* (Numata *et al.*, 2000) y la RNasa NW de *Nicotiana glutinosa* (Hino *et al.*, 2002). Resulta interesante que al contrastar dichos estudios con los resultados de este reporte, las metodologías, los vectores de expresión y las cepas utilizadas son similares. En el trabajo de

Gamage *et al.* (2000), se expresó la S₃-RNasa fusionada a GST en células de *E. coli* BL21. Y, aunque la GST-S₃-RNasa se observa como una banda muy tenue, su funcionalidad se prueba mediante un ensayo de actividad de ribonucleasa. De manera similar, en el presente trabajo la S_{C10}- y S_{A2}-RNasa fueron fusionadas a MBP y sobreexpresadas en BL21-AI. Aunque también se observaron bandas muy tenues en la fase soluble a la altura esperada (Figura 9A-C), su actividad de ribonucleasa no fue evaluada porque la proteína se encontró predominantemente en la fase insoluble. Por lo tanto, no podemos descartar el que en realidad sí exista una pequeña proporción de la enzima con una conformación funcional y que podría ser purificada para estudios enzimáticos. Sin embargo, la meta del proyecto es lograr el cristal de la proteína de la mutante S_{C10}-RNasa(C155S/C185S), por lo que en realidad es necesario contar con una concentración elevada de la proteína.

Si se lee detalladamente el trabajo sobre la expresión de S-RNasas de *Antirrhinum*, los autores nunca aclaran si las proteínas se encuentran en la fase insoluble, únicamente descartan el que la proteína sea tóxica al mencionar que la tasa de crecimiento de las bacterias es igual tanto induciendo la expresión de S-RNasas como sin inducirla (Yang y Xue, 2000). Sin embargo, en el presente trabajo nunca se observó una diferencia entre expresar la S_{A2}-RNasa y la S_{A2}-RNasa(H93R); y aun así ambas se agregaron en CI. Adicionalmente, Yang y Xue (2000) muestran que las S-RNasas recombinantes poseen actividad, aunque esta parece ser muy baja. Esto podría indicar que las S-RNasas recombinantes en realidad se encuentran predominantemente en la fase insoluble y la actividad de ribonucleasa se detecta en la fracción de enzima localizada en la fase insoluble.

Finalmente, para expresarlas en *E. coli*, la RNasa MC1 y RNasa NW se clonaron en el vector pET-22b, que añade una señal de secreción a periplasma a la proteína recombinante; y se sobreexpresaron en la cepa de *E. coli* BL21(DE3). En ambos casos se demostró la actividad de las proteínas recombinantes, aunque no se especifica su presencia o ausencia en la fase insoluble (Numata *et al.*, 2000; Hino *et al.*, 2002). Una desventaja de estos sistemas de expresión es que el rendimiento de las T2 RNasas resulta ser demasiado baja –de 0.1-0.5 mg por L de cultivo (Numata y Kimura, 2001; Hino *et al.*, 2002)– como para poder cristalizar la proteína, para lo que se requieren concentraciones elevadas de proteína –de 10-100 mg/L– (McPherson, 1990). Considerando estos rendimientos y dado que la cristalización de la S_{C10}-RNasa y la S_{C10}-RNasa(C155S/C185S) son un objetivo del laboratorio, no resultaría prudente sobreexpresar dichas proteínas en *E. coli*, incluso si se tuviesen en forma soluble. Por lo tanto se debe optar por un sistema de expresión eucarionte que permita obtener grandes cantidades de la enzima requerida, así como que esta sea funcional. Tal es el caso de *N. tabacum*, que ha dado rendimientos suficientemente altos de transgenes como para cristalizarlos (Flachmann y Kühlbrandt, 1996).

6.2 Renaturalización de la S_{A2}-RNasa recombinante a partir de cuerpos de inclusión de *E. coli*

Debido a que los CI obstaculizan la producción de proteínas funcionales en *E. coli* (Bhatwa *et al.*, 2021), se han desarrollado metodologías para solubilizar y replugar las proteínas a

partir de los CI y de esta manera recuperarlas. (Middelberg, 2002). Esto se abordó en el presente trabajo, donde se logró solubilizar la S_{A2}-RNasa aislada de CI utilizando urea 8M. Sin embargo, el replegamiento de la S_{A2}-RNasa solubilizada no resultó exitoso, como lo indica su nula actividad de ribonucleasa (Figura 14). Esta observación en realidad podría explicarse por la dificultad de encontrar las condiciones adecuadas para el replegamiento de proteínas (Singh y Panda, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2013). Adicionalmente, es importante remarcar que las proteínas con diversos residuos de cisteína y puentes disulfuro han resultado ser más complicadas de replegar (Fischer *et al.*, 1993).

Un problema que pudo ocurrir al solubilizar la S_{A2}-RNasa con urea es que las soluciones de dicho compuesto pueden contener isocianato, lo que genera la carbamilación de grupos amino libres en la cadena polipeptídica (Hagel *et al.*, 1971; Rudolph y Hauke, 1996). La acumulación de cianato es incluso mayor a un pH más alcalino (Hagel *et al.*, 1971), como lo es el pH del amortiguador utilizado para la solubilización de la S_{A2}-RNasa (Apéndice 2). Además del efecto negativo de la urea, debido a que el caótropro cloruro de guanidinio posee una mayor fuerza, se ha preferido para solubilizar cuerpos de inclusión (Rudolph y Hauke, 1996). Un ejemplo de esto es la interleucina-4, que mostró actividad tras ser replegada con cloruro de guanidinio, más no lo hizo al solubilizarse con urea (van Kimmenade *et al.*, 1988).

Otro factor a considerar surge al comparar un estudio en el cual una T2 RNasa de *Schistosoma japonicum* (Sj CP1412) se solubilizó con urea 8 M y se replegó mediante diálisis escalonada, mostrando una recuperación de la actividad de ribonucleasa –aunque fue muy baja– (Ke *et al.*, 2017). Por la similitud del protocolo con el utilizado en este trabajo, se debe considerar que el 2-mercaptoetanol, además de evitar puentes disulfuro intercatenarios, también pudo inhibir la formación de puentes disulfuro en la renaturalización y, por lo tanto, impedir el correcto plegamiento de la S_{A2}-RNasa recombinante.

Otros factores a considerar para lograr un replegamiento correcto de la S-RNasa sería el uso del sistema de reoxidación del glutatión. Este sistema involucra la adición de glutatión oxidado y glutatión reducido al medio de replegamiento. Estos compuestos ayudan a incrementar la tasa de oxidación/formación de puentes disulfuro, así como a la reducción/rompimiento de los puentes disulfuro no nativos; aunque es importante mencionar que la relación de glutatión oxidado:reducido debe optimizarse para cada proteína (Fischer *et al.*, 1993; Yamaguchi *et al.*, 2013). Este sistema ha sido utilizado exitosamente para aumentar el rendimiento de recuperación de actividad a partir de proteína desnaturalizada/reducida en los casos de la lisosima y la ribonucleasa pancreática (Ahmed *et al.*, 1975; Raman *et al.*, 1996).

6.3 Generación de líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresen la variante S_{C10}-RNasa(C155S/C185S)

El hecho de que la S-RNasa presente una mayor actividad al ser reducida por la NaTrxh indica que la S-RNasa experimenta cambios conformacionales al ser reducida durante la respuesta de autoincompatibilidad en *Nicotiana*. Para conocer estos cambios se debe resolver la estructura de la S-RNasa en su conformación “hiperactiva” –reducida por NaTrxh–.

Actualmente, la resolución de estructuras proteicas –y de otras biomoléculas– es una práctica común y, aunque existen distintos métodos, la cristalografía de rayos X continúa siendo un estándar en este campo (Shi *et al.*, 2014). Resolver la estructura de una proteína mediante difracción de rayos X involucra su obtención en grandes cantidades y su purificación casi a homogeneidad, además de que, en una misma solución, no debe presentar conformaciones distintas (Smyth y Martin, 2000; Ilari y Savino, 2008). Para esto, se debe utilizar un sistema de expresión que favorezca su plegamiento correcto y su producción en grandes cantidades. Dadas las complicaciones de sobreexpresar a la S-RNasa en *E. coli*, en este trabajo nos planteamos utilizar un sistema de expresión eucarionte, como lo es *N. tabacum*. Así, se generaron construcciones para la expresión constitutiva en la planta de distintas variantes de la S_{C10}-RNasa (Figuras 16 y 21), las cuales se clonaron en el vector destino pK2GW7, cuyo propósito es la sobreexpresión del transgén insertado –la transcripción queda bajo el control del promotor constitutivo 35S– (Karimi *et al.*, 2002). Todas las construcciones generadas tienen como molde la secuencia genómica de la S_{C10}-RNasa, que contiene un intrón de 99 pb que será necesario al momento de su expresión (Murfett *et al.*, 1994), y un péptido señal para la secreción de la S_{C10}-RNasa al apoplasto, lo que, en teoría, evitaría su efecto citotóxico y facilitaría su posterior purificación. Otro elemento importante que tienen estas construcciones es que la expresión del transgén se encuentra regulada por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor, que promueve una expresión de tipo nuclear y de manera tejido-inespecífica (Odell *et al.*, 1985). La expresión constitutiva de las S-RNasas es importante, ya que permitirá la obtención de esta proteína a partir de todos los órganos de la planta.

Una vez que la S_{C10}-RNasa silvestre y las variantes generadas –S_{C10}-RNasa(H31N), S_{C10}-RNasa(C155S/C185S), S_{C10}-RNasa(H31N/C155S/C185S)– se puedan obtener a partir de líneas transgénicas de *N. tabacum* que las expresen constitutivamente, las proteínas podrán ser extraídas a partir de hojas, con la ventaja de que su extracción puede realizarse en cualquier momento, además de que *N. tabacum* bajo condiciones estándar de invernadero produce una gran biomasa de este tipo de órganos vegetativos (Colgan *et al.*, 2010; Teng y Wang, 2012). Idealmente, se busca obtener una gran cantidad de S-RNasa para poder continuar con los objetivos del laboratorio, que incluyen la obtención de un cristal de la S_{C10}-RNasa(C155S/C185S) para la posterior resolución de su estructura por cristalografía de rayos X. Esto requerirá de un paso previo de purificación, para el cual se sugiere utilizar cromatografía de intercambio catiónico (Murfett *et al.*, 1994) o mediante dos columnas –CM-Sefarosa y SP-Sefarosa– (Cruz-García *et al.*, 2005). La estructura de la S_{C10}-RNasa(C155S/C185S) indicará los cambios conformacionales que tiene la S_{C10}-RNasa al ser reducida por la NaTrxh. Estos cambios también explican el aumento en la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa durante la autoincompatibilidad (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Además, una vez obtenidas las distintas variantes de la S_{C10}-RNasa, se podrán caracterizar cinéticamente, lo que brindará información relevante sobre el mecanismo enzimático de estas proteínas.

6.4 Regulación de la expresión de las S-RNasas y propuestas para sobreexpresarla

Existen diversos factores que podrían afectar la expresión de la S_{C10} -RNasa en *N. tabacum*. Es por ello que la generación de plantas transgénicas de *N. tabacum* permitirá abordar cuestiones relacionadas con la regulación de la expresión de la S-RNasa. En estudios anteriores se ha observado que la expresión de la S-RNasa se encuentra finamente regulada tanto por los elementos regulatorios en *cis* como por el ambiente genético de la especie de planta transformada (Murfett *et al.*, 1992; Murfett *et al.*, 1995a; Murfett *et al.*, 1995b; Murfett y McClure, 1998). Las diferencias entre el ambiente genético de *N. tabacum* y *N. alata* no son despreciables y ejemplo de ellos es que, al transformar plantas de *N. alata* y *N. tabacum* con la S_6 -RNasa regulada por su propio promotor, las transgénicas de *N. alata* expresaron el transgén y las transgénicas de *N. tabacum* no lo hicieron (Murfett *et al.*, 1995a). Es relevante resumir los resultados reportados por Murfett *et al.* (1992), quienes encontraron que al transformar plantas de *N. tabacum* con la secuencia genómica de la S_2 -RNasa regulada bajo el promotor 35S y la región 3'UTR de la S_2 -RNasa, su expresión ocurre mayormente en órganos florales y resulta ser baja en hojas, aumentando en los órganos florales con su maduración (Murfett *et al.*, 1992). Esto contrasta con el hecho de que el promotor 35S comúnmente favorece una mayor expresión en hojas y corolas (Odell *et al.*, 1985; Murfett *et al.*, 1992). En su conjunto, los experimentos previos (Murfett *et al.*, 1992; 1995a; 1995b; Murfett y McClure, 1998) indican que, de ser transgénicas, las plantas de *N. tabacum* generadas en este trabajo probablemente expresarán a la S_{C10} -RNasa, aunque en cantidades menores que *N. alata*. También será posible esperar que la expresión ocurra en varios órganos, aunque predominantemente en órganos florales.

Un aspecto adicional que se podrá abordar con las plantas generadas en este trabajo es el papel de la secuencia 3'UTR en la expresión de las S-RNasas. Se piensa que la expresión de las S-RNasas en pistilo se potencia gracias a elementos regulatorios en *cis*, como lo es probablemente la región 3'UTR de su secuencia. Esto se respalda con experimentos en los que se observa una mayor expresión de la S_2 -RNasa al estar regulada por su secuencia genómica –incluyendo su intrón y su región 3'UTR– respecto a cuando está regulada por su secuencia codificante –únicamente su cDNA– (Murfett *et al.*, 1992). Aun así, es importante resaltar que los patrones de expresión espacial y temporal permanecen relativamente constantes, lo que sugiere que los mismos exones de la S-RNasa contribuyen a la especificidad tisular de su expresión (Murfett *et al.*, 1992).

6.5 Importancia de la S-RNasa en su conformación reducida

Aunque generalmente los puentes disulfuro se consideran como elementos de estabilidad estructural, también se ha observado que pueden actuar como interruptores para la función de las proteínas (Hogg, 2003). En el caso de la S-RNasa, lo que se sabe es que su reducción –por la NaTrxh– aumenta su actividad de ribonucleasa, lo que es esencial para el rechazo del polen alelo *S* específico (Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). De esta manera, el puente disulfuro blanco de reducción por la NaTrxh funcionaría como activador de la S-RNasa durante el rechazo del polen en una cruce incompatible en *Nicotiana*. Aunque esto sea cierto, hay mucho que se desconoce sobre el papel de la S-RNasa en la AI. En particular, se desconoce en qué momento la NaTrxh reduce a la S-RNasa durante la respuesta de AI

(Torres-Rodríguez *et al.*, 2020). Es necesario mencionar que la secuencia de la *Sc10-RNasa(C155S/C185S)*, generada en este trabajo, podría ser utilizada –tras algunas modificaciones– para resolver esta pregunta. Para ello se podría expresar la *Sc10-RNasa(C155S/C185S)*, de modo que se evalúe su efecto en el fenotipo de AI en plantas transgénicas de *N. alata* X *N. plumbaginifolia*, híbridos muy útiles para este tipo de ensayos (ejemplificado en McClure *et al.*, 1999; Nathan Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2013; Torres-Rodríguez *et al.*, 2020).

Además de aumentar su actividad de ribonucleasa, la S-RNasa podría verse afectada de otras maneras al ser reducida por la NaTrxh. El cambio conformacional que esto implica en la S-RNasa podría también afectar su interacción con otras proteínas, aumentando o disminuyendo su afinidad y/o especificidad por ellas. Este podría ser el caso de la interacción entre la S-RNasa y la actina en el citoesqueleto, la cual se ha observado que ocurre con S-RNasas de Rosaceae (Matsumoto y Tao, 2012; Chen *et al.*, 2018) y *Nicotiana glauca* (Roldán *et al.*, 2012). Estas observaciones sugieren que, además de hacerlo mediante su actividad de ribonucleasa, la S-RNasa inhibe el crecimiento del tubo polínico mediante la despolimerización de actina. Es de particular interés que la observación de que, al menos *in vitro*, la S-RNasa de *Prunus avium* sólo interacciona con actina cuando se encuentra en un estado reducido (Matsumoto y Tao, 2012), indicando que, en el sistema de AI basado en S-RNasas, la S-RNasa ejerce su citotoxicidad despolimerizando a la F-actina gracias a que es reducida por la NaTrxh. Matsumoto y Tao (2012) también sugieren que la S-RNasa estaría actuando como señal de muerte celular programada, un evento para el que es característica la despolimerización de actina, como ocurre cuando el grano de polen es rechazado por la respuesta de AI en *Papaver rhoeas* (Goring *et al.*, 2023).

7 CONCLUSIONES

Se realizaron distintos experimentos de sobreexpresión de dos variantes de S-RNasas (S_{A2} - y S_{C10} -RNasa). Se observó que dichas proteínas recombinantes se localizan en la fase insoluble/CI cuando se sobreexpresan en la cepa de *E. coli* BL21-AI en condiciones variadas: 1) a 37 °C como proteínas con una etiqueta 6xHis; 2) a 37 °C como proteínas de fusión a MBP; 3) a 16 °C como proteínas con una etiqueta 6xHis; y 4) como proteínas sin actividad de ribonucleasa. Las S-RNasas también se agregaron al sobreexpresarse en la cepa de *E. coli* SHuffle T7.

Junto con los experimentos llevados a cabo por Gariglio-Rangel (2022), este trabajo corrobora que la sobreexpresión de la S-RNasa en *E. coli* resulta en la agregación de la proteína recombinante y su localización en CI. Esto probablemente ocurra por la complejidad estructural de las S-RNasas, porque poseen importantes modificaciones postraduccionales como la glicosilación y la formación de puentes disulfuro.

Por todo lo anterior, en este trabajo se buscó expresar adecuadamente una S-RNasa utilizando un sistema de expresión eucarionte como el de *N. tabacum*. Estas plantas son capaces de lo siguiente: 1) llevar a cabo las modificaciones postraduccionales necesarias para la estabilidad estructural de la S-RNasa; y 2) secretar a la proteína de modo que se evite su efecto citotóxico y, además, se facilite su purificación. Para esto, se han generado las construcciones pK2: S_{C10} -RNasa, pK2: S_{C10} -RNasa(H31N), pK2: S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N/C155S/C185S), que permiten la expresión constitutiva de cada una de las proteínas codificadas. Estas construcciones permiten la transformación de *N. tabacum* u otro modelo vegetal transformable mediante *A. tumefaciens*.

Actualmente se cuenta con resultados prometedores sobre la generación de líneas transgénicas de *N. tabacum* que expresen constitutivamente a la S_{C10} -RNasa y la S_{C10} -RNasa(H31N). Sin embargo, las transformaciones de *N. tabacum* con pK2: S_{C10} -RNasa(C155S/C185S) y pK2: S_{C10} -RNasa(H31N/C155S/C185S) no parecen haber sido exitosas. Las construcciones y el material biológico generado en este trabajo serán de gran utilidad para futuros estudios que aborden varios aspectos de las S-RNasas, en particular aquellos en que se aborden cuestiones relacionadas con la S-RNasa en estado reducido por la NaTrxh.

8 PERSPECTIVAS

Debido a lo discutido en este trabajo y a que la técnica de transfección de *N. tabacum* con pK2:Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) y pK2:Sc₁₀-RNasa(H31N/C155S/C185S) no parece ser prometedoras (Figura 23C-D), se sugieren alternativas para la futura generación de líneas transgénicas que las expresen y también a otras variantes de S-RNasas. La primera sería el uso de un promotor distinto al 35S, como puede ser el promotor *ChiP*, que produjo los mejores resultados en la expresión de S-RNasas en *Nicotiana* (Murfett y McClure, 1998). La segunda sería el uso de *N. alata*, y no *N. tabacum*, como sistema de expresión. Esto por las dificultades reportadas para expresar a las S-RNasas en *N. tabacum* (Murfett *et al.*, 1995a; Murfett y McClure, 1998). En las dos propuestas anteriores se considera que la expresión será mayor en órganos florales; sin embargo, podría proponerse la expresión de la S-RNasa en una planta con divergencia más temprana de *Nicotiana*, por ejemplo, *Arabidopsis thaliana*, de manera que podrían utilizarse las mismas construcciones generadas en este trabajo. Otra alternativa a considerarse es producir las variantes de Sc₁₀-RNasas en un cultivo de células vegetales en suspensión. Esta técnica presenta dos importantes ventajas para la generación de plantas transgénicas: 1) el cultivo de células en suspensión se realiza en un menor tiempo; y 2) la purificación de proteínas se facilita, en especial si tienen una señal de secreción como las S-RNasas (Plasson *et al.*, 2009).

Una alternativa para expresar más rápidamente las distintas variantes de Sc₁₀-RNasas generadas en este trabajo, sería transformarlas en levadura (*Pichia pastoris*). Esto ha demostrado ser útil al menos para las RNasa NW, RNasa NT y RNASET2. En el caso de la RNASET2 (*Homo sapiens*), se obtuvieron rendimientos mayores a los 30 mg/L de cultivo (Campomenosi *et al.*, 2011; Lualdi *et al.*, 2015); para las RNasas NW y NT (*N. glutinosa*), se utilizó a *P. pastoris* como sistema de expresión, incluso para cristalizar dichas proteínas y resolver su estructura (Kawano *et al.*, 2002; Kawano *et al.*, 2006), por lo que se propone resolver la estructura de la Sc₁₀-RNasa(C155S/C185S) tras expresarla en *P. pastoris*.

9 REFERENCIAS

- Ahmed, A. K., Schaffer, S. W. y Wetlaufer, D. B. (1975). Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *Journal of Biological Chemistry*, 250(21), 8477-8482.
- 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 stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, 321(6065), 38-44.
- Arié, J. P., Miot, M., Sassoon, N. y Betton, J. M. (2006). Formation of active inclusion bodies in the periplasm of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 62(2), 427-437.
- Ávila-Castañeda, A., Juárez-Díaz, J. A., Rodríguez-Sotres, R., Bravo-Alberto, C. E., Ibarra-Sánchez, C. P., Zavala-Castillo, A., Cruz-Zamora, Y., Martínez-Castilla, 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), 1-16.
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X. Z. y Zhou, T. (2021). Challenges associated with the formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli* and strategies to address them for industrial applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 630551.
- Beecher, B., Murfett, J. y McClure, B. A. (1998). RNaseI from *Escherichia coli* cannot substitute for S-RNase in rejection of *Nicotiana plumbaginifolia* pollen. *Plant molecular biology*, 36, 553-563.
- Broothaerts, W., Vanvinckenroye, P., Decock, B., Van Damme, J. y Vendrig, J. C. (1991). *Petunia hybrida* S-proteins: ribonuclease activity and the role of their glycan side chains in self-incompatibility. *Sexual Plant Reproduction*, 4, 258-266.
- Cabilly, S. (1989). Growth at sub-optimal temperatures allows the production of functional, antigen-binding Fab fragments in *Escherichia coli*. *Gene*, 85(2), 553-557.
- Campomenosi, P., Cinquetti, R., Tallarita, E., Lindqvist, C., Raimondi, I., Grassi, P., Näsman, J., Dell, A., Haslam, S. M., Taramelli, R. y Acquati, F. (2011). Comparison of the baculovirus-insect cell and *Pichia pastoris* heterologous systems for the expression of the human tumor suppressor protein RNASET2. *Biotechnology and applied biochemistry*, 58(1), 39-49.
- Carrió, M. M. y Villaverde, A. (2003). Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS letters*, 537(1-3), 215-221.
- Chan, W., Helms, L. R., Brooks, I., Lee, G., Ngola, S., McNulty, D., Maleeff, B., Hensley, P. y Wetzel, R. (1996). Mutational effects on inclusion body formation in the periplasmic expression of the immunoglobulin VL domain REI. *Folding and Design*, 1(2), 77-89.
- Chen, J., Wang, P., De Graaf, B. H., Zhang, H., Jiao, H., Tang, C., Zhang, S. y Wu, J. (2018). Phosphatidic acid counteracts S-RNase signaling in pollen by stabilizing the actin cytoskeleton. *The Plant Cell*, 30(5), 1023-1039.

- Choi, J. H., Jeong, K. J., Kim, S. C. y Lee, S. (2000). Efficient secretory production of alkaline phosphatase by high cell density culture of recombinant *Escherichia coli* using the *Bacillus sp.* endoxylanase signal sequence. *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 640-645.
- Colgan, R., Atkinson, C. J., Paul, M., Hassan, S., Drake, P. M., Sexton, A. L., Santa-Cruz, S., James, D., Hamp, K., Gutteridge, C. y Ma, J. K. (2010). Optimisation of contained *Nicotiana tabacum* cultivation for the production of recombinant protein pharmaceuticals. *Transgenic research*, 19, 241-256.
- Cornish, E. C., Pettitt, J. M., Bonig, I. y Clarke, A. E. (1987). Developmentally controlled expression of a gene associated with self-incompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature*, 326(6108), 99-102.
- de Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag. Berlin. 230 pp.
- de Nettancourt, D. (2001). *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants* (Vol. 3). Springer-Verlag. Berlin. 322 pp.
- Deshpande, R. A. y Shankar, V. (2002). Ribonucleases from T2 family. *Critical reviews in microbiology*, 28(2), 79-122.
- Egami, F y Nakamura, K. (1969). *Microbial Ribonucleases, Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, vol 6*. Springer-Verlag, Berlin.
- Fischer, B., Sumner, I. y Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnology and bioengineering*, 41(1), 3-13.
- Flachmann, R. y Kühlbrandt, W. (1996). Crystallization and identification of an assembly defect of recombinant antenna complexes produced in transgenic tobacco plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(25), 14966-14971.
- Floyd, B. E., Mugume, Y., Morriss, S. C., MacIntosh, G. C. y Bassham, D. C. (2017). Localization of RNS2 ribonuclease to the vacuole is required for its role in cellular homeostasis. *Planta*, 245, 779-792.
- Gamage, N., Matsuura, T., Norioka, N., Yoshimura, Y., Takasaki, T., Nakanishi, T. y Norioka, S. (2000). Expression of a fusion protein of *Pyrus pyrifolia* S-RNase with glutathione-S-transferase in *E. coli*. *Biotechnology letters*, 22, 1413-1417.
- Gariglio Rangel, A. F. (2022). *Expresión de dos variantes alélicas de la S-RNasa de Nicotiana alata recombinantes en Escherichia coli* [Tesis de licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Goldraij, A., Kondo, K., Lee, C. B., Hancock, C. N., Sivaguru, M., Vazquez-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.
- Goring, D., Cruz-Garcia, F. y Franklin-Tong, V. (2022). Self-Incompatibility. *eLS*, 3, 1-12.
- Goring, D. R., Bosch, M. y Franklin-Tong, V. E. (2023). Contrasting self-recognition rejection systems for self-incompatibility in *Brassica* and *Papaver*. *Current Biology*, 33(11), R530-R542.

- Green, P. J. (1994). The ribonucleases of higher plants. *Annual review of plant biology*, 45(1), 421-445.
- Gutteridge, A. y Thornton, J. (2004). Conformational change in substrate binding, catalysis and product release: an open and shut case? *FEBS letters*, 567(1), 67-73.
- Hagel, P., Gerding, J. J. T., Fieggen, W. y Bloemendal, H. (1971). Cyanate formation in solutions of urea: I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 243(3), 366-373.
- Hartley, J. L., Temple, G. F. y Brasch, M. A. (2000). DNA Cloning Using *in vitro* Site-Specific Recombination. *Genome Research* 10, 1788-1795.
- Hillwig, M. S., Liu, X., Liu, G., Thornburg, R. W. y MacIntosh, G. C. (2010). *Petunia* nectar proteins have ribonuclease activity. *Journal of Experimental Botany*, 61(11), 2951-2965.
- Hillwig, M. S., Contento, A. L., Meyer, A., Ebany, D., Bassham, D. C. y MacIntosh, G. C. (2011). RNS2, a conserved member of the RNase T2 family, is necessary for ribosomal RNA decay in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(3), 1093-1098.
- Hino, M., Kawano, S. y Kimura, M. (2002). Expression of *Nicotiana glutinosa* ribonucleases in *Escherichia coli*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 66(4), 910-912.
- Hogg, P. J. (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends in biochemical sciences*, 28(4), 210-214.
- Hua, Z. y Kao, T. H. (2006). Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *The Plant Cell*, 18(10), 2531-2553.
- Hwang, H. H., Yu, M. y Lai, E. M. (2017). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15.
- Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbiggin, E. D., Clarke, A. E., Sakiyama, F. y Sato, M. (2001). The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *Journal of Molecular Biology*, 314(1), 103-112.
- Igic, B. y Kohn, J. R. (2001). Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13167-13171.
- Ilari, A. y Savino, C. (2008). Protein structure determination by x-ray crystallography. *Bioinformatics: Data, Sequence Analysis and Evolution*, 63-87.
- 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, 81-87.
- Irie, M. (1999). Structure-function relationships of acid ribonucleases: lysosomal, vacuolar, and periplasmic enzymes. *Pharmacology & therapeutics*, 81(2), 77-89.
- Irie, M., Ohgi, K., Watanabe, H., Iwama, M., Nakamura, K. T., Kurihara, H., Nonaka, T., Mitsui, Y., Horiuchi, H. y Takagi, M. (1994). pH profile of kinetic constants of RNase Rh from *Rhizopus niveus* and its mutant enzymes towards UpU, and possible mechanisms of RNase Rh. *The Journal of Biochemistry*, 115(6), 1083-1087.

- Irie, M., Ohgi, K., Iwama, M., Koizumi, M., Sasayama, E., Harada, K., Yano, Y., Udagawa, J. y Kawasaki, M. (1997). Role of Histidine 46 in the Hydrolysis and the Reverse Transphosphorylation Reaction of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. *The Journal of biochemistry*, 121(5), 849-853.
- Ishimizu, T., Norioka, S., Kanai, M., Clarke, A. E. y Sakiyama, F. (1996). Location of Cysteine and Cystine Residues in S-Ribonucleases Associated with Gametophytic Self-Incompatibility. *European journal of biochemistry*, 242(3), 627-635.
- 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 glauca* 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. (2006). A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3418-3424.
- Kane, J. F. y Hartley, D. L. (1988). Formation of recombinant protein inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnology*, 6(5), 95-101.
- Karimi, M., Inzé, D. y Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, 7(5), 193-195.
- Kariu, T., Sano, K., Shimokawa, H., Itoh, R., Yamasaki, N. y Kimura, M. (1998). Isolation and characterization of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glauca* leaves. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(6), 1144-1151.
- Karunanandaa, B., Huang, S. y Kao, T. H. (1994). Carbohydrate moiety of the *Petunia inflata* S3 protein is not required for self-incompatibility interactions between pollen and pistil. *The Plant Cell*, 6(12), 1933-1940.
- Kawano, S., Kakuta, Y. y Kimura, M. (2002). Guanine binding site of the *Nicotiana glauca* ribonuclease NW revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 41(51), 15195-15202.
- Kawano, S., Kakuta, Y., Nakashima, T. y Kimura, M. (2006). Crystal structures of the *Nicotiana glauca* ribonuclease NT in complex with nucleoside monophosphates. *Journal of biochemistry*, 140(3), 375-381.
- Ke, X. D., Shen, S., Song, L. J., Yu, C. X., Kikuchi, M., Hirayama, K., Gao, H., Wang, J., Yin, X., Yao, Y., Liu, Q. y Zhou, W. (2017). Characterization of *Schistosoma japonicum* CP1412 protein as a novel member of the ribonuclease T2 molecule family with immune regulatory function. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-19.
- Kubo, K. I., Entani, T., Takara, A., Wang, N., Fields, A. M., Hua, Z., Toyoda, M., Kawashima, S. H., Ando, T., Isogai, A., Kao, T. H. y Takayama, S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, 330(6005), 796-799.
- Kurihara, H., Nonaka, T., Mitsui, Y., Ohgi, K., Irie, M. y Nakamura, K. T. (1996). The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2.0 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 255(2), 310-320.

- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G. y Xue, Y. (2002). An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant molecular biology*, 50, 29-41.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of λ site-specific recombination. *Annual review of biochemistry*, 58(1), 913-941.
- Lee, H. S., Huang, S. y Kao, T. H. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature*, 367(6463), 560-563.
- Levitt, M. y Chothia, C. (1976). Structural patterns in globular proteins. *Nature*, 261(5561), 552-558.
- Lilie, H., Schwarz, E. y Rudolph, R. (1998). Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Current opinion in biotechnology*, 9(5), 497-501.
- Löffler, A., Abel, S., Jost, W., Beintema, J. J. y Glund, K. (1992). Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiology*, 98(4), 1472-1478.
- Lualdi, M., Pedrini, E., Petroni, F., Näsman, J., Lindqvist, C., Scaldaferrri, D., Taramelli, R., Inforzato, A. y Acquati, F. (2015). New Strategies for expression and purification of recombinant human RNASET2 protein in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 57, 513-525.
- Luhtala, N. y Parker, R. (2010). T2 Family ribonucleases: ancient enzymes with diverse roles. *Trends in biochemical sciences*, 35(5), 253-259.
- Luu, D. T., Qin, X., Morse, D. y Cappadocia, M. (2000). S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, 407(6804), 649-651.
- Lv, S., Qiao, X., Zhang, W., Li, Q., Wang, P., Zhang, S. y Wu, J. (2022). The origin and evolution of RNase T2 family and gametophytic self-incompatibility system in plants. *Genome Biology and Evolution*, 14(7), evac093.
- MacIntosh, G.C. (2011). RNase T2 Family: Enzymatic Properties, Functional Diversity, and Evolution of Ancient Ribonucleases. En Nicholson, A. (Ed.), *Ribonucleases. Nucleic Acids and Molecular Biology*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- MacIntosh, G. C., Hillwig, M. S., Meyer, A. y Flagel, L. (2010). RNase T2 genes from rice and the evolution of secretory ribonucleases in plants. *Molecular Genetics and Genomics*, 283, 381-396.
- MacIntosh, G. C. y Castandet, B. (2020). Organellar and secretory ribonucleases: major players in plant RNA homeostasis. *Plant Physiology*, 183(4), 1438-1452.
- Matsumoto, D. y Tao, R. (2012). Isolation of Pollen-expressed Actin as a Candidate Protein Interacting with S-RNase in *Prunus avium* L. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 81(1), 41-47.
- Matsuura, T., Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F. y Norioka, S. (2001). Crystal structure at 1.5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *Journal of Biological Chemistry*, 276(48), 45261-45269.
- Matton, D. P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D. y Cappadocia, M. (1997). Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *The Plant Cell*, 9(10), 1757-1766.

- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F. y Clarke, A. E. (1989). Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature*, 342(6252), 955-957.
- McClure, B. A., Gray, J. E., Anderson, M. A. y Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility in *Nicotiana alata* 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.
- McCubbin, A. G., Chung, Y. Y. y Kao, T. H. (1997). A mutant S3 RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *The Plant Cell*, 9(1), 85-95.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. En: Christen, P., Hofmann, E. (eds) *EJB Reviews 1990. European Journal of Biochemistry, vol 1990*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Middelberg, A. P. (2002). Preparative protein refolding. *TRENDS in Biotechnology*, 20(10), 437-443.
- Murfett, J., Cornish, E. C., Ebert, P. R., Bonig, I., McClure, B. A. y Clarke, A. E. (1992). Expression of a Self-Incompatibility Glycoprotein (S2-Ribonuclease) from *Nicotiana alata* in Transgenic *Nicotiana tabacum*. *The Plant Cell*, 4(9), 1063-1074.
- Murfett, J., Atherton, T. L., Mou, B., Gassert, C. S. y McClure, B. A. (1994). S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature*, 367(6463), 563-566.
- Murfett, J., Ebert, P. R., Haring, V. y Clarke, A. E. (1995a). An S-RNase promoter from *Nicotiana alata* functions in transgenic *N. alata* plants but not *Nicotiana tabacum*. *Plant molecular biology*, 28, 957-963.
- Murfett, J., Bourque, J. E. y McClure, B. A. (1995b). Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II-and III-transcribed gene constructs. *Plant molecular biology*, 29, 201-212.
- Murfett, J. y McClure, B. A. (1998). Expressing foreign genes in the pistil: a comparison of S-RNase constructs in different *Nicotiana* backgrounds. *Plant molecular biology*, 37, 561-569.
- Narayanan, A., Ridilla, M. y Yernool, D. A. (2011). Restrained expression, a method to overproduce toxic membrane proteins by exploiting operator-repressor interactions. *Protein Science*, 20(1), 51-61.
- Nathan Hancock, C., Kent, L. y McClure, B. A. (2005). The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *The Plant Journal*, 43(5), 716-723.
- Numata, T., Kashiba, T., Hino, M., Funatsu, G., Ishiguro, M., Yamasaki, N. y Kimura, M. (2000). Expression and mutational analysis of amino acid residues involved in catalytic activity in a ribonuclease MC1 from the seeds of bitter melon. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64(3), 603-605.

- Numata, T. y Kimura, M. (2001). Contribution of Gln9 and Phe80 to Substrate Binding in Ribonuclease MCI from Bitter Gourd Seeds. *The journal of biochemistry*, 130(5), 621-626.
- Odell, J. T., Nagy, F. y Chua, N. H. (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313(6005), 810-812.
- Oxley, D. y Bacic, A. (1996). Disulphide Bonding in a Styelar Self-Incompatibility Ribonuclease of *Nicotiana Alata*. *European journal of biochemistry*, 242(1), 75-80.
- Plasson, C., Michel, R., Lienard, D., Saint-Jore-Dupas, C., Sourrouille, C., March, G. G. D. y Gomord, V. (2009). Production of Recombinant Proteins in Suspension-Cultured Plant Cells. En: Faye, L., Gomord, V. (eds) *Recombinant Proteins From Plants. Methods in Molecular Biology, vol 483*. Humana Press
- Qiao, H., Wang, H., Zhao, L., Zhou, J., Huang, J., Zhang, Y. y Xue, Y. (2004). The F-box protein AhSLF-S2 physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *The Plant Cell*, 16(3), 582-595.
- Raman, B., Ramakrishna, T. y Rao, C. M. (1996). Refolding of denatured and denatured/reduced lysozyme at high concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17067-17072.
- Ramanauskas, K. e Igić, B. (2017). The evolutionary history of plant T2/S-type ribonucleases. *PeerJ*, 5, e3790.
- Ramanauskas, K. e Igić, B. (2021). RNase-based self-incompatibility in cacti. *New Phytologist*, 231(5), 2039-2049.
- Rodriguez, S. M., Panjekar, S., Van Belle, K., Wyns, L., Messens, J. y Loris, R. (2008). Nonspecific base recognition mediated by water bridges and hydrophobic stacking in ribonuclease I from *Escherichia coli*. *Protein Science*, 17(4), 681-690.
- Roldán, J. A., Rojas, H. J. y Goldraij, A. (2012). Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana alata*. *Annals of botany*, 110(4), 787-795.
- Rudolph, R. y Hauke, L. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *The FASEB journal*, 10(1), 49-56.
- Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T. y Ikehashi, H. (1996). Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics MGG*, 250, 547-557.
- Sato, K. y Egami, F. (1957). Studies on ribonucleases in takadiastase. I. *The Journal of Biochemistry*, 44(11), 753-767.
- Shi, Y. (2014). A glimpse of structural biology through X-ray crystallography. *Cell*, 159(5), 995-1014.
- Singh, S. M. y Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of bioscience and bioengineering*, 99(4), 303-310.
- Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S. y Kao, T. H. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature*, 429(6989), 302-305.

- Smyth, M. S. y Martin, J. H. J. (2000). x Ray crystallography. *Molecular Pathology*, 53(1), 8.
- Tanaka, N., Arai, J., Inokuchi, N., Koyama, T., Ohgi, K., Irie, M. y Nakamura, K. T. (2000). Crystal structure of a plant ribonuclease, RNase LE. *Journal of molecular biology*, 298(5), 859-873.
- Taylor, C. B., Bariola, P. A., DelCardayre, S. B., Raines, R. T. y Green, P. J. (1993). RNS2: a senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(11), 5118-5122.
- Teng, Z. y Wang, Q. (2012). Extraction, identification and characterization of the water-insoluble proteins from tobacco biomass. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(7), 1368-1374.
- 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*, 103(4), 1304-1317.
- Tsai, D. S., Lee, H. S., Post, L. C., Kreiling, K. M. y Kao, T. H. (1992). Sequence of an S-protein of *Lycopersicon peruvianum* and comparison with other solanaceous S-proteins. *Sexual Plant Reproduction*, 5, 256-263.
- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I. y Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein expression and purification*, 28(1), 1-8.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M. y Hirano, H. (1998). Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular and General Genetics MGG*, 260, 261-268.
- van den Berg, B., Ellis, R. J. y Dobson, C. M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *The EMBO journal*, 18(24), 6927-6933.
- van Kimmenade, A., Bond, M. W., Schumacher, J. H., Laquoi, C. y Kastelein, R. A. (1988). Expression, renaturation and purification of recombinant human interleukin 4 from *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry*, 173(1), 109-114.
- Ventura, S. y Villaverde, A. (2006). Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends in biotechnology*, 24(4), 179-185.
- Villaverde, A. y Mar Carrió, M. (2003). Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters*, 25, 1385-1395.
- Vieira, J., Fonseca, N. A. y Vieira, C. P. (2008). An S-RNase-based gametophytic self-incompatibility system evolved only once in eudicots. *Journal of Molecular Evolution*, 67, 179-190.
- Woodward, J. R., Bacic, A., Jahnen, W. y Clarke, A. E. (1989). N-linked glycan chains on S-allele-associated glycoproteins from *Nicotiana glauca*. *The Plant Cell*, 1(5), 511-514.
- Yamaguchi, S., Yamamoto, E., Mannen, T., Nagamune, T. y Nagamune, T. (2013). Protein refolding using chemical refolding additives. *Biotechnology journal*, 8(1), 17-31.

- Yang, H. y Xue, Y. (2000). Expression of self-incompatibility ribonucleases of *Antirrhinum* in *Escherichia coli*. *Chinese Science Bulletin*, 45, 512-515.
- Zisovich, A. H., Stern, R. A., Sapir, G., Shafir, S. y Goldway, M. (2004). The RHV region of S-RNase in the European pear (*Pyrus communis*) is not required for the determination of specific pollen rejection. *Sexual Plant Reproduction*, 17, 151-156.

APÉNDICE 1

Preparación de células quimiocompetentes de *E. coli*

1. Crecer células de *E. coli* en 5 mL de medio líquido LB por 12-16 h a 37 °C con agitación.
2. Inocular 50 mL de LB fresco con 5 mL del precultivo, incubar a 37 °C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5.
3. Centrifugar a 4,000 rpm durante 5 min a 4 °C, decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 5 mL de CaCl₂ 100mM estéril y enfriar por 15 min a 4 °C. Repetir los pasos 3 y 4 dos veces más.
5. Resuspender el botón celular en 5 mL de una solución estéril de CaCl₂ 50 mM + glicerol 20 %.
6. Hacer alícuotas de 100 µL y conservar a -70 °C hasta su uso.

Transformación de *E. coli* por choque térmico

1. Descongelar en hielo una alícuota de 100 µL de células quimiocompetentes (Apéndice 1: *Preparación de células quimiocompetentes de E. coli*).
2. Agregar de 1-5 µL del DNA con el que se desea transformar y mezclar con la punta de la pipeta cuidadosamente.
3. Reposar en hielo por 20-30 min.
4. Dar el choque térmico a 42 °C por 35 s y pasar inmediatamente a hielo, donde se deja por 3 min.
5. Agregar 600 µL de medio LB + glucosa 20 mM.
6. Incubar a 37 °C con agitación por 1-2 h.
7. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 s y decantar dejando un sobrenadante de aproximadamente 50 µL.
8. Resuspender las células y sembrar en medio LB-agar selectivo.
9. Incubar a 37 °C por 12-16 h.

Análisis de las proteínas por SDS-PAGE e inmunotransferencia (Western-blot)

Las proteínas extraídas se separaron por electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12%. Cada gel se preparó mediante la siguiente receta (los componentes de las soluciones se muestran en el Apéndice 2):

	Gel separador	Gel apilador
Agua	1.4 mL	1 mL
Amortiguador separador	1 mL	–
Amortiguador apilador	–	444 µL
Acrilamida:bis-acrilamida (29:1)	1.6 mL	300 µL
PSA 20%	25 µL	20 µL
TEMED	2.5 µL	5 µL

Tras solubilizar las proteínas en un amortiguador de muestra (Apéndice 2), se desnaturizan incubándolas a 95 °C por 5 minutos. Las muestras se dejan a temperatura ambiente y se

cargan en el gel. Esto evita que la estructura tridimensional o su punto isoeléctrico influyan en su migración electroforética, separándose únicamente según su masa molecular.

Para realizar la inmunodetección (Western-blot), se deben de transferir las proteínas que migraron en un gel de SDS-PAGE a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) por electrotransferencia. Esto se realiza de la siguiente manera:

1. Finalizando 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 (Apéndice 2) por 10 –15 min con agitación suave.
3. Mientras se equilibra el gel, activar la membrana de PVDF sumergiéndola en metanol al 50% por 20 s, lavar inmediatamente 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 30 min.

Inmunodetección (Western-blot) de las proteínas recombinantes

1. Bloquear la membrana con solución de bloqueo (Apéndice 2) por 1 h a temperatura ambiente con agitación suave.
2. Retirar la solución de bloqueo y agregar al anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo, 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 a temperatura ambiente (el primer lavado de 5 min y el segundo de 10 min).
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 (10 min cada lavado).
6. Incubar con amortiguador alcalino (Apéndice 2) por 10 min con agitación suave a temperatura ambiente y decantar.
7. Agregar los sustratos de la fosfatasa alcalina [NBT/BCIP Stock Solution (Merck) diluída 1:50 en amortiguador alcalino (Apéndice 2)] e incubar hasta que aparezcan las bandas.
8. Detener la reacción de revelado lavando la membrana con agua desionizada.

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

Se utilizó el *Kit de recuperación de DNA de gel Zymoclean™* (Zymo Research), cuyo protocolo se describe a continuación:

1. Extraer el fragmento de DNA del gel de agarosa con una espátula limpia y transferirlo a un microtubo de 1.5 mL.
2. Agregar 3 volúmenes de *ADB* a 1 volumen de agarosa extraída (100 mg de gel ~ 100 μ L).
3. Incubar a 55 °C por un mínimo de 10 min y agita brevemente en vórtex o por inversión. Es esencial que el gel se encuentre completamente disuelto.
 - a. Para fragmentos >8 kb se añade 1 volumen adicional de agua (igual al volumen del gel).
4. Transferir la muestra de agarosa derretida a una columna *Zymo-Spin* en un tubo de colecta.
5. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min y descartar la fracción recolectada.
6. Añadir 200 μ L de *DNA Wash Buffer* a la columna y centrifugar a 13,000 rpm por 30 min. Descartar la fracción recolectada. Repetir este paso una vez más.
7. Para eluir al DNA, añadir ≥ 6 μ L de agua directamente a la matriz de la columna. Coloca la columna en un microtubo de 1.5 mL y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

Purificación de DNA plasmídico

Se utilizó el *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN), cuyo protocolo se describe a continuación:

1. Inocular 5 mL de medio LB con la cepa bacteriana de interés e incubar a 37 °C durante 12-16 h.
2. Generar un botón celular de 5 mL del cultivo bacteriano (paso 1) centrifugando a >8,000 rpm por 3 min y a temperatura ambiente (15-25 °C).
3. Resuspender el botón celular en 250 μ L de *Buffer P1* y transferir la muestra a un microtubo.
4. Añadir 250 μ L de *Buffer P2* y mezclar vigorosamente invirtiendo el tubo de 4-6 veces hasta que la solución se vuelva incolora. No permitir que esta reacción de lisis proceda por más de 5 min.
5. Agregar 350 μ L de *Buffer N3* y mezclar inmediatamente invirtiendo el tubo de 4-6 veces hasta que la solución se vuelva incolora.
6. Centrifugar a 13,000 rpm por 10 min.
7. Transferir 800 μ L del sobrenadante del paso 6 a una columna con una micropipeta. Centrifugar a 13,000 rpm por 30-60 s y descartar la fracción recolectada.
8. Lavar la columna añadiendo 500 μ L de *Buffer PB*. Centrifugar a 13,000 rpm por 30-60 s y descartar la fracción recolectada.
9. Lavar la columna añadiendo 750 μ L de *Buffer PE*. Centrifugar a 13,000 rpm por 30-60 s y descartar la fracción recolectada.
10. Centrifugar a 13,000 rpm por 1 min para eliminar cualquier amortiguador residual.
11. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 mL. Para eluir al DNA, añadir 50 μ L de agua, dejar reposar por 1 min y centrifugar a 13,000 rpm por 1 min.

Preparación de células quimiocompetentes de *A. tumefaciens*

1. Crecer células de la cepa de *A. tumefaciens* C58 en 5 mL de medio líquido LB por 12-16 h a 28 °C con agitación.
2. Inocular 50 mL de LB fresco con 2 mL del precultivo, incubar a 28 °C con agitación hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5.
3. Enfriar el cultivo en hielo por 10 min y centrifugar a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C, decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el botón celular en 1 mL de una solución estéril de CaCl₂ 20 mM + glicerol 10 % y dividir en alícuotas de 100 µL y conservar a -70 °C hasta su uso.

Transformación de *A. tumefaciens* por choque térmico

1. Descongelar en hielo una alícuota de células quimiocompetentes (Apéndice 1: *Preparación de células quimiocompetentes de A. tumefaciens*).
2. Agregar de 1-5 µL del DNA con el que se desea transformar y mezclar con la punta de la pipeta cuidadosamente.
3. Congelar a las células con el plásmido en N₂ líquido por 5 min.
4. Incubar a 37 °C por 25 min sin agitación.
5. Agregar 1 mL de medio LB + glucosa 20 mM.
6. Incubar a 28 °C por 3 h con agitación constante.
7. Centrifugar a 10,000 rpm por 30 s, decantar el sobrenadante y resuspender las células con 100 µL de medio LB.
8. Plaquear en medio LB-agar selectivo.
9. Incubar a 28 °C por 2-3 días.

APÉNDICE 2

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

- Acrilamida 29 g
- Bis-acrilamida 1 g
- Filtrar por una membrana de 0.45 μm

Amortiguador alcalino

- Tris-HCl 0.1 M, pH 9.5
- NaCl 0.1 M
- MgCl_2 0.05 M

Amortiguador apilador (100 mL)

- Tris 6.06 g
- SDS al 20% 2 mL
- Ajustar pH a 6.8

Amortiguador separador (100 mL)

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

Amortiguador de fosfatos salino (PBS) 10X

- NaCl 0.137 M
- KCl 2.7 mM
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 6.7 mM
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.4 mM
- Ajustar pH a 7.3 y esterilizar

Amortiguador de glicina 10X (1L)

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

Amortiguador de muestra 6X (SDS-PAGE)

- Tris-HCl 0.28 M, pH 6.8
- Glicerol al 30% (v/v)
- SDS al 1% (p/v)
- DTT 0.5 M
- Azul de bromofenol al 0.0012 % (p/v)

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

- Tris 242 g
- Ácido acético glacial hasta llegar al pH deseado
- EDTA 0.5 M 100 mL
- Ajustar pH a 8.0

Amortiguador TE (Tris EDTA)

- Tris 100 mM
- EDTA 10 mM
- Ajustado pH a 8.0

Amortiguador de transferencia (1L)

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

Amortiguador LEW (lisis-equilibrado-lavado)

- NaH_2PO_4 50 mM
- NaCl 300 mM
- Ajustar pH a 8.0

Amortiguador de columna

- NaH_2PO_4 50 mM
- NaCl 300 mM
- Urea 8 M
- 2-mercaptoetanol 25 mM
- Ajustar pH a 8.0

Medio LB (Lysogenic Broth)

- Triptona 10 g/L
- Extracto de levadura 5 g/L
- NaCl 10 g
- Esterilizar

Medio 2xYTA

- Peptona 16 g/L
- Extracto de levadura 10 g/L
- NaCl 5 g/L
- Ajustar pH a 7.0 y esterilizar

Solución de bloqueo

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

Medio NaP₆-4

- Sales inorgánicas del medio MS (Murashige y Skoog) 4.4 g/L
- Mioinositol 10 mg/L
- Ácido nicotínico 0.1 mg/L
- Piridoxina·HCl 0.1 mg/L
- Tiamina·HCl 1 mg/L
- ANA (ácido 1-naftilacético) 0.3 mg/L
- BAP (6-bencilaminopurina) 2 mg/L
- Glicina 2 mg/L
- Antioxidantes:
 - Ácido ascórbico 100 mg/L
 - Ácido cítrico 100 mg/L
- Sacarosa 30 g/L
- Gelzan 3.5 g/L (únicamente para medio sólido)
- Ajustar pH a 5.7 y esterilizar