



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

**UNAM**  
**POSGRADO**  
Ciencias Bioquímicas

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

NaTrxh ES UNA TIORREDOXINA *h* DE  
SECRECIÓN QUE REDUCE *in vitro* A LA  
S-RNasa DE *Nicotiana alata*

**T E S I S**

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

P R E S E N T A :

**JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ**

Tutor: DR. FELIPE CRUZ GARCÍA



MÉXICO, D. F.

Noviembre 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## RECONOCIMIENTOS

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

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

<b>Dr. Felipe Cruz García</b>	Facultad de Química, UNAM
<b>Dr. Wilhelm Hansberg Torres</b>	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
<b>Dra. Rosario A. Muñoz Clares</b>	Facultad de Química, UNAM
<b>Dr. Eleazar Martínez Barajas</b>	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce la colaboración de la **Dra. Sonia Vázquez Santana**, del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los cortes de los estilos de *Nicotiana glauca* para los experimentos de inmunolocalización de la NaTrxh, realizados también en su laboratorio.

Se reconoce la colaboración de la **Dra. Patricia León Mejía**, del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de fusión de la NaTrxh con la proteína verde fluorescente y el análisis de la expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* por microscopía confocal y de fluorescencia.

Se reconoce la colaboración y asesoría técnica del **Dr. Ángel Arturo Guevara García**, del Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, en todos los experimentos relacionados con la NaTrxh fusionada a la proteína verde fluorescente y el análisis de la expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana* y *A. thaliana* por microscopía confocal y de fluorescencia.

Se reconoce el apoyo de la **Q. Laurel Fábila** del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM.

Se reconoce el soporte técnico de **Andrés Saralegui Amaro** de la Unidad de Microscopía del Instituto de Biotecnología, UNAM.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACyT (40614-Q), DGAPA-UNAM (IN207406) y PAIP-UNAM (629015).

Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACyT y un complemento de beca por la DGEP-UNAM para la realización de la presente tesis.

**El Jurado de Examen Doctoral** estuvo constituido por:

Presidente	<b>Dra. Rosario A. Muñoz Clares</b>	Facultad de Química
Vocal	<b>Dr. Wilhelm Hansberg Torres</b>	Instituto de Fisiología Celular
Vocal	<b>Dra. Patricia León Mejía</b>	Instituto de Biotecnología
Vocal	<b>Dr. Fco. Javier Plasencia de la Parra</b>	Facultad de Química
Secretario	<b>Dra. Alejandra Covarrubias Robles</b>	Instituto de Biotecnología
Suplente	<b>Dra. Marina Gavilanes Ruiz</b>	Facultad de Química
Suplente	<b>Dr. Dimitris Georgellis</b>	Instituto de Fisiología Celular

## AGRADECIMIENTOS

A **Felipe Cruz García**, que además de ser un gran asesor que con ética y profesionalismo dirigió este trabajo, ha sabido ser un gran amigo al que admiro y respeto. Le agradezco con toda el alma que me haya dado el honor de formar parte de su equipo de investigación y de también considerarme como su amigo. También le agradezco todo lo que me ha enseñado en cuanto a la labor científico-académica, formando en mí un fuerte compromiso tanto laboral como personal.

A mis papás **Edna Díaz** y **Jesús Juárez**, que siempre muestran su apoyo incondicional en mis proyectos personales. Gracias a que su enorme e incondicional amor y dedicación están siempre conmigo, han logrado que sea la persona que soy ahora.

A mi hermana **Edna Suárez**, que siempre está para brindarme todo su cariño y, que sin dudarlo, me apoya para darme las fuerzas y el entusiasmo que me han permitido seguir adelante en mi carrera tanto académica como personal. De igual manera, le agradezco a **Víctor Anaya** todo su cariño y apoyo brindados. A mi sobrino **Mateo Anaya** (Tote), que sin saberlo, forma un pilar muy importante en mi crecimiento personal.

A mi hermano **Carlos Suárez**, que siempre ha sido una fuente de amor y apoyo incondicionales hacia mí. A **Patricia Lomelí**, que me ha demostrado ser una persona maravillosa que me apoya en todo. A mis sobrinos **Carlos, Daniela** y **Pablo Suárez** quienes, también sin saberlo, forman otro pilar muy importante en mi persona.

A **Karla Verdiguél** e **Iván Gómez**, a quienes también considero como mis hermanos, les agradezco de todo corazón que siempre están conmigo apoyándome y queriéndome bajo cualquier circunstancia. A mi otro hermano, **Luis Toledo**, también le agradezco todo lo que ha hecho por mí.

A **Judith Márquez** (mi mamá puma), quien a pesar del tiempo y a veces el poco contacto, siempre confía en mí y me muestra su cariño y su apoyo incondicionales.

A mi **abuelita Rosa** (q.e.p.d.), quien siempre me apoyó y estimuló para ser alguien en la vida.

A mis tíos y padrinos **Eduardo** y **Vicky Mouret** porque siempre están conmigo, siempre me apoyan y siempre me han dado un gran entusiasmo para seguir adelante. A mis primos **Lalo, Alejandro** y **Luis Adrián Mouret** les agradezco que siempre me han apoyado y querido incondicionalmente, siendo así un gran estímulo en mi vida.

A mis tíos **Hilda** y **Luis de la Lanza**, así como a mis **primos de la Lanza**, y a mi tío **Rodolfo Díaz** (tío Chapa), quienes también han sido siempre un fuerte estímulo en mi vida profesional y personal.

A mis amigos-hermanos **Gaby Galindo, Jazmín y Gloria Ménez, Giacomo Plavicini, Oscar Hans Serrano, Iliana Bello, Juan José Quijano y Reyna Ma. Pacheco** por todos los momentos que hemos vivido y por el apoyo brindado a lo largo de tantos años.

A mis amigos y compañeros de equipo del laboratorio 104: **Alejandra Ávila, Grethel Busot, Yuridia Cruz González, Andrea Hernández, Claudia Ibarra, Karina Jiménez y Gregorio Orozco**. Su valiosa amistad, su enorme entusiasmo, sus críticas y sus consejos tanto técnicos como personales han sido para mí un enorme estímulo a lo largo de todo este tiempo que llevamos juntos. También les agradezco a **Vanessa Maqueda** y a **Mayra Peña** su participación como parte de nuestro equipo de investigación.

A mis amigos **Lilia Bernal, Adriana Camacho, Selene Fragoso, Rodrigo Güémez, Ruth Gutiérrez, Valeria Martínez, Vanessa Maya, Manuela Nájera, Daniel Padilla, Víctor Zaldívar y Martín Vargas**, cuyo apoyo y cariño durante todo este tiempo en el Conjunto E han aportado muchísimo para mi crecimiento tanto personal como profesional.

A **Euclides Ávila**, que no sólo es un gran compañero como profesor, sino también es un gran amigo del que he aprendido muchas cosas tanto a nivel académico como personal.

A todos los profesores del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química les agradezco su disponibilidad y compromiso para formar gente que académicamente sea cada vez mejor. En especial quiero agradecerle a **Irma Bernal, Patricia Coello, Marina Gavilanes, Herminia Loza, Eleazar Martínez, Rosario Muñoz y Javier Plasencia** porque, además de aportar un gran estímulo y apoyo académico, me han brindado su confianza y cariño.

A **Eleazar Martínez**, quien ha sido un gran amigo y nunca me ha negado su apoyo y asesoría cuando lo necesito, teniendo siempre una mente amplia y crítica. A **Wilhelm Hansberg y Rosario Muñoz** por sus críticas e ideas. A los tres les agradezco el honor de permitirme contar con su valiosa participación para el desarrollo de este trabajo como miembros de mi Comité Tutorial.

A **Sonia Vázquez** por brindarme su amistad y apoyo. Así como también por ayudarme en muchas cosas fundamentales para la realización de este trabajo.

A **Ma. Teresa Olivera** por su apoyo en cuanto al trabajo y espacio en su laboratorio para la propagación de algunas de nuestras plantas. Así como para la generación de plantas transgénicas.

A **Leticia García** porque con la paciencia, el compromiso, la ética y el profesionalismo con el que realiza su trabajo hizo que todos mis trámites no hayan sido un desorden total. Además, le agradezco su enorme entusiasmo y su gran amistad. De

igual manera le agradezco a **Adelina González** todo su empeño y su gran labor en los trámites financieros.

A **Carlos Mújica** por ser un gran amigo y por todo su apoyo y asesoría técnica a lo largo de todo el tiempo que llevo en el Conjunto E. De igual manera se lo agradezco a **Carmen Parra**.

A **Patricia León** por haberme permitido trabajar en su laboratorio y aportar importantes ideas a este trabajo.

A **Arturo Guevara** que con su entusiasmo y profesionalismo no sólo mostró ser un gran académico, sino también un gran ser humano al que admiro, respeto y quiero mucho.

A **Cathy Arenas**, por su amistad y apoyo, así como por haberme dado posada durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología. De igual manera le agradezco a **Odette Avendaño** por el cariño con el que me recibió y dio posada durante dicha estancia.

A **Baldemar Sepúlveda, Maricela Ramos, Sonia Cuéllar, Analilia Arroyo, Jaime Aportela, Elizabeth Córdoba, Carolina San Román, Patricia Rueda** y, en general, a toda la gente que en Cuernavaca me trató con una gran calidez humana. Gracias a eso, ahora cuento con nuevos y verdaderos amigos.

A los miembros del **Jurado de Examen** les agradezco sus correcciones y críticas, aportando aspectos importantes para mi formación como científico y logrando que la calidad de este trabajo sea mejor.

A todos ustedes y mucha gente más: **!!!GRACIAS!!!**



# ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
<b>ÍNDICE DE LAS FIGURAS</b> .....	IV
<b>ÍNDICE DE LAS TABLAS</b> .....	VII
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
I.1. Autoincompatibilidad en angiospermas.....	3
I.2. Autoincompatibilidad esporofítica.....	7
I.3. Autoincompatibilidad gametofítica.....	12
I.3.1. Genes modificadores dentro del sistema de AI gametofítica en <i>N. alata</i> .....	13
I.4. Modelo para el efecto citotóxico en el sistema de AI gametofítica..	15
I.5. Modelos para el receptor y para el inhibidor en el sistema de AI gametofítica.....	16
I.5.1. Modelo para el inhibidor y sus variantes.....	17
I.6. Modelo para la degradación de las S-RNasas.....	19
I.7. Modelo para la evasión de la citotoxicidad de las S-RNasas.....	22
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	27
II.1 En busca de los genes modificadores en <i>N. alata</i> .....	27
II.1.1. El cDNA AFLP25-F codifica para una tiorredoxina tipo <i>h</i> .....	29
II.2. Tiorredoxinas.....	31
II.3. Tiorredoxina reductasa.....	33
II.4. Tiorredoxinas vegetales.....	35
II.5. Tiorredoxinas tipo <i>h</i> (citoplásmicas).....	36
II.5.1. Algunas funciones de las Trx <i>h</i> en plantas.....	38
II.6. Las Trx <i>h</i> no sólo son tiorredoxinas citoplásmicas.....	39
II.7. Algunas funciones que desempeñan las tiorredoxinas en diferentes organismos.....	40
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	41
<b>IV. OBJETIVOS</b> .....	42
IV.1. Objetivo general.....	42
IV.2. Objetivos particulares.....	42
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	43
V.1. Material biológico.....	43
V.2. Análisis filogenético.....	43
V.3. Construcción utilizada para la sobreexpresión y la purificación de la NaTrxh recombinante.....	44
V.4. Construcciones para la fusión de NaTrxh con la proteína verde fluorescente (GFP).....	44



V.5. Construcciones para la fusión de la NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ y de la NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ con la GFP.....	46
V.6. Ensayos para la expresión transitoria en <i>N. benthamiana</i> y en <i>A. thaliana</i> Col-0.....	47
V.7. Cuantificación de la proteína total.....	48
V.8. Ensayo para la actividad de las tiorredoxinas.....	49
V.9. Sistema de tiorredoxina NADPH/NTR/Trx, aplicado a la NaTrxh <i>in vitro</i> .....	49
V.10. Producción y semipurificación de los anticuerpos policlonales en contra de la NaTrxh.....	50
V.11. Fabricación de una columna con la NaTrxh recombinante unida covalentemente.....	51
V.12. Fabricación de una columna bloqueada con BSA o con glicina..	52
V.13. Purificación de los anticuerpos policlonales contra la NaTrxh recombinante.....	52
V.14. Extractos de proteína total de <i>N. alata</i> .....	53
V.15. Extracción secuencial de las proteínas de estilos de <i>Nicotiana</i> ...	53
V.16. Inmunodetección de las diferentes proteínas.....	54
V.17. Ensayos de colocalización de la NaTrxh y de la S <sub>C10</sub> -RNasa en los estilos de <i>N. alata</i> S <sub>C10</sub> S <sub>C10</sub> .....	56
V.18. Reducción <i>in vitro</i> de las proteínas de los estilos de <i>N. alata</i> .....	57
V.19. Identificación de las proteínas blanco de la NaTrxh en los estilos de <i>N. alata</i> con el sistema de electroforesis en dos dimensiones (no reductora/reductora).....	57
V.20. Identificación de algunas proteínas blanco de la NaTrxh en los estilos de <i>N. alata</i> por cromatografía de afinidad.....	59
V.21. Interacción proteína-proteína por cromatografía de afinidad.....	61
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	63
VI.1. El patrón de expresión de la NaTrxh en los distintos órganos de <i>N. alata</i> .....	63
VI.2. La NaTrxh se expresa preferentemente en las especies autoincompatibles de <i>Nicotiana</i> .....	66
VI.3. La NaTrxh es una tiorredoxina tipo <i>h</i> .....	68
VI.4. La NaTrxh recombinante actúa como Trx típica y es reducida con NAPDH y con la NTR.....	69
VI.5. Identificación de algunas proteínas blanco con una electroforesis en dos dimensiones SDS-PAGE (no reductora/reductora).....	72
VI.6. Identificación de la S-RNasa como proteína blanco de la NaTrxh con una cromatografía de afinidad.....	76
VI.7. La NaTrxh interacciona específicamente con la S-RNasa.....	78
VI.8. La NaTrxh se encuentra en la fase más soluble de la matriz extracelular de los estilos de <i>N. alata</i> .....	79
VI.9. La NaTrxh colocaliza con la S-RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión en estilos de <i>N. alata</i> .....	81
VI.10. La secuencia de la NaTrxh contiene la información necesaria para promover su secreción.....	83
VI.11. En el amino terminal de la NaTrxh se encuentra la señal que determina su secreción.....	86

<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	89
VII.1. La NaTrxh es una tiorredoxina tipo <i>h</i> que se secreta al espacio extracelular.....	89
VII.2. Es posible que la NaTrxh se secrete por una vía independiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi.....	90
VII.3. Posible papel bioquímico de la NaTrxh en los estilos de <i>N. alata</i> .....	94
VII.4. Posible función de la NaTrxh en el sistema de AI en <i>N. alata</i> .....	98
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	102
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	103
<b>APÉNDICE</b> .....	114
<b>ABREVIATURAS</b> .....	117
<b>ANEXO</b>	
<b>Artículo publicado:</b> <i>J. Biol. Chem.</i> (2006) <b>281</b> : 3418-3424.	

## ÍNDICE DE LAS FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura de una flor completa y perfecta, como lo es la de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Los tubos polínicos crecen a través de las células del tejido de transmisión de los estilos.....	4
<b>Figura 3.</b> La autoincompatibilidad (AI) promueve la fecundación cruzada.....	5
<b>Figura 4.</b> En el <i>locus S</i> se encuentran codificadas tanto la determinante de especificidad alélica masculina como la femenina....	6
<b>Figura 5.</b> Modelo para la percepción de la señal y su efecto en la respuesta de AI cuando los haplotipos S de SRK y SCR coinciden.....	10
<b>Figura 6.</b> Modelo modificado para el inhibidor en el sistema de AI gametofítica.....	19
<b>Figura 7.</b> Modelo para la degradación de las S-RNAsas.....	21
<b>Figura 8.</b> Modelo para la evasión de la citotoxicidad de la S-RNasa...	24
<b>Figura 9.</b> Generación de la población segregante 08681 de <i>Nicotiana</i> en los individuos que aceptan el polen S <sub>C10</sub> y en los individuos que lo rechazan.....	28
<b>Figura 10.</b> El cDNA AFLP25-F se expresa seis veces más a nivel del mRNA en los estilos de <i>N. alata</i> BT que en los de <i>N. plumbaginifolia</i> ..	29
<b>Figura 11.</b> Secuencia del cDNA AFLP25-F.....	30
<b>Figura 12.</b> Esquema para el mecanismo redox de la Trx sobre una proteína blanco.....	32
<b>Figura 13.</b> Mecanismo para la reacción de reducción del disulfuro de una proteína blanco que es dependiente del NADPH con el sistema de tiorredoxina.....	34
<b>Figura 14.</b> Fusión de la NaTrxh con la proteína verde fluorescente (GFP) que se utilizó para los ensayos de expresión transitoria.....	46
<b>Figura 15.</b> Esquema para las mutantes NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ y NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ utilizadas para corroborar la existencia del péptido señal.....	47
<b>Figura 16.</b> Identificación de proteínas blanco para la Trx.....	58

<b>Figura 17.</b> Esquema de la resina ThioBond que contiene al grupo 4-aminofenilarsinóxido (PAO) unido a agarosa por un espaciador de 10 átomos de carbono.....	59
<b>Figura 18.</b> Inmunodetección de la NaTrxh en los extractos de proteína total de los distintos órganos de <i>N. alata</i> BT, utilizando los anticuerpos policlonales contra la NaTrxh.....	63
<b>Figura 19.</b> Purificación del suero anti-NaTrxh.....	65
<b>Figura 20.</b> Inmunodetección de la NaTrxh utilizando los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad.....	66
<b>Figura 21.</b> Inmunodetección de la NaTrxh en los extractos de proteína total de los estilos de <i>N. alata</i> S <sub>105</sub> S <sub>105</sub> , de <i>N. alata</i> BT, de <i>N. plumbaginifolia</i> y de <i>N. tabacum</i> , usando el suero purificado anti-NaTrxh.....	67
<b>Figura 22.</b> Inmunodetección de la NaTrxh en los extractos de proteína total de los estilos de algunas especies AI y de algunas especies AC de <i>Nicotiana</i> .....	68
<b>Figura 23.</b> Análisis filogenético de las tioredoxinas vegetales.....	69
<b>Figura 24.</b> Actividad de reductasa de la NaTrxh y de la Trx de <i>E. coli</i> .....	70
<b>Figura 25.</b> Reducción de la NaTrxh recombinante con NADPH y con la NTR recombinante de <i>E. coli</i> .....	71
<b>Figura 26.</b> Identificación de la S <sub>105</sub> -RNasa como blanco de la NaTrxh.....	74
<b>Figura 27.</b> Identificación de la S <sub>C10</sub> -RNasa como blanco de la NaTrxh.....	75
<b>Figura 28.</b> Identificación de la S <sub>105</sub> -RNasa como proteína blanco utilizando la cromatografía de afinidad con PAO.....	77
<b>Figura 29.</b> La S <sub>105</sub> -RNasa interacciona específicamente con la NaTrxh.....	79
<b>Figura 30.</b> Inmunodetección de la S <sub>105</sub> -RNasa, de la NaTTS y de la NaTrxh en las tres fracciones obtenidas en base a la solubilidad de proteínas de estilos de <i>N. alata</i> S <sub>105</sub> S <sub>105</sub> .....	80
<b>Figura 31.</b> Colocalización de la NaTrxh y de la S <sub>C10</sub> -RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo de <i>N. alata</i> .....	82

<b>Figura 32.</b> Colocalización de la NaTrxh y de la S <sub>C10</sub> -RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión de estilos de <i>N. alata</i> .....	83
<b>Figura 33.</b> La proteína de fusión NaTrxh:GFP se secreta a la pared celular de las hojas de <i>N. benthamiana</i> y de <i>A. thaliana</i> .....	85
<b>Figura 34.</b> La información para dirigir la secreción de la NaTrxh se encuentra en el amino terminal de la proteína.....	87
<b>Figura 35.</b> Mecanismos hipotéticos para la secreción independiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi de la NaTrxh en las células del tejido de transmisión de estilos de <i>N. alata</i> .....	93
<b>Figura 36.</b> Posible función de la NaTrxh en el sistema de AI en <i>N. alata</i> .....	100

## ÍNDICE DE LAS TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Las determinantes masculinas y las femeninas de la especificidad alélica en las diferentes familias y en los sistemas de AI homomórficos.....	7
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los genes modificadores en el sistema de AI de acuerdo con su función.....	14
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las tiorredoxinas vegetales de acuerdo con su localización subcelular y con sus proteínas blanco principales.....	35
<b>Tabla 4.</b> Concentraciones utilizadas para cada uno de los reactivos que son necesarios para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del cDNA-NaTrxh para fusionar la secuencia completa y las mutantes <i>NaTrxhΔNα</i> y <i>NaTrxhΔNβ</i> a <i>GFP</i> en el vector pHBT.....	45
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de PCR para amplificar la <i>NaTrxh</i> completa y las mutantes <i>NaTrxhΔNα</i> y <i>NaTrxhΔNβ</i> con los sitios de restricción <i>Bam</i> -HI y <i>Nco</i> -I en el extremo 5' y 3', respectivamente, y así fusionarlas con la <i>GFP</i> en el vector pHBT.....	45

## RESUMEN

El sistema de autoincompatibilidad (AI) en las plantas es un mecanismo que favorece y mantiene la diversidad genética dentro de una especie. Este sistema se regula por un *locus* multialélico denominado *locus S*. En el sistema de AI gametofítica presente en las familias Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae, la determinante masculina es una proteína con caja F, la SLF, mientras que la determinante femenina es un glicoproteína de secreción que tiene actividad de ribonucleasa, la S-RNasa. Sin embargo, se requieren otros genes, no ligados al *locus S*, para que la respuesta de AI se lleve a cabo. Estos genes son conocidos como genes modificadores, de los cuales sólo se han identificado a *HT-B* y a *120K*.

Los individuos que aceptan y rechazan su propio polen de una población híbrida segregante sirvieron para realizar un análisis de expresión diferencial por la técnica de amplificación de fragmentos de polimórficos en longitud de cDNA. En el análisis de la secuencia de un cDNA completo se identificó un marco de lectura abierto que codifica para una tiorredoxina tipo *h* (Trx *h*), denominada NaTrxh. Los datos bioquímicos y filogenéticos realizados en este trabajo muestran que la NaTrxh pertenece al subgrupo II de las Trx *h*.

Para conocer la función que desempeña la NaTrxh en los estilos de *N. alata*, se identificaron las proteínas cuyos disulfuro se reducen con esta tiorredoxina. Se encontró que la S-RNasa es reducida *in vitro* por la NaTrxh en forma alelo *S*-inespecífica. También se encontró que estas proteínas interactúan fuertemente *in vitro*, independientemente de la presencia de los grupos tiol.

Se propone que la reducción de la S-RNasa es posible que ocurra *in vivo*, ya que se demostró que la NaTrxh se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión de los estilos de *N. alata*, donde colocaliza con la S-RNasa. Los experimentos de expresión transitoria de la proteína de fusión NaTrxh:GFP en las hojas de *N. benthamiana* y de *Arabidopsis thaliana* demuestran que la secuencia de la NaTrxh contiene la información necesaria para su secreción.

Las Trx *h* del subgrupo II se caracterizan por tener una extensión no conservada en el amino terminal, cuya función aún no se conoce. La mutante NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ , que carece de los primeros 16 aminoácidos, aún mantiene su carácter secretor ya que puede ser expresada transitoriamente fusionada a GFP en hojas de *A. thaliana*. Sin embargo, la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ , cuyo amino terminal está truncado en Pro-27, se acumula en el citoplasma. Estos datos sugieren que la NaTrxh contiene un péptido señal no ortodoxo en su extremo amino terminal y que sus principales residuos para funcionar como tal se encuentran al menos entre Ala-17 y Pro-27.

El hecho de que la NaTrxh sea secretada hacia la matriz extracelular y reduzca a las S-RNasas sugiere que podría estar involucrada en el rechazo del polen *S*-específico en *Nicotiana*. De esta manera se logra que la determinante femenina se encuentre en una forma estable y lista para llevar a cabo su efecto citotóxico sobre los tubos polínicos incompatibles.

## ABSTRACT

Self-incompatibility (SI) is a mechanism that promotes genetic diversity within species. SI in the Solanaceae, Rosaceae and Scrophulariaceae is controlled by the highly polymorphic *S locus* that includes two tightly linked genes, which encode pollen and pistil determinants. The *S-RNase* gene encodes the pistil determinant (an extracellular glycoprotein with ribonuclease activity), whereas the pollen determinant gene encodes an F-box protein, called *SLF*. However, it is well known that other genes, unlinked to the *S locus*, are required for the SI response. These genes are called modifier genes and only two of them have been identified (*HT-B* and *120K*). However, genetic studies predict that there are more modifier genes involved in SI response.

To look for new modifier genes, it was generated a hybrid segregating population with individuals that accept and reject pollen with the same pistil *S*-haplotype. It was predicted that this pollination behavior was due to a differential modifier gene expression between acceptors and rejecters. Therefore, it was performed a differential expression analysis by cDNA-amplification fragment length polymorphism technique. Through this approach, a full cDNA with an open reading frame encoding a thioredoxin type *h* (Trx *h*) was identified and named *NaTrxh*. Biochemical and phylogenetical approaches showed that NaTrxh protein is clustered into the subgroup II of the Trx *h*.

To identify potential stilar target proteins of NaTrxh, we performed reduction assays *in vitro* by two different approaches: two-dimensional electrophoreses (non-reducing/reducing conditions) and affinity chromatography. We found that S-RNase is one of the several potential substrates of NaTrxh in the stilar extracellular matrix, and that there is a specific interaction between NaTrxh and S-RNase in a disulfide independent way.

It is possible that S-RNase reduction occurs *in vivo*, because we proved that NaTrxh is a secretion protein that colocalizes with S-RNase in the extracellular matrix of the stilar transmitting tract tissue. In addition, NaTrxh:green fluorescent (GFP) fusion protein transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* leaves showed that this fusion protein is secreted, suggesting that NaTrxh has the required information to promote its secretion.

Subgroup II Trx *h* are characterized by possessing a non-conserved N-terminal extension; however, its function is not clear. We generated two different mutants: (1) NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ , with the first 16 N-terminal residues deleted and (2) NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ , whose deletion includes until the Pro-27 residue. NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  is secreted to the extracellular space when it fused to GFP in *A. thaliana* leaves, while NaTrxh $\Delta$ N $\beta$  is accumulated in the cytoplasm in the same transient expression assays. These data suggest that NaTrxh contains a non-classical signal peptide in its N-terminus. Thus, it is possible that the responsible residues to promote NaTrxh secretion are at least between Ala-17 and Pro-27.

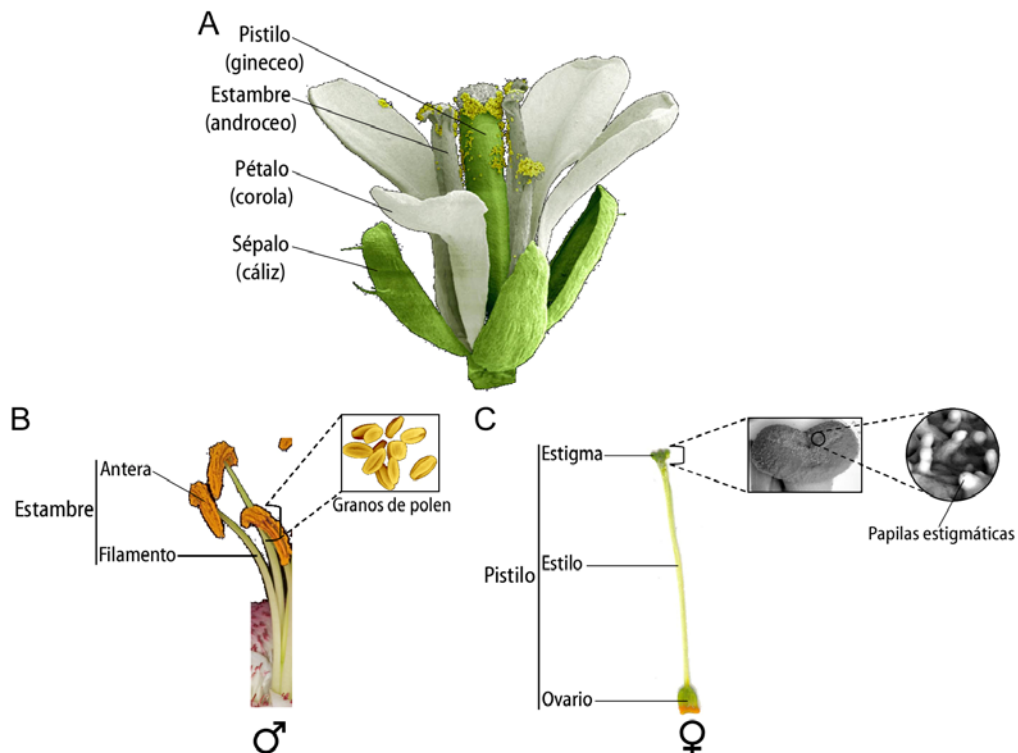
If NaTrxh is secreted to the extracellular matrix of the transmitting tract tissue and it reduces the S-RNase, it is possible that this thioredoxin could be involved in S-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. The S-RNase reduction may provoke a more stable conformation of the enzyme that permits its correct interaction with SLF to carry out its cytotoxic effect on incompatible pollen tubes.



# I. INTRODUCCIÓN

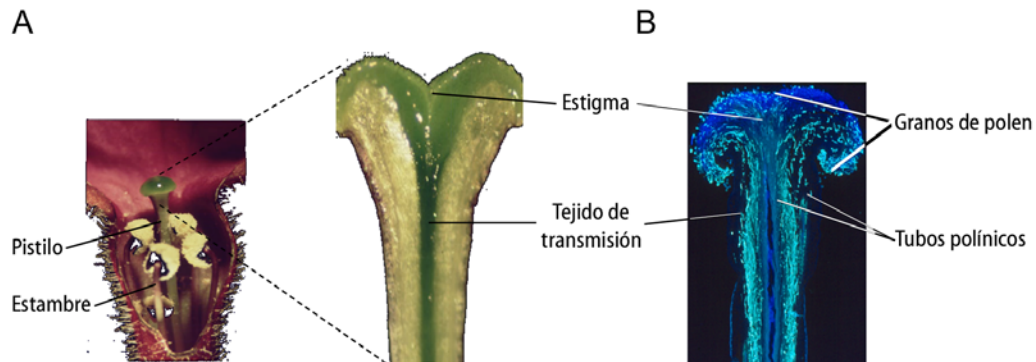
## I.1. Autoincompatibilidad en angiospermas

La flor es la estructura reproductora de las angiospermas. Una flor completa y perfecta cuenta con cuatro verticilos (Figura 1A), de los cuales el cáliz (formado por los sépalos) y la corola (formada por los pétalos) son los verticilos vegetativos. El androceo (formado por los estambres) y el gineceo (formado por los pistilos) son los verticilos reproductivos. Los estambres están formados por el filamento y la antera, que es donde se lleva a cabo la producción de los granos de polen (Figura 1B) y son los que portan a los gametos masculinos. Por otro lado, los gametos femeninos se producen en el ovario, que junto con el estilo y el estigma constituyen al pistilo (Figura 1C) (Bhojwani y Bhatnagar, 1999).



**Figura 1.** Estructura de una flor completa y perfecta, como lo es la de *Arabidopsis thaliana* (A). **B.** Estructura de los estambres (órganos sexuales masculinos). Formados por el filamento y la antera, que es donde se producen los granos de polen. **C.** Estructura del pistilo (órgano sexual femenino). Formado por el ovario, el estilo y el estigma. Se muestra un acercamiento del estigma, donde pueden apreciarse las papilas estigmáticas, lugar a donde llegan y en donde germinan los granos de polen.

El proceso de polinización abarca desde el momento en que se libera el grano de polen de las anteras hasta la liberación de las células espermáticas para que se lleve a cabo la fecundación del óvulo (Bhojwani y Bhatnagar, 1999). Este proceso involucra una gran cantidad de eventos. Una vez que el grano de polen llega a la superficie estigmática (Figuras 1C y 2), éste germina. El tubo polínico corresponde a la célula vegetativa y contiene a la célula generatriz o a las células espermáticas. Este tubo crece entre las células a lo largo del tejido de transmisión del estilo (Figura 2) hasta que alcanza la zona del ovario, donde encontrará al micrópilo. Finalmente, los núcleos espermáticos son liberados para que se lleve a cabo el evento de la doble fecundación, típica de las angiospermas (Bhojwani y Bhatnagar, 1999).

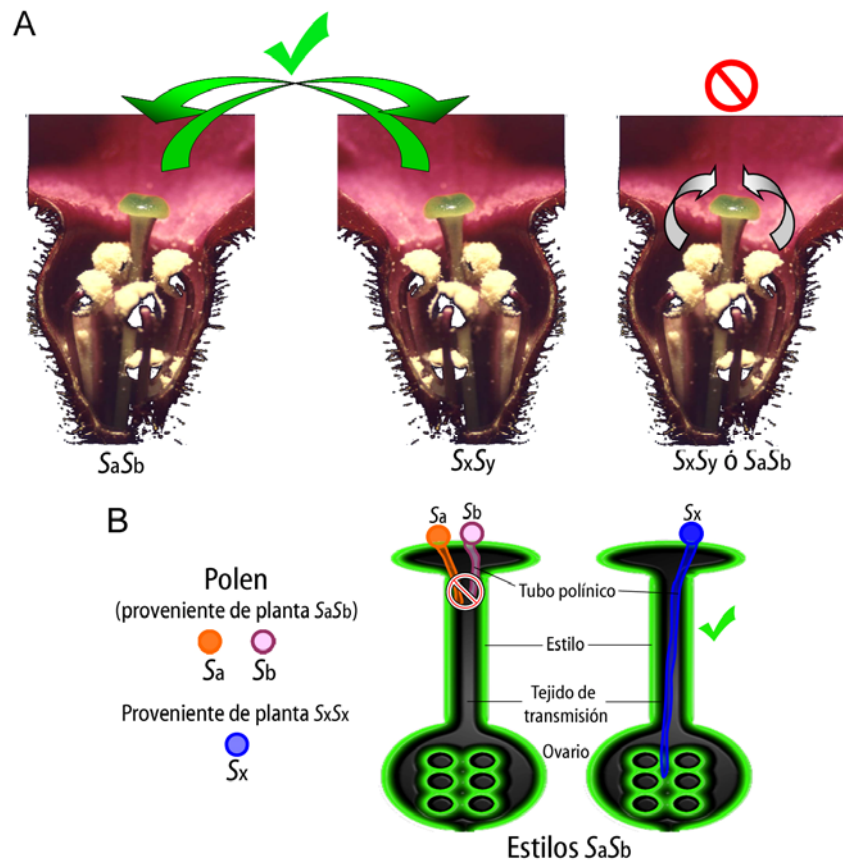


**Figura 2.** Los tubos polínicos crecen a través de las células del tejido de transmisión de los estilos. **A.** Corte longitudinal de la parte superior del estilo, donde se puede observar tanto a la superficie estigmática como al tejido de transmisión estilar. **B.** Corte longitudinal de un estilo polinizado, donde se pueden observar a los granos de polen en la superficie estigmática y a los tubos polínicos creciendo a través del tejido de transmisión del estilo. La pared celular del tubo polínico es rico en calosa y ésta fue teñida con azul de anilina (Jiménez-Durán *et al.*, sin publicar).

El proceso de polinización involucra una red de interacciones polen-pistilo que, en primera instancia, a nivel estigmático permiten el reconocimiento del grano de polen y, en muchos casos, su hidratación para que pueda germinar. Las interacciones polen-pistilo continúan durante todo el recorrido del tubo polínico por la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar (Figura 2), la cual se encuentra formada por diversas moléculas secretadas por las células de este tejido. Tales exudados de igual manera funcionan como fuente de nutrientes (de Graaf *et al.*, 2005) y algunos como agentes quimiotácticos que permiten un

crecimiento direccional del tubo polínico (Cheung y Wu, 2001; Higashiyama *et al.*, 2001). De igual manera, existen proteínas involucradas en el reconocimiento celular que permiten o evitan que el grano de polen germine o que el tubo polínico siga creciendo.

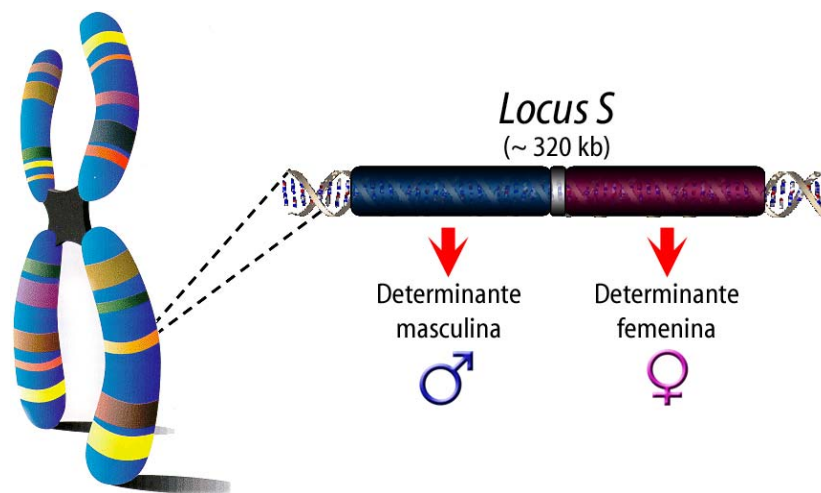
Uno de los eventos de interacción polen-pistilo es el que han desarrollado muchas plantas y que promueve la fecundación cruzada (Figura 3A). Esto es posible gracias a que son capaces de reconocer y discriminar entre un polen propio y uno proveniente de otro individuo. A este fenómeno se le conoce como autoincompatibilidad sexual (AI) (Kachroo *et al.*, 2002; Kao y Tsukamoto, 2004; Takayama e Isogai, 2005; McClure y Franklin-Tong, 2006).



**Figura 3.** La autoincompatibilidad (AI) promueve la fecundación cruzada. **A.** Una planta con genotipo  $S_aS_b$  aceptará granos de polen provenientes de una planta con un genotipo  $S$  diferente (e. g.  $S_xS_y$ ) y rechazará su propio polen ( $S_a$  ó  $S_b$ ) y viceversa. **B.** En algunos casos, el crecimiento del tubo polínico es inhibido en el tejido de transmisión del estilo en una crucea AI, mientras que en una crucea compatible, éste crece hasta alcanzar los óvulos que se localizan en el ovario.

La AI es uno de los sistemas más importantes utilizados por muchas angiospermas que evitan la autopolinización (Figura 3A), promoviendo así la generación y el mantenimiento de la diversidad genética dentro de una especie (de Nettancourt, 2001). La respuesta de AI es un proceso que permite el reconocimiento y discriminación del polen propio del que no lo es, seguido de una inhibición selectiva del desarrollo del polen (o tubo polínico) propio (Figura 3B). La AI se define como la incapacidad de una planta fértil hermafrodita de producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). Este sistema de reconocimiento del polen se encuentra genéticamente controlado por el *locus* multialélico S (Figura 4), el cual es el que determina la especificidad en la polinización tanto en la parte masculina (polen) como en la femenina (pistilo) (Bateman, 1955; de Nettancourt, 1977; 2001; Franklin *et al.*, 1995).

La determinante de especificidad femenina, producto del *locus* S en el pistilo (Figura 4), interacciona e identifica a su contraparte, la determinante de especificidad masculina, como propia o no. Esta última determinante es el producto S del polen y también está codificada en el *locus* S (Figura 4).



**Figura 4.** En el *locus* S se encuentran codificadas tanto la determinante de especificidad alélica masculina como la femenina. El *locus* S de *Petunia inflata* tiene una longitud aproximada de 320 kb.

Las primeras determinantes de especificidad alélica fueron identificadas en la familia Brassicaceae (Stein *et al.*, 1991; Schopfer *et al.*, 1999; Schopfer y Nasrallah, 2000; Kachroo *et al.*, 2002), posteriormente se identificaron las

determinantes de especificidad en Solanaceae, Rosaceae y Scrophulariaceae, las cuales comparten la misma determinante femenina (McClure *et al.*, 1989; Sijacic *et al.*, 2004; McClure, 2004; Takayama e Isogai, 2005; McClure y Franklin-Tong, 2006). Finalmente, también fue identificada la determinante femenina en Papaveraceae (Foote *et al.*, 1994; Takayama e Isogai, 2005; McClure y Franklin-Tong, 2006) (Tabla 1). A pesar de que el esquema en el que dos genes son los responsables del reconocimiento multialélico se conserva, las determinantes identificadas no comparten similitud entre sí, sugiriendo que la AI ha surgido varias veces a lo largo de la evolución en distintos linajes de las angiospermas (de Nettancourt, 2001; Takayama e Isogai, 2005).

Existen dos sistemas homomórficos de AI descritos: el esporofítico y el gametofítico. En el primer caso, el polen presenta el fenotipo de compatibilidad de la planta diploide de donde fue originado; mientras que en el segundo, el polen expresa el fenotipo de compatibilidad de su genotipo haploide S (Cruz-García y McClure, 2001).

**Tabla 1.** Las determinantes masculinas y las femeninas de la especificidad alélica en las diferentes familias y en los sistemas de AI homomórficos (modificado de Takayama e Isogai, 2005).

<b>Familia</b>	<b>Tipo de AI</b>	<b>Determinante ♂</b>	<b>Determinante ♀</b>
Brassicaceae	Esporofítico	SCR	SRK
Solanaceae, Rosaceae, Scrophulariaceae	Gametofítico	SLF	S-RNasa
Papaveraceae	Gametofítico	¿?	Proteína-S

## **I.2. Autoincompatibilidad esporofítica**

Tanto la determinante de especificidad femenina como masculina se identificaron primero en el sistema de AI esporofítico en Brassicaceae (Tabla 1), siendo éste el único mecanismo cuya interacción entre las determinantes alélicas ha sido establecida y en el que se ha podido proponer el mecanismo de respuesta al existir una interacción entre productos S con el mismo haplotipo (Takayama e Isogai, 2005).

En plantas autoincompatibles de la familia Brassicaceae, los tubos polínicos no se desarrollan sobre el estigma que expresa el mismo haplotipo *S* que los expresados en la planta que produjo el polen. El rechazo del polen se manifiesta en la falta de hidratación del grano de polen, o en su caso, en la rápida inhibición del crecimiento del tubo polínico en la superficie estigmática (Kachroo *et al.*, 2002; Takayama e Isogai, 2005).

El gen de la determinante de especificidad femenina se expresa exclusivamente en la epidermis de las células papilares del estigma. Este gen codifica para el receptor con actividad de cinasa del *locus S* (SRK) (Tabla 1). La secuencia de nucleótidos de *SRK* predice una proteína con un dominio extracelular, un dominio único transmembranal y un dominio citoplásmico (Stein *et al.*, 1991) que tiene actividad de Ser/Thr cinasa (Goring y Rothstein, 1992; Stein y Nasrallah, 1993).

Se ha reportado que al menos un alelo de *SRK* también produce la forma truncada de la parte soluble del dominio extracelular de SRK, denominado eSRK (Giranton *et al.*, 1995). Estas formas truncadas parecen ser el producto de transcritos cortos que terminan dentro del primer intrón del gen (Stein *et al.*, 1991).

La proteína SRK se expresa específicamente en la epidermis del estigma, su transcrito se acumula a lo largo de la maduración de los estigmas (Stein *et al.*, 1991, 1996). Los alelos de *SRK* pueden presentar hasta un 35% de divergencia a nivel de aminoácidos (Stein *et al.*, 1991; Nishio y Kusaba, 2000; Kusaba *et al.*, 2001).

En el *locus S* se encuentra codificada otra proteína que no determina la especificidad en la respuesta de AI pero que parece tener una función en la respuesta del rechazo del polen (Takayama e Isogai, 2005). Esta proteína es denominada SLG (glicoproteína del *locus S*) y su aislamiento facilitó la clonación de *SRK* (Nasrallah *et al.*, 1985). *SLG* es un gen polimórfico dentro del *locus S* que comparte una alta identidad a nivel de secuencia con el dominio extracelular de SRK y se expresa en niveles mucho mayores que *SRK*. SLG es una proteína abundante en la composición de la pared celular de las células papilares (Kandasamy *et al.*, 1989).

Existe evidencia experimental que indica claramente que SLG no es absolutamente requerida para la respuesta de AI (Silva *et al.*, 2001). Además, si SLG fuera necesaria para la AI, sería de esperarse que todas las especies AI de *Brassica* dependieran de este gen. Sin embargo, existen al menos dos haplotipos S en *Brassica* (Suzuki *et al.*, 2000) y dos en *Arabidopsis lyrata* (Kusaba *et al.*, 2001) que no contienen el gen SLG en su genoma. En estos casos, las isoformas de SRK pueden ser estables por sí mismas o pueden ser estabilizadas por sus moléculas correspondientes de eSRK (Takayama e Isogai, 2005).

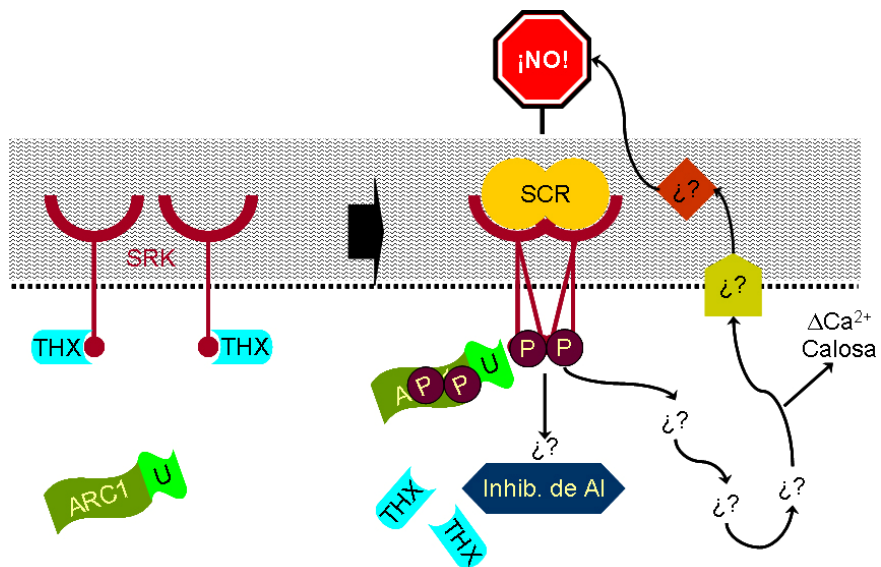
La especificidad masculina está dada por la proteína rica en cisteína del locus S, SCR (Tabla 1) (Schopfer *et al.*, 1999; Schopfer y Nasrallah, 2000). El gen SCR se encuentra fuertemente ligado al gen SRK en el locus S, su polimorfismo está asociado al haplotipo S, se expresa específicamente en las anteras y codifica para una proteína básica de 50 a 59 aminoácidos (Takayama e Isogai, 2005). Por inmunocitoquímica se ha encontrado que esta proteína se localiza en la cubierta del polen (Shiba *et al.*, 2001).

Al igual que con SRK, se ha demostrado que SCR es suficiente y necesario para el rechazo del polen S-específico en *Brassica* (Schopfer *et al.*, 1999; Shiba *et al.*, 2001). En ensayos de polinización, además, al pretratar a las células de las papilas estigmáticas con SCR recombinante del mismo haplotipo S, se inhibe la hidratación del polen compatible (Takayama *et al.*, 2000, 2001; Kachroo *et al.*, 2001), es decir, bajo este estímulo la señal para el rechazo del polen se activa en las células estigmáticas.

La localización subcelular de SRK y de SCR, sus secuencias y otras evidencias experimentales demuestran que ambas proteínas actúan como receptor-ligando, respectivamente, en la respuesta de AI. Una predicción en este modelo es que SCR es el ligando de SRK y que la especificidad de la respuesta de AI es producto de la unión de estos dos y/o la activación de SRK. La unión haplotipo S-específica de SCR al dominio extracelular de SRK ha sido demostrada (Kachroo *et al.*, 2001).

Takayama *et al.* (2000) encontraron que, al adicionar una forma sintética del ligando SCR a fracciones de membrana de células estigmáticas, SRK se

autofosforila. Por otro lado, se mostró que SRK se autofosforilia 60 min después de una autopolinización (Cabrillac *et al.*, 2001), probablemente por la fosforilación cruzada de los dominios de cinasa entre dos moléculas de SRK (Giranton *et al.*, 2000). La activación de SRK involucra también una oligomerización del receptor. La fosforilación de la proteína SRK recombinante puede inducirse en forma dosis-dependiente y de manera saturable utilizando anticuerpos dirigidos hacia el amino terminal de SRK (Cabrillac *et al.*, 2001).



**Figura 5.** Modelo para la percepción de la señal y su efecto en la respuesta de AI cuando los haplotipos S de SRK y SCR coinciden. SRK (color rojo oscuro) se muestra atravesando la membrana plasmática (línea punteada) de la epidermis de la célula papilar del estigma, con el dominio de cinasa (círculo rojo oscuro) hacia el citoplasma y su ectodominio extendiéndose hacia la pared celular (área gris). ARC1 se muestra en verde ocre sólo con su caja U en verde más claro. La fosforilación se indica con "P" encerrada en un círculo. Las tiorredoxinas (THX) (turquesa), se encuentran asociadas al dominio de cinasa de SRK sólo en ausencia del ligando. Se representa a un inhibidor de la respuesta de AI (hexágono azul) como posible blanco de ubiquitinación. Las flechas delgadas y las interrogaciones indican componentes no conocidos de la transducción de señales, la cual parece terminar con la modificación de la membrana o pared celular de la papila en el sitio de contacto con el polen propio (modificado de Kachroo *et al.*, 2002).

Se encontró que la SRK recombinante está siempre fosforilada *in vitro* (Giranton *et al.*, 2000). Esta fosforilación se inhibe cuando es tratada con proteínas solubles de extracto de estigmas o por una tiorredoxina tipo *h* (Cabrillac *et al.*, 2001), cuya interacción con SRK ha sido reportada (Bower *et al.*, 1996; Mazzurco *et al.*, 2001). La inhibición de la SRK por esta tiorredoxina se detiene cuando se



adicionan proteínas de la cubierta de polen con el mismo haplotipo S que el de SRK (Figura 5). Esto sugiere que *in vivo* la tioredoxina se puede unir al dominio de cinasa de SRK evitando que la respuesta de AI se encuentre constitutivamente activa (Cabrellac *et al.*, 2001), permitiendo así que los eventos de polinización compatibles se puedan llevar a cabo.

La cascada de señalización que ocurre cuando el haplotipo S de SCR coincide con el de SRK y ambas interaccionan se muestra en la Figura 5. Aún no se sabe bien cómo la unión SRK-SCR y la activación de SRK son transducidos hacia el rechazo del polen alelo S-específico. Hasta ahora, sólo se ha identificado a ARC1 (proteína con repeticiones tipo *arm*) como un componente de la transducción de la señal (Gu *et al.*, 1998).

ARC1 interacciona con la región citoplásmica de SRK (Gu *et al.*, 1998) a través las repeticiones que contiene hacia su carboxilo terminal. Para esta interacción se requiere de un dominio activo de cinasa en SRK, lo cual provoca la fosforilación de ARC1 *in vitro* (Gu *et al.*, 1998) (Figura 5). La idea de que ARC1 participa en la polinización se refuerza con su expresión específica en el estigma y con los experimentos en plantas que expresan en antisentido a ARC1, las cuales muestran una falla parcial en la respuesta de AI (Stone *et al.*, 1999). El hecho de que sólo se observe una compatibilidad parcial en estas plantas transgénicas, podría explicarse por mRNAs residuales de ARC1 o podría indicar que ARC1 no es el único sustrato de SRK (Kachroo *et al.*, 2002).

Azevedo *et al.* (2001) encontraron que ARC1 contiene una caja U, la cual es un motivo inicialmente identificado en el factor E4 de poliubiquitinación UFD2 en levadura (Koegl *et al.*, 1999). La ubiquitinación puede ser un proceso importante en la transducción de señales, incluyendo la modulación de señales mediadas por receptor a través de su internalización y degradación. Debido a que ARC1 es un efector positivo de la AI, es posible que la fosforilación de ARC1 por SRK activo provoque su interacción con los componentes de la maquinaria de ubiquitinación para que se lleve a cabo la degradación de algún inhibidor de la respuesta de AI (Figura 5) (Kachroo *et al.*, 2002). Sin embargo, también es posible que sea otra la función que lleve a cabo, ya que la ubiquitinación es un proceso

que también ha sido relacionado con eventos distintos a la degradación de proteínas, tales como dirigir proteínas a compartimentos celulares y su reclutamiento a complejos moleculares (Wilkinson, 1999).

El resto de los componentes de la cascada de señales aún no se han identificado. Cuando ocurre una polinización incompatible, la señal provoca la inhibición de la germinación del polen o la inhibición muy temprana del crecimiento del tubo polínico sobre la superficie estigmática.

### **I.3. Autoincompatibilidad gametofítica**

En especies con AI gametofítica pertenecientes a las familias Solanaceae, Scrophulariaceae y Rosaceae, el *locus S* en el pistilo expresa una glicoproteína extracelular con actividad de ribonucleasa llamada S-RNasa (Tabla 1) (McClure *et al.*, 1989). Estas plantas rechazan el polen cuando su haplotipo S es igual a uno de los dos alelos S presentes en el pistilo diploide.

Las S-RNasas son secretadas a la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar (Anderson *et al.*, 1989). Cuando los tubos polínicos, compatibles o incompatibles, crecen a través de este tejido incorporan en su citoplasma a las S-RNasas por endocitosis (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Cuando ocurre una polinización incompatible, las S-RNasas se comportan como citotoxinas degradando el RNA del tubo polínico en su recorrido por el tejido de transmisión estilar (McClure *et al.*, 1990). A diferencia de lo que ocurre en el sistema de AI esporofítico, todos los granos de polen germinan eficientemente al llegar al estigma, pero los tubos polínicos de cruas incompatibles mueren en el estilo antes de alcanzar el ovario. Existen evidencias experimentales en *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* que demuestran que las S-RNasas son las que determinan la especificidad alélica en el estilo (Lee *et al.*, 1994; Murfett *et al.*, 1994; Matton *et al.*, 1997).

Durante muchos años se intentó clonar a la determinante alélica masculina *SLF* (Tabla 1). Sin embargo, sólo hasta el 2004, Sijacic *et al.* lograron su

identificación y caracterización en *P. inflata*. El gen *SLF* codifica para un miembro de la familia de proteínas con caja F. Este gen muestra especificidad alélica y únicamente se expresa en el polen (Sijacic *et al.*, 2004). Su participación como determinante alélica masculina fue demostrada por medio de la transformación de plantas homocigas  $S_1S_1$  y de plantas heterocigas  $S_1S_2$  y  $S_2S_3$  con *SLF*<sub>2</sub>, provocando así que la función del alelo S del polen se perdiera (Sijacic *et al.*, 2004).

Se han clonado genes ortólogos de *SLF* en *Antirrhinum hispanicum* (Lai *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2004a), y se ha demostrado su participación en el rechazo del polen alelo S-específico (Qiao *et al.*, 2004b). Se ha observado que *SLF* interacciona de manera inespecífica con variables alélicas de la S-RNasa, así como con otras proteínas, tales como ASK y proteínas similares a culina. La hipótesis es que existe un complejo Skp1-culina-*SLF* ( $SCF^{SLF-S}$ ) involucrado en la degradación de la S-RNasa “propia” (o incompatible) por la vía del proteosoma 26A (Qiao *et al.*, 2004b).

### **I.3.1. Genes modificadores dentro del sistema de AI gametofítica en *N. alata***

Se sabe que en el sistema de AI gametofítico, la S-RNasa y *SLF* determinan la especificidad alélica del rechazo del polen (McClure *et al.*, 1989; Sijacic *et al.*, 2004). Sin embargo, las evidencias genéticas indican que otros factores estilares no ligados al *locus* S, conocidos como genes modificadores, son necesarios para modular la actividad biológica de la S-RNasa en el rechazo del polen (Anderson y de Winton, 1931; Mather, 1943; Martin, 1968; Ai *et al.*, 1991; Murfett *et al.*, 1996; Tsukamoto *et al.*, 1999; Cruz-García y McClure, 2001). McClure *et al.* (2000) clasificaron estos genes modificadores en tres grupos de acuerdo con la función que podrían tener en la respuesta de AI (Tabla 2).

**Tabla 2.** Clasificación de los genes modificadores en el sistema de AI de acuerdo con su función (McClure *et al.*, 2000).

<b>Genes modificadores</b>	<b>Función</b>
Grupo I	Afectan directamente la expresión de los genes S que determinan la especificidad.
Grupo II	Interaccionan genética o bioquímicamente con las determinantes de especificidad sin afectar su expresión.
Grupo III	Poseen funciones tanto en el sistema de autoincompatibilidad como en el proceso de fecundación.

Los genes modificadores dentro del grupo I son aquellos factores que regulan directamente la expresión de las determinantes alélicas. Tsukamoto *et al.* (1999; 2003) describieron una población silvestre de *Petunia axillaries* con individuos tanto autocompatibles (AC) como autoincompatibles (AI). La mutación en las plantas AC afectaba la expresión de la S<sub>13</sub>-RNasa, siendo el *locus MDF* el responsable.

El grupo II incluye a los genes modificadores involucrados en regular la actividad biológica de las determinantes de especificidad alélica. Estos genes tienen una única función en el rechazo del polen sin otra participación durante la polinización. El primer gen modificador de este grupo que se identificó en *N. alata* fue *HT-B* (McClure *et al.*, 1999), el cual también fue posteriormente identificado en *Lycopersicon* y *Solanum* (O'Brien *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2002a, 2002b).

HT-B es una proteína de 8.2 kDa rica en asparagina. Cuando se suprime su expresión por RNA en antisentido o por RNA de interferencia (RNAi), queda claro que HT-B es esencial para el rechazo del polen alelo S-específico porque se abate la AI tanto en *Nicotiana* como en *Solanum* (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002) sin alterar los niveles de la S-RNasa en los estilos ni el crecimiento del tubo polínico.

El segundo gen modificador identificado del grupo II codifica para una arabinogalactoproteína de 120 kDa, denominada 120K (Hancock *et al.*, 2005). La proteína 120K interacciona con la S-RNasa *in vitro* (Cruz-García *et al.*, 2005) y su

silenciamiento en plantas transgénicas modifica el fenotipo de AI a AC, sin afectar los niveles de S-RNasa ni el crecimiento del tubo polínico (Hancock *et al.*, 2005).

Otro gen asociado al sistema de AI gametofítica es el *factor-4936*. A pesar de que este gen no se ha clonado, se sabe que cuando está mutado provoca que la respuesta de AI falle en *N. alata* (McClure *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006).

Inicialmente se había propuesto que los factores del grupo II eran requeridos para la incorporación de la S-RNasa en el tubo polínico (McClure *et al.*, 2000; Cruz-García *et al.*, 2003, 2005). Sin embargo, se demostró que en las plantas con mutaciones en el *factor-4936* o con el silenciamiento del gen *HT-B ó 120K*, las S-RNasas siguen incorporándose a los tubos polínicos, sean compatibles o no (Goldraij *et al.*, 2006).

El tercer grupo incluye genes que funcionan tanto en el rechazo del polen como en algún otro evento de la polinización, es decir, tienen una función más general, formando parte de la red de interacción polen-pistilo. Existen factores que son candidatos para este grupo de genes modificadores, tales como la proteína específica del tejido de transmisión de *N. alata* (NaTTS), la proteína similar a extensina III de pistilo (PELP III) y una quimiocianina (Nap11). Estas proteínas interaccionan *in vitro* con las S-RNasas y se ha propuesto que podrían estar involucradas en el transporte de las S-RNasas a los tubos polínicos, además de participar en el crecimiento del tubo polínico (McClure *et al.*, 2000; Cruz-García *et al.*, 2003, 2005).

#### **I.4. Modelo para el efecto citotóxico en el sistema de AI gametofítica**

Los análisis de secuencia han mostrado que los residuos importantes para la actividad de ribonucleasa están conservados en todas las S-RNasas que son funcionales en el rechazo del polen (Haring *et al.*, 1990; Ioerger *et al.*, 1991). Se hicieron experimentos en *P. inflata* por mutagénesis sitio-dirigida, en donde una de las dos histidinas catalíticas fue mutada a asparagina. Las plantas transgénicas produjeron una S<sub>3</sub>-RNasa sin actividad de ribonucleasa y fueron incapaces de

rechazar al polen  $S_3$  (Huang *et al.*, 1994). Los resultados obtenidos por McClure *et al.* (1990) muestran que el RNA es degradado en estilos cuya polinización era incompatible; mientras que en estilos con tubos polínicos compatibles, el RNA permanece intacto. Por otro lado, se demostró que una mutante de *Lycopersicon peruvianum* era AC debido a que producía una S-RNasa inactiva porque uno de los residuos de histidina del sitio activo estaba reemplazado por arginina (Kowiyama *et al.*, 1994; Royo *et al.*, 1994).

Ahora se tiene claro que la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa es esencial para que el rechazo del polen se lleve a cabo. Esto sugiere un modelo citotóxico para el sistema de AI gametofítico regulado por las S-RNasas (Kao y Tsukamoto, 2004; McClure y Franklin-Tong, 2006). En este modelo se propone que cada haplotipo S codifica una diferente S-RNasa que es secretada a la matriz extracelular del tejido de transmisión en el estilo. La S-RNasa es incorporada al citoplasma del tubo polínico donde ocurre la degradación del RNA en tubos polínicos incompatibles. Se cree que esta actividad citotóxica interfiere con el crecimiento de los tubos polínicos incompatibles evitando la expresión del programa genético del polen (McClure y Franklin-Tong, 2006).

### **I.5. Modelos para el receptor y para el inhibidor en el sistema de AI gametofítica**

Existen dos modelos que pretenden explicar cómo se regula la capacidad citotóxica de las S-RNasas para la degradación específica del RNA del tubo polínico incompatible (Thompson y Kirch, 1992; Kao y McCubbin, 1996). El modelo para el receptor predice que el producto del alelo S del polen es un receptor unido a la membrana o pared celular del tubo polínico. Este receptor permitiría la incorporación específica de las S-RNasas cuyo haplotipo S sea igual al del polen. El otro modelo, conocido como modelo para el inhibidor, en forma simplificada, predice que el producto del alelo S del polen es un inhibidor citoplásmico de la S-RNasa, el cual inhibe específicamente la actividad de ribonucleasa de todas las S-

RNAsas con un haplotipo *S* diferente, pero no afecta la actividad de la S-RNasa con el haplotipo *S* igual.

Para validar estos dos modelos, se determinó si la incorporación de las S-RNAsas es o no alelo *S*-específica, encontrándose que éstas son incorporadas al tubo polínico sean o no compatibles (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Esta información apoya al modelo para el inhibidor y sugiere que si la incorporación de las S-RNAsas a los tubos polínicos requiere de un receptor (o complejo receptor), es posible que éste reconozca características comunes a todas las S-RNAsas (Kao y Tsukamoto, 2004) o a algún factor del grupo III que estuviera interaccionando con la S-RNasa y promoviendo dicho reconocimiento e incorporación (Cruz-García *et al.*, 2003).

### **I.5.1. Modelo para el inhibidor y sus variantes**

Cuando existen dos *loci S* en el polen de distintos haplotipos (heteroalélico), la función del polen en la respuesta de AI se pierde. Esto sucede cuando todo o una parte crítica del *locus S* está duplicado o cuando una planta AI diploide, que porta dos haplotipos *S* diferentes, se vuelve tetraploide (de Nettancourt, 2001). Este fenómeno es conocido como interacción competitiva y lo explica el modelo para el inhibidor (Kao y Tsukamoto, 2004; McClure, 2004; McClure y Franklin-Tong, 2006).

A partir de mutantes con el *locus S* duplicado por radiación con rayos  $\gamma$ , se encontró que de los granos de polen producidos por plantas mutantes AC por la parte masculina, sólo aquellos cuyo *locus S* es de un haplotipo diferente al del *locus S* extra pierden su función en la AI (Golz *et al.*, 1999, 2001). Por ejemplo, si una planta  $S_1S_2$  contiene un *locus S*<sub>1</sub> extra, los granos de polen que no serán rechazados por el pistilo en una autopolinización son los granos de polen  $S_2$  que portan al *locus S*<sub>1</sub> duplicado, es decir, un polen heteroalélico (*i. e.* polen  $S_1S_2$ ) (Luu *et al.*, 2001; Kao y Tsukamoto, 2004; Sijacic *et al.*, 2004).

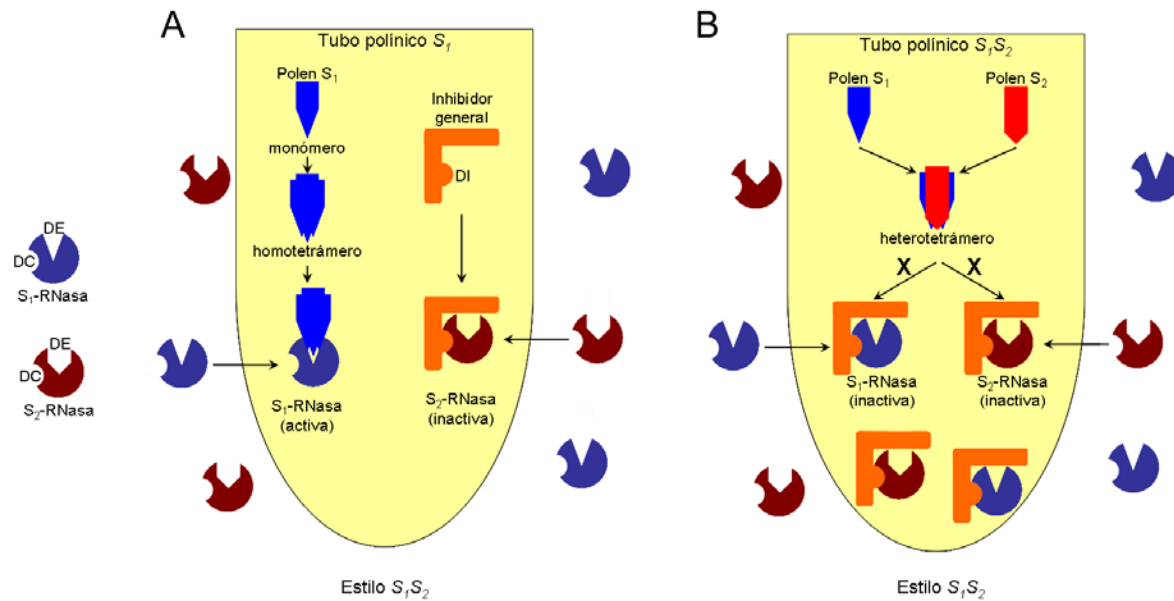
El modelo para el inhibidor predice que cuando dos alelos *S* del polen se expresan en el mismo grano de polen, sus productos inhiben la actividad de ribonucleasa de todas las S-RNAsas, resultando así en la pérdida de la AI.

Luu *et al.* (2001) propusieron un modelo para el inhibidor modificado (Figura 6A) para explicar el comportamiento de especificidad dual de la S-RNasa quimérica generada por Matton *et al.* (1999), llamada  $S_{11/13}$ -RNasa. Esta S-RNasa es una proteína quimérica entre las  $S_{11}$ - y  $S_{13}$ -RNasas de *Solanum chacoense*. Las plantas que expresan a la  $S_{11/13}$ -RNasa rechazan al polen tanto  $S_{11}$  como  $S_{13}$ . Estas plantas también rechazan el polen de plantas tetraploides  $S_{11}S_{11}S_{13}S_{13}$ , sugiriendo que el polen diploide  $S_{11}S_{13}$  es rechazado por la  $S_{11/13}$ -RNasa. Posteriormente, se demostró que el polen diploide  $S_{11}S_{13}$  fue compatible en pistilos produciendo  $S_{11}$ - y  $S_{13}$ -RNasas monoespecíficas, tal y como se espera cuando ocurre la interacción competitiva (Figura 6B) (Luu *et al.*, 2001). La especificidad dual de la  $S_{11/13}$ -RNasa es diferente a la de sus formas monoespecíficas correspondientes en su habilidad para reconocer y rechazar el polen diploide heteroalélico. Esto sugiere que ambos alelos  $S$  se están expresando en el polen diploide, descartando la posibilidad de que la AI no funciona porque la interacción competitiva provoque el silenciamiento de la expresión de ambos alelos  $S$  (Kao y Tsukamoto, 2004).

De esta manera, el modelo modificado para el inhibidor predice tres puntos fundamentales: (1) la forma activa del producto alelo  $S$  del polen es un homotetrámero; (2) los productos del alelo  $S$  del polen sólo reconocen algún dominio de especificidad alélica sobre la S-RNasa; y (3) debe existir un inhibidor general de las S-RNasas que sea el responsable de su inhibición (Figura 6) (Kao y Tsukamoto, 2004). De acuerdo a este modelo, el inhibidor general se une e inactiva a todas las S-RNasas que no se hayan unido a su contraparte del producto  $S$  del polen a través de sus dominios de especificidad alélica (Figura 6A). Cuando un grano de polen expresa dos alelos diferentes del gen  $S$  del polen, los productos, por interacción competitiva, formarían principalmente heterotetrámeros, los cuales no se unen eficientemente a las S-RNasas correspondientes. Esto permite que el inhibidor general se les una y las inactive (Figura 6B). Este modelo también predice que los heterotetrámeros no se pueden unir a cualquier otra S-RNasa. Por lo tanto, los tubos polínicos heteroalélicos serían compatibles con estilos de cualquier genotipo. En el caso de la especificidad dual de la  $S_{11/13}$ -RNasa,



ésta puede unirse a los heterotetrámeros formados por los dos productos S del polen, bloqueando la unión del inhibidor general (Kao y Tsukamoto, 2004).



**Figura 6.** Modelo modificado para el inhibidor en el sistema de AI gametofítica. **A.** Cuando un tubo polínico  $S_1$  crece en un estilo  $S_1S_2$ , el producto  $S_1$  del polen (azul claro) forma homotetrámeros y así es como interacciona con el dominio de especificidad alélica (DE) de la  $S_1$ -RNasa (azul oscuro). Así, el inhibidor general (naranja) no se puede unir a la  $S_1$ -RNasa, quedando activa. Como el producto  $S_1$  del polen no reconoce el DE de la  $S_2$ -RNasa (rojo oscuro), ésta es inactivada porque el inhibidor general de RNasas se le une al dominio catalítico (DC). **B.** Cuando un tubo polínico heteroalélico con ambos alelos,  $S_1$  y  $S_2$ , son expresados, los productos de dichos alelos ( $S_1$ : azul claro;  $S_2$ : rojo) forman un heterotetrámero, el cual es incapaz de interaccionar con la  $S_1$ - ni con la  $S_2$ -RNasa (indicado por las flechas con la cruz). Por lo tanto, el inhibidor general se une a ambas S-RNasas, inactivándolas y provocando que no se dé la respuesta de AI. En **A** y **B** la polinización se lleva a cabo en un estilo que expresa los alelos  $S_1$  y  $S_2$ . DI: dominio de inhibición general de RNasas. Tanto la  $S_1$ - como la  $S_2$ -RNasa son incorporadas al tubo polínico (indicado por las flechas). Los símbolos que representan a cada una de las S-RNasas se muestran a la izquierda (modificado de Kao y Tsukamoto, 2004).

## I.6. Modelo para la degradación de las S-RNasas

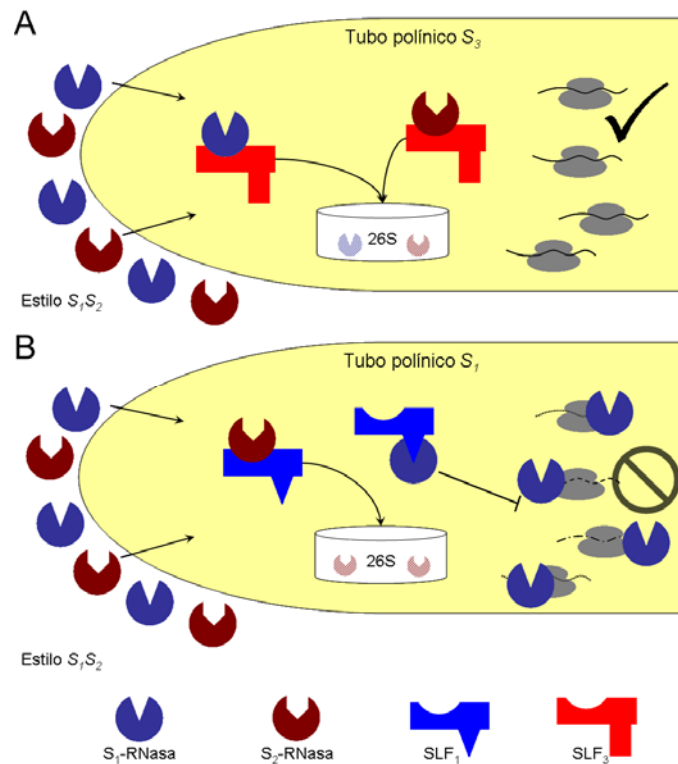
La identificación de *SLF* como la determinante masculina (Entani *et al.*, 2003; Ikeda *et al.*, 2004; Qiao *et al.*, 2004a, 2004b; Sijacic *et al.*, 2004; Ushijima *et al.*, 2003, 2004; Sonneveld *et al.*, 2005) fue muy importante para proponer un modelo que implicara la degradación de la S-RNasa en los tubos polínicos (Sijacic *et al.*, 2004).

Los genes *SLF* pertenecen a la familia de proteínas con caja F cuya función generalmente es como proteínas adaptadoras que unen un sustrato específico al complejo ubiquitina ligasa E3, SCF (Skp1-culina-proteína con caja F). Los sustratos son poliubiquitinados y generalmente degradados por el proteosoma 26S. De esta manera se propone un nuevo modelo, el modelo para la degradación de las S-RNAsas compatibles (o “no propias”) (Entani *et al.*, 2003; Qiao *et al.*, 2004a, 2004b; Sijacic *et al.*, 2004; Ushijima *et al.*, 2003, 2004; Takayama e Isogai, 2005).

En este modelo se predice que SLF interaccionaría físicamente de manera diferencial con las S-RNAsas en función de su haplotipo, de tal manera que las S-RNAsas compatibles sean degradadas por el proteosoma 26S (Figura 7). A diferencia del modelo para el inhibidor, en este caso es la estabilidad y no la actividad de la S-RNasa la que se está regulando por la interacción de Al. La degradación alelo S-específica se lograría si la interacción entre los dominios de especificidad alélica de un haplotipo SLF con el mismo de la S-RNasa evitaran la poliubiquitinación; mientras que la falta de interacción entre estos dominios entre SLF y una S-RNasa compatible resultará en la ubiquitinación y consecuentemente en su degradación (Kao y Tsukamoto, 2004).

Se ha demostrado, tanto por el sistema de doble híbrido en levadura como *in vitro*, que SLF de *Antirrhinum* se une a la S-RNasa en forma alelo S-inespecífica (Qiao *et al.*, 2004b). SLF se une a Skp1 y a una proteína similar a culina para formar el complejo SCF. Al utilizar inhibidores del proteosoma 26S se inhibieron selectivamente los tubos polínicos compatibles, sugiriendo que las S-RNAsas “no propias” son degradadas en una polinización compatible (Qiao *et al.*, 2004b). Sin embargo, otros reportes indican que en *N. alata* no hay degradación de las S-RNAsas cuyo haplotipo no coincida con el del polen. De hecho, parece ser que las cantidades de S-RNasa, compatible e incompatible, dentro de los tubos polínicos son muy similares durante la polinización (Goldraij *et al.*, 2006). Por otro lado, la proteína similar a culina que interacciona con SLF para formar el complejo SCF propuesto (Qiao *et al.*, 2004b) es más pequeña (66 kDa) que una culina típica (100 kDa). Por lo tanto, no se sabe si SLF forma un complejo SCF típico o no. La

posibilidad de que realice una función distinta está por aclararse (McClure y Franklin-Tong, 2006).



**Figura 7.** Modelo para la degradación de las S-RNasas. **A.** Cruza compatible. Cuando el alelo S del polen no coincide con ninguno de los alelos S del estilo. El tubo polínico  $S_3$  incorpora tanto a la  $S_1$ - (azul oscuro) como a la  $S_2$ -RNasa (rojo oscuro). SLF<sub>3</sub> (rojo) interacciona con ambas S-RNasas y dirige, por poliubiquitinación, su degradación por la vía del proteosoma 26S (blanco). El RNA del tubo polínico queda intacto, sigue la traducción de su programa genético (ribosomas en gris con mRNAs) y continúa su crecimiento hasta el ovario. **B.** Cruza incompatible. Cuando el alelo S del polen coincide con alguno de los alelos S del estilo. El tubo polínico  $S_1$  produce SLF<sub>1</sub> (azul claro), el cual interacciona diferencialmente con las S-RNasas, dirigiendo la degradación de la  $S_2$ -RNasa por la vía del proteosoma 26S y evitando que la  $S_1$ -RNasa sea degradada para que pueda llevar a cabo su función citotóxica sobre el RNA del tubo polínico. El RNA del tubo polínico es degradado y por lo tanto, su crecimiento es inhibido. En **A** y **B** la polinización se lleva a cabo en un estilo que expresa los alelos  $S_1$  y  $S_2$ . Tanto la  $S_1$ - como la  $S_2$ -RNasa son incorporadas al tubo polínico (indicado por las flechas). Los símbolos que representan a cada una de las S-RNasas y de las SLFs se muestran en la parte inferior (modificado de Kao y Tsukamoto, 2004).

El modelo para la degradación de las S-RNasas (Figura 7) no incluye ningún factor estilar diferente a las S-RNasas necesarios para la respuesta de AI (e. g. HT-B y 120K). Aunque no se ha definido el nivel de expresión de la proteína SLF, su mRNA parece no ser tan abundante en tubos polínicos como el de la S-RNasa. La S-RNasa es una proteína muy abundante tanto en la matriz

extracelular como en el tubo polínico cuando se incorpora (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006); por lo tanto, es muy difícil explicar cómo una proteína poco abundante (SLF) pudiera dirigir la degradación de una proteína tan abundante (S-RNasa). Por otro lado, dicho modelo predice que ocurre la degradación de las S-RNasas “no propias” como base para la compatibilidad. Sin embargo, ensayos de inmunolocalización en *Solanum* mostraron que tanto las S-RNasas compatibles como las incompatibles se localizan abundantemente en los tubos polínicos (Luu *et al.*, 2000), y en *N. alata* no se encontró evidencia que sugiriera una degradación a gran escala de las S-RNasas en tubos polínicos incompatibles (Goldraij *et al.*, 2006).

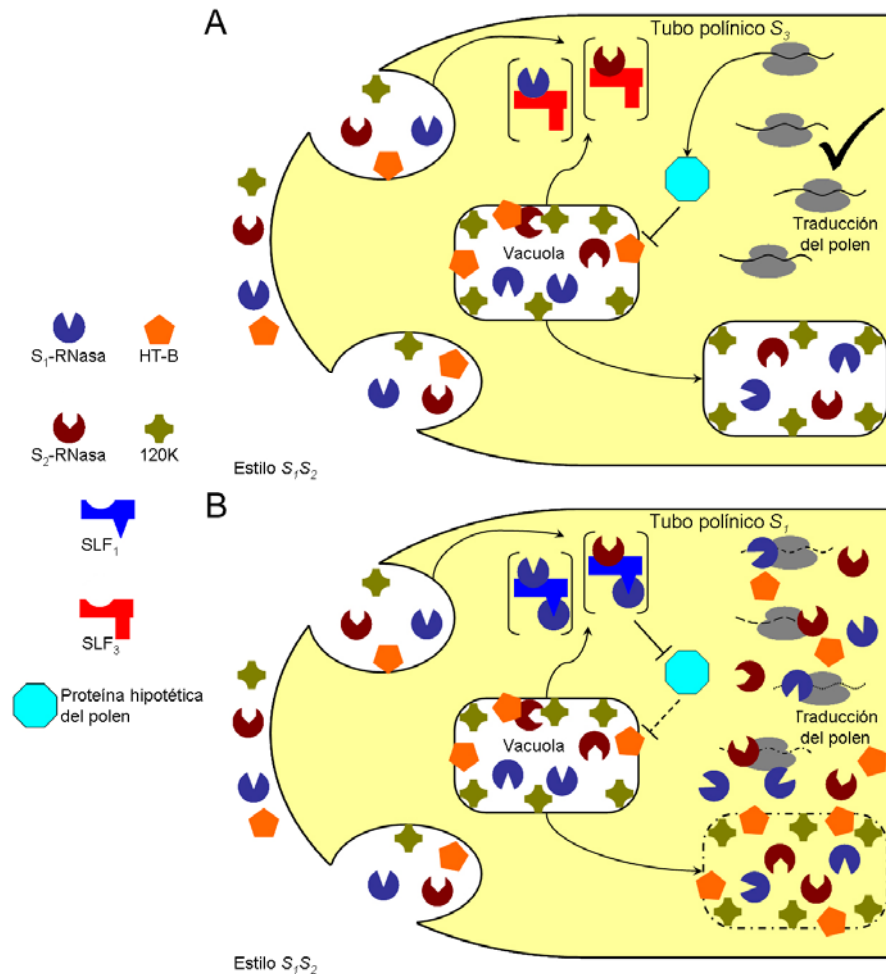
Debido a las evidencias que están en contra del modelo para la degradación de las S-RNasas, se propone un modelo alternativo que explica cómo los tubos polínicos pueden evadir la citotoxicidad de las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006). Sin embargo, las evidencias experimentales para ambos modelos aún no son suficientes para descartar a alguno de ellos.

### **I.7. Modelo para la evasión de la citotoxicidad de las S-RNasas**

Al realizar experimentos de colocalización con anticuerpos anti-calosa (componente de la pared del tubo polínico) y anti-S-RNasa en plantas mutantes AC de *N. alata* (*i. e.* con el *factor-4936* mutado o el gen *HT-B* o *120K* silenciados), se encontró que las S-RNasas son incorporadas al tubo polínico de igual manera que en una planta silvestre AI (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006). Con esto se demostró que los genes modificadores del grupo II (Tabla 2) hasta ahora identificados (*HT-B*, *120K* y el *factor-4936*), no son necesarios para la incorporación de las S-RNasas al citoplasma del tubo polínico, sino que actúan después de este evento y antes de que se lleve a cabo el efecto citotóxico (Goldraij *et al.*, 2006).

Se sabe que la arabinogalactoproteína 120K entra al tubo polínico cuando éste crece a lo largo del tejido de transmisión estilar en *Nicotiana* (Lind *et al.*, 1996) y que esta proteína participa directamente en la respuesta de AI, probablemente interactuando con la S-RNasa (Cruz-García *et al.*, 2005; Hancock *et al.*, 2005). Cuando se hicieron ensayos de colocalización triple, utilizando anticuerpos anti-calosa, anti-120K y anti-S-RNasa en tubos polínicos de *N. alata*, se observó que en cruzas compatibles e incompatibles, 16 h después de la polinización, las S-RNasas se encuentran rodeadas por 120K en un compartimiento celular. Utilizando a la aleuraína (proteasa presente en el lumen de vacuolas de cebada, petunia y tabaco) y a la pirofosfatasa de membrana vacuolar (vPPasa) como marcadores de vacuola, se demostró que tanto 120K como la S-RNasa se encuentran en vacuolas del tubo polínico (Figura 8) (Goldraij *et al.*, 2006).

En fases tempranas de una polinización AI (16 h), el compartimiento donde 120K rodea a la S-RNasa es tan evidente como en una crusa compatible. En fases tardías (36 h), se observa que la señal de 120K disminuye y ya no es evidente la compartimentalización de las S-RNasas, por lo que aparentemente se encuentran libres en el citoplasma del tubo polínico en donde llevarían a cabo su efecto citotóxico sobre el RNA. Sin embargo, tanto la señal de 120K como la compartimentalización de las S-RNasas son siempre evidentes a lo largo de una polinización compatible (Goldraij *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que las S-RNasas son incorporadas por endocitosis al tubo polínico y mantenidas en un compartimiento celular en las fases tempranas de la polinización tanto en cruzas compatibles como incompatibles. Esta vacuola se mantiene intacta durante una polinización compatible (Figura 8A) y disuelta sólo en fases tardías de una polinización incompatible (Figura 8B) (Goldraij *et al.*, 2006).



**Figura 8.** Modelo para la evasión de la citotoxicidad de la S-RNasa. Las proteínas de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo  $S_1$ -RNasa (azul oscuro),  $S_2$ -RNasa (rojo oscuro), HT-B (naranja) y 120K (verde) son incorporadas al tubo polínico por endocitosis. **A.** Cruza compatible. El tubo polínico  $S_3$  evade a la citotoxicidad de las S-RNasas, compartimentalizándolas en una vacuola (blanco) y degradando a HT-B. Una posibilidad es que la degradación de HT-B la lleva a cabo una proteína hipotética del polen (turquesa). Algunas S-RNasas escapan e interactúan con  $SLF_3$  (rojo), las cuales pueden ser degradadas por la vía del proteosoma 26S. **B.** Cruza incompatible. La interacción alelo S-específica de la  $S_1$ -RNasa con  $SLF_1$  (azul claro) probablemente inhibe a la proteína hipotética del polen, promoviendo la estabilización de HT-B. En fases tardías de la inhibición, el compartimiento membranosos desaparece, liberando a las S-RNasas. La degradación del RNA del polen evita el reemplazamiento de factores necesarios para la estabilización de HT-B y mantenimiento del compartimiento. En **A** y **B** la polinización se lleva a cabo en un estilo que expresa los alelos  $S_1$  y  $S_2$ . Los símbolos que representan a cada una de las S-RNasas, las SLFs, a HT-B, 120K y a la proteína hipotética del polen se muestran a la izquierda de la figura. (Modificado de Goldraij *et al.*, 2004; McClure y Franklin-Tong, 2006).

La vacuola que contiene a las S-RNasas dentro del tubo polínico y evita que éstas sean liberadas hacia el citoplasma también se observa en plantas con *120K* silenciado por RNAi, en plantas con *HT-B* en antisentido y en plantas con el

*factor-4936* mutado (Goldraij *et al.*, 2006). Estos datos explican el hecho de que las plantas con dichos entornos genéticos sean AC (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).

El modelo para la evasión de la citotoxicidad de las S-RNasas considera que estas enzimas son incorporadas de la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar y transportadas a una vacuola en el tubo polínico (Figura 8). Esta compartimentalización podría ser el mecanismo mediante el cual el tubo polínico se protege de la citotoxicidad de las S-RNasas. Una vez compartimentalizada la S-RNasa, cuando la cruce es incompatible, se libera selectivamente (Figura 8) (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006). La función mejor conocida de las proteínas con caja F está relacionada con su papel en la ubiquitinación y degradación de proteínas. Sin embargo, también se conocen otras funciones que pueden llevar a cabo. Por ejemplo, Rcy1p forma un complejo distinto al SCF y participa en el reciclamiento de membranas en levadura (Galan *et al.*, 2001). Hasta ahora no se cuenta con evidencia suficiente como para sugerir que SLF actúa así, pero debe considerarse que la determinante masculina en este sistema de AI puede estar participando de manera distinta a la propuesta por el modelo para la degradación de las S-RNasas.

Al analizar simultáneamente los niveles de la S-RNasa y de HT-B en estilos polinizados, los de la primera permanecieron sin diferencias significativas, mientras que los niveles de HT-B disminuyeron a lo largo de la polinización, siendo mucho mayor el cambio en una cruce compatible, donde la disminución fue hasta del 97% (Goldraij *et al.*, 2006). Aunque no se descarta la idea de que haya una degradación de la S-RNasa en pequeñas cantidades, es claro que la predicción del modelo para la degradación de las S-RNasas no concuerda con lo observado en *Nicotiana* (McClure y Franklin-Tong, 2006).

Aún no es muy claro si la ruta por la cual HT-B es incorporada al tubo polínico es igual a la de las S-RNasas. Sin embargo, HT-B es degradada en tubos polínicos compatibles, donde el compartimiento vacuolar se mantiene intacto (Figura 8A). Por otro lado, HT-B se encuentra en niveles fácilmente detectables en tubos polínicos incompatibles, donde dicho compartimiento vacuolar se destruye

(Figura 8B) (Goldraij *et al.*, 2006). Estos datos explican el hecho de que cuando HT-B no se expresa, no se da la respuesta de AI (McClure *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2002a, 2002b) porque en su ausencia las S-RNAsas permanecen compartimentalizadas, independientemente de su haplotipo S. A diferencia del modelo para la degradación de las S-RNAsas, en este modelo se propone que es la degradación de HT-B la característica más importante en la respuesta de AI y que posiblemente el papel de SLF sea participar en la degradación de HT-B (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).

En el modelo modificado para el inhibidor (Figura 6) (Luu *et al.*, 2001) se propone que es un inhibidor general el que actúa contra las S-RNAsas; sin embargo, es claro que una actividad inhibitoria sobre HT-B o cualquier otro factor requerido para la respuesta de AI sería un mecanismo igualmente efectivo (McClure y Franklin-Tong, 2006). Una hipótesis es que existe una proteína del polen con actividad proteolítica que degrada a HT-B (Figura 8) (Goldraij *et al.*, 2006).

Si las S-RNAsas son compartimentalizadas, queda la interrogante de cómo interaccionan con SLF, si por definición, la interacción S-RNasa/SLF es la que determina la especificidad alélica. Una posibilidad es que dicha interacción sea en forma indirecta y otra es que exista algún mecanismo que reclute a SLF a la membrana o que existan pequeñas fugas de S-RNasa hacia el citoplasma (Goldraij *et al.*, 2006). El modelo predice que una interacción incompatible evita que la proteasa del polen degrade a HT-B, mientras que en una interacción compatible promueve su degradación. Al liberarse las S-RNAsas en una polinización incompatible, éstas interfieren con la homeostasis del polen (*i. e.* no habría síntesis de *novo* de la proteasa del polen), reforzando así la estabilidad de HT-B y al mecanismo en general del rechazo del polen alelo S-específico (Figura 8B) (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).



## II. ANTECEDENTES

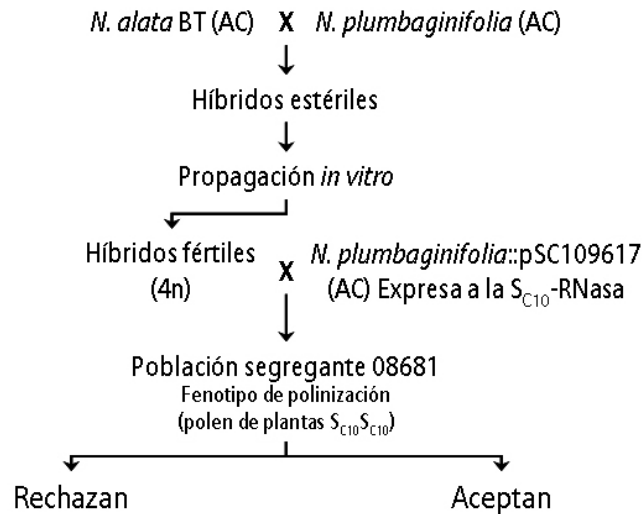
### II.1. En busca de los genes modificadores en *N. alata*

Aunque el modelo de la Figura 8 explica mejor las observaciones hechas a la fecha en relación a los diferentes elementos que participan en la respuesta de AI, aún quedan muchas preguntas por responder. Una causa es que falta la identificación de otros genes modificadores, tanto estilares como del polen, que regulen la respuesta de AI. Factores que estén involucrados en eventos de endocitosis, en el transporte vesicular, en la degradación de HT-B son sólo ejemplos de estos genes faltantes, los cuales podrían pertenecer al grupo II o al III (Tabla 2). En nuestro laboratorio se sigue una línea de investigación para identificarlos y clonarlos.

Para este fin, una de las estrategias que se ha seguido es utilizar una población (08681) híbrida de *Nicotiana* que expresa a la S<sub>C10</sub>-RNasa y segrega en individuos que aceptan el polen S<sub>C10</sub> e individuos que lo rechazan (Figura 9). Ambas subpoblaciones expresan niveles normales de la S<sub>C10</sub>-RNasa funcional. La población 08681 fue derivada de la cruce de una planta transgénica de *N. plumbaginifolia* (una especie AC) que expresa el transgen de la S<sub>C10</sub>-RNasa con *N. alata cultivar* BT (*N. alata* BT) (Figura 9).

La planta transgénica de *N. plumbaginifolia* que expresa a la S<sub>C10</sub>-RNasa acepta tanto el polen S<sub>C10</sub> como aquél de *N. plumbaginifolia*. Esto significa que *N. plumbaginifolia* es AC no sólo por carecer de la S-RNasa sino porque también carece de uno o varios genes modificadores para el rechazo del polen S-específico. Por otro lado, *N. alata* BT contiene el entorno genético adecuado para que funcione el sistema de AI; sin embargo, no expresa ninguna S-RNasa, por lo que es un *cultivar* AC (Murfett *et al.*, 1996). La progenie resultante de la cruce de estas dos plantas fue la población 08681 (Figura 9), la cual fue compatible con el polen de *N. alata* BT. Con el polen S<sub>C10</sub>, 12 plantas fueron clasificadas como fuertemente incompatibles (de 0 – 20% de polinizaciones compatibles); 58 fueron consideradas como débilmente incompatibles (40 – 60%

compatibles) y 106 fueron compatibles (80 – 100% compatibles). Los niveles de S-RNasa en estos tres grupos dentro de la población no mostraron diferencias. Por lo tanto, la hipótesis fue que las diferencias en la aceptación o en el rechazo del polen  $S_{C10}$  se debió a una expresión diferencial de genes modificadores.

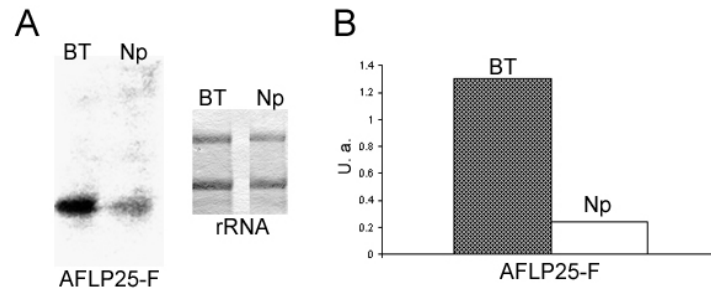


**Figura 9.** Generación de la población segregante 08681 de *Nicotiana* en los individuos que aceptan el polen  $S_{C10}$  y en los individuos que lo rechazan.

La búsqueda de genes modificadores expresados diferencialmente entre estilos de plantas que aceptan y de las que rechazan el polen  $S_{C10}$  se realizó por medio de la técnica de cDNA-AFLP. Se utilizaron 200 combinaciones de oligonucleótidos que permitieron la comparación de 14,400 cDNAs. Dentro de los fragmentos que presentaron una mayor expresión en *N. alata* BT que en *N. plumbaginifolia*, el cDNA-AFLP5 resultó ser idéntico al gen *HT-B*, previamente identificado como gen modificador del sistema de AI en *N. alata* (McClure *et al.*, 1999). El cDNA-AFLP25, por su parte, no mostró similitud a ningún otro gen en las bases de datos.

Debido a que el cDNA-AFLP25 sólo era un fragmento, se recuperó su cDNA completo a partir de una biblioteca de cDNA de estilos de *N. alata*. Este cDNA (AFLP25-F) fue de 712 pb e incluía la secuencia del cDNA-AFLP25, por lo que se utilizó como sonda para corroborar su patrón de expresión entre *N. plumbaginifolia* y *N. alata* BT debido a que éstos son los progenitores de la

población 08681. El ensayo tipo Northern-blot (Figura 10A) y el análisis densitométrico (Figura 10B) corroboraron la expresión diferencial, es decir, los estilos maduros de *N. alata* BT expresan al menos seis veces más a *AFLP25-F* que los de *N. plumbaginifolia*.



**Figura 10.** El cDNA-AFLP25-F se expresa seis veces más a nivel del mRNA en estilos de *N. alata* BT (BT) que en los de *N. plumbaginifolia* (Np). **A.** Ensayo tipo Northern-blot utilizando al cDNA-AFLP25-F como sonda. El rRNA se muestra teñido con azul de metileno como control de carga. **B.** Análisis densitométrico de los resultados obtenidos en **A.** La barra oscura muestra los niveles de expresión del cDNA-AFLP25-F en *N. alata* BT y la barra blanca los niveles de expresión en *N. plumbaginifolia*.

### II.1.1. El cDNA-AFLP25F codifica para una tiorredoxina tipo *h*

La secuencia del AFLP25F (Figura 11) contiene un marco de lectura abierto que codifica para una proteína de 16.8 kDa. La estructura primaria de la proteína inferida a partir de su cDNA contiene en la primera mitad del amino a la secuencia típica del sitio activo de las tiorredoxinas (Trx): Trp-Cys-Gly-Pro-Cys.

El análisis de la estructura primaria de la proteína AFLP25F (Figura 11) dio la primera evidencia de que se trataba de una tiorredoxina citoplásmica (tipo *h*), por lo que se nombró NaTrxh (Na: *Nicotiana glauca*; Trxh: tiorredoxina tipo *h*). Al realizar un alineamiento múltiple con otras tiorredoxinas, se encontró que la NaTrxh tiene una identidad del 20.1% con la de *E. coli*, un máximo del 28.8% con la Trx de humano y del 55.6% con una de *A. thaliana*, lo que demuestra que la NaTrxh está mucho más relacionada con las tiorredoxinas vegetales que con la de humano y que se parece más a ésta que a la de *E. coli* (Juárez-Díaz, 2002), tal y como ocurre con las demás Trx *h* de plantas (Schürmann y Jacquot, 2000). Además, no se encontró ningún péptido de tránsito canónico que pudiera dirigir a

la proteína a algún organelo, como la mitocondria o el cloroplasto, por lo que se descartaron los tipos de Trx organelares que más adelante se describirán y se puede sugerir que efectivamente se trata de una tiorredoxina tipo *h* (Meyer *et al.*, 1999).

```

1 CCACGCGTCCGGGAAAATCGAATTCACAATAGGAGCT3CGCGTAATATAA
51 AAGCAGTGCTTTTATTACCGTCTCAGTAGTTTCTTCCCTATTTTGACTAC
    M G S Y L 5
101 TTTGTGCGTAAGGAGAGAGAGAGAGAGTGAAGAATCCAATGGGATCGTATCT
    S S L L G G G A A E A A E A E S G 22
151 TTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAATCAG
    S S S E P S R V I A F H S S N R 38
201 GATCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGG
    W Q L H F N S S K Q L N K L I V V 55
251 TGGCAACTTCACTTCAATTCCCTCCAAGCAATTAATAAACTCATAGTTGT
    D F A A T W C G P C K M M E P V I 72
301 GGATTTTGC GGCTAC TGGTGTGGGCCCTGCAAAAATGATGGAGCCGGTTA
    N A M S A K Y T D V D F V K I D 88
351 TTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAATCGAC
    V D E L S D V A Q E F G V Q A M P 105
401 GTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCC
    T F L L L K Q G K E V E R V V G A 122
451 AACATTTTTGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGTTGGGG
    K K D E L E K K I L K H R E A P 138
501 CTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCT
    K F A A S N Y R T K F H V Q Stop 152
551 AAATTTGCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAAATTA
601 CAGAAAAGAAAAGCATCATTTTTACTTTACTACCGGATTGGGATGAACCG
651 AATATTGTTGAATTGCTTTGGGGGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAG
701 GGCGGCCGTTTA

```

**Figura 11.** Secuencia del cDNA AFLP25-F. El marco de lectura abierto denominado cDNA NaTrxh se muestra flanqueado por las flechas (desde el codón de inicio ATG hasta el de término TAA). El recuadro indica la secuencia típica del sitio activo de las tiorredoxinas (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-). La numeración en la izquierda corresponde a la secuencia nucleotídica y la de la derecha a la secuencia de aminoácidos correspondiente.

Puesto que aún se desconoce cómo participan las Trx en las interacciones polen-pisitlo en *N. alata*, en la investigación de esta tesis se planteó como objetivo el conocer el papel que desempeña la NaTrxh en el estilo a través de la identificación de sus proteínas blanco.

## II.2. Tiorredoxinas

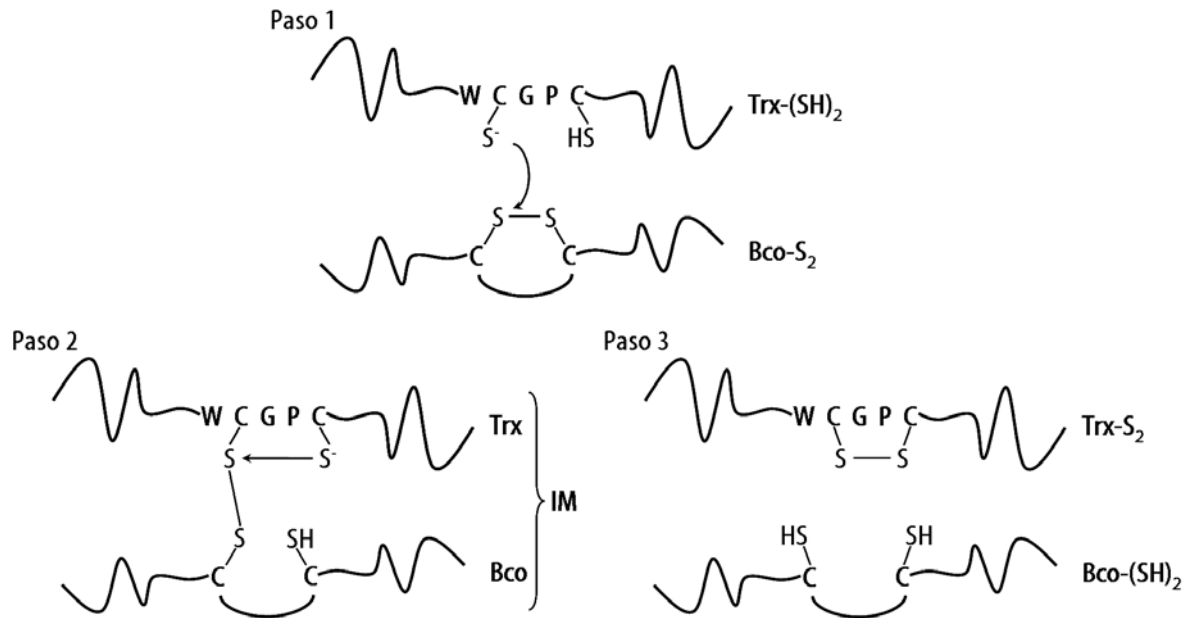
Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas pequeñas (~12 kDa) que se encuentran en todos los organismos y forman parte de la gran familia de las enzimas con actividad de oxidorreductasa tiol:disulfuro (Wollman *et al.*, 1988). Los miembros de esta familia se caracterizan por contener en su sitio activo la secuencia típica WCXXC, la cual permite la oxidación, reducción o isomerización del puente disulfuro de sus proteínas blanco (Laloi *et al.*, 2001).

El motivo WCGPC, en algunos casos WCPPC (Bréhélin *et al.*, 2000), en el sitio activo contribuye a originar el bajo potencial redox de las Trx, lo que les confiere su propiedad reductora. En su estado reducido (Trx-(SH)<sub>2</sub>), las Trx son capaces de romper los puentes disulfuro de un gran número de proteínas blanco, participando así en la regulación enzimática, en la respuesta al estrés oxidativo, en la regulación de la transcripción y de la traducción, entre otras. Además, las Trx participan en varias reacciones reductoras como donadoras de electrones (Balmer y Buchanan, 2002).

Las Trx descritas desde procariotes hasta eucariotes tienen del 27 al 69% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos con la Trx de *E. coli*. Los modelos indican que todas estas proteínas tienen estructuras tridimensionales similares a pesar de la gran variación que existe en sus secuencias aminoacídicas (Eklund *et al.*, 1991). Todas comparten un plegamiento común con una sucesión de elementos estructurales secundarios que incluyen a más del 75% de los residuos de la proteína (Holmgren, 1985):  $\beta 1$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 4$ ,  $\beta 5$  y  $\alpha 4$ . La estructura compacta globular resultante es generada por cinco hebras beta, tres paralelas y dos antiparalelas (Holmgren, 1985), que forman una región hidrofóbica rodeada por cuatro  $\alpha$ -hélices sobre la superficie externa (Holmgren, 1985; Powis y Montfort, 2001).

La primera cisteína del sitio activo tiene un bajo valor de  $pK_a$  y es la que realiza el ataque nucleofílico en la reducción del puente disulfuro de otras proteínas. El mecanismo involucra un intermediario mixto transitorio y un rápido intercambio tiol-disulfuro en un ambiente hidrofóbico (Figura 12). Esta reacción es

reversible y la tiorredoxina puede romper o formar disulfuros dependiendo del potencial redox del sustrato. El bajo potencial redox de la Trx (*E. coli* Trx1 = -270 mV (Krause *et al.*, 1991) asegura que la Trx-(SH)<sub>2</sub> sea el principal ditiol reductor en el citosol (Holmgren, 1985; 1995).



**Figura 12.** Esquema para el mecanismo redox de la Trx sobre una proteína blanco (Bco). En el paso 1 ocurre un primer ataque nucleofílico de la primera cisteína de la tiorredoxina reducida (Trx-(SH)<sub>2</sub>) sobre un átomo de azufre de la proteína blanco oxidada (Bco-S<sub>2</sub>), provocando así la formación de un complejo intermedio mixto (IM) e inestable (paso 2). El anión tiolato de la segunda cisteína del sitio activo de la Trx entonces rompe el puente disulfuro entre la Trx y la proteína blanco para liberarla (paso 3), quedando así la tiorredoxina oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) y la proteína blanco reducida (Bco-(SH)<sub>2</sub>) (Meyer *et al.*, 1999). W: triptofano; C: cisteína; G: glicina; P: prolina; S: átomo de azufre; SH ó HS: grupo tiol.

Generalmente, cuando se descubre una proteína se le adjudica un nombre y una función relacionándola con algún sistema bioquímico en particular. En el caso de las tiorredoxinas, se ha descubierto que están involucradas en al menos doce diferentes sistemas bioquímicos. Las funciones de las Trx en los diferentes organismos han evolucionado a partir de una reacción común fundamental a una gran cantidad de funciones especializadas, lo cual es una prueba de su gran importancia, utilidad y especificidad. En términos muy amplios, la actividad de oxidorreductasa de las Trx participa en dos funciones bien conocidas: (1) como portadora de electrones necesarios para los ciclos catalíticos de enzimas

biosintéticas y (2) como protectora de las proteínas citosólicas de la agregación o inactivación por la formación de puentes disulfuro intra o intermoleculares (Arnér y Holmgren, 2000).

### II.3. Tiorredoxina reductasa

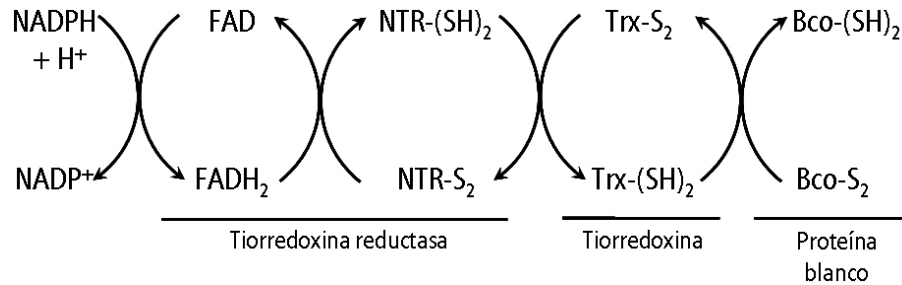
Para tener una idea clara de la función de las tiorredoxinas se debe considerar el papel que desempeñan las tiorredoxina reductasas (NTR), las cuales son las únicas enzimas conocidas capaces de reducir el sitio activo oxidado de las tiorredoxinas (Mustacich y Powis, 2000; Powis y Montfort, 2001). Por lo tanto, es posible que alteraciones en la actividad de la NTR puedan regular algunas de las actividades de la Trx (Mustacich y Powis, 2000).

La NTR forma parte de la familia de las disulfuro reductasas, la cual incluye flavoenzimas homodiméricas que catalizan la transferencia de electrones entre nucleótidos de piridina y compuestos disulfuro/ditiol (Williams Jr. *et al.*, 2000). En cada monómero de las enzimas de esta familia se encuentra un grupo prostético FAD, un sitio de unión a NADPH y un sitio activo que contiene un disulfuro con actividad óxido-reductora (Mustacich y Powis, 2000). De esta manera, la catálisis de la enzima se lleva a cabo vía FAD y un disulfuro activo (Williams Jr. *et al.*, 2000).

Existen dos clases de NTR (Luthman y Holmgren, 1982; Williams Jr. *et al.*, 2000): (1) las de baja masa molecular (35 kDa por subunidad), como la de *E. coli* y otros procariotes, levadura, micoplasmas, *Giardia duodenalis*, *Arabidopsis thaliana* y *Methanococcus jannaschii* (Williams Jr. *et al.*, 2000) y (2) las de alta masa molecular (55 kDa por subunidad), las cuales se encuentran en eucariotes superiores y están relacionadas en estructura y función a la glutatión reductasa, lipoamida deshidrogenasa y otros miembros de la familia de nucleótido-disulfuro piridina oxidorreductasas (Arscott *et al.*, 1997).

La reacción que efectúa la familia de las disulfuro reductasas involucra la transferencia de equivalentes reductores del sustrato nucleótido de piridina al

sustrato disulfuro. Un hidruro pasa del NADPH a la flavina y entonces el equivalente reductor es transferido de la flavina reducida al disulfuro del sitio activo (Williams Jr. *et al.*, 2000). Finalmente, la NTR reducida (NTR-(SH)<sub>2</sub>) en su sitio activo puede reducir a su sustrato (Figura 13).



**Figura 13.** Mecanismo para la reacción de reducción del disulfuro de una proteína blanco que es dependiente del NADPH por el sistema de tiorredoxina. El sitio activo de la tiorredoxina reductasa oxidada (NTR-S<sub>2</sub>) se reduce (NTR-(SH)<sub>2</sub>) vía FAD, el cual es reducido (FADH<sub>2</sub>) a partir de NADPH + H<sup>+</sup>. La tiorredoxina oxidada (Trx-S<sub>2</sub>) es entonces reducida por la NTR-(SH)<sub>2</sub> y la tiorredoxina reducida (Trx-(SH)<sub>2</sub>) rompe el puente disulfuro de su proteína blanco, generando en ésta dos grupos tiol (Bco-S<sub>2</sub> → Bco-(SH)<sub>2</sub>).

Las Trx reductasas vegetales dependientes de NADPH (NTR) parecen estar mucho más relacionadas con las de procariones que con las de mamíferos. Estas últimas contienen una extensión hacia el amino terminal y un residuo esencial de selenocisteína (SeCys) hacia el extremo carboxilo (Gorlatov y Stadtman, 1998; Zhong *et al.*, 2000). En *A. thaliana* se han identificado al menos dos genes que codifican para NTR. Sus cDNAs fueron aislados y se pudo cristalizar a la proteína recombinante, de la cual se encontró que la enzima es un homodímero con subunidades de 35 kDa aproximadamente. Cada una de las subunidades posee dos subdominios: un dominio central de unión a NADPH y uno constituido por los extremos amino y carboxilo que une FAD. Además, cada subunidad contiene un disulfuro redox activo con la secuencia -Cys-Ala-Val-Cys- (Dai *et al.*, 1996).

Una vez reducida la NTR, ésta reduce a la Trx, formando así el sistema NADPH/NTR/Trx (Figura 13), el cual es uno de los mecanismos de reducción de disulfuros más ampliamente distribuidos y presente en todos los tipos celulares.



Sin embargo, en cloroplastos y en procariotes fotosintéticos oxigénicos, la reducción de la tiorredoxina no está relacionada con el NADPH sino con la ferredoxina por la enzima heterodimérica de hierro-azufre ferredoxina-tiorredoxina reductasa (FTR). En ambos casos, la Trx-(SH)<sub>2</sub> reduce puentes disulfuro específicos de sus proteínas blanco, lo que altera su actividad o sirve como sustrato reductor en alguna reacción enzimática (Balmer y Buchanan, 2002).

#### II.4. Tiorredoxinas vegetales

En levaduras y células animales, el perfil de las tiorredoxinas es mucho más complejo que en bacterias, ya que cuentan con un segundo sistema dependiente de NADPH en mitocondria. Sin embargo, el patrón en plantas es aún más complejo (Tabla 3). En mamíferos sólo se han reportado dos genes que codifican para tiorredoxinas, tres en levadura y dos en *E. coli*; mientras que en plantas han sido detectado al menos 20 genes (Meyer *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2004; Gelhaye *et al.*, 2004a).

**Tabla 3.** Clasificación de las tiorredoxinas vegetales de acuerdo con su localización subcelular y con sus proteínas blanco principales.

Compartimiento celular	Tipo de Trx	Número de genes en <i>A. thaliana</i>	Proteína blanco
Cloroplasto	Tipo <i>m</i>	4	NADP-malato deshidrogenada
	Tipo <i>f</i>	2	Fructosa 1,6-bifosfatasa
	Tipo <i>x</i>	1	2-Cys peroxirredoxina
Mitocondria	Tipo <i>o</i>	1	Peroxirredoxina (?)
Citoplasma	Tipo <i>h</i>	8	Varios

En las plantas existen al menos cinco grupos principales de tiorredoxinas: tres de cloroplasto, uno de mitocondria y uno citoplásmico (Tabla 3). El sistema en cloroplastos contiene tres tipos de tiorredoxinas. Dos grupos son los principales, el tipo *m* (Trx *m*) y el tipo *f* (Trx *f*). Existe también la tiorredoxina tipo *x* (Trx *x*), la cual está más relacionada a las secuencias procariotes pero relativamente distante a la

Trx m que es la considerada como bacteriana (Balmer y Buchanan, 2002). Estas Trx son reducidas por la enzima heterodimérica FTR por medio de la cadena de transporte de electrones fotosintética y se encuentran representadas por dos genes para Trx f, al menos cuatro para Trx m y uno para Trx x en el genoma de *A. thaliana* (Tabla 3) (Mestres-Ortega y Meyer, 1999; Laloi *et al.*, 2001).

En la mitocondria sólo se tenía evidencia de actividad tanto de Trx como de NTR, pero Laloi *et al.* (2001) identificaron un nuevo tipo de tiorredoxinas, denominado tipo o (Trx o) (Tabla 3) y una NTR mitocondrial similar a la citoplásmica. Tanto el gen de la Trx o como el de la NTR mitocondrial codifican mRNAs cuyos productos contienen un péptido de tránsito hacia mitocondria (Laloi *et al.*, 2001).

El sistema citoplásmico de las plantas consiste de las Trx tipo h (Trx h) y una NTR similar a la de levadura y a la de procariotes (Balmer y Buchanan, 2002). En el genoma de *A. thaliana* se encuentran ocho genes que codifican para Trx h (Tabla 3) (Rivera-Madrid *et al.*, 1995; Mestres-Ortega y Meyer, 1999; Laloi *et al.*, 2001).

A partir de análisis filogenéticos se ha sugerido que la Trx m tiene un origen procariote, mientras que las Trx f y h son de tipo eucariote (Balmer y Buchanan, 2002). Al incluir en el análisis a la Trx o, se encontró que las tiorredoxinas se agrupan en cuatro grupos filogenéticos diferentes de acuerdo a su localización celular, donde la Trx h está relacionada filogenéticamente con la Trx f (Laloi *et al.*, 2001). Por otro lado, la Trx x forma un quinto grupo formado por sólo un miembro (Mestres-Ortega y Meyer, 1999).

## **II.5. Tiorredoxinas tipo h (citoplásmicas)**

La presencia de muchas tiorredoxinas en el mismo compartimiento celular plantea el problema de si existe redundancia funcional o especificidad en cuanto a sus sustratos (Jacquot *et al.*, 1997; Meyer *et al.*, 1999). Desde un punto de vista evolutivo, el hecho de haber obtenido proteínas híbridas con un espectro de

actividad mucho más amplia que las dos Trx h progenitoras de *A. thaliana* con actividad restringida, ha reforzado la hipótesis de un origen común de las tiorredoxinas vegetales tipo *h* a partir de un ancestro totipotente, a partir del cual, por duplicaciones génicas, aparecieron mutaciones que dieron lugar a determinantes necesarias para la interacción con blancos en particular, resultando así en una especialización de las Trx h (Bréhélin *et al.*, 2000).

Las secuencias de las Trx h son un poco más largas que la de *E. coli*. La mayoría posee extensiones hacia el extremo amino y/o carboxilo. De acuerdo con los análisis de las estructuras primarias, se propone que las Trx h vegetales están mucho más relacionadas con la Trx humana que con la de *E. coli* (Schürmann y Jacquot, 2000).

Las Trx h carecen de un péptido de transporte, por lo que se asumía que son proteínas citoplásmicas (Meyer *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha demostrado en arroz (Ishiwatari *et al.*, 1995) y en muchas otras plantas que las Trx h también están presentes en el floema. Al no haber una señal de secreción, se cree que las tiorredoxinas son transportadas a través de los plasmodesmos debido a su tamaño (Ishiwatari *et al.*, 1995; Meyer *et al.*, 1999). De hecho, se ha demostrado por microinyección de una Trx h recombinante que la proteína misma tiene la capacidad de mediar su propio transporte de célula a célula a través de los plasmodesmos (Ishiwatari *et al.*, 1998). Al sumar esta evidencia con la que se tiene de la tiorredoxina humana, Trx-1, la cual es secretada masivamente a la sangre por linfocitos, hepatocitos, fibroblastos y una variedad de células cancerígenas (Powis y Montfort, 2001), se ha sugerido que las tiorredoxinas tienen la capacidad de actuar como mensajeros en la transducción de señales (Meyer *et al.*, 1999; Powis y Montfort, 2001). Esto sugiere que la Trx h es un elemento móvil en las plantas y que puede también actuar como portadora de mensajes (Schürmann y Jacquot, 2000), tal y como se describió en el caso del receptor con actividad de cinasa del locus S (SRK) en *Brassica* (Brassicaceae) (Bower *et al.*, 1996; Cabrillac *et al.*, 2001).

### II.5.1. Algunas funciones de las Trx h en plantas

Las tiorredoxinas tipo *h* también puedan actuar como moléculas de señalización en los tejidos vegetales por sus propiedades de regulación redox. Esto les podría permitir la interacción con receptores específicos, como es el caso de SRK (Cabrillac *et al.*, 2001), descrito previamente.

Para las Trx h se han sugerido también otras funciones. Un ejemplo de esto se presenta durante la germinación de semillas, donde es muy probable que esté involucrada en la reducción de las proteínas de almacenaje, inhibidores de enzimas y en la regulación de una proteasa dependiente de su estado redox, la tiocalsina (Kobrehel *et al.* 1992; Besse *et al.*, 1996). La relación de las Trx h con la germinación y el desarrollo de la semilla sugiere que la Trx h es reducida por la NTR con el NADPH metabólicamente generado y que actúa en las etapas tempranas del desarrollo de la semilla para iniciar la movilización del nitrógeno y carbón al endospermo, que es el sitio principal de almacenaje de reservas en los cereales (Kobrehel *et al.*, 1992; Lozano *et al.*, 1996).

A partir de un análisis del patrón de expresión de los 8 genes descritos de Trx h en *A. thaliana*, se encontró, que a excepción del mRNA de *AtTRX8*, todos los transcritos son detectados en casi todos los órganos, aunque presentan diferencias en sus niveles de expresión (Reichheld *et al.*, 2002). En este estudio se encontró que los genes producidos por duplicación no muestran un patrón idéntico de expresión. El transcrito de *AtTRXh3* se acumula abundantemente en hojas, mientras que el correspondiente a *AtTRXh5* muestra un nivel de acumulación mayor en la raíz. Por otro lado, *AtTRXh7* se detecta en raíces, tejidos reproductivos y en plántulas crecidas *in vitro*, mientras que los niveles de mRNA de *AtTRXh8* sólo se detectan en callo. *AtTRXh1*, *AtTRXh2* Y *AtTRXh4* se expresan primordialmente en la flor que en otros órganos (Reichheld *et al.*, 2002). Estos datos apoyan un perfil de expresión diferencial dentro de los miembros de la familia multigénica de las Trx h y apoyaría la idea de que tienen diferentes funciones en la planta (Reichheld *et al.*, 2002), ya que dependiendo del órgano donde se expresen, sus proteínas blanco serán diferentes, y es ahí donde podría radicar su especificidad fisiológica. Además, como se muestra en el estudio,

algunas Trx h coexisten espacialmente, lo que sugiere también una especificidad hacia sus proteínas blanco.

Varios reportes indican que tanto en las cianobacterias como en las plantas, la Trx está involucrada en la desintoxicación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por medio de la enzima tiorredoxina peroxidasa o peroxirredoxina (PRDX) (Schürmann y Jacquot, 2000), la cual pertenece a la familia conservada de proteínas antioxidantes y usa los grupos tiol como reductores equivalentes para atrapar a los oxidantes (Chae *et al.*, 1997). En el citosol, la PRDX puede ser un blanco de la Trx h, ya que esta enzima ha sido aislada como un blanco *in vivo* de la tiorredoxina vegetal tipo *h* en levadura por medio de la estabilización del disulfuro mixto intermedio (Verdoucq *et al.*, 1999). En células vegetales se han encontrado los equivalentes estructurales y funcionales de la PRDX de la levadura y mamíferos. Se cree que el tipo de PRDX de dos cisteínas, caracterizado en *Hordeum* y *Spinacia*, funciona como antioxidante (Baier y Dietz, 1996).

## **II.6. Las Trx h no sólo son tiorredoxinas citoplásmicas**

A las Trx h se les ha considerado como proteínas citoplásmicas por carecer de algún péptido de tránsito (Meyer *et al.*, 1999). Sin embargo, recientemente se observó que este tipo de Trx se divide en tres subgrupos (Gelhaye *et al.*, 2004a). Dentro del subgrupo II se encuentran Trx h que se caracterizan por contener extensiones no conservadas hacia su región amino terminal.

Ha sido interesante encontrar que los algoritmos disponibles no predicen la existencia de algún péptido señal. Sin embargo, Gelhaye *et al.* (2002) observaron que al sobreexpresar a PtTrxh2 (una Trx h de *Populus tremula*) en células de *E. coli*, la proteína era procesada, por lo que carecía de los primeros 19 residuos de aminoácidos. Posteriormente, se demostró que PtTrxh2 se localiza en la mitocondria (Gelhaye *et al.*, 2004b).

La función de estas extensiones hacia el amino terminal aún no es muy clara. Sin embargo, sí es claro que las tiorredoxinas tipo *h* no son exclusivamente

proteínas citoplásmicas y que queda mucho por estudiar en estas proteínas y sus posibles péptidos señales.

## **II.7. Algunas funciones que desempeñan las tiorredoxinas en diferentes organismos**

Todas las tiorredoxinas, como oxidorreductasas ditiol-disulfuro, catalizan la reducción de disulfuros mucho más eficientemente que el ditioneitol (DTT) o el mismo glutatión reducido (GSH). El papel de las Trx como portadoras de electrones para los ciclos catalíticos de enzimas biosintéticas y como protectoras de enzimas citoplásmicas (Arnér y Holmgren, 2000) son sólo dos aproximaciones muy generales de lo que estas enzimas realizan dentro de las células. Sin embargo, también hay que considerar a la tiorredoxina reductasa, ya que es posible que ésta pueda estar regulando las actividades de la misma tiorredoxina por ser la única enzima conocida capaz de reducir su sitio activo. Muchos de los estudios en procesos tales como crecimiento celular y protección contra estrés oxidativo, por mencionar algunos, enfocados en TrxR se han centrado hasta ahora en su papel como reductor de Trx (Mustacich y Powis, 2000).

En general, los organismos utilizan la tiorredoxina como un donador de electrones para la ribonucleótido reductasa, que es una enzima esencial para la síntesis del DNA (Laurent *et al.*, 1964; Holmgren, 1989). Asimismo, se requiere para reducir los puentes disulfuro de las proteínas intracelulares (Holmgren, 1984; Stewart *et al.*, 1998). En la mayoría de los seres vivos se utiliza la tiorredoxina para catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, evitando así, junto con otras enzimas como la catalasa, el estrés oxidativo y la inducción de la apoptosis (Arnér y Holmgren, 2000).

### III. HIPÓTESIS

La proteína NaTrxh es una tiorredoxina *h* con expresión preferencial en plantas autoincompatibles de *Nicotiana*, por lo que es probable que participe en la respuesta del rechazo del polen como un reductor de factores involucrados en el rechazo del polen S-específico en estilos de *N. alata*.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1. Objetivo general

Caracterizar a la NaTrxh en *N. alata* para inferir su papel en la respuesta del rechazo del polen alelo S-específico.

### IV.2. Objetivos particulares

- a) Evaluar la expresión de la proteína NaTrxh en los estilos de *N. alata* y de *N. plumbaginifolia*.
- b) Definir el patrón de expresión de la proteína NaTrxh en las plantas de *N. alata*.
- c) Identificar *in vitro* las proteínas que son reducidas con la NaTrxh en los estilos de *N. alata*.
- d) Definir la localización subcelular de la NaTrxh en el tejido de transmisión de los estilos de *N. alata*.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS<sup>1</sup>

### V.1. Material biológico

Se utilizaron plantas de *Nicotiana tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. alata* autoincompatible (genotipos S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> y S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>) y *N. alata* autocompatible (*cultivar Breakthrough* (BT)) crecidas en invernadero. Para el aislamiento de proteínas de todos los extractos se utilizaron flores en antesis, excepto cuando se indique. También, en algunos casos se utilizaron hojas jóvenes.

Las plantas de *N. benthamiana* y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (Col-0) fueron crecidas bajo condiciones de invernadero a 22°C usando un fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad).

### V.2. Análisis filogenético

Evidencias derivadas del análisis de secuencia de aminoácidos y bioquímicas indicaban que la NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h* (Juárez-Díaz, 2002). Sin embargo, para hacer un análisis filogenético más detallado que permitiera ubicar a la NaTrxh dentro de las tiorredoxinas vegetales y sobre todo dentro de los tres subgrupos de las tiorredoxinas tipo *h* (Gelhaye *et al.*, 2004a), se alinearon diversas secuencias de tiorredoxinas de plantas con el programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997). Basándose en el alineamiento se obtuvo un árbol filogenético utilizando el método *neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987). Este análisis filogenético fue realizado con el programa MEGA versión 2.1 (Kumar *et al.*, 2001).

Los números de acceso a la base de datos GenBank<sup>TM</sup> de las secuencias que se utilizaron fueron: Trxs tipo *f*: *A. thaliana* (Q9XFH8), *Pisum sativum* (X63537) y *Spinacia oleracea* (X14959); proteínas similares a Trx: *Hordeum*

---

<sup>1</sup> La forma de preparación de ciertos reactivos y algunas metodologías adicionales se encuentran en el apéndice.

*bulbosum* (AF159385), *Lolium perenne* (AF159387), *Phalaris coerulescens* (AF159388), *Secale cereale* (AF159386), *A. thaliana* (AAG51342); Trxs tipo *h*: *Ipomea batatas* (AY344228), *A. thaliana* (AAG52561, AAD39316, S58119, S58118, S58123, S58120 y P29448), *Brassica napus* (U59379), *O. sativa* (D26547), *N. alata* (NaTrxh) (DQ021448), *Nicotiana tabacum* (Q07090 y X58527); Trxs tipo *m*: *A. thaliana* (AAF15949, O48737, Q9SEU6 y AAF15950), *P. sativum* (X76269), *S. oleracea* (X51462), *Zea mays* (L40957); Trx tipo *x*: *A. thaliana* (AAF15952); y Trx tipo *o*: *A. thaliana* (AF396650).

### **V.3. Construcción utilizada para la sobreexpresión y purificación de la NaTrxh recombinante**

El marco de lectura abierto encontrado previamente (Juárez-Díaz, 2002) en el cDNA AFLP-25F fue usado como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región codificante (cDNA-NaTrxh) utilizando el oligonucleótido *forward* 5' CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA 3' y el *reverse* 5' GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA 3', con los sitios de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI, respectivamente. El producto de la amplificación fue digerido y ligado al vector de expresión pGEX 4T-2 previamente linearizado con las enzimas de restricción *Bam*-HI y *Eco*-RI. Finalmente, fue clonado en células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

### **V.4. Construcciones para la fusión de la NaTrxh con la GFP**

Para probar si la secuencia de la NaTrxh contiene la información necesaria para dirigir su secreción, ésta fue fusionada al extremo amino de la proteína verde fluorescente (GFP). Se produjo un cDNA con los sitios de restricción *Bam*-HI en el extremo 5' y *Nco*-I en el 3' del cDNA-NaTrxh por PCR. La mezcla de reacción que

se utilizó para la amplificación se muestra en la Tabla 4 y las condiciones de PCR pueden verse en la Tabla 5.

**Tabla 4.** Concentraciones utilizadas para cada uno de los reactivos que son necesarios para la amplificación por PCR del cDNA-*NaTrxh* para fusionar la secuencia completa y las mutantes *NaTrxhΔNα* y *NaTrxhΔNβ* con la *GFP* en el vector pHBT.

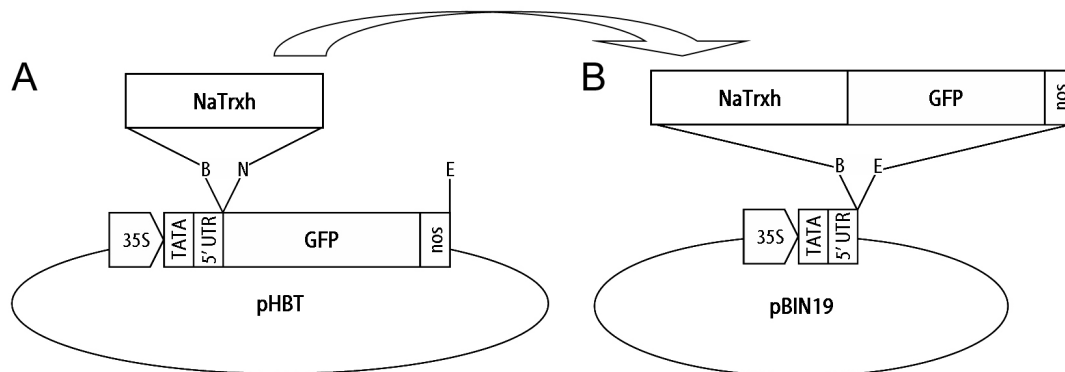
Reactivo	Concentración final
Oligonucleótido <i>forward</i> 10 μM	0.2 μM
Oligonucleótido <i>reverse</i> 10 μM	0.2 μM
dNTPs 10 mM	0.2 mM
Amortiguador de PCR con MgCl <sub>2</sub> 10X	1X
Taq DNA polimerasa 5 u/μl	1 u
DNA molde	---
<b>Volumen final</b>	<b>50 μl</b>

**Tabla 5.** Condiciones de PCR para amplificar la *NaTrxh* completa y las mutantes *NaTrxhΔNα* y *NaTrxhΔNβ* con los sitios de restricción *Bam*-HI y *Nco*-I en el extremo 5' y 3', respectivamente, y así fusionarlas con la *GFP* en el vector pHBT.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Desnaturalización inicial	94	5.0
Amplificación (40 ciclos)		
a) Desnaturalización	94	0.5
b) Alineamiento	56	1.0
c) Elongación	72	1.0
Elongación final	72	5.0

Una vez obtenido el producto de amplificación, se digirió con las enzimas de restricción correspondientes para ligarlo al vector pHBT (Sheen *et al.*, 1995), el cual contiene el gen de la *GFP* con los sitios de restricción *Bam*-HI y *Nco*-I (ambos hacia el extremo 5' de *GFP*) (Figura 14A). Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron el *forward* 5' CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA 3' y el *reverse* 5' AGCCATGGTTGGACATG 3'.

La fusión *NaTrxh:GFP* en pHBT (Figura 14A) fue retirada con las enzimas *Bam*-HI y *Eco*-RI para clonarla en el vector binario pBIN19 (Jefferson, 1988), quedando así esta fusión bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico del tabaco (CaMV35S) (Figura 14B) en ambos vectores.



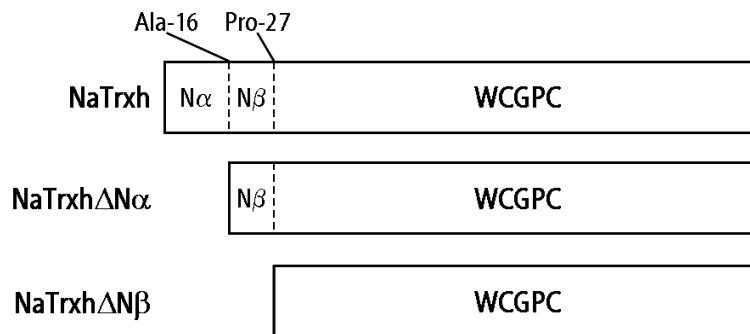
**Figura 14.** Fusión de la NaTrxh con la GFP que se utilizó para los ensayos de expresión transitoria. La fusión en el vector pHBT (A) fue utilizada para bombardear plántulas de *A. thaliana*; mientras que la construcción en el vector binario pBIN19 (B) se usó para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* y transformar hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración. Los vectores contienen al promotor CaMV35S (35S), una caja TATA (TATA), una región 5' no traducible (5'UTR), la región que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) y el terminador de la transcripción de la nitrato sintasa (nos). Los sitios de restricción están indicados como sigue: B: *Bam*-HI; N: *Nco*-I; E: *Eco*-RI.

## V.5. Construcciones para la fusión de la NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ y de la NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ con la GFP

Con el fin de probar si la extensión hacia el extremo amino de la NaTrxh era la portadora de la información para dirigir su secreción, se eliminó a partir del cDNA-NaTrxh original (cDNA-AFLP25F) por PCR. Los oligonucleótidos que se utilizaron fueron los *forward* 5' GCGCGGATCCATGGCAGAGGCAGAATCAG 3' para la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  y 5' GCGGATCCATGTCGCGTGTGATTG 3' para la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ . Ambos oligonucleótidos contienen el sitio de restricción *Bam*-HI. El oligonucleótido *reverse* que se usó fue el mismo que se utilizó para la fusión de NaTrxh a GFP con el sitio de restricción *Nco*-I. La mezcla de reacción para la amplificación de ambas mutantes se muestra en la Tabla 4 y las condiciones de PCR pueden verse en la Tabla 5.

La mutante NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  tiene truncado el extremo amino de la NaTrxh hasta el residuo Ala-16 que es justo donde el algoritmo *Hidden Markov* (Bendtsen *et al.*, 2004b) predice que hay un sitio de corte con una probabilidad del 59.3% (Figura

15). Por otro lado, en un trabajo previo se diseñó un péptido para producir anticuerpos específicos contra la NaTrxh. Este péptido tiene la secuencia EAAEAESGSSSEP, que incluye del residuo Glu-15 al Pro-27. Estos anticuerpos sólo pudieron reconocer a la proteína recombinante, mientras que no fue clara la detección de la NaTrxh en extractos de proteína total de estilos de *N. alata*. Por lo tanto, la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\beta$  que se generó carece del extremo amino hasta el residuo Pro-27 (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema para las mutantes NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  y NaTrxh $\Delta$ N $\beta$  utilizadas para corroborar la existencia del péptido señal. NaTrxh: secuencia completa de la proteína. NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ : mutante que carece de los primeros 16 residuos (hasta el residuo Ala-16). NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ : mutante que carece de los primeros 27 residuos (hasta el residuo Pro-27). WCGPC: indica la secuencia del sitio activo de la NaTrxh.

## V.6. Ensayos para la expresión transitoria en *N. benthamiana* y en *A. thaliana* Col-0

La fusión de NaTrxh:GFP en el vector binario pBIN19 (Figura 14) se usó para transformar a *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 (Deblaere *et al.*, 1985). Con las células de *A. tumefaciens* transformantes se transformaron hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración (Schöb *et al.*, 1997; Llave *et al.*, 2000) como a continuación se describe. La expresión de la proteína se observó por microscopía confocal después de tres días.

- a) A partir de un precultivo de *A. tumefaciens* con el plásmido deseado, inocular un medio fresco con los antibióticos necesarios. En este caso se utilizaron rifampicina, ampicilina y kanamicina a una concentración de

100 µg/ml cada uno (la cepa pGV2260 es resistente a rifampicina y ampicilina. El pBIN19 confiere resistencia a kanamicina).

- b) Incubar con agitación a 28°C toda la noche.
- c) Medir la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm. La  $DO_{600}$  debe ser de 0.5 aproximadamente.
- d) Centrifugar 5 ml de cultivo a 8,000 rpm por 10 min (por duplicado).
- e) Resuspender el botón celular con 6 ml de medio de infiltración estéril ( $MgCl_2$  10 mM, MES 10 mM, pH 5.7) y medir la  $DO_{600}$ .
- f) Diluir a las células con más medio de infiltración, si es necesario, hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.5.
- g) Utilizando una jeringa de 1 ml sin aguja, infiltrar por la parte del envés de la hoja.
- h) Dejar las plantas en las condiciones de invernadero antes descritas por 3 a 4 días.

La transformación de *A. thaliana* Col-0 se llevó a cabo por bombardeo (Sanford, 1990) con partículas de tungsteno (M-17, Bio-Rad) cubiertas del vector pHBT conteniendo la fusión NaTrxh:GFP, NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ :GFP o NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ :GFP sobre plántulas de 2 semanas crecidas asépticamente en medio MS 0.5X con 1% de sacarosa. La expresión de la proteína fue observada por microscopía confocal una semana después de la transformación.

#### **V.7. Cuantificación de la proteína total**

La concentración de proteína en todos los experimentos se determinó utilizando la técnica de Bradford (1976) con albúmina de suero de bovino (BSA) como patrón.

## V.8. Ensayo para la actividad de las tiorredoxinas

Con el objetivo de comparar la actividad de reductasa de la NaTrxh recombinante con la de la Trx recombinante de *E. coli* (Sigma), se utilizó el método espectrofotométrico específico para tiorredoxinas (Holmgren, 1979). Este ensayo consiste en medir la turbidez del medio por la precipitación de la cadena B de la insulina al liberarse de la cadena A por la reducción de los puentes disulfuro que las unen. Dicha reducción es catalizada por la Trx utilizando como donador de electrones al ditioneitol (DTT).

Para este ensayo de actividad, en cada celda se colocaron 500  $\mu$ l de insulina a una concentración de 1 mg/ml (partiendo de una solución a 10 mg/ml preparada como se indica en el apéndice) disuelta en  $K_2PO_4$  0.1 M, pH 7.0 y EDTA 2 mM, pH 8.0. A cada muestra se le agregaron 2.5  $\mu$ g de la NaTrxh recombinante o de la Trx recombinante de *E. coli* disueltas en un volumen final de 100  $\mu$ l con  $K_2PO_4$  0.1 M, pH 7.0 y EDTA 2 mM, pH 8.0. Para empezar la reacción, se les agregó 10  $\mu$ l de DTT 100 mM.

## V.9. Sistema de tiorredoxina NADPH/NTR/Trx, aplicado a la NaTrxh *in vitro*

Las Trx tipo *h* son reducidas por la tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (NTR), a diferencia de las de cloroplasto (Trx *m*, *f* y *x*) que son reducidas por la tiorredoxina reductasa dependiente de ferredoxina (FTR). Para demostrar que la NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h*, se incubaron por separado 2.5  $\mu$ g de NaTrxh recombinante y 2.5  $\mu$ g de Trx recombinante de *E. coli* diluidas en 100  $\mu$ l de Tris-HCl 50 mM, pH 7.9, con 2.0  $\mu$ g de NTR recombinante de *E. coli* (Sigma) y 0.125  $\mu$ mol de NADPH (Sigma), dejando la reacción a 37°C por diferentes tiempos. Después, a cada reacción se le agregó 0.2  $\mu$ mol de monobromobimano (mBBBr) en 10  $\mu$ l de acetonitrilo. La solución se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Finalmente, las proteínas se hirvieron por 5 min en amortiguador de muestra con SDS, libre de agentes reductores, separadas por SDS-PAGE en

gradiente de concentración del 10 al 20% y visualizadas bajo luz UV (Fluor-S, Fuji Corp.).

#### **V.10. Producción y semipurificación de anticuerpos policlonales en contra de la NaTrxh**

La NaTrxh recombinante fue acoplada a hemocianina (Sigma) y utilizó el adyuvante completo de Freund (Sigma), asegurando así el carácter inmunogénico en el conejo. El protocolo fue el siguiente:

- a) Disolver 2 mg de hemocianina en 800  $\mu$ l de agua desionizada estéril.
- b) Adicionar 200  $\mu$ l de amortiguador salino de fosfatos (PBS).
- c) Agregar a la solución 100  $\mu$ l de glutaraldehido en solución acuosa al 25% diluido en PBS en una proporción de 1:10.
- d) Incubar a temperatura ambiente con rotación continua por 12 h.
- e) Utilizando un tubo centricón-30 (Millipore), eliminar el exceso de glutaraldehido centrifugando a 480 g durante 30 min. Agregar 500  $\mu$ l PBS y repetir la centrifugación. Recuperar la solución que contiene a la hemocianina.
- f) A la solución con hemocianina, adicionar 400  $\mu$ g de NaTrxh recombinante diluida en PBS.
- g) Incubar a temperatura ambiente con rotación continua por 12 h.
- h) Adicionar en proporción 1:1 el adyuvante completo de Freund.
- i) Inmunizar a los conejos por inyección subcutánea (1 vez a la semana).

A la quinta semana, se obtuvieron 60 ml de sangre del conejo por punción cardiaca. El suero fue separado dejando coagular la sangre a 4°C por 1 a 2 h y se procedió como a continuación se describe:

- a) Centrifugar a 4,000 g 10 min a 4°C.
- b) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y medir el volumen.



- c) Adicionar 0.5 volumen de solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.3 lentamente sobre el suero en agitación continua con ayuda de una barra magnética.
- d) Incubar a  $4^\circ\text{C}$  por 12 h.
- e) Centrifugar a 4,000 g 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio.
- f) Agregar el mismo volumen de la solución de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 7.3 que se usó en el tercer paso de la misma manera.
- g) Incubar a  $4^\circ\text{C}$  por 12 h.
- h) Centrifugar a 4,000 g 30 min a  $4^\circ\text{C}$ . Desechar el sobrenadante.
- i) Resuspender el botón en PBS utilizando 0.1 volumen de suero inicial.

#### **V.11. Fabricación de una columna con la NaTrxh recombinante unida covalentemente**

Como el suero semipurificado por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  contenía anticuerpos que reaccionaron con proteínas de distinta masa molecular del esperado para la NaTrxh nativa, se unió covalentemente a la NaTrxh recombinante a una matriz inerte (Affi-Gel-10, BioRad) para posteriormente purificar los anticuerpos por cromatografía de afinidad.

Por otro lado, también se requirió evaluar la posible interacción entre la S-RNasa y la NaTrxh. Esta columna también sirvió para los ensayos tipo *pull down* que posteriormente se describirán.

El procedimiento para fabricar la columna Affi-Gel-NaTrxh fue el siguiente:

- a) Purificar NaTrxh recombinante siguiendo la metodología previamente descrita (Juárez-Díaz, 2002) a partir de 6 l de cultivo.
- b) Lavar 1 ml de Affi-Gel (Bio-Rad) con agua desionizada fría.
- c) Mezclar la resina con 27 mg de NaTrxh recombinante diluidos en 3 ml de PBS.
- d) Incubar con rotación continua a  $4^\circ\text{C}$  por 12 h.

- e) Lavar la columna con 10 ml de PBS.
- f) Lavar con una solución de glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6 y bloquear los grupos ésteres que hayan podido quedar activos incubando la resina con 2 ml de etanolamina 1 M por 1 h a temperatura ambiente.
- g) Transferir la matriz a una columna y lavar extensivamente para quitar reactivos no unidos.
- h) Medir la eficiencia de unión comparando la cantidad de proteína no unida con la que se aplicó inicialmente.

### **V.12. Fabricación de una columna bloqueada con BSA o con glicina**

Se estudió la interacción proteína-proteína entre la S-RNasa y la NaTrxh utilizando la columna Affi-Gel-NaTrxh. Como control de esta interacción se utilizaron dos columnas: una con BSA unida covalentemente a la columna (Affi-Gel-BSA) y otra con los grupos activos de la resina bloqueados con glicina (Affi-Gel-Gly). Para ambas columnas se utilizó Affi-Gel-15 (Bio-Rad).

Para la columna Affi-Gel-BSA se utilizaron 20 mg de BSA por mililitro de resina en MOPS 0.1 M, pH 7.5 dejando incubar a la resina toda la noche con la proteína y, finalmente, los grupos que pudieron permanecer activos fueron bloqueados con glicina 1.0 M, pH 8.0. Para la columna Affi-Gel-Gly se incubó 1 ml de la resina por toda la noche con una solución de glicina 1.0 M, pH 8.0.

### **V.13. Purificación de los anticuerpos policlonales contra la NaTrxh recombinante**

El suero parcialmente purificado por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fue dializado contra PBS a 4°C por 12 h, realizando un cambio a las 6 h. La purificación de los anticuerpos policlonales contra la NaTrxh recombinante se hizo de la siguiente manera:

- a) Equilibrar la columna Affi-Gel-NaTrxh con 5 lavados de 5 ml PBS cada uno.
- b) Cargar el suero dializado a la columna e incubar con rotación continua por 1 h a temperatura ambiente.
- c) Lavar la columna con PBS hasta que la  $A_{280}$  sea de 0.0.
- d) Adicionar 1 ml de glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6, para la elución de los anticuerpos unidos. Recibir el eluato en 200  $\mu$ l de Tris 1 M para neutralizar la solución con los anticuerpos.
- e) Repetir el paso anterior 9 veces y medir la absorbancia a 280 nm de cada fracción.
- f) Juntar las fracciones en las que se haya obtenido una  $A_{280}$  que indique la presencia de proteína, concentrar por liofilización y resuspender con 0.1 volúmenes del volumen total de las fracciones unidas de PBS.

#### **V.14. Extractos de proteína total de *N. alata***

Los estilos (con estigma), anteras, ovarios, sépalos, pétalos y hojas jóvenes fueron congelados con nitrógeno líquido y triturados con pistilo en un mortero para finalmente ser homogenizados en NaCl 50 mM, acetato de sodio 50 mM, pH 5.0 y 2-mercaptoetanol al 1% (v/v). Posteriormente, el homogenizado se centrifuga a 20,800 g por 30 min a 4°C para separar cuidadosamente y utilizar la fase soluble de cada extracto. Finalmente, los extractos se almacenaron a -80°C hasta su uso.

#### **V.15. Extracción secuencial de las proteínas de estilos de *N. alata***

Para este propósito se siguió la metodología propuesta por Wu *et al.* (2000) con ciertas modificaciones:

- a) Disectar manualmente los estilos (con estigma) y sumergirlos en una solución de Tris·HCl 100 mM, pH 8.0,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  2 mM, en una proporción de

15 mg (tejido):200µl de amortiguador, durante 2.5 h a 4°C agitando con vortex ocasionalmente.

- b) Recuperar el sobrenadante y clarificarlo centrifugando a 20,800 rpm por 35 min a 4°C (fracción de proteínas solubles de matriz extracelular).
- c) Lavar a los estilos con el mismo amortiguador del primer paso y desechar la solución.
- d) Sumergir los mismos estilos utilizando la misma proporción antes mencionada en Tris·HCl 40 mM, pH 8.0, NaCl 400 mM, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2 mM por 2.5 h a 4°C agitando ocasionalmente con vortex.
- e) Recuperar el sobrenadante y clarificarlo centrifugando a 14,000 rpm por 35 min a 4°C (fracción de proteínas de matriz extracelular asociadas a la pared celular).
- f) Lavar con el mismo amortiguador del cuarto paso y desechar la solución.
- g) Congelar los mismos estilos con nitrógeno líquido y tritularlos hasta obtener un polvo fino para finalmente homogenizarlo con NaCl 400 mM, Tris·HCl 40 mM, pH 8.0, tritón X-100 al 1%, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 2 mM (utilizando la misma proporción tejido:amortiguador antes mencionada).
- h) Centrifugar a 20,800 rpm por 35 min a 4°C y recuperar el sobrenadante (fracción intracelular).

Con el fin de aumentar la concentración de proteína total de cada fracción, los extractos fueron liofilizados, resuspendidos en agua desionizada y dializados contra Tris·HCl 50 mM, pH 7.9.

## **V.16. Inmunodetección de las diferentes proteínas**

Para estos ensayos, las proteínas aisladas de los tejidos de *N. alata* (y en algunos casos de *N. tabacum*, *N. plumbaginifolia*, *N. bonarensis*, *N. forgetiana* y *N. longiflora*) fueron separadas por SDS-PAGE al 12.5% y luego electrotransferidas a

una membrana de nitrocelulosa por 50 min a 75 mA en un sistema semihúmedo. La metodología para la inmunodetección fue la siguiente:

- a) Bloquear la membrana sumergiéndola en leche descremada al 5% disuelta en PBS con Tween-20 al 0.1% por un mínimo de 2 h a temperatura ambiente.
- b) Desechar la solución anterior y agregar el anticuerpo primario diluido adecuadamente en solución de bloqueo fresca.
  - Anti-S<sub>105</sub>-RNasa: 1:10,000.
  - Anti-NaTTS (PRP4): 1:6,000.
  - Anti-NaTrxh: 1:1000.
- c) Incubar por 3 h a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C con agitación suave constante.
- d) Desechar la solución y hacer un lavado con PBS de 5 min y otro de 10 min.
  - En el caso de la inmunodetección de la S<sub>105</sub>-RNasa, el segundo lavado se realizó con PBS más NaCl 0.25 M.
- e) Agregar la solución del primer paso con el anticuerpo secundario (anticonejo) acoplado a peroxidasa o fosfatasa alcalina.
- f) Incubar con agitación constante por 1 – 2 h a temperatura ambiente.
- g) Hacer tres lavados con PBS de 10 min cada uno.
  - Si el anticuerpo secundario está acoplado a la fosfatasa alcalina, entonces es necesario realizar un lavado extra con NaCl al 0.58% y MgCl<sub>2</sub> al 0.1% en Tris·HCl 100 mM, pH 9.0.
- h) Revelar con 10 ml de Tris·HCl 100 mM, pH 8.5 conteniendo 25 µl de ácido 4-hidroxicinámico en dimetil sulfóxido (DMSO), 50 µl de luminol en DMSO y 17 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 2%, en el caso de que el anticuerpo secundario esté acoplado a peroxidasa. Si está acoplado a la fosfatasa alcalina, entonces se usan 100 µl de cloruro de nitrotetrazolio azul (nBT) (33 mg/ml en DMSO al 70%) y 100 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (17 mg/ml en DMSO) en una solución de NaCl al 0.58% y MgCl<sub>2</sub> al 0.1% en Tris·HCl 100 mM, pH 9.0.

### V.17. Ensayos de colocalización de la NaTrxh y de la S<sub>C10</sub>-RNasa en los estilos de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>

El protocolo para los ensayos de colocalización fue el siguiente:

- a) Al cosechar los estilos de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> cortarlos en tres secciones (parte inferior, media y superior) e inmediatamente fijarlos en formaldehído al 4% en PBS por 2 h a 4°C.
- b) Deshidratar las muestras sumergiéndolas en concentraciones de etanol al 50, 70, 85, 96 y 100% (dos veces en esta última) por 30 min en cada una.
- c) Embeber las muestras con una solución de xilol:parafina (Paraplast Plus, Polysciences) en proporción 1:1. Luego, embeber en Paraplast Plus puro. Ambos pasos se realizan a 55°C.
- d) Realizar cortes transversales con un grosor de 6 – 7 µm.
- e) Eliminar la parafina sumergiendo los portaobjetos en solución Slide Brite a temperatura ambiente.
- f) Hidratar las muestras sumergiéndolas en concentraciones decrecientes de etanol (100, 96, 85 y 70%) por 10 min en cada una. Finalmente, sumergir las muestras en PBS por 10 min dos veces.
- g) Bloquear las secciones con la solución de bloqueo (BSA al 3.0%, azida de sodio al 0.01% y Tritón X-100 al 0.1% en PBS) por 4 h a 4°C.
- h) Desechar la solución de bloqueo.
- i) Incubar simultáneamente las secciones con los anticuerpos primarios (anti-NaTrxh de conejo y anti-S<sub>C10</sub>-RNasa de ratón) a 4°C por toda la noche.
  - Para el ensayo de competencia, previo a este paso, los anticuerpos primarios se incuban con 100 µg de la NaTrxh recombinante pura a temperatura ambiente. La solución completa se utiliza para aplicarla sobre los cortes.
- j) Realizar lavados con PBS.
- k) Incubar simultáneamente con los anticuerpos secundarios [anti-conejo con el fluorocromo Alexa 568 acoplado (rojo) y anti-ratón acoplado al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) (verde)].

- l) Lavar con PBS.
- m) Las muestras se montan en medio de montaje para fluorescencia (Dako) y pueden ser observadas bajo el microscopio confocal de fluorescencia.

#### **V.18. Reducción *in vitro* de las proteínas de los estilos de *N. alata***

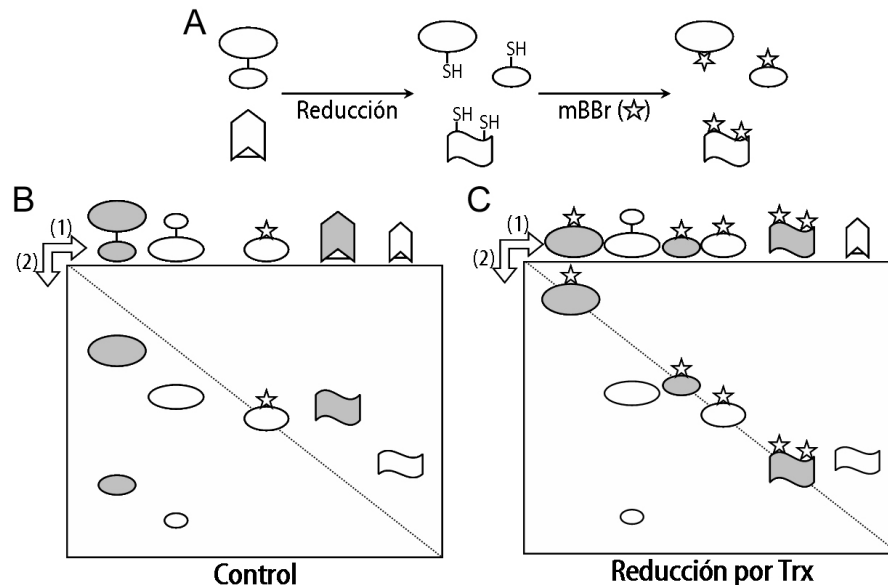
Los extractos proteicos que se utilizaron para estos ensayos fueron obtenidos sin 2-mercaptoetanol (extractos de proteína total) o sin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (fracción soluble de la matriz extracelular). La estrategia consistió en incubar 50 µg de proteína a 37°C bajo las siguientes condiciones por 3 h en un volumen final de 100 µl de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9:

1. Control (sin agentes reductores).
2. DTT (100 mM).
3. 2.5 µg NaTrxh recombinante + 2.0 µg NTR recombinante de *E. coli* + 0.125 µmol NADPH.

#### **V.19. Identificación de las proteínas blanco de la NaTrxh en estilos de *N. alata* con el sistema de electroforesis en dos dimensiones (no reductora/reductora)**

Con los extractos totales o solubles de matriz extracelular de estilos de *N. alata* sin reducir, reducidos con DTT o con el sistema Trx, se siguió la estrategia propuesta por Yano *et al.* (2001). Esta estrategia consiste en marcar a los grupos tiol con mBBBr, el cual es una sonda fluorescente que se une a los grupos sulfhidrilo. Posteriormente, las proteínas son separadas electroforéticamente en dos dimensiones. Al utilizar condiciones no reductora/reductora se revela la especificidad de la tiorredoxina en la reducción de puentes disulfuro intramoleculares contra intermoleculares, ya que en la segunda dimensión se localizan en una diagonal sobre el gel, además de que fluorescentemen por el

mBBr, mientras que en un control (sin tratamiento reductor previo a la primera dimensión), las proteínas que formen puentes disulfuro intracatenarios quedan sobre la diagonal y las otras debajo de ésta (Figura 16).



**Figura 16.** Identificación de proteínas blanco para la Trx (Yano *et al.*, 2001). **A.** Los puentes disulfuro de las proteínas de un extracto son reducidos por DTT o por el sistema NADPH/NTR/Trx. Los grupos sulfhidrilo fluorescen por el monobromobimano (mBBr). **B** y **C.** Las proteínas son separadas por SDS-PAGE en dos dimensiones, la primera (1) bajo condiciones no reductoras y la segunda (2) bajo condiciones reductoras. **B.** Para el control, las proteínas no son reducidas por DTT ni por el sistema NADPH/NTR/Trx, por lo que las proteínas que formen puentes disulfuro intercatenarios quedarán debajo de la diagonal, mientras que las que tengan puentes disulfuro intracatenarios quedarán encima de ésta. **C.** Si las proteínas son reducidas antes de la primera dimensión electroforética, migrarán la misma distancia en ambas dimensiones, por lo que quedarán sobre una diagonal y además estarán marcadas fluorescentemente. Las proteínas sombreadas son proteínas blanco de la tiorredoxina. Este esquema muestra lo que se espera al reducir a las proteínas con el sistema NADPH/NTR/Trx. Las proteínas sombreadas son proteínas blanco de la tiorredoxina.

Una vez tratados los extractos se siguió la metodología para el sistema de electroforesis en dos dimensiones:

- a) Adicionar a la solución de proteínas 0.2  $\mu\text{mol}$  mBBr en 10  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo e incubar con rotación continua por 20 min a temperatura ambiente.
- b) Disolver con amortiguador de muestra libre de agentes reductores y realizar la primera dimensión electroforética.

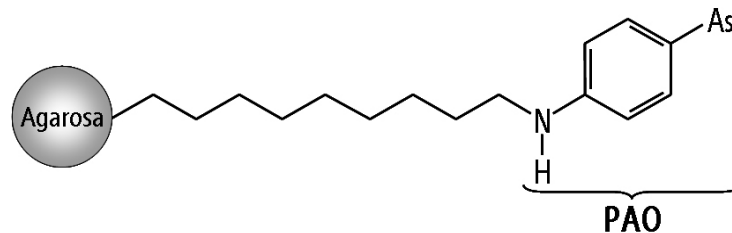


- c) Una vez terminada la electroforesis, cortar el carril y sumergirlo en amortiguador de muestra con 2-mercaptoetanol al 5% por 20 min a temperatura ambiente.
- d) Colocar el carril sobre otro gel de poliacrilamida y realizar la segunda dimensión electroforética.

Visualizar a las proteínas marcadas bajo luz UV (Fluor-S, Fuji Corp.) y finalmente teñirlas con azul brillante de Coomassie.

### V.20. Identificación de algunas proteínas blanco de la NaTrxh en los estilos de *N. alata* por cromatografía de afinidad

Con el fin de contar con más evidencia acerca de las proteínas blanco de la NaTrxh en *N. alata*, se decidió utilizar una resina (ThioBond, Invitrogen) que cuenta con el grupo 4-aminofenilarsinóxido (PAO) unido a agarosa como soporte (Figura 17) para realizar un análisis cromatográfico por afinidad.



**Figura 17.** Esquema de la resina Thiobond (Invitrogen) que contiene al grupo 4-aminofenilarsinóxido (PAO) unido a agarosa por un espaciador de 10 átomos de carbono. Los átomos de azufre de los grupos tiol vecinos de alguna proteína con puentes disulfuro reducidos se unen covalentemente al arsénico del grupo PAO. Este enlace puede romperse aumentando la concentración de 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) y así se eluyen a las proteínas unidas.

Para que las proteínas con grupos tiol vecinos puedan unirse a la columna con el grupo PAO (Kalef *et al.*, 1993), ésta debe activarse de la siguiente manera:

- a) Tomar el volumen necesario de resina, dejar que se asiente por gravedad y decantar cuidadosamente.

- b) Resuspender con cuatro volúmenes cama de amortiguador (Tris·HCl 50 mM, pH 7.9) con 2-mercaptoetanol 20 mM. Dejar que se asiente por gravedad y decantar.
- c) Repetir el paso anterior, pero ahora dejar incubar la resina en el amortiguador con rotación continua por 1 h a temperatura ambiente. Dejar que se asiente y decantar.
- d) Lavar tres veces con cuatro volúmenes de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9.

Una vez activada la resina, se puede hacer la cromatografía. Para estos experimentos se usó proteína de la fracción soluble de la matriz extracelular de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> (obtenida sin Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) en Tris·HCl 50 mM, pH 7.9. Los tratamientos previos a la cromatografía fueron los siguientes:

- a) Sin tratamiento reductor.
- b) Reducción con 2-mercaptoetanol 20 mM.
- c) Reducción con 2.5 µg NaTrxh recombinante + 2.0 µg NTR recombinante de *E. coli* + 0.125 µmol NADPH.

Las muestras fueron incubadas por 4 h a 37°C en un volumen final de 200 µl, utilizando 100 µg de proteína. Al finalizar las incubaciones, cada fracción fue aplicada a 70 µl de volumen cama de resina activada y se procedió con la siguiente metodología:

- a) Incubar con rotación continua a 4°C por 1 h.
- b) Dejar que la resina se asiente por gravedad y separar la fracción no unida por decantación.
- c) Lavar dos veces con cuatro volúmenes cama de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 con 2-mercaptoetanol 1 mM, dejando que la resina se asiente entre cada lavado para poder decantar.
- d) Lavar la resina más astringentemente con tres volúmenes cama de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 con 2-mercaptoetanol 5 mM cinco veces, recuperando por separado cada fracción.

- e) Eluir a las proteínas fuertemente unidas aplicando tres volúmenes cama de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 con 2-mercaptoetanol 0.5 M tres veces, recuperando por separado cada fracción.
- f) Liofilizar todas las fracciones, disolverlas con amortiguador de muestra con DTT y hervir por 5 min (en un volumen suficiente para realizar el SDS-PAGE por duplicado).
  - Uno de los geles se usó para teñir a las proteínas con nitrato de plata.
  - El segundo gel se utilizó para el análisis por Western-blot; en este caso no se aplicó la fracción no unida.

#### **V.21. Interacción proteína-proteína por cromatografía de afinidad**

Para demostrar que la NaTrxh interacciona con la S-RNasa, se utilizó un extracto de proteínas de estilo de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> homogeneizando el tejido en Tris·HCl 50 mM, pH 7.9. Por la columna Affi-Gel-NaTrxh fue pasado 1 mg de proteína total de dicho extracto. Después de obtener la fracción no unida, la columna se lavó 10 veces con dos volúmenes cama cada vez de Tris·HCl 50 mM, pH 7.9. Posteriormente, la columna se lavó secuencialmente de la siguiente manera:

- a) Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 + Tween X-100 al 1%.
- b) Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 + NaCl 0.1 M.
- c) Tris·HCl 50 mM, pH 7.9 + NaCl 0.2 M.

Para eluir las proteínas que interaccionan fuertemente con la NaTrxh fue necesario lavar la columna con una solución de glicina 50 mM, pH 2.6 + NaCl 50 mM. Las muestras se neutralizaron adicionando 1/5 volumen de Tris 1M. Finalmente, las fracciones se concentraron por precipitación con acetona fría a -20°C y analizadas por SDS-PAGE al 12.5%. Los geles fueron transferidos a

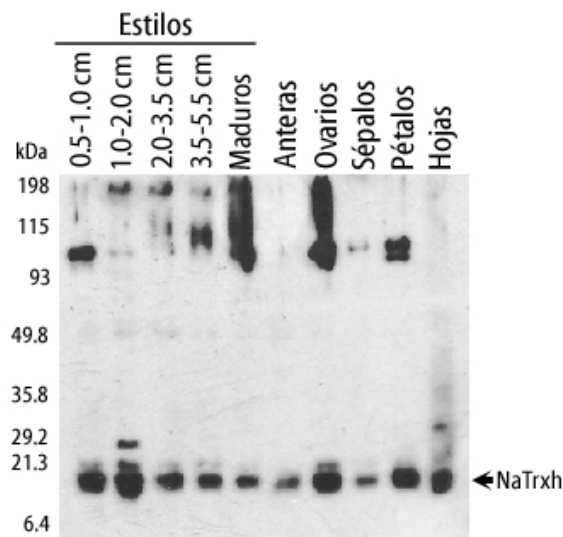
membrana de nitrocelulosa para inmunodetectar a la S-RNasa y/o a la proteína 120K.

Como control para la interacción proteína-proteína se pasó 1 mg de proteína total proveniente de estilos, en Tris-HCl 50 mM, pH 7.9, por las columnas Affi-Gel-BSA y Affi-Gel-Gly. Se hicieron los mismos lavados y eluciones que con la columna Affi-Gel-NaTrxh; ninguna proteína estilar se retuvo en estas columnas control.

## VI. RESULTADOS

### VI.1. El patrón de expresión de la NaTrxh en los distintos órganos de *N. alata*

Para conocer el patrón de expresión de la proteína NaTrxh en los distintos órganos de *N. alata*, se prepararon extractos de proteína total de los estilos (en diferentes fases de desarrollo), las anteras, los ovarios, los sépalos, los pétalos (flores en antesis) y de las hojas jóvenes. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE al 12.5% y analizadas por réplica en Western. Para la inmunodetección se utilizó el suero con los anticuerpos con la NaTrxh recombinante semipurificados por precipitación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 18).



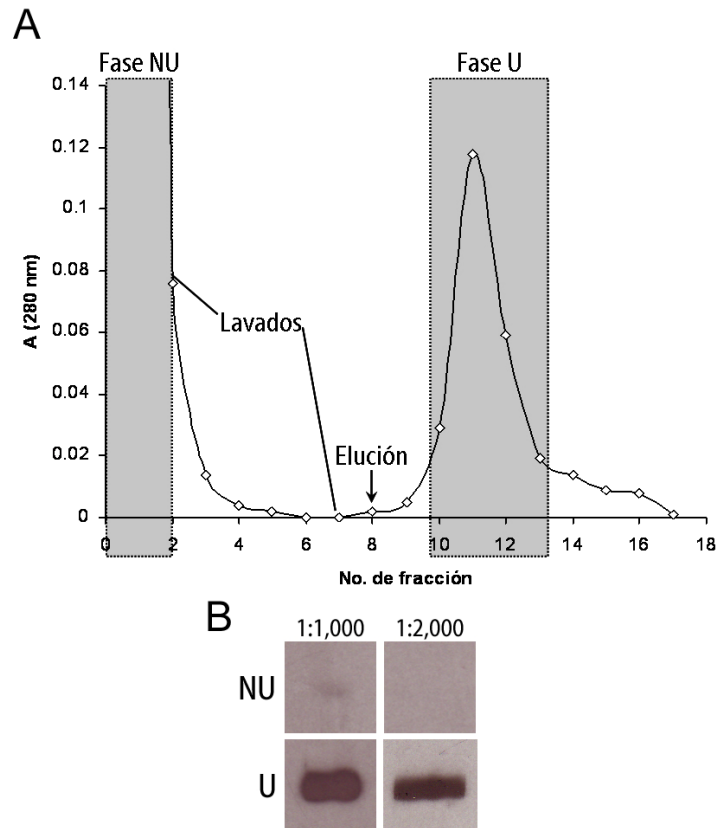
**Figura 18.** Inmunodetección de la NaTrxh en los extractos de proteína total de los distintos órganos de *N. alata* BT, utilizando los anticuerpos policlonales contra la NaTrxh.

Los resultados de este inmunoanálisis demostraron que los anticuerpos contra la NaTrxh presentan reacción cruzada con especies proteicas cuya masa molecular oscila entre los 95 y ~200 kDa, así como con proteínas de baja masa molecular. Dentro de estas últimas, se inmunodetectó principalmente a una proteína de masa similar que la de la NaTrxh en todos los extractos analizados (Figura 18). Sin embargo, también se detectaron otras proteínas de masa

molecular por debajo de la NaTrxh. La expresión de la banda que coincide con la NaTrxh es ubicua, como el que se ha reportado para las tiorredoxinas.

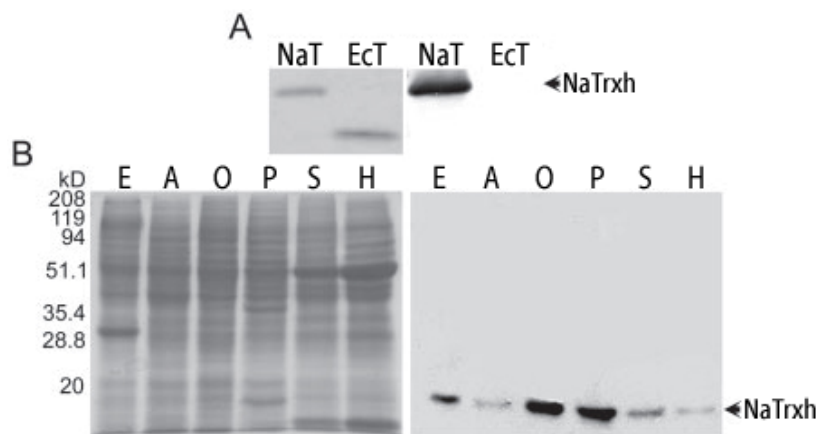
Para eliminar a las inmunoglobulinas del suero anti-NaTrxh que generaban la reacción cruzada con otras proteínas de *N. alata* y evaluar específicamente el patrón de expresión de la NaTrxh, se purificó el suero anti-NaTrxh por cromatografía de afinidad. Para esto, se sobreexpresó a la NaTrxh fusionada a GST que está contenida en el vector pGEX-4T2 en células de *E. coli*. Después de la purificación por cromatografía de afinidad y la escisión de NaTrxh de GST (Juárez-Díaz, 2002), se recuperaron 30 mg de NaTrxh recombinante con un alto grado de pureza. La proteína pura fue unida covalentemente a una matriz inerte (Affi-Gel) y así se generó una columna de afinidad (Affi-Gel-NaTrxh). El porcentaje de unión fue del 65% aproximadamente, por lo que en 1 ml de resina se fijaron 16.06 mg de NaTrxh recombinante.

El suero anti-NaTrxh fue dializado contra PBS y pasado por la columna Affi-Gel-NaTrxh. Después de lavar la columna hasta obtener una  $A_{280}$  de 0.0 (fracción 7, Figura 19A), se procedió a la elución de las proteínas unidas fuertemente aplicando una solución de glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6 (fracción 8, Figura 19A). Las fracciones que contenían una mayor cantidad de proteína (fracciones 10 a 13, Figura 19A) se mezclaron y se consideraron como la fase unida a la columna. Tanto la fase no unida (primeras dos fracciones, Figura 19A), como la unida a la columna fueron concentradas por liofilización y resuspendidas en PBS utilizando la misma proporción de volumen inicial a volumen de resuspensión para evaluar su capacidad de inmunodetectar a la NaTrxh recombinante. En la figura 19B se observa que sólo la fracción unida se enriqueció con los anticuerpos anti-NaTrxh.



**Figura 19.** Purificación del suero anti-NaTrxh. **A.** Análisis por absorbancia (280 nm) de las fracciones obtenidas de la purificación del suero por cromatografía de afinidad utilizando la columna Affi-Gel-NaTrxh. Los lavados se hicieron agregando PBS a la columna (fracciones 1 a 7), mientras que la elución se efectuó con glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6 (a partir de la fracción 8). Los recuadros indican las fracciones que fueron mezcladas y consideradas como la fase no unida (NU) y la unida (U) a la columna, respectivamente. **B.** Análisis por Western-blot de la fase no unida a la columna (NU) y la unida a ésta (U) de su capacidad de inmunodetectar 1  $\mu$ g de la NaTrxh recombinante utilizando títulos de 1:1,000 y 1:2,000, como se indica.

El suero purificado anti-NaTrxh con las proteínas recombinantes NaTrxh y Trx de *E. coli* detectaba específicamente a la NaTrxh recombinante (Figura 20A). Al repetir el inmunoanálisis en distintos órganos de *N. alata*, sólo se inmunodetectó a la banda de 16 kDa que coincide con la masa molecular teórica de la NaTrxh (Figura 20B). Por lo tanto, se puede concluir que la NaTrxh se expresa en todos los órganos de la planta, pero sobre todo se encuentra en los estilos maduros, coincidiendo temporalmente con las proteínas involucradas en las interacciones polen-pistilo.



**Figura 20.** Inmunodetección de la NaTrxh utilizando los anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad. **A.** Los anticuerpos sólo reconocen a la NaTrxh recombinante (NaT) y no a la Trx recombinante de *E. coli* (EcT). **B.** Patrón de expresión de NaTrxh en estilos maduros (E), anteras (A), ovarios (O), pétalos (P), sépalos (S) y hojas (H) de *N. alata* utilizando los anticuerpos contra NaTrxh recombinante purificados por cromatografía de afinidad. A la izquierda de cada membrana se presenta el gel teñido con azul de Coomassie correspondiente.

## VI.2. La NaTrxh se expresa preferentemente en las especies autoincompatibles de *Nicotiana*

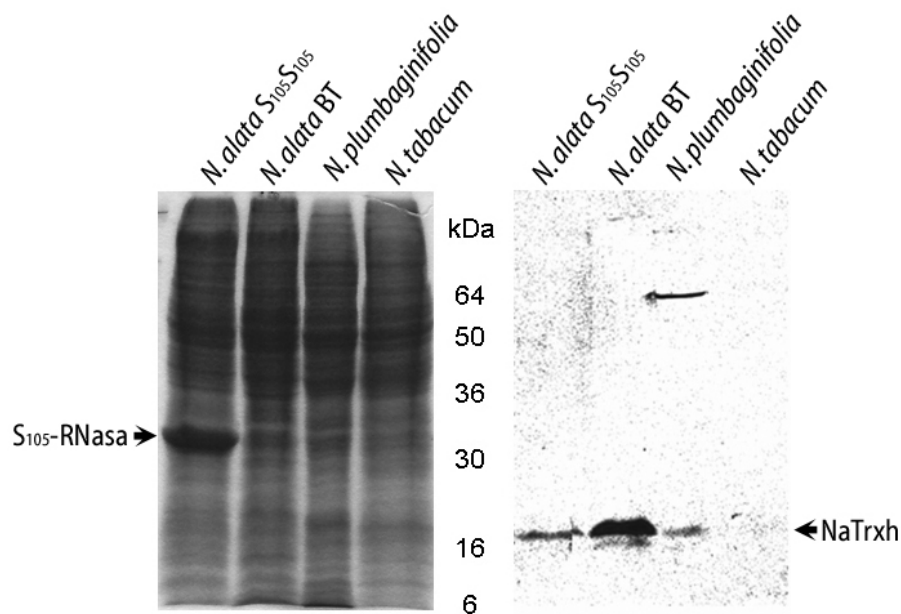
El cDNA AFLP-25F fue aislado por su expresión diferencial entre estilos de *N. alata* BT y *N. plumbaginifolia* a nivel de mRNA (Figura 10), por lo que fue necesario demostrar que este patrón se reproducía a nivel de proteína.

El patrón de expresión a nivel de proteína se evaluó por inmunodetección de la NaTrxh utilizando extractos de proteína total de estilos de de *N. alata* Al S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y AC BT, de AC *N. plumbaginifolia* y AC *N. tabacum*. En la Figura 21 se demuestra que la expresión de *NaTrxh* no sólo es mayor a nivel de mRNA (Figura 10) sino también a nivel de proteína en estilos de *N. alata* que de *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*.

La diferencia de expresión a nivel de proteína de *NaTrxh* no es tan pronunciada cuando se comparan los estilos de *N. plumbaginifolia* con los estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. De hecho, también existe una aparente diferencia entre los estilos de los dos genotipos de *N. alata* (Figura 21). Esta diferencia posiblemente se debe a que cuando se normalizan las cantidades de proteína total, los extractos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> contienen una proporción muy elevada de S-RNasa con



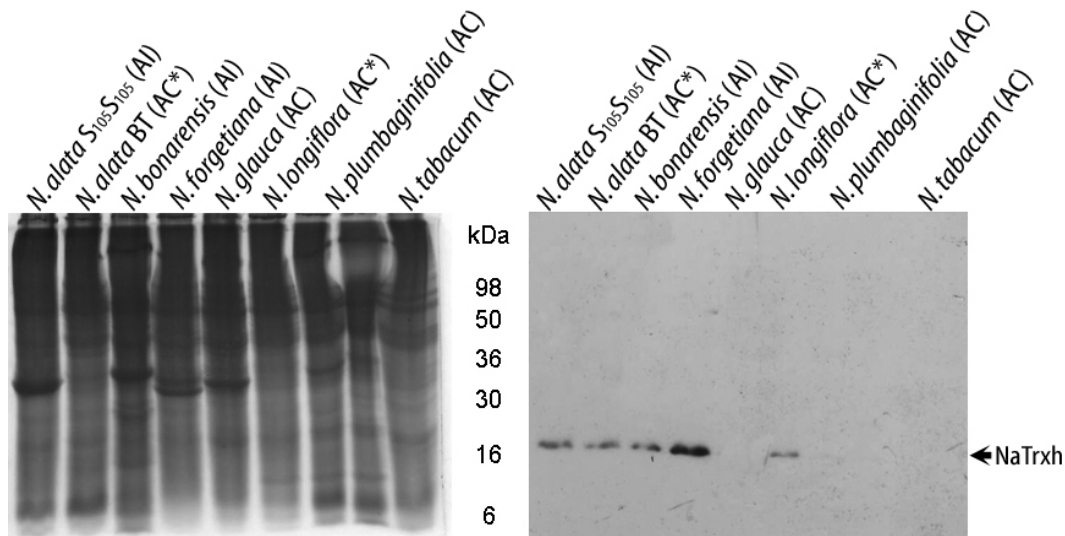
respecto al resto de las proteínas. De esta manera, los extractos de *N. alata* BT, que no expresa ninguna S-RNasa, aparentemente contienen más NaTrxh. Se puede considerar que los niveles reales de la NaTrxh corresponden a un perfil donde las proteínas se encuentran mejor representadas, como se encontró en los extractos de estilos de *N. alata* BT, *N. plumbaginifolia* o *N. tabacum*. Por lo tanto, al comparar los niveles de la NaTrxh entre estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> y *N. plumbaginifolia*, debe considerarse la abundancia relativa de las proteínas al ser normalizadas y cargadas en el gel para su análisis.



**Figura 21.** Inmunodetección de la NaTrxh en los extractos de proteína total (15 µg) de los estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> (AI), de *N. alata* BT (AC), de *N. plumbaginifolia* y de *N. tabacum* (ambas AC), usando el suero purificado anti-NaTrxh. A la izquierda se muestra el gel teñido con azul de Coomassie.

En un análisis más amplio para evaluar la presencia de la NaTrxh en otras especies de *Nicotiana*, se incluyeron a las siguientes especies AI: *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, *N. alata* BT (AC por no expresar S-RNasas), *N. bonariensis*, *N. forgetiana* y *N. longiflora* (cultivar AC por no expresar S-RNasas); y las siguientes AC: *N. glauca*, *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*. Fue interesante observar que los niveles de la NaTrxh son mayores en las especies AI que en las AC (Figura 22). Este resultado apoya la idea de que este gen efectivamente se encuentra involucrado

en el sistema de AI y, por lo tanto, sea un gen modificador que participaría en el rechazo del polen alelo S-específico en *Nicotiana*.

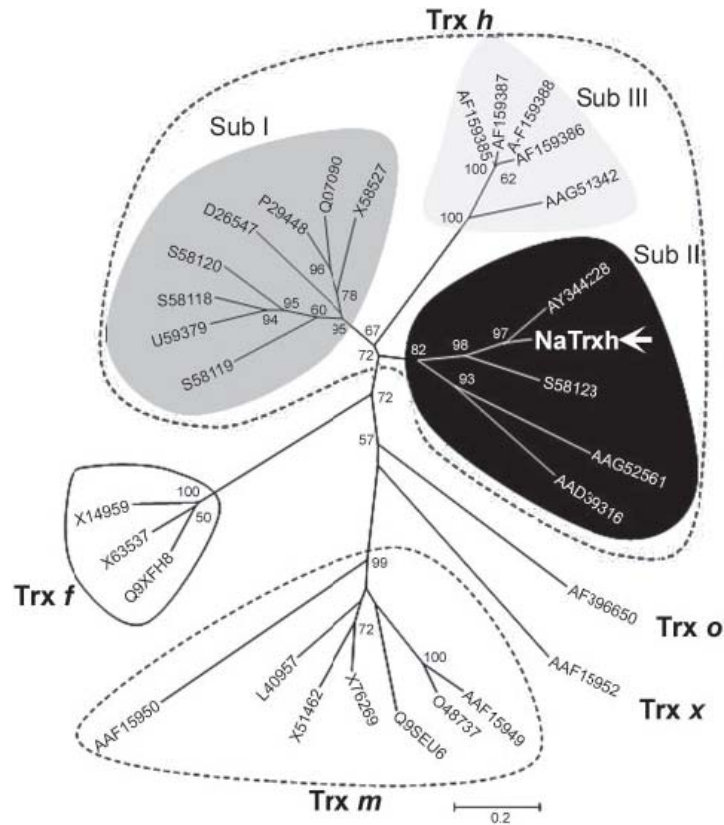


**Figura 22.** Inmnodección de la NaTrxh en los extractos de proteína total de los estilos de algunas especies autoincompatibles (AI): *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, *N. alata* BT (AC\*: compatible por carecer de S-RNasas), *N. bonarensis*, *N. forgetiana* y *N. longiflora* (AC\*: compatible por carecer de S-RNasas) y de algunas especies autocompatibles (AC): *N. glauca*, *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*. Para la inmnodección se utilizó el anticuerpo anti-NaTrxh purificado. A la izquierda se muestra el gel teñido con azul de Coomassie.

### VI.3. La NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h*

Debido a que las Trx forman un grupo muy diverso en las plantas, fue necesario determinar para qué tipo de Trx codificaba *NaTrxh*. Se hizo un análisis filogenético utilizando el método de *neighbor-joining* (Kumar *et al.*, 2001) con diferentes secuencias de aminoácidos de Trx vegetales. El resultado de este análisis filogenético (Figura 23) muestra cinco grupos de tiorredoxinas correspondientes a los tipos específicos (*f*, *m*, *x*, *o* y *h*) y, por lo tanto, a su localización subcelular. Cuatro grupos corresponden a las tiorredoxinas organelares, de los cuales los dos principales son las tiorredoxinas de cloroplasto tipo *m* y las tipo *f*. Por otro lado, se encuentra la tiorredoxina tipo *x* (de cloroplasto) usada en el análisis y en otra rama a la única tiorredoxina mitocondrial hasta ahora identificada de *A. thaliana* (tiorredoxina tipo *o*). El otro grupo principal del análisis corresponde a las Trx tipo *h*. Este grupo se subdivide en tres subgrupos, los

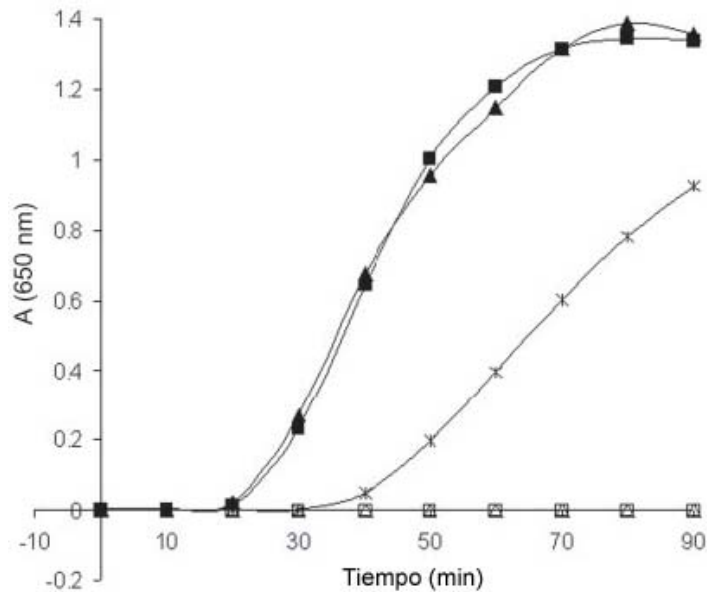
cuales corresponden perfectamente con los descritos por Gelhaye *et al.* (2004a). Dentro de este grupo de Trx se encuentra ubicada la secuencia de la NaTrxh, incluida en el subgrupo II de las Trx h (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis filogenético de las tiorredoxinas vegetales. Cuatro grupos (Trx *f*, Trx *m*, Trx *x* y Trx *o*) corresponden a las tiorredoxinas organelares. El quinto grupo contiene a las tiorredoxinas tipo *h* (Trx *h*). Este último se encuentra dividido en tres subgrupos (Sub I, Sub II y Sub III). La NaTrxh (resaltada y señalada con la flecha) se encuentra dentro del subgrupo II de las Trx *h*.

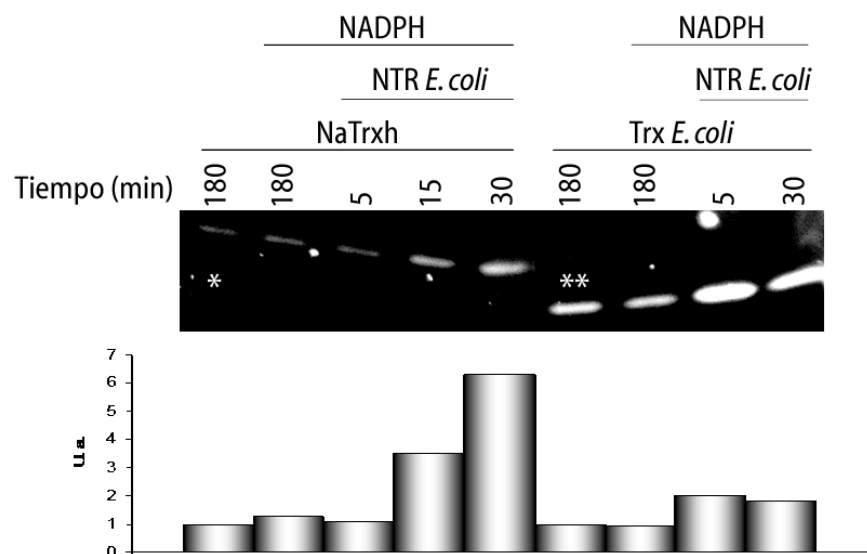
#### VI.4. La NaTrxh recombinante actúa como Trx típica y es reducida con NADPH y con la NTR

Para conocer el papel que desempeña la NaTrxh en eventos de polinización, es necesaria la identificación de sus proteínas blanco. Con este objetivo, se analizó la capacidad de la NaTrxh para reducir los puentes disulfuro de la insulina (Holmgren, 1979) comparándola con la de la tiorredoxina recombinante de *E. coli*. El resultado indica que ambas proteínas cualitativamente presentan un perfil de actividad igual (Figura 24).



**Figura 24.** Actividad de reductasa de la NaTrxh (cuadrados) y de la Trx de *E. coli* (triángulos). Ambas proteínas fueron incubadas con la insulina en presencia (reellenos) o ausencia (vacíos) de DTT como donador de electrones. El ensayo de reducción de la insulina sólo con DTT 0.1 M fue utilizado como control (asteriscos).

En las plantas, el sistema típico reportado para las Trx tanto citoplásmicas como mitocondriales es el sistema NADPH/NTR/Trx. En el caso de las Trx mitocondriales existe una NTR en mitocondria (Laloi *et al.*, 2001); mientras que las Trx h son reducidas por la NTR de citoplasma (Florencio *et al.*, 1988). Sabiendo que la NaTrxh tiene un perfil de actividad típico de Trx (Figura 24), incubando el sistema completo por diferentes tiempos y marcando los grupos sulfhidrilo con mBBr, se demostró que la NaTrxh es reducida por la NTR recombinante de *E. coli* a partir de NADPH (Figura 25). De esta manera, se siguió la estrategia de reducir *in vitro* a las proteínas estilares de *N. alata* utilizando el sistema NADPH/NTR/Trx para identificar a las proteínas blanco de la NaTrxh.



**Figura 25.** Reducción de la NaTrxh recombinante con NADPH y con la NTR recombinante de *E. coli* (NTR *E. coli*). Los electrones únicamente fluyen cuando se encuentra el sistema NADPH/TrxR/Trx completo, lo cual se observa por el aumento en la fluorescencia de los grupos sulfhidrilo en la Trx por el marcaje con mBBr. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de cada una de las muestras. Los datos de fluorescencia de la NaTrxh se normalizaron con respecto al carril marcado con un asterisco, mientras que los de la Trx de *E. coli* con el carril marcado con dos asteriscos. Trx *E. coli*: tiorredoxina recombinante de *E. coli*.

El resultado que se observa en la figura 25 indica que la NaTrxh recibe los electrones del NADPH únicamente cuando está la NTR de por medio. El incremento en la fluorescencia de la NaTrxh es reflejo del aumento de grupos sulfhidrilo, los cuales son producto de la reducción del puente disulfuro ubicado en el sitio activo de la misma Trx. Obtener este resultado es relevante porque a pesar de que la NTR de procariones es muy similar a las de plantas, existen reportes en los que se plantea que una NTR de procariones no reduce a una tiorredoxina de plantas (Meyer *et al.*, 1999). Así, que con estos datos queda demostrado que la NaTrxh es una Trx h y que además, la NaTrxh puede ser reducida por la NTR recombinante de *E. coli* (Figura 25). Esto asegura que la reducción *in vitro* de las proteínas estilares de *N. alata* utilizando el sistema NADPH/NTR/NaTrxh pueda llevarse a cabo.

## **VI.5. Identificación de algunas proteínas blanco con una electroforesis en dos dimensiones SDS-PAGE (no reductora/reductora)**

Para conocer el papel bioquímico de la NaTrxh en el rechazo del polen alelo S-específico, fue primero necesario identificar a sus proteínas blanco, es decir, conocer aquellas proteínas cuyos disulfuro fueran reducidos por la NaTrxh y demostrar que su función pudiera ser regulada por su estado redox.

Para tal propósito se probó el sistema de identificación de proteínas blanco de Trx propuesto por Yano *et al.* (2001), el cual consiste en un sistema de electroforesis desnaturalizante en dos dimensiones. La primera dimensión electroforética se realiza en condiciones no reductoras, es decir, los grupos tiol de las proteínas del extracto crudo son marcados con mBBr y las proteínas desnaturalizadas con amortiguador sin DTT ó 2-mercaptoetanol. Para la segunda dimensión, el carril en el cual fueron separadas las proteínas es cortado del gel, sumergido en amortiguador de muestra con 2-mercaptoetanol (5%) y colocado sobre el segundo gel para su fraccionamiento electroforético.

Las condiciones para la primera dimensión fueron las que variaron y se muestran a continuación:

- a) Sin agentes reductores.
- b) Reducción con DTT.
- c) Reducción con NADPH + NTR + NaTrxh.

La primera condición sirve como control negativo y muestra aquellos grupos sulfhidrilo que no forman puentes disulfuro (*i. e.* alguna cisteína libre) o se mantienen reducidos a pesar de las condiciones oxidantes de la extracción de proteínas. Estas proteínas fluorescerán por el marcaje con mBBr y quedarán sobre una diagonal porque su migración tanto en la primera como en la segunda dimensión debe ser igual; mientras que las proteínas con puentes disulfuro se reducirán en la segunda dimensión y tendrán un patrón de migración diferente en ésta, quedando así fuera de la diagonal. Además, estas proteínas no estarán

marcadas con fluorescencia, ya que el mBBr se aplica antes de realizar la primera dimensión electroforética.

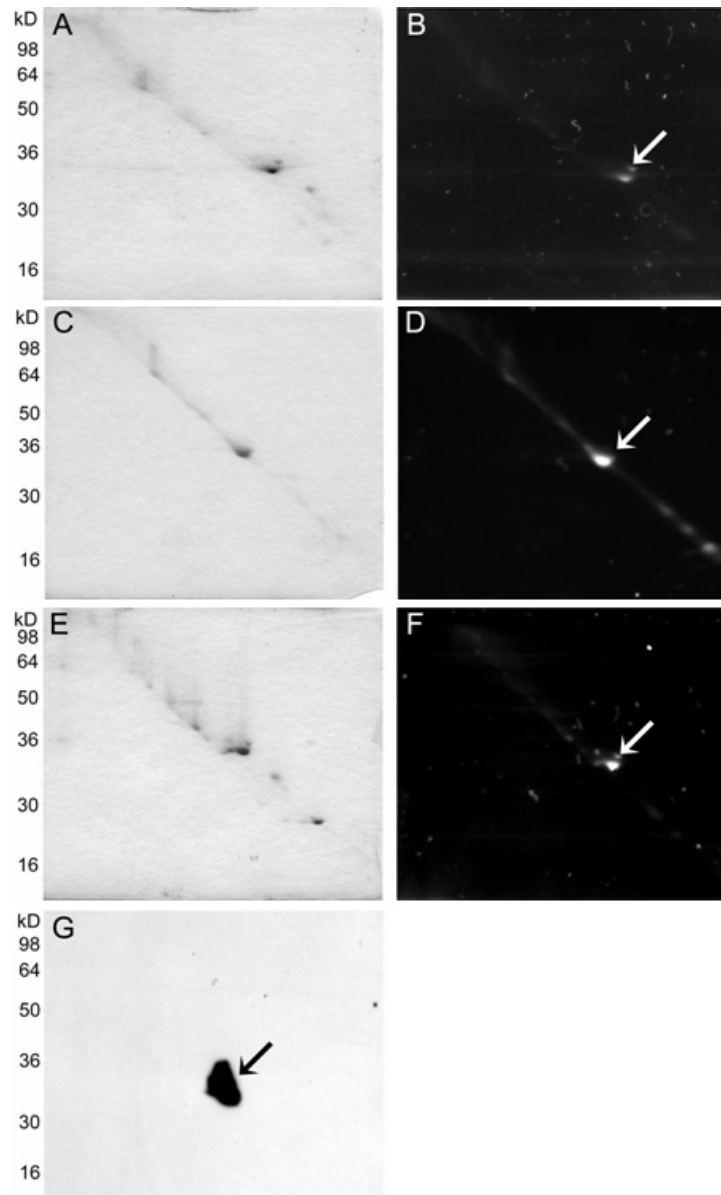
La segunda condición revelará el total de sulfhidrilos marcados, es decir, fluorescen tanto los grupos tiol iniciales libres como aquéllos que fueron producto de la reducción de algún puente disulfuro, quedando todas las proteínas sobre una diagonal. Bajo esta condición, realizando una sustracción de las proteínas con grupos tiol marcados en el control negativo, se hacen evidentes aquellas proteínas cuyos puentes disulfuro podrían ser blanco de la NaTrxh.

Al utilizar el sistema NADPH/NTR/Trx con la NaTrxh recombinante se espera un intermedio entre las dos condiciones anteriores. No se tiene muy claro aún, pero las tiorredoxinas reducen sólo a algunas proteínas, es decir, existe cierta especificidad hacia su proteína blanco. Por lo tanto, se tendrían proteínas tanto dentro como fuera de la diagonal, un marcaje fluorescente mayor al control negativo pero menor (o menos generalizado) que en el caso del control positivo.

Al realizar este análisis utilizando un extracto de proteínas solubles de matriz extracelular de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>, se determinó que en el control negativo existieron grupos sulfhidrilos basales (Figura 26B). Al tener un extracto completamente reducido, las proteínas marcadas estuvieron sobre la diagonal tal y como se esperaba (Figuras 26C y D). Sin embargo, al tratar con NADPH, la NTR recombinante de *E. coli* y la NaTrxh recombinante de *N. alata*, se observó que existen algunas proteínas que fueron reducidas por esta tiorredoxina pero de manera un poco más discreta que cuando fueron reducidas con DTT (Figura 26F).

Algo interesante de estos resultados era que una de las proteínas claramente reducida por la NaTrxh era muy abundante y tenía una masa molecular similar a la de la S-RNasa (Figura 26F). Al realizar una inmunodetección utilizando anticuerpos anti-S<sub>105</sub>-RNasa se confirmó que, en efecto, esta proteína era la S-RNasa (Figura 26G), lo cual es de gran importancia por ser la determinante femenina en el rechazo del polen alelo S-específico en *N. alata*. Cabe mencionar que tanto el marcaje de grupos sulfhidrilo como la migración de esta enzima, es diferente al ser reducida con DTT que con la NaTrxh. Esto sugiere dos cosas: (1) la NaTrxh no reduce los cuatro puentes disulfuro contenidos en la

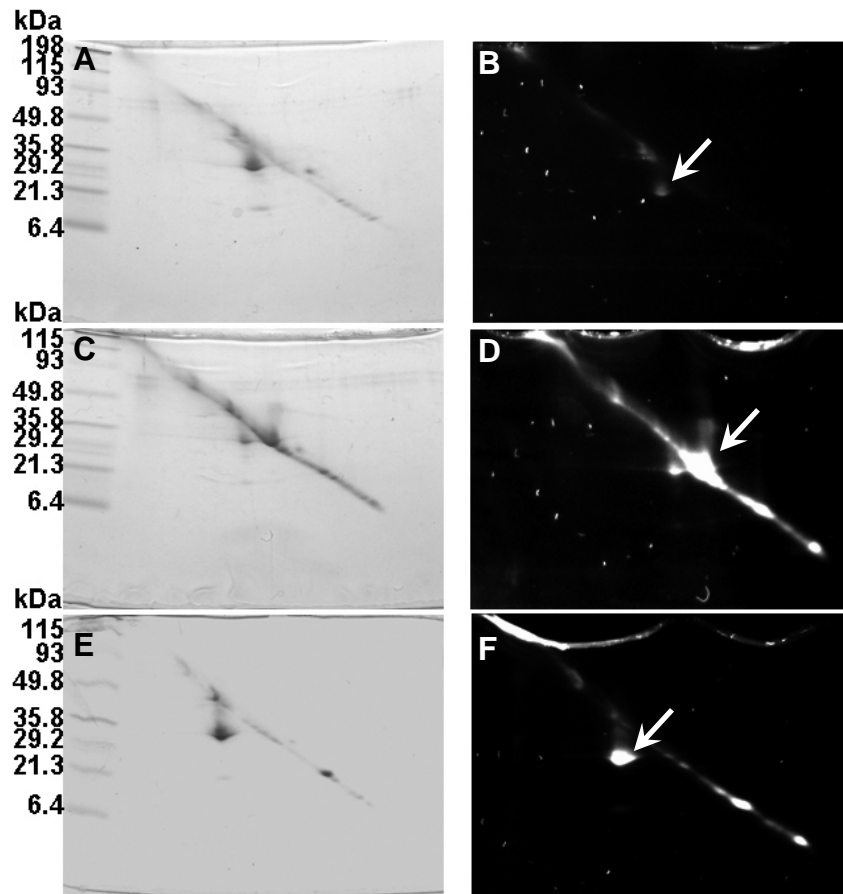
S-RNasa y; (2) existe una especificidad química de la NaTrxh hacia determinados puentes disulfuro de la S-RNasa.



**Figura 26.** Identificación de la S<sub>105</sub>-RNasa como blanco de la NaTrxh. Se utilizó la técnica de SDS-PAGE 2D con un extracto de proteína soluble de matriz extracelular de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **A** y **B**. las proteínas no fueron reducidas para la primera dimensión. **C** y **D**. Reducción con DTT. **E** y **F**. Reducción con el sistema Trx usando a la NaTrxh recombinante; **G**. Inmunodetección de la S<sub>105</sub>-RNasa. Las flechas señalan a la S-RNasa.



Este mismo ensayo fue realizado utilizando un extracto de proteína total de estilos de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>. Como se puede ver en la Figura 27, la mancha que corresponde a la S-RNasa, nuevamente es reducida por la NaTrxh. Por lo tanto, la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh es un evento alelo S-inespecífico porque reduce tanto a la S<sub>105</sub>- como a la S<sub>C10</sub>-RNasa.



**Figura 27.** Identificación de la S<sub>C10</sub>-RNasa como blanco de la NaTrxh. Se utilizó la técnica de SDS-PAGE 2D con un extracto de proteína total de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>. **A** y **B**. Las proteínas no fueron reducidas para la primera dimensión. **C** y **D**. Reducción con DTT. **E** y **F**. Reducción con el sistema Trx usando a NaTrxh recombinante. Las flechas señalan a la S-RNasa.

## VI.6. Identificación de la S-RNasa como proteína blanco de la NaTrxh con una cromatografía de afinidad

Una vez identificada a la S-RNasa de dos diferentes haplotipos ( $S_{C10}$ - y  $S_{105}$ -RNasa) como proteína blanco de la NaTrxh por medio del sistema de electroforesis en dos dimensiones (Figuras 26 y 27), era necesario contar con evidencia que reforzara el resultado. Para esto se utilizó la resina ThioBond (Invitrogen), la cual tiene un grupo PAO unido a agarosa (Figura 17). Cuando un puente disulfuro es reducido, se forman dos grupos tiol vecinos, los cuales se unen al arsénico presente en el PAO. De esta manera, es posible separar por cromatografía de afinidad a aquellas proteínas cuyos puentes disulfuro fueron reducidos por la NaTrxh (Kalef *et al.*, 1993).

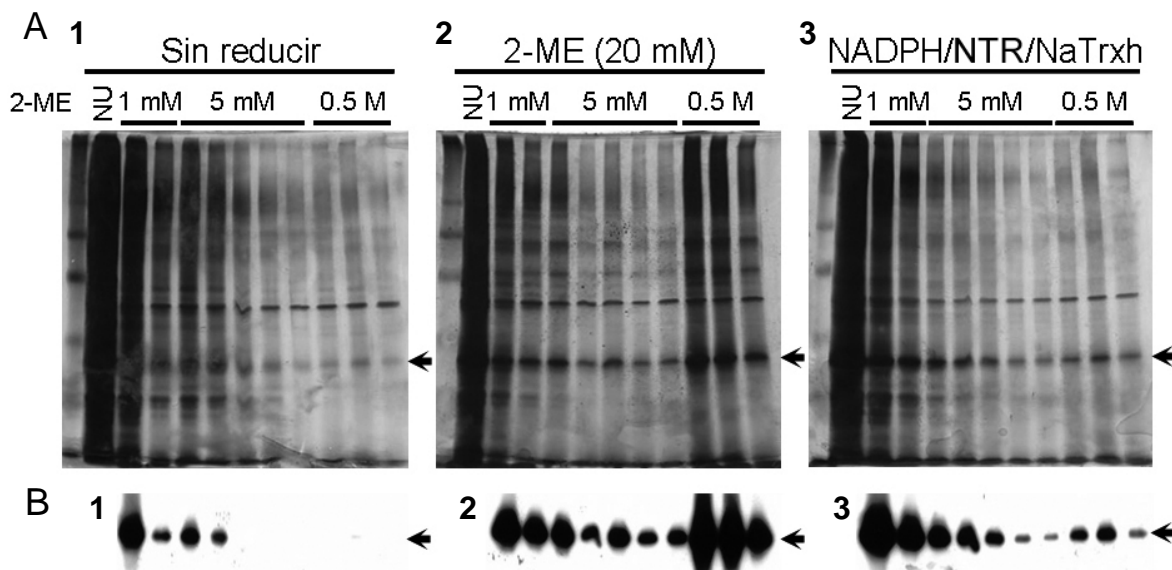
Para estos ensayos, únicamente se utilizaron las proteínas de la fracción más soluble de la matriz extracelular de *N. alata*  $S_{105}S_{105}$ , las cuales fueron obtenidas bajo las condiciones descritas en la metodología, a excepción de que ninguno de los amortiguadores contenía  $Na_2S_2O_4$  porque actúa como agente reductor. Las proteínas fueron tratadas bajo las siguientes condiciones antes de proceder a la cromatografía:

- a) Sin ningún agente reductor.
- b) 2-mercaptoetanol 20 mM.
- c) 2.5  $\mu$ g NaTrxh + 2.0  $\mu$ g TrxR (*E. coli*) + 0.125  $\mu$ mol NADPH.

Finalmente, cada reacción fue aplicada a la resina y por decantación se obtuvo la fase no unida. Después de lavar la resina dos veces con Tris·HCl 50 mM, pH 7.9, 2-mercaptoetanol 1 mM, se hicieron cinco lavados con el mismo amortiguador pero con 2-mercaptoetanol 5 mM. Finalmente, las proteínas unidas fuertemente se eluyeron lavando tres veces con el amortiguador conteniendo 2-mercaptoetanol 0.5 M.

Cada fracción fue analizada por SDS-PAGE al 12.5% (Figura 28A). En el resultado obtenido, cuando el extracto fue reducido con 2-mercaptoetanol o con el sistema NADPH/NTR/NaTrxh, una de las proteínas que se unieron en forma específica a la resina fue de 35 kDa aproximadamente. Su abundancia sugirió que

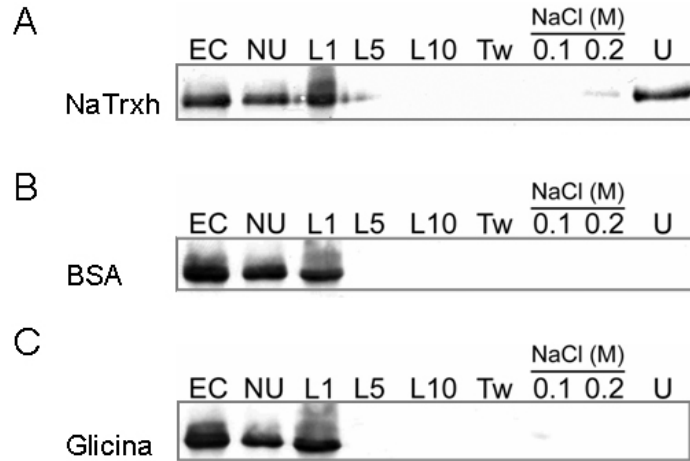
correspondía a la S<sub>105</sub>-RNasa (Figuras 28A2 y A3). Los lavados y los eluatos fueron analizados por Western-blot utilizando anticuerpos contra la S<sub>105</sub>-RNasa (Figura 28B), lo cual demostró que la S<sub>105</sub>-RNasa es reducida, junto con otras proteínas, por la NaTrxh recombinante (Figura 24B3), mientras que en el control negativo (Figuras 28A1 y B1), la S<sub>105</sub>-RNasa sólo se observa en las primeras fracciones de la cromatografía. Esto no descarta totalmente la posibilidad de que haya una fracción de la S<sub>105</sub>-RNasa reducida con grupos tiol vecinos en una cantidad muy baja, de tal forma que no es posible detectar un patrón de elución similar a la enzima incubada con el sistema NADPH/NTR/NaTrxh. Lo mismo se puede notar en las Figuras 26B y 27B, donde se observa que las S-RNasas tienen un marcaje inicial pero menor que cuando son reducidas por la NaTrxh (Figuras 26F y 27F).



**Figura 28.** Identificación de la S<sub>105</sub>-RNasa como proteína blanco de la NaTrxh utilizando la cromatografía de afinidad con PAO. **A.** Proteínas teñidas con nitrato de plata después de haber sido separadas por SDS-PAGE al 12.5%. NU: fracción no unida a la resina; La concentración de 2-mercaptoetanol en cada lavado o en las elusiones están marcadas como 1 mM (dos carriles), 5 mM (cinco carriles) y 0.5 M (3 carriles). **1.** Sin reducir: las proteínas no fueron reducidas; **2.** 2-ME (20 mM): reducción con 2-mercaptoetanol 20 mM; **3.** NADPH/NTR/NaTrxh: reducción con el sistema Trx usando a la NaTrxh recombinante. **B.** Análisis por Western-blot utilizando los anticuerpos anti-S105-RNasa. Las flechas tanto en **A (1-3)** como en **B (1-3)** indican a la banda correspondiente de la S<sub>105</sub>-RNasa.

## VI.7. La NaTrxh interacciona específicamente con la S-RNasa

La interacción entre una tiorredoxina y su proteína blanco generalmente es efímera (Kallis y Holmgren, 1980; Wynn *et al.*, 1995). La única manera de estabilizar el complejo Trx:proteína blanco es mutando a la segunda cisteína de la Trx por una serina (Verdoucq *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha logrado ver la interacción entre las Trx THL1 y THL2 con SRK en *Brassica* por la técnica de doble híbrido en levadura (Bower *et al.*, 1996; Mazzurco *et al.*, 2001). Con el fin de corroborar que la interacción entre la NaTrxh y la S-RNasa es específica, se hizo un ensayo tipo *pull down*. Se pasó un extracto de proteína total de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> por una columna de afinidad, la Affi-Gel-NaTrxh. Después de lavar completamente a la columna con amortiguador de unión, se hicieron lavados con distintas concentraciones de NaCl y Tritón X-100. La S-RNasa sólo eluyó cuando se cambió el medio de pH 7.9 a 2.6 con glicina 50 mM y NaCl 50 mM (Figura 29A). Como control de interacción, se usó la columna Affi-Gel-BSA (Figura 29B) y la columna Affi-Gel-Gly (Figura 29C), a las cuales la S<sub>105</sub>-RNasa no se unió, lo que refuerza que la interacción entre esta proteína y la NaTrxh es específica. De esta manera, se puede concluir que la reducción de la S-RNasa depende de un reconocimiento independiente del estado redox de ambas proteínas.

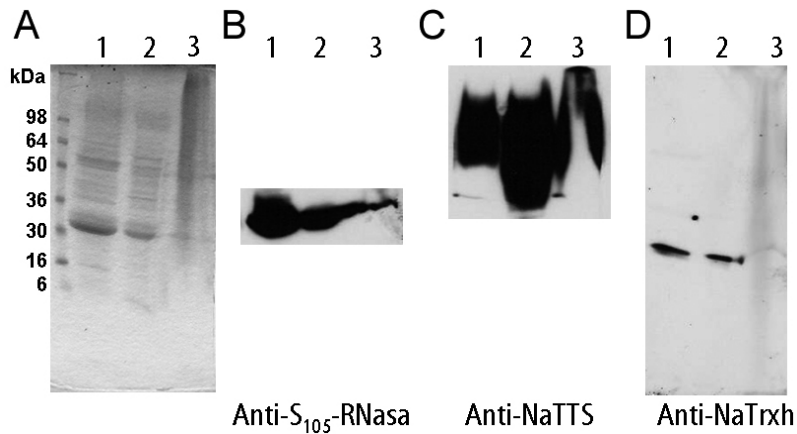


**Figura 29.** La S<sub>105</sub>-RNasa interacciona específicamente con la NaTrxh. **A.** Extractos de proteína total de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> obtenidos sin agentes reductores (extracto crudo, EC) fueron pasados por la columna Affi-Gel-NaTrxh. Después de recuperar la fracción no unida (NU), la columna fue lavada con 10 volúmenes cama de amortiguador de unión (sólo se muestran el primero (L1), quinto (L5) y décimo lavado (L10)), luego con amortiguador con Tween-20 al 1% (Tw) y finalmente se hicieron lavados con amortiguador conteniendo NaCl 0.1 M y 0.2 M, como se indica. Las proteínas fuertemente unidas a la NaTrxh (U) se eluyeron con amortiguador de elución. Todas las fracciones fueron analizadas utilizando el anticuerpo policlonal anti-S<sub>105</sub>-RNasa. **B** y **C.** mismo procedimiento que en **A** pero las proteínas fueron pasadas por la columna Affi-Gel-BSA (BSA) o por la columna Affi-Gel-Gly (Glicina), respectivamente.

## VI.8. La NaTrxh se encuentra en la fase más soluble de la matriz extracelular de los estilos de *N. alata*

La idea de que la NaTrxh reduzca *in vivo* a la S-RNasa se vería reforzada si estas proteínas coexistieran espacialmente en la planta. Se siguió la metodología propuesta por Wu *et al.* (2000), en la que se parte del hecho de que las proteínas extracelulares del estilo eluyen del tejido de acuerdo a su solubilidad, lo que sugiere su localización subcelular. Las proteínas más solubles son las que se encuentran en la matriz extracelular, luego, incrementando la concentración de NaCl, eluyen aquéllas de la matriz extracelular que se encuentran asociadas más fuertemente a la pared celular. Siguiendo esta estrategia, se obtuvieron fracciones de proteínas estilares recuperando las fracciones soluble de la matriz extracelular, de matriz extracelular asociada a la pared celular y la fracción de proteínas

intracelulares. Todas estas fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE (Figura 30A).



**Figura 30.** Inmunodetección de la S<sub>105</sub>-RNasa, de la NaTTS y de la NaTrxh en las tres fracciones obtenidas en base a la solubilidad de proteínas de los estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **A.** Proteínas teñidas con azul de Coomassie. **B.** Inmunodetección de la S<sub>105</sub>-RNasa. **C.** Inmunodetección de la NaTTS. **D.** Inmunodetección de la NaTrxh (nótese cómo únicamente se observa una banda en cada fracción). **1.** Proteínas de la fracción más soluble de la matriz extracelular. **2.** proteínas de matriz extracelular asociadas a la pared celular. **3.** proteínas intracelulares.

Al analizar las diferentes fracciones, se determinó que la S-RNasa y NaTTS son recuperadas en las dos primeras fracciones (Figuras 30B y C, carriles 1 y 2), resultado que corrobora lo reportado en la literatura, ya que se sabe que la S-RNasa y NaTTS son proteínas de la matriz extracelular del estilo de *N. alata* (Anderson *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2000). Otro dato que corrobora que las fracciones 1 y 2 del estilo se encuentran enriquecidas con proteínas de matriz extracelular, son las isoformas de NaTTS. Estas isoformas se generan por diferentes grados de glicosilación (Wu *et al.*, 2000). Claramente se observan dos poblaciones de NaTTS, en la primera se inmunodetecta una población que varía de 55 – 110 kDa y es la que se encuentra en la fase más soluble de la matriz extracelular (tal y como se observa en el carril 1 de la Figura 30C), mientras que la otra varía de 45 – 110 kDa (como se observa en el carril 2 de la figura 30C), lo cual concuerda con lo reportado por Wu *et al.* (2000). De esta manera, la S-RNasa y NaTTS fueron utilizadas como marcadores que indicaran que el protocolo experimental había sido llevado a cabo adecuadamente (Figuras 30B y C).

Fue interesante encontrar que cuando se utilizaron los anticuerpos anti-NaTrxh, se inmunodetectó a esta proteína en la fracción más soluble de la matriz extracelular (Figura 30D, carril 1), lo que sugiere que NaTrxh es una proteína de matriz extracelular del estilo.

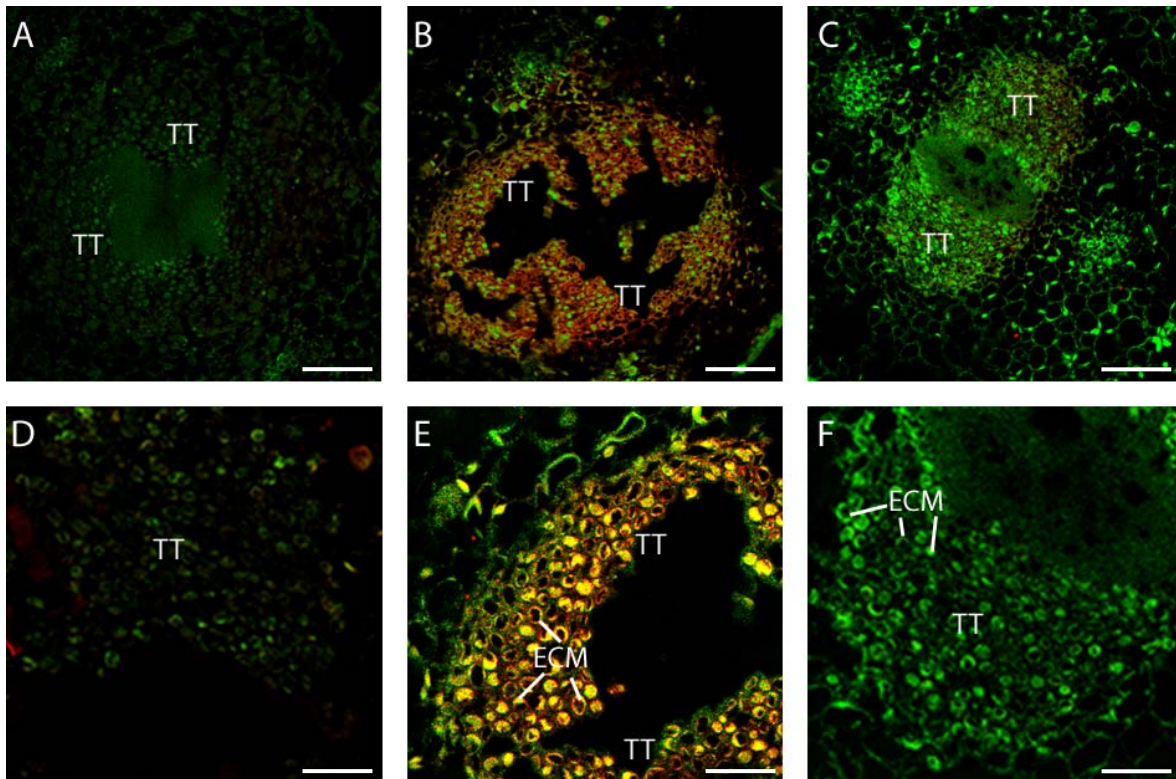
Con los resultados hasta aquí descritos se concluye que la NaTrxh es una tiorredoxina que se expresa en forma ubicua en *N. alata*. Al estar presente en estilos maduros y en la fracción más soluble de la matriz extracelular, es posible sugerir que la NaTrxh coexiste tanto temporal como espacialmente con proteínas de gran importancia en las interacciones polen-pistilo, como lo son la S-RNasa y NaTTS. Por lo tanto, la interacción y reducción de la S-RNasa por la NaTrxh es posible que ocurra *in vivo*.

#### **VI.9. La NaTrxh colocaliza con la S-RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión en estilos de *N. alata***

Los datos de la Figura 30 indican que una fracción considerable de la NaTrxh se encuentra en extractos enriquecidos de matriz extracelular del tejido de transmisión de estilos. Además, posee características similares de solubilidad a dos proteínas específicas de la matriz extracelular, la S-RNasa y NaTTS. Sin embargo, en la secuencia de la NaTrxh no se predice ningún péptido señal ortodoxo que promueva su secreción. Para tener datos más precisos sobre la localización subcelular de la NaTrxh, se hicieron ensayos de colocalización en cortes transversales de estilos de 6 – 7  $\mu\text{m}$  de grosor de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>. Los cortes fueron incubados simultáneamente con los anticuerpos primarios anti-NaTrxh y con los anticuerpos monoclonales anti-S<sub>C10</sub>-RNasa. Después, se hizo la incubación simultánea con los anticuerpos secundarios anti-conejo conjugados al fluorocromo Alexa Fluor 568 (señal roja) y anti-ratón conjugado al FITC (señal verde) (Figura 31).

El resultado de los ensayos de inmunolocalización indica una clara colocalización de la S<sub>C10</sub>-RNasa y la NaTrxh en el tejido de transmisión estilar

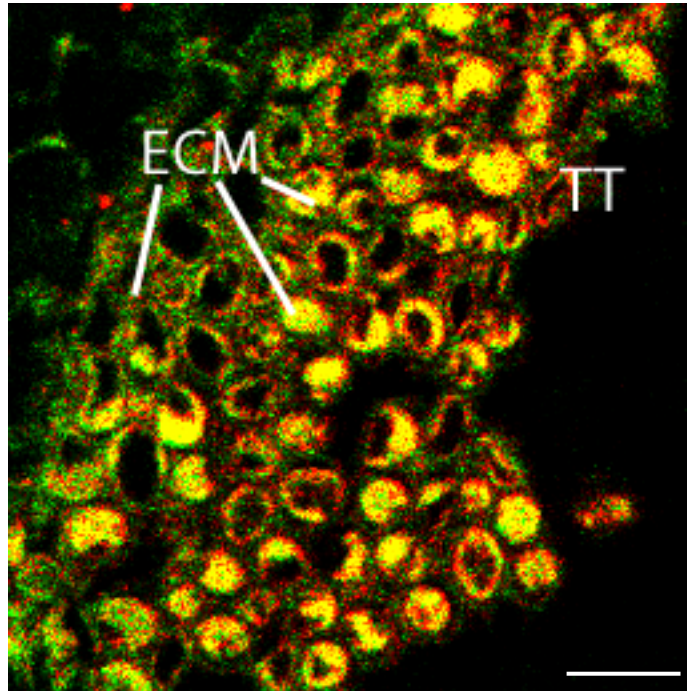
(Figuras 31B y E). Al preincubar los anticuerpos primarios con la NaTrxh recombinante, sólo se observó la señal verde (correspondiente a la  $S_{C10}$ -RNasa), lo que quiere decir que la señal roja se abatió (Figuras 31C y F) debido a que los anticuerpos anti-NaTrxh fueron saturados con la NaTrxh, indicando su especificidad hacia esta proteína.



**Figura 31.** Colocalización de la NaTrxh y de la  $S_{C10}$ -RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo de *N. alata*. **A** y **D**. Sin anticuerpos primarios para mostrar la autofluorescencia del tejido. **B** y **E**. Colocalización de la NaTrxh (rojo) y la  $S_{C10}$ -RNasa (verde). **C** y **F**. Igual que en **B** y **E**; sin embargo, los anticuerpos primarios fueron incubados con la NaTrxh recombinante antes de ser aplicados al tejido. Las barras corresponden a 68  $\mu\text{m}$  en **A** a **C** y a 55  $\mu\text{m}$  en **D** a **F**.

Al magnificar la imagen de la figura 31E, es claro que tanto la  $S_{C10}$ -RNasa como la NaTrxh son proteínas de secreción y que éstas colocalizan en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar en *N. alata* (Figura 32). Con esta evidencia es posible proponer que la NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h* que se secreta al espacio extracelular.





**Figura 32.** Colocalización de la NaTrxh y de la  $S_{C10}$ -RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión de estilos de *N. alata*. La barra corresponde a 13.3  $\mu\text{m}$ .

#### **VI.10. La secuencia de la NaTrxh contiene la información necesaria para promover su secreción**

Se ha asumido que las Trx h tienen una localización citoplásmica debido a que sus secuencias carecen de algún péptido señal (Meyer *et al.*, 1999). Sin embargo, Gelhaye *et al.* (2004a) reportaron que las Trx h pueden ser divididas en tres subgrupos, de las cuales, las Trx contenidas dentro del subgrupo II son proteínas cuyas secuencias contienen extensiones no conservadas hacia el amino terminal. La función de estas extensiones aún no es muy clara. Sin embargo, Gelhaye *et al.* (2004b) encontraron que una tiorredoxina tipo *h* de *Populus tremula* perteneciente al subgrupo II se localiza en la mitocondria, además, su extremo amino terminal es procesado hasta el residuo 19 y es esencial para esta localización no antes descrita de una Trx h (Gelhaye *et al.*, 2004a, 2004b).

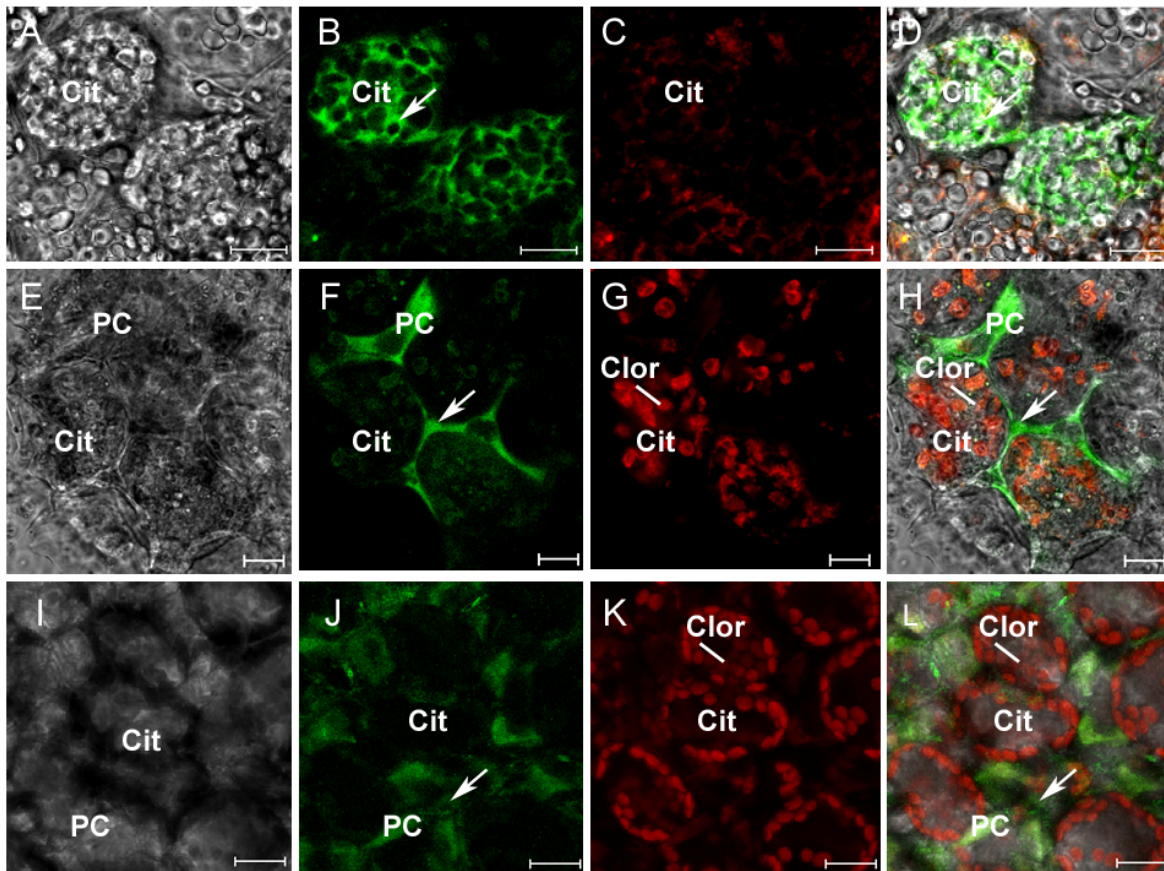
Al analizar la secuencia de la NaTrxh para identificar un posible péptido señal por distintos algoritmos, se obtuvieron resultados contradictorios. Mientras

que el algoritmo de *redes neuronales* (Bendtsen *et al.*, 2004a) predice que la NaTrxh no es una proteína de secreción; el programa de predicción *Hidden Markov* (Bendtsen *et al.*, 2004b) indicó que la NaTrxh podría ser una proteína de secreción, ya que predijo un péptido señal con una probabilidad del 95.3%. Además, predijo un sitio de corte que se encuentra entre los residuos Ala-16 y Ala-17 con una probabilidad del 59.3%. Por otro lado, el programa *Secretome 1.0* (Bendtsen *et al.*, 2004b) predice también, con una probabilidad del 87.4%, que la NaTrxh es una proteína que se secreta por una vía no clásica de secreción, es decir, independientemente del retículo endoplásmico y al aparato de Golgi (RE/Golgi). Esta predicción se logra porque el programa compara a la NaTrxh con la Trx-1 de humano, la cual es secretada al torrente sanguíneo. Esta tiorredoxina carece de péptido señal y se sabe que puede secretarse por una vía independiente al RE/Golgi (Tanudji *et al.*, 2003).

El análisis filogenético de la Figura 23 muestra que la NaTrxh pertenece al subgrupo II de las Trx h. Esta proteína efectivamente contiene una extensión hacia el amino terminal que no se encuentra conservada en otras secuencias de Trx. Por lo tanto, para probar si la proteína contiene la información necesaria para determinar su secreción, la secuencia completa de la NaTrxh se fusionó a GFP y se bombardearon plántulas de *A. thaliana* para analizar su expresión transitoria y la localización de la GFP. Por otro lado, la fusión NaTrxh:GFP también se clonó usando el vector binario pBIN19 en *A. tumefaciens* y se infectaron hojas de *N. benthamiana* por agroinfiltración para analizar de igual manera su expresión transitoria y localización de GFP. En ambos vectores, la fusión *NaTrxh:GFP* se encuentra bajo el control del promotor CaMV35S (Figura 14).

Los resultados muestran que cuando es utilizado el vector pBIN19 sin la secuencia de la NaTrxh, la GFP se localiza en el citoplasma de las células de las hojas de *N. benthamiana* tal y como se espera de esta proteína (Figuras 33B y D). Sin embargo, cuando en hojas de *N. benthamiana* se expresa la proteína de fusión NaTrxh:GFP, la fluorescencia de la GFP se ubica principalmente en la pared celular (Figuras 33F y H), lo que significa que esta proteína de fusión es secretada al espacio extracelular. Por otro lado, fue interesante encontrar que lo mismo

ocurrió cuando la proteína de fusión se expresó en hojas de *A. thaliana* (Figuras 33J y L).



**Figura 33.** La proteína de fusión NaTrxh:GFP se secreta a la pared celular de las hojas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana*. **A – D.** Expresión de GFP en hojas de *N. benthamiana* como control de expresión y localización. **E – H.** Expresión de la proteína de fusión NaTrxh:GFP en hojas de *N. benthamiana*. **I – L.** Expresión de la proteína de fusión NaTrxh:GFP en hojas de *A. thaliana*. Después de la transfección, las hojas se analizaron bajo microscopía de contraste de fases (**A, E, I**) y bajo microscopio de fluorescencia para GFP (**B, F, J**) y para clorofila (**C, G, K**). Las imágenes **D, H** y **L** corresponden a la superposición de las tres imágenes de cada experimento. Las flechas señalan la fluorescencia de GFP; PC: pared celular; Cit: citoplasma; Clor: fluorescencia de clorofila. Las barras corresponden a 10  $\mu\text{m}$  (**A – H**) y a 20  $\mu\text{m}$  (**I – L**).

Con los resultados de la Figura 33 se demuestra que la secuencia de la NaTrxh contiene la información necesaria para que se lleve a cabo su secreción. Además, el hecho de que este comportamiento se observe en hojas y en dos sistemas heterólogos a *N. alata* significa que la señal contenida en la NaTrxh es general y reconocida a pesar de ser órganos y especies diferentes. Por lo tanto, la secreción que se lleva a cabo en los estilos de *N. alata* se debe a la misma

NaTrxh y no al carácter secretor que tienen las células del tejido de transmisión estilar.

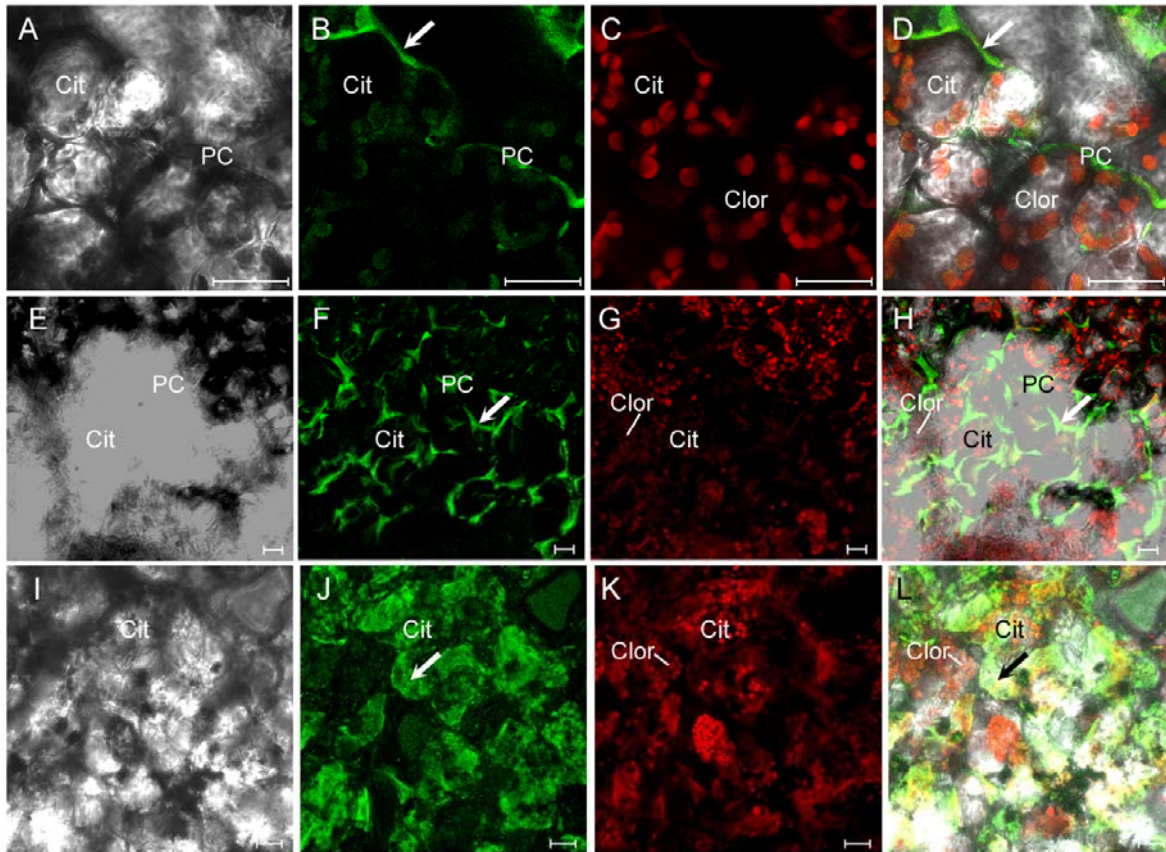
#### **VI.11. En el amino terminal de la NaTrxh se encuentra la señal que determina su secreción**

Los resultados mostrados en la Figura 33 muestran que efectivamente la secuencia de la NaTrxh contiene la información suficiente para que se lleve a cabo su secreción. Tomando en cuenta la predicción del sitio de corte del péptido señal usando el algoritmo basado en el modelo *Hidden Markov* (Bendtsen *et al.*, 2004b), se eliminaron los primeros 16 residuos de la secuencia de la NaTrxh. A esta mutante se le denominó NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  (Figura 15). Por otro lado, en un trabajo del laboratorio se produjeron anticuerpos contra la secuencia EAAEAESGSSSEP, que incluyen del residuo Glu-15 al Pro-27 de la NaTrxh. Estos anticuerpos reconocieron a la NaTrxh recombinante; sin embargo, la inmunodetección de la NaTrxh nativa en extractos de tejido vegetal no era muy clara. Considerando que la probabilidad del sitio de corte dado por el modelo *Hidden Markov* (0.593) fuera hasta cierto punto baja, era posible que de existir algún péptido señal que sea procesado, la probabilidad que incluyen al péptido para el cual fue dirigido este anticuerpo es alta. Por esta razón, también se generó la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ , la cual carece de los primeros 27 residuos de aminoácidos (Figura 15).

Ambas mutantes fueron clonadas en el vector pHBT, quedando así fusionadas hacia el amino terminal de la GFP y bajo el promotor CaMV35S. El plásmido fue utilizado para bombardear plántulas de *A. thaliana* y analizar la expresión transitoria de cada una de las mutantes en las hojas.

Como control positivo se utilizó a la proteína de fusión NaTrxh:GFP, es decir, con la secuencia completa de la NaTrxh, la cual, como se muestra en las figuras 33J y L, es secretada hacia la pared celular en las hojas de *A. thaliana* (Figuras 34B y D). Cuando se transformó con la mutante NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  fusionada a GFP, esta proteína siguió secretándose hacia la pared celular (Figuras 34F y H). Sin embargo, cuando se expresó la proteína de fusión NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ :GFP, la

fluorescencia de GFP sorprendentemente se observa en el citoplasma (Figuras 34J y L). Este resultado sugiere que, en efecto, la información que contiene la NaTrxh para dirigir su secreción se encuentra hacia el amino feera sin que sea un péptido señal clásico en el sentido amplio del concepto.



**Figura 34.** La información para dirigir la secreción de la NaTrxh se encuentra en el amino terminal de la proteína. **A – D.** Expresión de la proteína de fusión NaTrxh:GFP en hojas de *A. thaliana*. **E – H.** Expresión de la proteína mutante NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$  fusionada a GFP en hojas de *A. thaliana*. **I – L.** Expresión de la proteína mutante NaTrxh $\Delta$ N $\beta$  fusionada a GFP en hojas de *A. thaliana*. Después de la transfección, las hojas fueron analizadas bajo microscopía de contraste de fases (**A, E, I**) y bajo microscopio de fluorescencia para GFP (**B, F, J**) y para clorofila (**C, G, K**). Las imágenes **D, H** y **L** corresponden a la superposición de las tres imágenes de cada experimento. Las flechas señalan la fluorescencia de GFP; PC: pared celular; Cit: citoplasma; Clor: fluorescencia de clorofila. Las barras corresponden a 20  $\mu$ m.

El hecho de que una proteína sin un péptido señal canónico sea secretada podría significar la existencia de señales internas en la secuencia de la misma proteína como ocurre con la Trx-1 de humano (Tanudji *et al.*, 2003). En el caso de la NaTrxh, esta información se encuentra hacia el amino terminal, pero no en el

extremo como generalmente ocurre con los péptidos señal ortodoxos. Queda claro que esta señal es interna porque al ser eliminados los primeros 16 aminoácidos la proteína sigue siendo secretada (Figuras 34F y H) a diferencia de cuando es eliminado hasta el residuo Pro-27 (Figuras 34J y L).

Este resultado también sugiere que la secreción de la NaTrxh no se lleva a cabo por la vía clásica de secreción, es decir, que tal vez se lleve a cabo por una vía que sea independiente del RE/Golgi, tal y como ocurre con la Trx-1 en humanos. Esta idea se puede corroborar aplicando un inhibidor del aparato de Golgi, como la brefeldina-A, en células en suspensión de *N. alata* que expresen la proteína de fusión NaTrxh:GFP. Si la secreción se inhibe en presencia de brefeldina A, diría que la secreción se lleva a cabo por la vía clásica; si se sigue llevando a cabo, significaría que la NaTrxh es secretada por una vía independiente del RE/Golgi.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1. La NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h* que se secreta al espacio extracelular

En este trabajo se corroboró que la NaTrxh, codificada en el cDNA AFLP25-F, es una tiorredoxina tipo *h* de 16.8 kDa. El análisis filogenético indica que la NaTrxh está incluida en el subgrupo II del grupo de las Trx *h*. Esta Trx es nueva dentro del género *Nicotiana*, ya que hasta la fecha sólo se habían reportado dos genes de Trx *h* en *N. tabacum* (Brugidou *et al.*, 1993) pertenecientes al subgrupo I (números de acceso: Q07090 y X58527, Figura 23).

En este trabajo se muestran los datos que indican que la NaTrxh es una proteína de secreción. La NaTrxh tiene características de solubilidad en la matriz extracelular del tejido de transmisión de los estilos de *N. alata* que son similares a las de las proteínas NaTTS y S-RNasa, cuya secreción y localización hacia la matriz extracelular están bien documentadas (Anderson *et al.*, 1989; Wu *et al.*, 2000). Asimismo, los ensayos de inmunolocalización muestran una colocalización de la S-RNasa y de la NaTrxh en la matriz extracelular del tejido de transmisión en los estilos de *N. alata*. El hecho de que la NaTrxh sea secretada por las células del tejido de transmisión podría deberse al carácter secretor de este tejido. Sin embargo, cuando se expresa de manera transitoria la proteína de fusión NaTrxh:GFP en las hojas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana*, se demuestra que la secreción de la NaTrxh también se lleva a cabo en otros órganos y en especies vegetales distintas, sugiriendo que la NaTrxh contiene una señal para dirigir su secreción que es reconocida por otras plantas.

Hasta ahora, no se había reportado que una Trx *h* se secretara al espacio extracelular. La NaTrxh es la primera Trx de plantas que se demuestra que se secreta. El mecanismo por el cual la región que tiene en su extremo amino dirige la secreción de la NaTrxh no está claro. Es evidente que esta secuencia actúa como una señal de secreción. Sin embargo, la señal es diferente a las descritas a la fecha y al analizar la secuencia con los algoritmos disponibles, éstos arrojan

resultados contradictorios [modelo de *redes neuronales* y el de *Hidden Markov* (Bendtsen *et al.*, 2004a; 2004b)].

Las Trx h del subgrupo II se caracterizan por tener una extensión en su extremo amino, cuya función se desconoce. Hay evidencias que sugieren que esta extensión es importante para su localización en distintos compartimientos celulares (Gelhaye *et al.*, 2004a, 2004b). El ejemplo más claro se encuentra en la Trx h PtTrxh2 de *Populus tremula* del subgrupo II que contiene una secuencia esencial para dirigir la proteína hacia la mitocondria. Esta extensión de 19 aminoácidos se procesa en la planta y también cuando se expresa en células de *E. coli* (Gelhaye *et al.*, 2002, 2004b).

Otro caso es el de la proteína RPP13-1, una Trx h del subgrupo I (número de acceso D26547, Figura 23), que es abundante en el floema del arroz (Ishiwatari *et al.*, 1995; Gelhaye *et al.*, 2004a). Cuando se eliminan los primeros cinco aminoácidos de su secuencia, la proteína es incapaz de moverse a través del simplasto entre una célula y otra (Ishiwatari *et al.*, 1998). En este caso, los primeros cinco aminoácidos del extremo amino de RPP13-1, el dominio MAEE, funciona como una señal, ya que cuando se elimina este dominio, se pierde su movilidad; sin embargo, no se pierde si se muta a la secuencia MAEEA. RPP13-1 también tiene otro dominio esencial hacia su extremo carboxilo (RKDD), el cual se propone que funciona para interaccionar con los elementos que permiten el transporte célula-célula a través de los plasmodesmos, ya que al ser mutado por AAAA, la movilidad también se pierde (Ishiwatari *et al.*, 1998).

## **VII.2. Es posible que la NaTrxh se secrete por una vía independiente del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi**

El hecho de que hayan proteínas que se secretan a pesar de carecer de un péptido señal, sugiere que dicha secreción se lleva a cabo por una vía independiente del RE/Golgi. Sin embargo, este fenómeno no ha sido totalmente estudiado en plantas. En levadura se ha encontrado un gran número de proteínas que, a pesar de no contener un péptido señal, se encuentran en la superficie



celular (Nombela *et al.*, 2006). Algunas de estas proteínas también se localizan en el citoplasma, donde llevan a cabo funciones ya conocidas, mientras que cuando son exportadas están involucradas en procesos específicos en la superficie celular (Fernandes *et al.*, 1992; Gozalbo *et al.*, 1998).

En la búsqueda de una señal de secreción en el extremo amino de la NaTrxh, se eliminaron los primeros 16 residuos de la región del amino terminal (NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ ), que es la región que se predice como péptido señal (Bendtsen *et al.*, 2004b). También se generó otra mutante, la NaTrxh $\Delta$ N $\beta$ , de 27 residuos faltantes en su amino terminal. Los resultados mostraron que la eliminación de los primeros 16 residuos no modifica la secreción de la proteína de fusión NaTrxh $\Delta$ N $\alpha$ :GFP. Sin embargo, cuando se transformó con la NaTrxh $\Delta$ N $\beta$  fusionada a GFP, la capacidad de secreción de dicha fusión no se perdió. Esto significa que la señal que dirige la secreción de la NaTrxh en hojas de *A. thaliana* no se encuentra entre los primeros 16 residuos, sino en un dominio interno que aparentemente estaría en la secuencia contenida entre los residuos Ala-17 y Pro-27. De esta manera, el mecanismo por el cual esta extensión del extremo amino de la NaTrxh dirige su secreción podría ser por una vía no clásica de secreción, es decir, que no sea por la vía dependiente del RE/Golgi, tal y como ocurre con la Trx-1 de humano, la interleucina-1 $\beta$  y la galectina-1 (Rubartelli *et al.*, 1990; Cooper y Barondes, 1990; Tanudji *et al.*, 2003). De manera interesante, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la enolasa y la fructosa 1,6-bifosfato aldolasa de levadura son capaces de dirigir la secreción de proteínas reporteras fusionadas a éstas (Pardo *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2003), tal y como ocurrió con la NaTrxh fusionada a GFP.

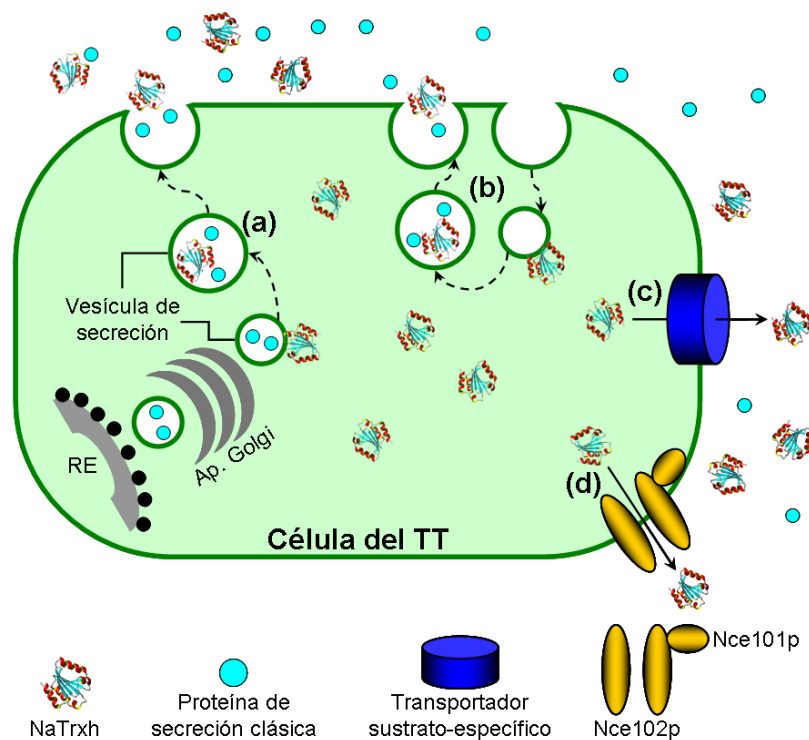
Las proteínas que carecen de un péptido señal canónico pero que son secretadas deben ser capaces de atravesar la membrana plasmática. En estudios recientes por microarreglos de proteína de levadura, se ha encontrado que muchas proteínas citoplásmicas poseen la habilidad de unirse a la membrana celular, tales como la enolasa y muchas otras que se detectan en la superficie celular (Zhu *et al.*, 2001). Sin embargo, aún falta mucha información que permita

conocer los detalles de un proceso de secreción alternativo al dependiente de RE/Golgi.

En levadura son tantas las proteínas que se secretan en forma no convencional que aún no ha sido posible proponer un mecanismo alternativo para su secreción. Sin embargo, basándose en los reportes de levaduras y otros organismos, se han podido postular diferentes hipótesis (Nombela *et al.*, 2006) que involucran distintos mecanismos y proteínas que participan en la exportación de proteínas de secreción no clásica. Un posible mecanismo es que este tipo de proteínas pueden tener cierta afinidad hacia vesículas de secreción provenientes del aparato de Golgi o a los endosomas en su proceso de reciclamiento y fusionarse a estos subcompartimientos celulares (Nickel, 2003; Nombela *et al.*, 2006). Por otro lado, el transportador de proteínas que une ATP, Ste6p, es un candidato que puede estar dirigiendo la exportación de estas proteínas, tal y como lo hace con la feromona  $\alpha$  de levadura (Nickel, 2003; Nombela *et al.*, 2006). También se encuentran los genes de exportación no clásica, *NCE101* y *NCE102* de levadura, los cuales están involucrados en la exportación de galectina heteróloga de mamíferos (Cleves *et al.*, 1996; Nombela *et al.*, 2006). Evidencias en mamíferos y parásitos sugieren que también puede haber formación de burbujas en la membrana (Nickel, 2003). Por último, se propone que puede haber un reconocimiento específico por ciertos transportadores de las proteínas de exportación no convencional para que logren atravesar la membrana celular y salir.

En las plantas pueden estar ocurriendo todas las posibilidades aquí mencionadas. Para el caso particular de la NaTrxh en los estilos de *N. alata*, hay que considerar que el tejido de transmisión estilar tiene un carácter secretor. Por lo tanto, debe tener una actividad muy alta en cuanto a producción y transporte de vesículas de secreción del aparato de Golgi hacia la membrana plasmática. Una posibilidad es que la NaTrxh tenga cierta afinidad a las vesículas de secreción y se adhiera a ellas para así alcanzar el espacio extracelular junto con las otras proteínas de secreción que participan en las interacciones polen-pistilo (Figura 35, situación a). También es posible que en el reciclamiento de endosomas en las

células del tejido de transmisión pueda haber integración de la NaTrxh a uno de estos compartimientos para salir al apoplasto (Figura 35, situación b). Sin embargo, aunque se requiere mucho más evidencia genética y molecular, tampoco es excluyente la posibilidad de que existan factores que medien la secreción de la NaTrxh, ya sea en forma específica, interaccionando por ejemplo con algún “transportador” específico y exclusivo (Figura 35, situación c) o de manera inespecífica, es decir, interaccionando con ortólogos hipotéticos de *NCE101* y *NCE102* de levadura o con proteínas que realicen funciones similares (Figura 35, situación d). Sin embargo, en esta última propuesta existe el problema de que no se han reportado genes homólogos a los *NCE* de levadura en plantas.



**Figura 35.** Mecanismos hipotéticos para la secreción independiente del RE/Golgi de la NaTrxh en las células del tejido de transmisión (TT) de estilos de *N. alata*. Se propone que la NaTrxh (rojo) puede tener cierta afinidad hacia las vesículas de secreción producidas por el sistema RE/Golgi (a) o a los subcompartimientos endosomales en su proceso de reciclamiento (b) que le permite adherirse y/o incorporarse a ellos para poder ser secretada. En el primer caso (a), la NaTrxh sería secretada junto con otras proteínas de secreción clásica (turquesa). Por otro lado, pueden existir transportadores específicos (azul oscuro) que permitan la secreción de la NaTrxh (c) o que proteínas homólogas a Nce101p y Nce102p de levadura en plantas (amarillo oscuro) sean las responsables de su exportación (d). RE: retículo endoplásmico; Ap. Golgi: aparato de Golgi. Los símbolos utilizados para representar a cada proteína y factor se muestran en la parte inferior de la figura.

### VII.3. Posible papel bioquímico de la NaTrxh en los estilos de *N. alata*

Las Trx modifican la estructura y la actividad de sus proteínas blanco al reducir sus puentes disulfuro (Meyer *et al.*, 1999; Laloï *et al.*, 2001). Al estudiar las proteínas blanco de una de las ocho Trx h codificadas en el genoma de *A. thaliana*, AtTRXh3, se encontró que ésta reduce enzimas involucradas en al menos nueve procesos biológicos, tales como en el estrés oxidativo, en el plegamiento de proteínas, en la fotosíntesis y en algunos procesos de degradación de proteínas, por mencionar algunos (Marchand *et al.*, 2004).

Las Trx h también se han involucrado en el sistema de AI esporofítico en *Brassica*, donde se encontró que dos tiorredoxinas, THL-1 y THL-2, interaccionan específicamente con el receptor con actividad de cinasa del *locus* S (SRK), que es la determinante femenina de la especificidad alélica (Bower *et al.*, 1996; Cabrillac *et al.*, 2001; Mazzurco *et al.*, 2001). Aunque la naturaleza de esta interacción aún no se comprende totalmente, las evidencias sugieren que THL-1 se une a SRK, evitando que el receptor se oligomerice y autofosforile (Cabrillac *et al.* 2001). Cuando SRK interacciona con su ligando, la proteína rica en cisteína del *locus* S (SCR), que es la determinante masculina, la interacción e inhibición por THL-1 se abaten, dando como consecuencia la activación del receptor y así la cascada de señales que dan como respuesta el rechazo del polen *S*-específico (Cabrillac *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2002).

Un criterio que se ha seguido para considerar que un gen está involucrado en el sistema de AI, es que éste se exprese específicamente en alguno de los órganos sexuales (*i. e.* estilo, estigma, anteras, granos de polen o tubos polínicos) (McClure, 2004). Esto quiere decir que el gen *NaTrxh* pudo haber sido descartado desde el inicio del estudio como posible candidato para ser un gen modificador del sistema de rechazo del polen alelo *S*-específico en *N. alata*. Análogamente, de haberse seguido este criterio, Cabrillac *et al.* (2001) no habrían encontrado la manera en cómo se regula SRK en *Brassica*. Por otro lado, la evidencia con las ocho Trx h de *A. thaliana* sugiere que a pesar de mostrar una expresión ubicua, existen diferencias en la expresión de los distintos genes de Trx a lo largo de la

planta, lo que significa que pueden ejercer distintas funciones bioquímicas en los diferentes órganos (Reichheld *et al.*, 2002). Un ejemplo sería el patrón de expresión de la NaTrxh, la cual se encuentra en niveles más altos en los verticilos florales de *N. alata*, lo cual podría indicar que es aquí donde lleva a cabo principalmente su función como Trx.

El hecho de que a partir de la población segregante (08681) de *Nicotiana* se encontró, mediante la técnica de cDNA-AFLP, que el gen *NaTrxh* se expresa diferencialmente entre los progenitores (*N. alata* BT y *N. plumbaginifolia*) a nivel de mRNA y que esta diferencia se mantiene a nivel de proteína, sugiere la posibilidad de que la NaTrxh sea uno de los factores responsables en la diferencia fenotípica en cuanto a la capacidad de rechazo de polen S-específico dentro de los individuos de la población 08681 y, por lo tanto, ser un gen modificador dentro del sistema de AI. Por esta razón, el gen *NaTrxh* no fue descartado y se decidió identificar a las proteínas blanco de la NaTrxh en la matriz extracelular del tejido de transmisión de estilos y así tener evidencia acerca de su papel dentro de la respuesta de AI gametofítica en *N. alata*.

La matriz extracelular del tejido de transmisión estilar en *N. alata* es rica en proteínas de secreción, tales como la S-RNasa, que posee cuatro puentes disulfuro (Anderson *et al.*, 1989; Ida *et al.*, 2001) y una variedad de arabinogalactoproteínas que poseen un dominio rico en cisteínas (*e. g.* 120K y NaTTS) (Bacic *et al.*, 1988; Lind *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2000). La NaTrxh puede ser capaz de regular el estado redox de estas proteínas y así podría explicarse su mayor abundancia relativa en los pistilos cuando se comparan los niveles de proteína en distintos órganos de la planta.

El hecho de que la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar sea abundante en proteínas de secreción, facilitó la demostración directa de que algunas de estas proteínas son el sustrato para la reducción por la NaTrxh.

Si la NaTrxh reduce proteínas extracelulares, entonces es necesaria la presencia de una NTR en la matriz extracelular también, que permita el mantenimiento del estado activo de la NaTrxh. Sin embargo, no se tiene evidencia de que exista alguna NTR secretada en plantas. Sólo en animales se ha reportado

que una NTR es secretada junto con la Trx-1 por monocitos y por líneas celulares malignas de melanoma o leucemia (Soderberg *et al.*, 2000). Otra posibilidad es que al ir creciendo el tubo polínico por el tejido de transmisión, incorpore a su citoplasma a la NaTrxh, tal y como ocurre con otras proteínas estilares, tales como la S-RNasa (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), 120K (Lind *et al.*, 1996; Goldraij *et al.*, 2006) y HT-B (Goldraij *et al.*, 2006). Es más probable encontrar NADPH y una NTR en el citoplasma del tubo polínico para que la NaTrxh pueda llevar a cabo su función reductora.

En este trabajo se mostró claramente que la S-RNasa es un sustrato de la NaTrxh. La S-RNasa fue una de las proteínas con mayor marcaje fluorescente por el mBBr y una de las principales proteínas unidas específicamente a la columna con el grupo PAO, aun en presencia de otros posibles sustratos, tales como NaTTS, 120K y las proteínas similares a extensina específicas del pistilo clase III (Bosch *et al.*, 2001), las cuales, como ya se mencionó, todas tienen un dominio rico en cisteínas (Bacic *et al.*, 1988).

Por otro lado, también fue posible detectar una interacción estable entre la S-RNasa y la NaTrxh, la cual es específica e independiente de la existencia de cualquier puente disulfuro debido a las condiciones experimentales con las que se realizó el ensayo. Se sabe que la interacción entre una tiorredoxina y su proteína blanco generalmente es efímera porque únicamente depende del puente disulfuro intermolecular que se forma cuando la primera cisteína de la proteína blanco es reducida por la cisteína del lado del amino terminal. Inmediatamente después, es atacada por la segunda cisteína de la Trx liberando así a la proteína blanco reducida y a la Trx oxidada (Figura 12) (Kallis y Holmgren, 1980; Wynn *et al.*, 1995). Por lo tanto, parece ser que la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh es específica y depende de un previo reconocimiento del sustrato por parte de esta Trx.

Es posible que las S-RNasas formen oligómeros *in planta*, ya que se ha encontrado que la expresión de una forma inactiva de S-RNasa con una activa del mismo alelo tiene un efecto negativo en el rechazo del polen alelo S-específico (McCubbin *et al.*, 1997). Además, se han encontrado dímeros de S-RNasa por

cromatografía de exclusión molecular bajo condiciones reductoras, ácidas y ligeramente desnaturizantes (Oxley y Bacic, 1996). Esto significa que es posible que para que la S-RNasa interactúe con la determinante masculina, SLF, en su forma tetramérica, que es como se propone que se encuentra en el tubo polínico (Kao y Tsukamoto, 2004; Sijacic *et al.*, 2004), la S-RNasa forme oligómeros, al menos como homodímeros. La interacción de la NaTrxh con la S-RNasa y su consecuente reducción pueden ser de gran importancia, ya que proveería de las condiciones óptimas (reductoras) que generen un cambio conformacional de la S-RNasa, promoviendo dicha oligomerización y favoreciendo así su interacción con el homotetrámero de SLF.

Cuando se realizó una centrifugación analítica de la S<sub>C10</sub>-RNasa purificada, la proteína presentó un coeficiente de sedimentación correspondiente a la forma monomérica. Sin embargo, al reducirla con Tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), se obtuvo que el coeficiente de sedimentación incrementó, indicando la presencia de dímeros y agregados más grandes de S-RNasa (B. McClure, sin publicar). También se demostró por espectroscopía por dicroísmo circular que al calentar a la S<sub>F11</sub>-RNasa, ésta comienza a desnaturizarse a los 55°C aproximadamente bajo condiciones no reductoras; mientras que cuando está reducida no se observa dicho efecto. Inclusive, a los 75°C se observa un perfil de desnaturización muy diferente dependiendo de las condiciones (reductora o no reductora), sugiriendo que la S-RNasa es más termoestable cuando se encuentra reducida (B. McClure, sin publicar). Los ensayos de actividad de ribonucleasa en gel no mostraron que la S-RNasa se afectara al ser reducida por TCEP a temperaturas biológicamente relevantes (B. McClure, sin publicar). De esta manera, si la S-RNasa es reducida *in vivo* para cumplir su actividad biológica, es muy probable que sea la NaTrxh el agente reductor *in planta*.

Las condiciones extracelulares generalmente son oxidativas. Así que si la NaTrxh lleva a cabo su función en la matriz extracelular del tejido de transmisión, una posible función sea mantener estable y activa a la S-RNasa en forma oligomérica. Otra posibilidad es que, como ya se mencionó, ambas proteínas sean incorporadas al tubo polínico, donde la S-RNasa debiera recuperar tanto su

estabilidad como actividad, lográndola gracias a la reducción por la NaTrxh. De igual manera, este cambio conformacional favorecería su interacción con la SLF.

La secreción de la NaTrxh a la matriz extracelular del tejido de transmisión en los estilos de *N. alata*, su interacción y consecuente reducción de la S-RNasa, son evidencias que sugieren fuertemente que esta tiorredoxina tipo *h* tenga un papel muy importante en el rechazo del polen alelo S-específico en *N. alata*.

#### **VII.4. Posible función de la NaTrxh en el sistema de AI en *N. alata***

El modelo de la evasión de la citotoxicidad de las S-RNasas (Figura 8), muestra que éstas junto con la proteína 120K son incorporadas al tubo polínico y compartimentalizadas en una vacuola (Goldraij *et al.*, 2006).

Es importante considerar que el ambiente vacuolar generalmente es ácido. Se ha demostrado que este ambiente ácido es mantenido principalmente por la bomba de protones vacuolar dependiente de ATP (V-ATPasa) (Padmanaban *et al.*, 2004) y que dicha acidificación de las vacuolas provee de energía para la liberación e incorporación de iones y metabolitos (Sze *et al.*, 1992; Lüttge y Ratajczak, 1997).

Es muy probable que la proteína 120K de alguna manera se encuentra asociada a la membrana del compartimiento vacuolar que la contiene junto con las S-RNasas en el tubo polínico. La señal que se observa en los ensayos de inmunolocalización de 120K muestran un patrón similar al que se observa con la enzima de membrana vacuolar vPPasa (Goldraij *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio se encontró, por la técnica de doble híbrido en levadura, que la región del carboxilo de 120K interacciona con la subunidad c de la V-ATPasa, la cual, en número de 6 copias, forma un canal de protones, cuya rotación es esencial para el transporte de los mismos (Hirata *et al.*, 2003).

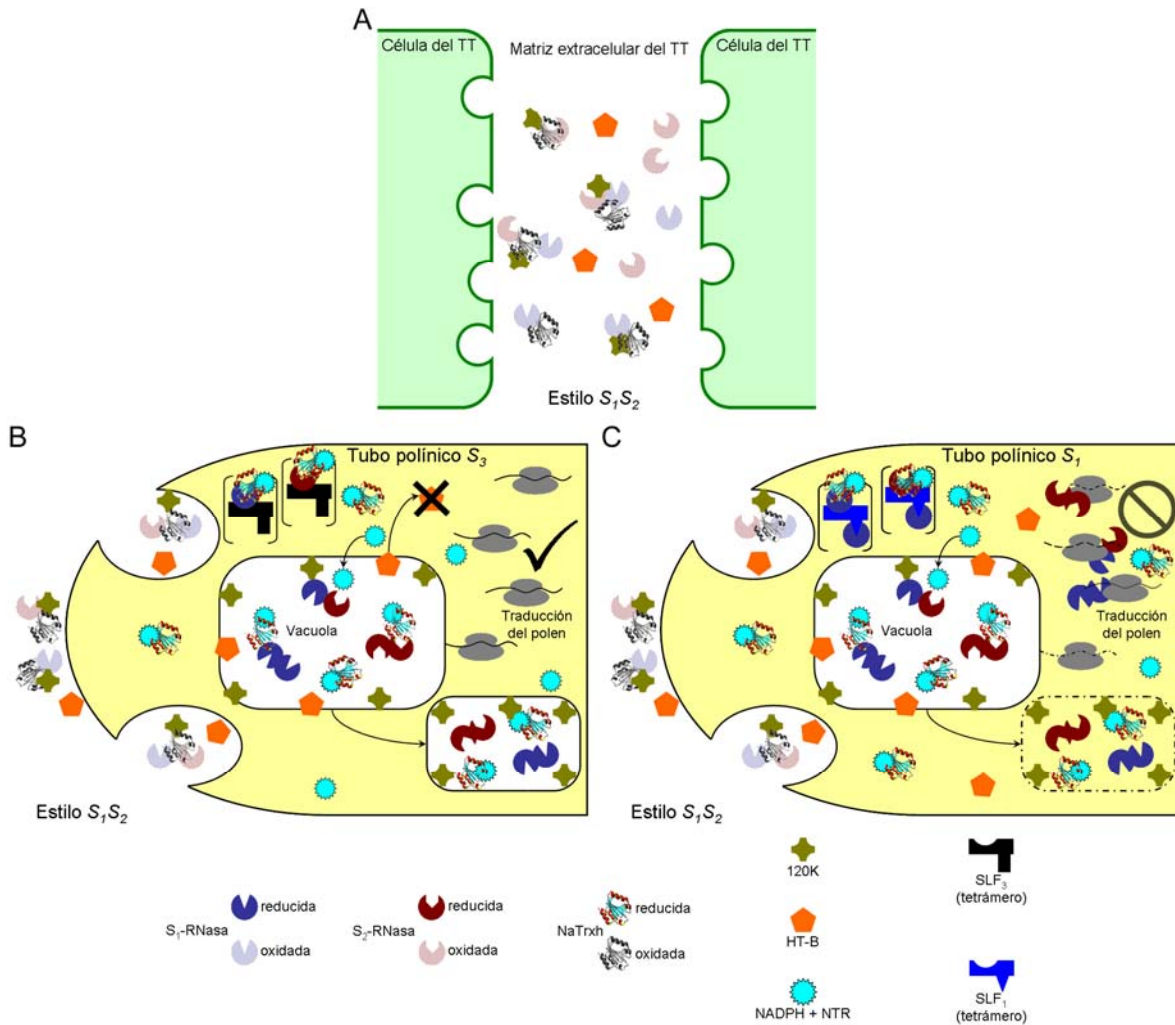
Este dato es muy relevante porque se considera que la acidificación de las vesículas por la V-ATPasa es crítica en la endocitosis de complejos ligando-receptor, en el tráfico de membranas y de proteínas solubles vacuolares



en levadura (Stevens y Forgac, 1997). Cuando la V-ATPasa es inhibida por concanamicina A, la liberación adecuada de las proteínas solubles vacuolares se pierde en *N. tabacum* (Matsuoka *et al.*, 1997).

De acuerdo a las observaciones de Oxley y Bacic (1996) y de B. McClure (sin publicar), las S-RNasas al localizarse en la vacuola del tubo polínico, se encontrarían en un ambiente ácido y propicio para su oligomerización. Como la NaTrxh interacciona con la S-RNasa independientemente de la presencia de puentes disulfuro, se propone que la NaTrxh se incorpora por la misma vía que las S-RNasas al tubo polínico (Figura 36). Por otro lado, se tienen datos en el laboratorio por cromatografía de afinidad que también es posible que la NaTrxh interaccione con la 120K, aumentando la probabilidad de que la incorporación de la NaTrxh sea por la misma vía que las S-RNasas y 120K. Una vez incorporadas al tubo polínico, sería ahí donde actuaría como agente reductor biológico que mantendría el estado reductor propicio para la estabilización, mantenimiento de la actividad de las S-RNasas y la generación de una conformación que le permita interactuar de manera adecuada con los homotetrámeros de SLF.

Una vez liberadas las S-RNasas a la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar, éstas podrían sufrir una oxidación debido a las posibles condiciones extracelulares oxidativas (Figura 36A). Esto podría provocar que su conformación no sea la adecuada para su interacción con SLF y/o su óptimo efecto citotóxico sobre el tubo polínico, una vez incorporadas en su citoplasma. Esta posible oxidación de la S-RNasa de alguna manera podría favorecer su interacción con otras proteínas estilares, tales como 120K, NaTTS y la proteína similar a quimiocianina de 11 kDa, p11 (Cruz-García *et al.*, 2003; 2005). Además, la interacción NaTrxh:S-RNasa independientemente de la presencia de grupos tiol, reportada en este trabajo, sugiere que posiblemente la NaTrxh también se encuentra formando este complejo proteico.



**Figura 36.** Posible función de la NaTrxh en el sistema de AI en *N. alata*. **A.** Las células del tejido de transmisión (TT) secretan una gran variedad de proteínas hacia la matriz extracelular donde la mayoría son oxidadas, entre las cuales se encuentran la NaTrxh (estructura proteica), 120K (verde) y las S-RNasas (azul y rojo oscuros) (formando los complejos observados *in vitro*) y HT-B (naranja). **B.** Cruza compatible. La NaTrxh es incorporada también por endocitosis al tubo polínico. Al haber fugas de S-RNasas y NaTrxh hacia el citoplasma del tubo polínico, donde existe NADPH y al menos una NTR (turquesa), se lleva a cabo la reducción y oligomerización de las S-RNasas, lo cual favorece su interacción con el homotetrámero de SLF<sub>3</sub> (negro). Como no hay coincidencia alélica, se promueve la degradación de HT-B. También se contempla que en la vacuola es donde la NaTrxh puede ser reducida por NADPH y una NTR posiblemente transportados a la vacuola (blanco). De esta manera, las S-RNasas son reducidas y se oligomerizan. Como HT-B es degradada, la vacuola se mantiene intacta y las S-RNasas no son liberadas al citoplasma del tubo polínico, permitiendo que éste siga su crecimiento. **C.** Cruza incompatible. La interacción de la S<sub>1</sub>-RNasa con los homotetrámeros de SLF<sub>1</sub> (azul claro) se da adecuadamente debido a la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh en el citoplasma. Como sí hay coincidencia alélica, se promueve la estabilización de HT-B y el compartimento membranoso desaparece, liberando a las S-RNasas en forma estable debido a la posible reducción por la NaTrxh desde la vacuola. En **A**, **B** y **C** los estilos mostrados expresan los alelos S<sub>1</sub> y S<sub>2</sub>. El tubo polínico en **A** expresaría a SLF<sub>3</sub> y en **B** a SLF<sub>1</sub>. Los símbolos que representan a las S-RNasas (oxidadas y reducidas), a los dos haplotipos de SLF en forma homotetramérica, a la NaTrxh (oxidada y reducida) y a los demás factores involucrados están mostrados en la parte inferior de la figura.

En la propuesta de las figuras 36B y C se considera como factor importante la posible fuga de S-RNasas al citoplasma del tubo polínico, contemplada por el modelo de la evasión de citotoxicidad de las S-RNasas (Figura 8) con el fin de explicar una interacción directa S-RNasa:SLF (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006). De tal manera, es también posible que haya fugas de la NaTrxh debido a su fuerte interacción con la S-RNasa. Así, en el citoplasma del tubo polínico, donde seguramente hay NADPH y una NTR, también se llevaría a cabo la reducción de la S-RNasa, produciendo la forma oligomérica que posiblemente es la que interacciona favorablemente con los homotetrámeros de SLF. Si los haplotipos no coinciden, la interacción entre las determinantes alélicas no se lleva a cabo adecuadamente y entonces las S-RNasas permanecen compartimentalizadas en la vacuola debido a la ausencia de HT-B (Goldraij *et al.*, 2006) (Figura 36B). En una cruce incompatible, los oligómeros de la S-RNasa interaccionan adecuadamente con los homotetrámeros de SLF, provocando que HT-B sea mantenida y las S-RNasas serían liberadas al citoplasma del tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006) (Figura 36C), tal y como se explica por el modelo de la evasión de la citotoxicidad de las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006; McClure y Franklin-Tong, 2006).

En la Figura 36 se propone principalmente que las fugas de NaTrxh y S-RNasa son fundamentales para que la NaTrxh reduzca a la S-RNasa en el citoplasma del tubo polínico y así favorecer su interacción con SLF. Sin embargo, también se contempla la posibilidad de que la NaTrxh se encuentre dentro de la vacuola y pueda ser reducida por una NTR que hipotéticamente se incorpore a este compartimiento del tubo polínico. El NADPH, producido en la vacuola o incorporado a ésta, junto con la NTR mantendrían el sistema NADPH/NTR/Trx dentro de la vacuola para que la NaTrxh pueda reducir a las S-RNasas compartimentalizadas y así mantenerlas en su forma más estable y activas. En caso de ser liberadas, podrán llevar a cabo su efecto citotóxico sobre el tubo polínico en forma rápida y eficiente. Ambas posibilidades son factibles e incluso no son excluyentes.

## VIII. CONCLUSIONES

La NaTrxh es una proteína que se expresa más en los estilos de especies AC que en los de las especies AC de *Nicotiana*, sugiriendo que sea uno de los genes modificadores involucrados en la respuesta del rechazo del polen alelo S-específico. A pesar de que *NaTrxh* presenta un patrón de expresión ubicuo a nivel de proteína en *N. alata*, se propone que es una Trx que participa en eventos reproductivos. Una evidencia que apoya esta idea es que, además de expresarse principalmente en los verticilos florales, en los estilos no sólo interacciona con la S-RNasa, sino también la reduce. Esta reducción es de gran relevancia fisiológica si se considera que puede ser la causa de que la S-RNasa posea una conformación adecuada que le permita interactuar con SLF, su contraparte masculina en el tubo polínico.

La NaTrxh es una Trx h cuya característica particular, y novedosa en plantas, es que es una proteína de secreción. Esta proteína contiene un dominio, probablemente entre los residuos Ala-17 y Pro-27, que promueve su exportación hacia la matriz extracelular del tejido de transmisión de los estilos en *N. alata*.

Las redes de interacción entre el tubo polínico y el pistilo se llevan a cabo principalmente en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar. El hecho de que la NaTrxh sea secretada hacia esta región del estilo y coexista espacialmente con la S-RNasa refuerza la propuesta de que tanto su interacción como la reducción de la S-RNasa se lleve a cabo *in vivo*, siendo así la NaTrxh el agente reductor que provoca una conformación adecuada de la S-RNasa para que realice su función de reconocimiento alelo S-específico.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- 📖 Ai, Y., E. Kron y T. H. Kao. 1991. S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida*. *Mol. Gen. Genet.* **230**: 353-358.
- 📖 Anderson, E. y D. de Winton. 1931. The genetic analysis of an unusual relationship between self-sterility and self-fertility in *Nicotiana*. *Ann. Mo. Bot. Gard.* **18**: 97-116.
- 📖 Anderson, M. A., E. C. Cornish, I. Goeffrey, R. Bernatzky, A. Altkinson, T. Orpin, H. Dedman, G. Tregear, R. Fernley y A. E. Clarke. 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana alata*. *Plant Cell* **1**: 483-491.
- 📖 Arnér, E. S. J. y A. Holmgren. 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6102-6109.
- 📖 Arscott, L. D., s. Gromer, R. H. Schirmer, K. Becker y C. H. Williams Jr. 1997. The mechanism of thioredoxin reductase from human placenta is similar to the mechanisms of lipoamide dehydrogenase and glutathione reductase and is distinct from the mechanism of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **94**: 3621-3626.
- 📖 Azevedo, C., J. M. Santos-Rosa y K. Shirasu. 2001. The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* **6**: 354-358.
- 📖 Bacic, A., A. C. Gell y A. E. Clarke. 1988. Arabinogalactan proteins from stigmas of *Nicotiana alata*. *Phytochemistry* **27**: 679-684.
- 📖 Baier, M. y K. J. Dietz. 1996. Primary structure and expresión of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol. Biol.* **31**: 553-564.
- 📖 Balmer, Y. y B. B. Buchanan. 2002. Yet another plant thioredoxin. *Trends Plant Sci.* **7**: 191-193.
- 📖 Bateman, A. J. 1955. Self-incompatibility systems in angiosperms. III. Cruciferae. *Heredity* **9**: 52-68.
- 📖 Bendtsen, J. D., L. J. Jensen, N. Blom, G. von Heijne y S. Brunak. 2004b. Feature-based prediction of non classical and leaderless protein secretion. *Protein Eng. Des. Sel.* **17**: 349-356.
- 📖 Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne y S. Brunak. 2004a. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.* **340**: 783-790.
- 📖 Besse, I., J. H. Wong, K. Kobrehel y B. B. Buchanan. 1996. Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **93**: 3169-3175.
- 📖 Bhojwani, S. S. y S. P. Bhatnagar. 1999. *The embryology of Angiosperms*. Vilkas Publishing House PVT LTD, 4a edición, Nueva Delhi, India.
- 📖 Bosch, M., J. Sommer-Knudsen, J. Derkensen y C. Mariani. 2001. Class III pisti-specific extensin-like proteins from tobacco have characteristics of arabinogalactan proteins. *Plant Physiol.* **125**: 2180-2188.
- 📖 Bower, M. S., D. D. Matias, E. Fernandes-Carvalho, M. Mazzurco, T. Gu, S. Rothstein y D. R. Goring. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact

with the kinase domain of a *Brassica* S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**: 1641-1650.

📖 Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

📖 Bréhélin, C., N. Mouaheb, L. Verdoucq, J. M. Lancelin e Y. Meyer. 2000. Characterization of determinants for the specificity of *Arabidopsis* thioredoxins h in yeast complementation. *J. Biol. Chem.* **275**: 31641-31647.

📖 Brugidou, C., I. Marty, Y. Chartier e Y. Meyer. 1993. The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 285-293.

📖 Cabrillac, D., J. M. Cock, C. Dumas y T. Gaude. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**: 220-223.

📖 Chae, h. Z., S. J. Chung y S. T. Raines. 1997. General acid/base catalysis in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **36**: 15810-15816.

📖 Cheung, A. Y. y H-M. Wu. 2001. Pollen-tube guidance-right on target. *Science* **293**: 1441-1442.

📖 Cleves, A. E., D. N. W. Cooper, S. H. Barondes y R. B. Nelly. 1996. A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **133**: 1017-1026.

📖 Cooper, D. N. y S. H. Barondes. 1990. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J. Cell Biol.* **110**: 1681-1691.

📖 Cruz-García, F., C. N. Hancock, D. Kim y B. McClure. 2005. Stylar glycoproteins bind to S-RNase *in vitro*. *Plant J.* **42**: 295-304.

📖 Cruz-García, F., C. N. Hancock y B. McClure. 2003. S-RNase complexes and pollen rejection. *J. Exp. Bot.* **54**: 123-130.

📖 Cruz-García, F. y B. A. McClure. 2001. Sexual incompatibility. In Bohjwani, S. S. y W. Y. Soh (eds.). *Current trends in the embryology of angiosperms*. Kluwer Academic Publishers, Inglaterra. Pp. 166-196.

📖 Dai, S., C. Schwendtmayer, P. Schürmann, S. Ramaswamy y H. Eklund. 2000. Redox signaling in chloroplasts: cleavage of disulfides by an iron-sulfur cluster. *Science* **287**: 655-658.

📖 de Graaf, B. H. J., A. Y. Cheung, T. Andreveva, K. Levasseur, M. Kieliszewski y H-m Wu. 2005. Rab11 GTPase-regulated membrane trafficking is crucial for tip-focused pollen tube growth in tobacco. *Plant Cell* **17**: 2564-2579.

📖 de Nettancourt, D. 1977. *Incompatibility in angiosperms*. Monographs on theoretical and applied Genetics 3. Springer-Verlag, E.U.A.

📖 de Nettancourt, D. 2001. *Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants*. Springer-Verlag, E.U.A.

📖 Deblaere, R., B. Bytebier, H. De Greve, F. Deboeck, J. Schell, M. Van Montagu y J. Leemans. 1985. Efficient octopin Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* **13**: 4777-4778.

📖 Delgado, M. L., M. L. Gil y D. Gozalbo. 2003. *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces*

*cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast* **20**: 713-722.

📖 Eklund, H., F. K. Gleason y A. Holmgren. 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* **11**: 13-28.

📖 Entani, T., M. Iwano, H. Shiba, F. S. Che, A. Isogai y S. Takayama. 2003. Comparative análisis of the self-incompatibility (S-) locus region of *prunas mume*: identification of a pollen expressed F-box gene with allelic diversity. *Genes Cells* **8**: 203-213.

📖 Florencio, F. J., B. C. Yee, T. C. Johnson y B. B. Buchanan. 1988. An NADP/thioredoxin system in leaves. Purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin *h* from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* **266**: 496-507.

📖 Fernandes, P. A., J. N. Keen, J. B. C. Findlay y P. Moradas-Ferreira. 1992. A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**: 67-73.

📖 Foote, H. C. C., J. P. Ride, V. E. Franklin-Tong, E. A. Walker, M. J. Lawrence y F. C. H. Franklin. 1994. Cloning and expression of a distinctive class of self-incompatibility (S) gene from *Papaver rhoeas* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2265-2269.

📖 Franklin, F. C. H., M. J. Lawrence y V. E. Franklin-Tong. 1995. Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *Int. Rev. Cytol.* **158**: 1-64.

📖 Galan, J. M., A. Wiederkehr, J. H. Seol, R. Haguenaer-Tsapis, R. J. Deshaies, H. Riezman y M. Peter. 2001. Skp1p and the F-box protein Rcy1p form a non-SCF complex involved in recycling of the SNARE Snc1p in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 3105-3117.

📖 Gelhaye, E., N. Rouhier, J. Gérard, Y. Jolivet, J. Gualberto, N. Navrot, P. I. Ohlsson, G. Wingsle, M. Hirasawa, D. B. Knaff, H. Wang, P. Dizengremel, Y. Meyer y J. P. Jacquot. 2004b. A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14545-14550.

📖 Gelhaye, E., N. Rouhier y J. P. Jacquot. 2004a. The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 265-271.

📖 Gelhaye, E., N. Rouhier, P. Laurent, P. E. Sautière, F. Martin y J. P. Jacquot. 2002. Isolation and characterization of an extended thioredoxin *h* from poplar. *Physiol. Plantarum* **114**: 165-171.

📖 Gilmore, T. D., M. Koedood, K. A. Piffat y D. W. White. 1996. Rel/NF-kappaB proteins and cancer. *Oncogene* **13**: 1367-1378.

📖 Giranton, J. L., M. J. Ariza, C. Dumas, J. M. Cock y T. Gaude. 1995. The S locus receptor kinase gene encodes a soluble glycoprotein corresponding to the SRK extracellular domain in *Brassica oleracea*. *Plant J.* **8**: 827-834.

📖 Giranton, J. L., C. Dumas, J. M. Cock y T. Glaude. 2000. The integral membrane S-locus receptor kinase of *Brassica* has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 3759-3764.

- 📖 Goldraj, A., K. Kondo, C. B. Lee, C. N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vázquez-Santana, S. Kim, T. E. Phillips, F. Cruz-García y B. McClure. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature* **439**: 805-810.
- 📖 Golz, J. F., H. Y. Oh, V. Su, M. Kusaba y E. Newbigin. 2001. Genetic análisis of *Nicotiana* pollen-part mutants is consistent with the presence of an S-ribonuclease inhibitor at the S locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 15372-15376.
- 📖 Golz, J. F., V. Su, A. E. Clarke y E. Newbigin. 1999. A molecular description of mutations affecting the pollen component of the *Nicotiana alata* S locus. *Genetics* **152**: 1123-1135.
- 📖 Goring, D. R. y S. J. Rothstein. 1992. The S-locus receptor kinase gene in a self-incompatible *Brassica napus* line encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Cell* **4**: 1273-1281.
- 📖 Gorlatov, S. N. y T. C. Stadtman. 1998. Human thioredoxin reductase from HeLa cells: selective alkylation of selenocysteine in the protein inhibits enzyme activity and reduction with NADPH influences affinity to heparin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 8520-8525.
- 📖 Gozalbo, D., I. Gi-Navarro, I. Azorín, J. Renau-Piqueras, J. P. Martínez y M. L. Gil. 1998. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* **66**: 2052-2059.
- 📖 Gu, T., M. Mazzurco, W. Sulaman, D. D. Matias y D. R. Goring. 1998. Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 382-387.
- 📖 Hancock, C. N., L. Kent y B. A. McClure. 2005. The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**: 716-723.
- 📖 Haring, V., J. E. Gray, B. McClure, M. A. Anderson y A. Clarke. 1990. Self-incompatibility: a self-recognition system in plants. *Science* **250**: 937-941.
- 📖 Higashiyama, T., S. Yabe, N. Sasaki, Y. Nishimura, S. Miyagishima, H. Kuroiwa y T. Kuroiwa. 2001. Pollen tube attraction by the synergid cell. *Science* **293**: 1480-1483.
- 📖 Hirata, T., A. Iwamoto-Kihara, G. H. Sun-Wada, T. Okajima, Y. Wada y M. Futai. 2003. Subunit rotation of vacuolar-type proton pumping ATPase: relative rotation of the G as to c subunit. *J. Biol. Chem.* **278**: 23714-23719.
- 📖 Holmgren, A. 1984. Enzymatic reduction-oxidation of protein disulfides by thioredoxin. *Methods Enzymol.* **107**: 295-300.
- 📖 Holmgren, A. 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**: 237-271.
- 📖 Holmgren, A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**: 9627-9632.
- 📖 Holmgren, A. 1995. Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**: 239-243.
- 📖 Huang, S., H. S. Lee, B. Karunanandaa y T. H. Kao. 1994. Ribonuclease activity of *Petunia inflata* S proteins is essential for rejection in self-pollen. *Plant Cell* **6**: 1021-1028.



- 📖 Ida, K., S. Norioka, M. Yamamoto, T. Kumasaka, E. Yamashita, E. Newbiggin, A. E. Clarke, F. Sakiyama y M. Sato. 2001. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* S<sub>F11</sub>-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**: 103-112.
- 📖 Ikeda, K., B. Igic, K. Ushijima, H. Yamane, N. R. Hauck, R. Nakano, H. Sassa, A. F. Iezzoni, J. R. Kohn y R. Tao. 2004. Primary structural features of the S haplotype-specific F-box protein, SFB, in *Prunus*. *Sex. Plant Reprod.* **16**: 235-243.
- 📖 Ioerger, T. R., J. R. Gohlke, B. Xu y T. H. Kao. 1991. Primary structural features of the self-incompatibility protein in Solanaceae. *Sex. Plant Reprod.* **4**: 81-87.
- 📖 Ishiwatari, Y., T. Fujiwara, K. C. McFarland, K. Nemoto, H. Hayashi, M. Chino y W. J. Lucas. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**: 12-22.
- 📖 Ishiwatari, Y., C. Honda, I. Kawashima, S. Nakamura, H. Hirano, S. Mori, T. Fujiwara, H. Hayashi, M. Chino. 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**: 456-463.
- 📖 Jacquot, J. P., J. M. Lancelin e Y. Meyer. 1997. Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New Phytol.* **136**: 543-570.
- 📖 Jefferson, R. A. 1988. Plant reporter genes: the GUS gene fusion reporter system. *Genet. Eng.* **10**: 247-263.
- 📖 Juárez-Díaz, J. A. 2002. *Identificación de un cDNA que codifica para una tiorredoxina tipo h en Nicotiana alata*. Tesis Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- 📖 Kachroo, A., E. M. E. Nasrallah y J. B. Nasrallah. 2002. Self-incompatibility in the Brassicaceae: receptor-ligand signaling and cell-to-cell communication. *Plant Cell Sup.* **2002**: S227-S238.
- 📖 Kachroo, A., C. R. Schopfer, M. E. Nasrallah y J. B. Nasrallah. 2001. Allele-specific receptor-ligand interactions in Brassica self-incompatibility. *Science* **293**: 1824-1826.
- 📖 Kalef, E., P. G. Walfish y C. Gitler. 1993. Arsenical-based affinity chromatography of vicinal dithiol-containing proteins: purification of L1210 leukemia cytoplasmic proteins and the recombinant rat c-erb Aβ<sub>1</sub> T<sub>3</sub> receptor. *Anal. Biochem.* **212**: 325-334.
- 📖 Kallis, G. B., y A. Holmgren. 1980. Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **255**: 10261-10265.
- 📖 Kandasamy, M. K., D. J. Paolillo, C. D. Faraday, J. B. Nasrallah y M. E. Nasrallah. 1989. The S-locus specific glycoproteins of Brassica acumulate in the cell wall of developing stigma papillae. *Dev. Biol.* **134**: 462-472.
- 📖 Kao, T. H. y A. G. McCubbin. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12059-12065.
- 📖 Kao, T. H., y T. Tsukamoto. 2004. The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: S72-S83.

- 📖 Kobrehel, K., J. H. Wong, A. Balogh, F. Kiss, B. C. Yee y B. B. Buchanan. 1992. Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *f*. *Plant Physiol.* **99**: 919-924.
- 📖 Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenjer, H. D. Ulrich, T. U. Mayer y S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635-644.
- 📖 Kondo, K., M. Yamamoto, R. Itahashi, T. Sato, H. Egashira, T. Hattori y Y. Kowiyama. 2002a. Insights into the evolution of self-compatibility in *Lycopersicon* from a study of stylar factors. *Plant J.* **30**: 143-153.
- 📖 Kondo, K., M. Yamamoto, D. P. Matton, T. Sato, M. Hirai, S. Norioka, T. Hattori y Y. Kowiyama. 2002b. Cultivated tomato has defects in both *S-RNase* and *HT* genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J.* **29**: 627-636.
- 📖 Kowiyama, Y., C. Kunz, I. Lewis, E. Newbigin, A. E. Clarke y M. A. Anderson. 1994. Self-compatibility in a *Lycopersicon peruvianum* varian (LA2157) is associated with a lack of style S-RNase activity. *Theor. Appl. Genet.* **88**: 859-864.
- 📖 Krause, G., J. Lundström, J. López-Barrera, C. Pueyo-de la Cuesta y A. Holmgren. 1991. Mimicking the active site of protein disulfide-isomerase by substitution of proline 34 in *Escherichia coli* thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **266**: 9494-9500.
- 📖 Kumar, S., K. Tamura, I. B. Jakobsen y M. Nei. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics análisis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.
- 📖 Kusaba, M., K. Dwyer, J. Hendershot, J. Vrebalov, J. B. Nasrallah y M. Nasrallah. 2001. Self-incompatibility in the genus *Arabidopsis*: characterization of the *S* locus in the outcrossing *A. lyrata* and its autogamous relative *A. thaliana*. *Plant Cell* **13**: 627-643.
- 📖 Lai, Z., W. Ma, B. Han, L. Liang, Y. Zhang, G. Hong y Y. Xue. 2002. An F-box gene linked to the self-incompatibility (*S*) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* **50**: 29-41.
- 📖 Laloi, C., N. Rayapuram, Y. Chartier, J. M. Grienenberger, G. Bonnard e Y. Meyer. 2001. Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 14144-14149.
- 📖 Laurent, T. C., E. C. Moore y P. Reichhard. 1964. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides VI. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **239**: 3436-3444.
- 📖 Lee, H. S., S. Huang y T. H. Kao. 1994. S-proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature* **367**: 560-563.
- 📖 Lind, J. L., I. Bonong, A. E. Clark y M. A. Anderson. 1996. A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* *in vitro*. *Sex. Plant Reprod.* **9**: 75-86.
- 📖 Llave, C., K. D. Kasschau y J. C. Carrington. 2000. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13401-13406.
- 📖 Lozano, R. M., J. H. Wong, B. C. Yee, A. Peters, K. Kobrehel y B. B. Buchanan. 1996. New evidence for a role for thioredoxin *h* in germination and seedling development. *Planta* **200**: 100-106.

- 📖 Luthman, M. y A. Holmgren. 1982. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* **21**: 6628-6633.
- 📖 Lüttge, U. y R. Ratajczak. 1997. The physiology, biochemistry, and molecular biology of the plant vacuolar ATPase. *Adv. Bot. Res.* **25**: 253-296.
- 📖 Luu, D. T., K. Qin, G. Laublin, Q. Yang, D. Morse y M. Cappadocia. 2001. Rejection of S-heteroallelic by a dual-specific S-RNase in *Solanum chacoense* predicts a multimeric SI pollen component. *Genetics* **159**: 329-335.
- 📖 Luu, D. T., X. Qin, D. Morse y M. Cappadocia. 2000. S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature* **407**: 649-651.
- 📖 Marchand, C., P. L. Maréchal, Y. Meyer, M. Miginiac-Maslow, E. Issakidis-Bourguet y P. Decottignies. 2004. New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**: 2696-2706.
- 📖 Martin, F. W. 1968. The behavior of *Lycopersicon* incompatibility alleles in an alien genetic milieu. *Genetics* **60**: 101-109.
- 📖 Mather, K. 1943. Specific differences in *Petunia* I. Incompatibility. *J. Genet.* **45**: 215-235.
- 📖 Matsuoka, K., T. Higuchi, M. Maeshima y K. Nakamura. 1997. A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. *Plant Cell* **9**: 533-546.
- 📖 Matton, D. P., D. T. Luu, Q. Xike, Q. Laublin, M. O'Brien, O. Maes, D. Morse y M. Cappadocia. 1999. Production of an S-RNase with dual specificity suggests a novel hypothesis for the generation of new S alleles. *Plant Cell* **11**: 2087-2097.
- 📖 Matton, D. P., O. Maes, G. Laublin, Q. Xike, C. Bertrand, D. Morse y M. Cappadocia. 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell* **9**: 1757-1766.
- 📖 Mazzurco, M., W. Sulaman, H. Elina, J. M. Cock y D. R. Goring. 2001. Further analysis of the interactions between the *Brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1, and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* **45**: 365-376.
- 📖 McClure, B. Sin publicar. *Nicotiana* S-RNase forms homo-oligomers *in vitro* and *in vivo*.
- 📖 McClure, B. 2004. S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell* **16**: 2840-2847.
- 📖 McClure, B. A., F. Cruz-García, B. S. Beecher y W. Sulaman. 2000. Factors effecting inter- and intra-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Ann. Bot. Suppl. A* **85**: 113-123.
- 📖 McClure, B. A. y V. Franklin-Tong. 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta* **224**: 233-245.
- 📖 McClure, B. A., J. E. Gray, M. A. Anderson y A. E. Clarke. 1990. Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen ribosomal RNA. *Nature* **347**: 757-760.
- 📖 McClure, B. A., V. Haring, P. R. Ebert, M. A. Anderson, R. J. Simpson, F. Sakiyama y A. Clarke. 1989. Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature* **342**: 955-957.

- 📖 McClure, B. A., B. Mou, S. Canevascini y R. Bernatzky. 1999. A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 13548-13553.
- 📖 McCubbin, A. G., Y. Y. Chung y T. H. Kao. 1997. A mutant S<sub>3</sub> RNase of *Petunia inflata* lacking RNase activity has an allele-specific dominant negative effect on self-incompatibility interactions. *Plant Cell* **9**: 85-95.
- 📖 Mestres-Ortega, D. e Y. Meyer. 1999. The *A. thaliana* genome encodes at least four thioredoxins *m* and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**: 307-316.
- 📖 Meyer, Y., L. Verdoucq y F. Vignols. 1999. Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* **4**: 388-394.
- 📖 Meyer, Y., F. Vignols y J. P. Reichheld. 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**: 394-402.
- 📖 Murfett, J., T. Atherton, B. Mov, C. Gasser y B. A. McClure. 1994. S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature* **367**: 563-566.
- 📖 Murfett, J., T. J. Strabala, D. M. Zurek, B. Mou, B. Beecher y B. A. McClure. 1996. S-RNase and interspecific pollen rejection in the genus *Nicotiana*: multiple pollen-rejection pathways contribute to unilateral incompatibility between self-incompatible and self-compatible species. *Plant Cell* **8**: 943-958.
- 📖 Mustacich, D. y G. Powis. 2000. Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* **346(Pt 1)**: 1-8.
- 📖 Nasrallah, J. B., T. H. Kao, M. L. Goldberg y M. E. Nasrallah. 1985. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleracea*. *Nature* **318**: 263-267.
- 📖 Nickel, W. 2003. The mystery of nonclassical protein secretion. A current view on cargo proteins and potential export routes. *Eur. J. Biochem.* **270**: 2109-2119.
- 📖 Nishio, T. y M. Kusaba. 2000. Sequence diversity of SLG and SRK in *Brassica oleracea* L. *Ann. Bot.* **85(suppl. A)**: 141-146.
- 📖 Nombela, C., C. Gil y W. L. Chaffin. 2006. Non-conventional protein secretion in yeast. *Trends Microbiol.* **14**: 15-21.
- 📖 O'Brien, M., C. Kapfer, G. Major, M. Laurin, C. Bertrand, K. Kondo, Y. Kowiyama y D. P. Matton. 2002. Molecular analysis of the stilar-expressed *Solanum chacoense* small asparagine-rich protein family related to the HT modifier of gametophytic self-incompatibility in *Nicotiana*. *Plant J.* **32**: 985-996.
- 📖 Oxley, D. y A. Bacic. 1996. Disulphide bonding in a stilar self-incompatibility ribonucleases of *Nicotiana glauca*. *Eur. J. Biochem.* **242**: 75-80.
- 📖 Padmanaban, S., X. Lin, I. Perera, Y. Kawamura y H. Sze. 2004. Differential expression of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Phys.* **134**: 1514-1526.
- 📖 Pardo, M., L. Monteoliva, J. Pla, M. Sánchez, C. Gil y C. Nombela. 1999. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**: 459-472.

- 📖 Powis, G. y W. R. Montfort. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**: 261-295.
- 📖 Qiao, H., H. Wang, L. Zhao, J. Zhou, Z. Lai, Y. Zhang, T. P. Robbins y Y. Xue. 2004a. The F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell* **16**: 2307-2322.
- 📖 Qiao, H. H. Wang, L. Zhao, J. Zhou, J. Huang, Y. Zhang y Y. Xue. 2004b. The F-box protein AhSLF-S<sub>2</sub> physically interacts with S-RNases that may be inhibited by the ubiquitin/26S proteasome pathway of protein degradation during compatible pollination in *Antirrhinum*. *Plant Cell* **16**: 582-595.
- 📖 Reichheld, J. P., D. Mestres-Ortega, C. Laloi e Y. Meyer. 2002. The multigenic family of thioredoxin *h* in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol. Biochem.* **40**: 685-690.
- 📖 Rivera-Madrid, R., D. Mestres, P. Marinho, J. P. Jacquot, P. Decottignies, M. Muginiac-Maslow e Y. Meyer. 1995. Evidence for five divergent thioredoxin *h* sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **92**: 5620-5624.
- 📖 Royo, J., C. Kunz, Y. Kowyama, M. A. Anderson, A. E. Clarke y E. Newbigin. 1994. Loss of a histidine residue at the active site of S-locus ribonuclease is associated with self-compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 6511-6514.
- 📖 Rubartelli, A., F. Cozzolino, M. Talio y R. Sitia. 1990. A novel secretory pathway for interleukin-1 $\beta$ , a protein lacking a signal sequence. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* **9**: 1503-1510.
- 📖 Saitou, N. y M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
- 📖 Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plantarum* **79**: 206-209.
- 📖 Schöb, H., C. Kunz y F. Meins Jr. 1997. Silencing of transgenes introduced in leaves by agroinfiltration: a simple method for investigating sequences requirements for gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* **256**: 581-585.
- 📖 Schopfer, C. R. y J. B. Nasrallah. 2000. Self-incompatibility: Prospects for a novel putative peptide-signaling molecule. *Plant Physiol.* **124**: 935-940.
- 📖 Schopfer, C. R., M. E. Nasrallah y J. B. Nasrallah. 1999. The male determinant of self-incompatibility in *Brassica*. *Science* **286**: 1697-1700.
- 📖 Schürmann, P. y J. P. Jacquot. 2000. Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 371-400.
- 📖 Sheen, J., H. Seongbin, Y. Niwa, H. Kobayashi y D. W. Galbraith. 1995. Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells. *Plant J.* **8**: 777-784.
- 📖 Shiba, H., S. Takayama, M. Iwano, H. Shimosato, M. Funato, T. Nakagawa, F. S. Che, G. Suzuki, M. Watanabe, K. Hinata y A. Isogai. 2001. A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in self-incompatibility of Brassica species. *Plant Physiol.* **125**: 2095-2103.
- 📖 Sijacic, P., X. Wang, A. L. Skirpan, Y. Wang, P. E. Dowd, A. G. McCubbin, S. Huang, T. H. Kao. 2004. Identification of the pollen determinant of S-RNase self-incompatibility. *Nature* **429**: 302-305.
- 📖 Silva, N. F., S. L. Stone, L. N. Christie, W. Sulaman, K. A. Nazarian, L. A. Burnett, M. A. Arnoldo, S. J. Rothstein y D. R. Goring. 2001. Expression of the S receptor kinase in self-compatible *Brassica napus* cv. Westar leads to the allele-

specific rejection of self-incompatible *Brassica napus* pollen. *Mol. Genet. Genomics* **265**: 552-559.

📖 Soderberg, A., B. Sahaf y A. Rosen. 2000. Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res.* **60**: 2281-2289.

📖 Sonneveld, T., K. R. Tobutt, S. P. Vaughan y T. P. Robbins. 2005. Loss of pollen-S function in two self-compatible selections of *Prunus avium* is associated with deletion/mutation of an S haplotype-specific F-box gene. *Plant Cell* **17**: 37-51.

📖 Stein, J. C., B. Howlett, D. C. Boyes, M. E. Nasrallah y J. B. Nasrallah. 1991. Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **88**: 8816-8820.

📖 Stein, J. C. y J. B. Nasrallah. 1993. A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase of *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **101**: 1103-1106.

📖 Stewart, E. J., F. Åslund y J. Beckwith. 1998. Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* **17**: 5543-5550.

📖 Stevens, T. H. y M. Forgac. 1997. Structure, function, and regulation of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 779-808.

📖 Stone, S. L., M. Arnoldo y D. R. Goring. 1999. A breakdown of Brassica self-incompatibility in ARC1 antisense transgenic plants. *Science* **26**: 1729-1731.

📖 Suzuki, T., M. Kusaba, M. Matsushita, K. Okazaki y T. Nishio. 2000. Characterization of Brassica S-haplotypes lacking S-locus glycoprotein. *FEBS Lett.* **482**: 102-108.

📖 Sze, H., J. M. Ward y S. Lai. 1992. Vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPases from plants. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 371-381.

📖 Takayama, S. y A. Isogai. 2005. Self-incompatibility in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 467-489.

📖 Takayama, S., H. Shiba, M. Iwano, H. Shimosato, F. S. Che, N. Kai, M. Watanabe, G. Suzuki, K. Hinata y A. Isogai. 2000. The pollen determinant of self-incompatibility in *Brassica campestris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1920-1925.

📖 Takayama, S., H. Shimosato, H. Shiba, M. Funato, F. S. Che, M. Watanabe, M. Iwano y A. Isogai. 2001. Direct ligand-receptor complex interaction controls Brassica self-incompatibility. *Nature* **413**: 534-538.

📖 Tanudji, M., S. Hevi y S. Cchuck. 2003. The nonclassic secretion of thioredoxin is not sensitive to redox state. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **284**: C1272-C1279.

📖 Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin y D. G. Higgins. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* **25**: 4876-4882.

📖 Thompson, R. y H. Kirch. 1992. The S-locus in flowering plants: when self-rejection is self-interest. *Trends Genet.* **8**: 381-387.

📖 Tsukamoto, T., T. Ando, H. Kokubun, H. Watanabe, M. Masada, X. Zhu, E. Marchesi y T. H. Kao. 1999. Breakdown of self-incompatibility in a natural

population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants. *Sex. Plant Reprod.* **12**: 6-13.

📖 Tsukamoto, T., T. Ando, H. Kokubin, H. Watanabe, T. Sato, M. Masada, E. Marchesi y T. H. Kao. 2003. Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* caused by a modifier locus that suppresses the expression of an S-RNase gene. *Sex. Plant Reprod.* **15**: 255-263.

📖 Ushijima, K., H. Sassa, A. M. Dandekar, T. M. Gradziel, R. Tao y H. Hirano. 2003. Structural and transcriptional análisis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *Plant Cell* **15**: 771-781.

📖 Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzi y R. Tao. 2004. The S haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant J.* **39**: 573-586.

📖 Verdoucq, L., J. P. Jacquot, F. Vignols, Y. Chartier e Y. Meyer. 1999. In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J. Biol. Chem.* **274**: 19714-19722.

📖 Wilkinson, K. D. 1999. Ubiquitin-dependent signaling: the role of ubiquitination in the response of cells to their environment. *J. Nutr.* **129**: 1933-1936.

📖 Williams Jr., C. H., L. D. Arscott, S. Müller, B. W. Iennon, M. L. Ludwig, P. F. Wang, D. M. Veine, K. Becker y R. H. Schirmer. 2000. Thioredoxin reductase. Two models of catalysis have evolved. *Eur. J. Biochem.* **267**: 6110-6117.

📖 Wollman, E. E., L. d'Auriol, L. Rimsky, A. Shaw, J. P. Jacquot, P. Wingfield, P. Graber, F. Dessarps, P. Robin, F. Galibert, J. Bertoglio y D. Fradelizi. 1988. Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin. *J. Biol. Chem.* **263**: 15506-15512.

📖 Wu, H. M., E. Wong, J. Ogdahl y A. Y. Cheung. 2000. A pollen tube growth promoting arabinogalactan protein from *Nicotiana glauca* is similar to the tobacco TTS protein. *Plant J.* **22**: 165-176.

📖 Wynn, R., M. J. Cocco y F. M. Richards. 1995. Mixed disulfide intermediates during the reduction of disulfides by *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* **34**: 11807-11813.

📖 Yano, H., J. H. Wong, Y. M. Lee, J. M. Cho y B. B. Buchanan. 2001. A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4794-4799.

📖 Zhong, L. W., E. S. J. Arner y A. Holmgren. 2000. Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 5854-5859.

📖 Zhu, H. M. Bilgin, R. Bangham, D. Hall, A. Casamayor, P. Bertone, N. Lan, R. Jansen, S. Bidlingmaier, T. Houfek, T. Mitchell, P. Miller, R. A. Dean, M. Gerstein y M. Snyder. 2001. Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* **293**: 2101-2105.

## APÉNDICE

### Amortiguador de corrida SDS-PAGE (cátodo y ánodo)

- a) Glicina: 14.4 g
- b) Tris: 3 g
- c) SDS: 1 g
- d) Aforar a 1 l con H<sub>2</sub>O desionizada.

### Amortiguador de electrotransferencia (Western-blot)

- a) Glicina: 14.4 g
- b) Tris: 3 g
- c) SDS: 1 g
- d) Metanol: 200 ml
- e) Aforar a 1 l con H<sub>2</sub>O desionizada.

### Amortiguador de muestra 6X (para SDS-PAGE)

- a) Tris·HCl 0.28 M, pH 6.8
- b) Glicerol: 30% (v/v)
- c) SDS: 1% (w/v)
- d) DTT (opcional): 0.5 M
- e) Azul de bromofenol: 0.0012% (w/v)
- f) Si se desea preparar con DTT, éste se usa a una concentración final de

### Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 10X

- a) NaCl: 80.0628 g
- b) KCl: 2.013 g
- c) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O: 11.527 g
- d) NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O: 1.9318 g
- e) Disolver en 900 ml de H<sub>2</sub>O desionizada
- f) Ajustar a pH 7.3
- g) Aforar a 1 l y esterilizar por autoclave.

### Células de *A. tumefaciens* competentes para transformación por choque térmico

- a) Crecer una colonia de *A. tumefaciens* en medio YM a 28°C toda la noche con agitación constante.
- b) Inocular 2 ml del cultivo anterior en 50 ml de medio YM fresco.
- c) Incubar con agitación constante a 28°C hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5.
- d) Enfriar el cultivo en hielo por 10 min y centrifugar a 6,000 rpm 5 min a 4°C.
- e) Resuspender el botón celular en 1 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> 20 mM con glicerol al 10% y dividir en alícuotas de 100 µl.
- f) Las células pueden usarse inmediatamente para transformación o congelarse con nitrógeno líquido y guardarlas a -80°C.



### **Células de *E. coli* competentes para transformación por choque térmico**

- a) Crecer una colonia de *E. coli* en 50 ml de medio LB contenidos en un matraz de 250 ml. Incubar con agitación constante a 37°C toda la noche.
- b) Inocular 4 ml del cultivo anterior en 400 ml de medio LB fresco en un matraz de 2 l.
- c) Dejar crecer a 37°C con agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>590</sub> de 0.375.
- d) Vaciar el cultivo en 4 tubos de polipropileno de 250 ml estériles y dejarlos en hielo de 5 a 10 min.
- e) Centrifugar a 3,000 rpm 7 min a 4°C.
- f) Resuspender gentilmente cada botón celular en 20 ml de solución de CaCl<sub>2</sub> fría (preparada como se describe más adelante en este apéndice).
- g) Centrifugar a 3,000 rpm 5 min a 4°C.
- h) Repetir el paso f. Mantener resuspendidas a las células en hielo por 30 min. Mezclar cuidadosamente el contenido de los tubos en uno solo.
- i) Centrifugar a 3,000 rpm 7 min a 4°C.
- j) Resuspender el botón celular con 5 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> frío y dividir en alícuotas de 100 µl.
- k) Sumergir los tubos en nitrógeno líquido y finalmente, guardarlos a -80°C.

### **Medio LB líquido**

- a) Triptona (o peptona): 16 g
- b) Extracto de levadura: 10 g
- c) NaCl: 5 g
- d) Aforar a 1 l con H<sub>2</sub>O desionizada.
- e) Esterilizar por autoclave.
- f) Si se requiere la adición de antibióticos, éstos deben aplicarse una vez esterilizado y enfriado el medio.

### **Medio LB sólido**

- a) Utilizar los mismos reactivos que para el medio LB líquido.
- b) Antes de aforar, agregar 15 g de agar por cada litro de medio LB.
- c) Esterilizar por autoclave.
- d) Si se requiere la adición de antibióticos, éstos deben aplicarse una vez esterilizado y enfriado el medio pero sin que se haya solidificado.

### **Medio YM (para células de *A. tumefaciens*)**

- a) Manitol 10.0 g
- b) Extracto de levadura: 0.4 g
- c) NaCl: 0.1 g
- d) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0.2 g
- e) Aforar a 1 l con H<sub>2</sub>O desionizada (solución A).
- f) Preparar por separado una solución de MgSO<sub>4</sub> 2 M (solución B)
- g) Esterilizar por autoclave (por separado la solución A de la B).
- h) Antes de utilizar el medio para cultivo, agregar a la solución A la solución B, en una proporción 1,000:1.
- i) Si se requiere la adición de antibióticos, éstos deben aplicarse una vez esterilizado y enfriado el medio.

### **Medio YM sólido**

- a) Preparar la solución A del medio YM.
- b) Antes de aforar, agregar 15 g de agar por cada litro de medio YM.
- c) Esterilizar por autoclave.
- d) Agregar la solución B estéril a la solución A en proporción de 1,000:1.
- e) Si se requiere la adición de antibióticos, éstos deben aplicarse una vez esterilizado y enfriado el medio.

### **Solución de CaCl<sub>2</sub> (para células de *E. coli* competentes)**

- a) CaCl<sub>2</sub>: 60 mM
- b) Glicerol: 15% (v/v)
- c) PIPES: 10 mM, pH 7.0
- d) Esterilizar por autoclave.

### **Solución de insulina a una concentración de 10 mg/ml**

- a) Resuspender 5 mg de insulina de bovino (Sigma) en 4 ml de Tris·HCl 50 mM, pH 8.0.
- b) Ajustar a pH 2.0 con HCl 1 M.
- c) Titular rápidamente a pH 8.0 con NaOH 1 M.
- d) Aforar a un volumen final de 5 ml con H<sub>2</sub>O.

### **Transformación de células de *A. tumefaciens* por choque térmico**

- a) Descongelar a las células competentes en hielo.
- b) Agregarles 1 µg del plásmido con el que se desea transformar.
- c) Congelar a las células con el plásmido en nitrógeno líquido por 5 min.
- d) Incubar a las células a 37°C por 25 min.
- e) Agregar 1 ml de medio YM sin marcador de selección e incubar por 3 h a 28°C con agitación constante (225 – 250 rpm).
- f) Centrifugar a 13,000 rpm por 30 s y resuspender el botón celular con 100 µl de medio YM.
- g) Plaquear las células en medio YM sólido con el(los) marcador(es) de selección.
- h) Incubar a 28°C por 2 ó 3 días para obtener a las células transformantes.

### **Transformación de células de *E. coli* por choque térmico**

- a) Agregar a 100 µl de células competentes XX ng del plásmido con el que se desea transformar.
- b) Incubar en hielo por 30 min.
- c) Incubar a 42°C por 40 s.
- d) Adicionar 450 µl de medio LB con glucosa 20 mM e incubar a 37°C con agitación constante (200 – 225 rpm) por 1 h.
- e) Centrifugar a 13,000 rpm por 30 s y resuspender el botón celular con 100 µl de medio LB.
- f) Esparcir en un aplaca de LB con el marcador de selección.
- g) Incubar a 37°C toda la noche.

## ABREVIATURAS

120K	Arabinogalactoproteína de 120 kDa
AC	Autocompatible
Affi-Gel-BSA	Columna de Affi-Gel con BSA unida covalentemente
Affi-Gel-Gly	Columna de Affi-Gel bloqueada con glicina
Affi-Gel-NaTrxh	Columna de Affi-Gel con NaTrxh recombinante unida covalentemente
AFLP	Amplificación de fragmentos polimórficos en longitud
AI	Autoincompatibilidad / autoincompatible
ARC1	Proteína con repeticiones tipo <i>arm</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
CaMV35S	Promotor 35S del virus del mosaico del tabaco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
eSRK	Forma truncada de SRK (sólo contiene la parte soluble del dominio extracelular de SRK)
FAD / FADH <sub>2</sub>	Flavín adenín dinucleótido oxidado / reducido
FITC	Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (verde)
FTR	Tiorredoxina reductasa dependiente de ferredoxina
GFP	Proteína verde fluorescente
GST	Glutación S-transferasa
mBBr	Monobromobimano
<i>N. alata</i> BT	<i>Nicotiana alata cultivar</i> BT (no expresa ninguna S-RNasa, por lo que es un <i>cultivar</i> AC)
NADP <sup>+</sup> / NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado / reducido
Nap11	Quimiocianina específica de estilos de <i>Nicotiana alata</i> de 11 kDa
NaTTS	Proteína específica del tejido de transmisión de <i>N. alata</i>
NTR	Tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH

PAO	4-aminofenilarsinóxido
PBS	Amortiguador fosfato-salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PELP III	Proteína similar a extensina III de pistilo
PRDX	Peroxirredoxina
RE/Golgi	Retículo endoplásmico y aparato de Golgi
RNAi	RNA de interferencia
SCR	Proteína rica en cisteína del <i>locus S</i> de Brassicaceae (determinante masculina del sistema de AI esporofítico)
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
S-RNasa	Glicoproteína con actividad de ribonucleasa del <i>locus S</i> de Solanaceae (determinante femenina del sistema de AI gametofítico)
SCF	Complejo de ubiquitina ligasa E3 (Skp1-culina-caja F)
SLF	Proteína con caja F del <i>locus S</i> de Solanaceae (determinante masculina del sistema de AI gametofítico)
SLG	Glicoproteína del <i>locus S</i> de Brassicaceae
SRK	Receptor con actividad de cinasa del <i>locus S</i> de Brassicaceae (determinante femenina del sistema de AI esporofítico)
TCEP	Tris (2-carboxietil) fosfina
Trx	Tiorredoxina
Trx-S <sub>2</sub>	Tiorredoxina oxidada
Trx-(SH) <sub>2</sub>	Tiorredoxina reducida
V-ATPasa	Bomba de protones vacuolar dependiente de ATP
vPPasa	Pirofosfatasa de membrana vacuolar

# A Novel Thioredoxin *h* Is Secreted in *Nicotiana alata* and Reduces S-RNase *in Vitro*\*

Received for publication, October 28, 2005. Published, JBC Papers in Press, December 13, 2005, DOI 10.1074/jbc.M511687200

Javier Andrés Juárez-Díaz<sup>†</sup>, Bruce McClure<sup>§</sup>, Sonia Vázquez-Santana<sup>¶</sup>, Arturo Guevara-García<sup>||</sup>, Patricia León-Mejía<sup>||</sup>, Judith Márquez-Guzmán<sup>¶</sup>, and Felipe Cruz-García<sup>†1</sup>

From the <sup>†</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), D. F. 04510, México, the <sup>§</sup>Division of Biochemistry, Life Sciences Center, Columbia, Missouri 65211, the <sup>¶</sup>Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70-356, D. F. 04510, México, and the <sup>||</sup>Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Mor. 62250, México

Thioredoxins type *h* are classified into three subgroups. The subgroup II includes thioredoxins containing an N-terminal extension, the role of which is still unclear. Although thioredoxin secretion has been observed in animal cells, there is no evidence suggesting that any thioredoxin *h* is secreted in plants. In this study, we report that a thioredoxin *h*, subgroup II, from *Nicotiana alata* (NaTrxh) is secreted into the extracellular matrix of the stylar transmitting tract tissue. Fractionation studies showed that NaTrxh is extracted along with well characterized secretion proteins such as S-RNases and NaTTS (*N. alata* transmitting tissue-specific protein). Moreover, an NaTrxh-green fluorescent fusion protein transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* leaves was also secreted, showing that NaTrxh has the required information for its secretion. We performed reduction assays *in vitro* to identify potential extracellular targets of NaTrxh. We found that S-RNase is one of the several potential substrates of the NaTrxh in the extracellular matrix. In addition, we proved by affinity chromatography that NaTrxh specifically interacts with S-RNase. Our findings showed that NaTrxh is a new thioredoxin *h* in *Nicotiana* that is secreted as well as in animal systems. Because NaTrxh is localized in the extracellular matrix of the stylar transmitting tract and its specific interaction with S-RNase to reduce it *in vitro*, we suggest that this thioredoxin *h* may be involved either in general pollen-pistil interaction processes or particularly in S-RNase-based self-incompatibility.

Thioredoxins (Trxs)<sup>2</sup> are small conserved proteins that play an important role in cellular redox regulation. When the Trx active site WCGPC is reduced, it is able to reduce the disulfide bonds of target proteins. Trxs are widely distributed in nature from prokaryotes to

eukaryotes. In photosynthetic organisms, Trxs have been shown to be highly polymorphic and to participate in several central cellular processes (1, 2). The diversity of physiological roles in which Trxs participate depends entirely on the target proteins (3–5). The 20 genes encoding Trxs in the *Arabidopsis thaliana* genome (6) and the proteomic analysis (2) of their targeted proteins by Trx h3 in *A. thaliana* reinforce the wide range of functions in which these proteins are involved.

In plants, five different types of Trxs have been described: *m*, *f*, *x*, *o*, and *h*. Types *m*, *f*, and *x* are chloroplastic, whereas type *o* Trxs are mitochondrial and type *h* Trxs (Trx h) are assumed to be localized in the cytoplasm (5, 7–11). The mitochondrial and cytoplasmic Trxs are reduced by mitochondrial (11) or cytoplasmic (12) NADPH-dependent thioredoxin reductases (NTR).

Although Trxs h have traditionally been considered to be cytoplasmic proteins, recent analyses (13) revealed that they can be further differentiated into three subgroups. Subgroup II includes Trxs h with N-terminal extensions. The biochemical function of these extensions remains unclear, and the available algorithms do not predict any targeting signal. Gelhaye *et al.* (14) reported on a Trx h subgroup II from poplar (*Populus tremula*), PtTrxh2, the N-terminal extension of which is necessary to target this Trx h to mitochondria. In addition, RPP13-1, a Trx h present in the rice (*Oryza sativa*) phloem sap, mediates its own transport from cell to cell through plasmodesmata only if its N-terminal extension is present (15, 16).

Here, we report an analysis of a Trx h that belongs to the subgroup II, from *Nicotiana alata*, called NaTrxh. The N-terminal extension of NaTrxh was not recognizable as a secretion signal, and yet we demonstrated that NaTrxh accumulates in the extracellular matrix (ECM) of the stylar transmitting tract (TT) in *N. alata*. Moreover, fusion of NaTrxh to the green fluorescent protein (GFP) directed secretion of this fusion protein in two heterologous systems. We used two separate biochemical approaches, monobromobimane (mBB) labeling and 4-aminophenylarsine oxide (PAO) chromatography, to test potential substrates of NaTrxh. S-RNase was clearly among the proteins reduced by NaTrxh, raising the possibility that it is involved in pollination, particularly in self-incompatibility (SI).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Plant Materials**—*Nicotiana plumbaginifolia* (inventory number TW107, accession number 43B) was obtained from Tobacco Germoplasm Collection number TW107, Crops Research Laboratory, U. S. Department of Agriculture–Agricultural Research Service, Oxford, NC. Self-compatible (SC) *N. alata* cv Breakthrough was obtained from Thompson and Morgan, Jackson, NJ. Self-incompatible (SI) *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> and S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> have been described previously (17–19). *Nicoti-*

\* This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Grant 40614Q), Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM (Grants IN214304, IN2045503-3, and IN211702), the Howard Hughes Medical Institute, and the U. S. National Science Foundation (Grant IBN 03-15647). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The nucleotide sequence(s) reported in this paper has been submitted to the GenBank™/EBI Data Bank with accession number(s) DQ021448.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. Tel.: 55-5622-5279; Fax: 55-5622-5329; E-mail: fcg@servidor.unam.mx.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: Trx, thioredoxin; Trx h, thioredoxin type h; NTR, NADPH-dependent thioredoxin reductase; ECM, extracellular matrix; TT, transmitting tract; GFP, green fluorescent protein; mBB, monobromobimane; PAO, 4-aminophenylarsine oxide; SI, self-incompatibility/incompatible; SC, self-compatible; GST, glutathione S-transferase; NaTrx<sub>rec</sub>, recombinant NaTrxh; NaTTS, *N. alata* transmitting tissue-specific protein; DTT, dithiothreitol; BB, binding buffer; BSA, bovine serum albumin; MOPS, 4-morpholinopropanesulfonic acid.

*ana benthamiana* and *A. thaliana* Columbia (Col-0) ecotype plants were grown under greenhouse conditions using a 16:8 photoperiod at 22 °C.

**Recombinant NaTrxh Overexpression and Purification**—The NaTrxh cDNA with BamHI and EcoRI sites was generated using the following primers: forward, 5'-CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA-3'; reverse, 5'-GCGCGCGGGAATTCATTTATTGGACATGAAA-3'. The PCR product was cloned in-frame with the glutathione S-transferase (GST) into the pGEX 4T-2 expression vector (Amersham Biosciences). The GST:NaTrxh fusion protein was separated by batch affinity chromatography using glutathione-Sepharose 4B (Amersham Biosciences). NaTrxh was released from GST by thrombin digestion (Amersham Biosciences).

**NaTrxh-GFP Fusion Constructs and Transient Expression**—An NaTrxh cDNA with BamHI and NcoI sites was produced by PCR and fused in-frame to the N-terminal of the GFP in the pHBT vector (20). Primers used are as follows: forward, 5'-CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA-3'; reverse, 5'-AGCCATGGTTGGACATG-3'. The NaTrxh-GFP fusion was cloned into pBIN19 (21) under control of the 35S cauliflower mosaic virus (CaMV35S) promoter.

After *Agrobacterium tumefaciens* pGV2260 (22) transformation, an agroinfiltration of *N. benthamiana* leaves was carried out, as described previously (23, 24). The protein expression was observed by confocal microscopy after 3 days. *A. thaliana* Col-0 transformation was carried out by bombarding (25) 2-week-old plantlets (grown aseptically in 0.5× Murashige and Skoog with 1% sucrose) with DNA-coated tungsten particles (Tungsten M-17, Bio-Rad) containing the NaTrxh-GFP construct cloned into the pHBT vector (20). The protein expression was observed by confocal microscopy after 1 week.

***N. alata* Total Protein Extracts**—Total protein extracts from mature styles including stigmas, anthers, ovaries, sepals, petals, and young leaves from *N. alata* were obtained using 0.05 M sodium acetate, pH 5.0, 0.05 M NaCl, 1% (v/v) 2-mercaptoethanol as extraction buffer.

**Sequential Style Protein Extractions**—*N. alata* styles were treated as described previously (26), with the following modifications. Hand-bisected *N. alata* styles (styles + stigmas) were submerged sequentially in two different salt concentration buffers for 2.5 h at 4 °C: (a) low salt buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>); (b) high salt buffer (400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Finally, the styles were ground under liquid N<sub>2</sub> and homogenized in 400 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, 1% Triton X-100.

**Protein Assay**—Protein concentrations were determined as described previously (27), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

**Reductase Activity Assay**—Recombinant NaTrxh (NaTrxh<sub>rec</sub>) and recombinant *Escherichia coli* thioredoxin (Sigma) were evaluated for their ability to reduce insulin disulfide bonds as described previously (28). The ability of the NADPH/NTR system to reduce NaTrxh<sub>rec</sub> was evaluated as follows: NaTrxh<sub>rec</sub> (2.5 μg) and *E. coli* Trx (2.5 μg) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, were incubated at 37 °C with 2.0 μg of recombinant *E. coli* NTR and 0.125 μmol of NADPH in a final volume of 100 μl. After incubation, 0.2 μmol of mBBR in 10 μl of acetonitrile was added, and the samples were incubated for 20 min at room temperature. Proteins were boiled for 5 min in SDS sample buffer free of reducing agents, separated in 10–20% gradient SDS-PAGE, and visualized under UV light (Fluor-S, Fuji Corp Saddle Brook, NJ).

**NaTrxh-Affi-Gel Affinity Column and Purification of Anti-NaTrxh Antibody**—NaTrxh<sub>rec</sub> (16 mg) was immobilized to Affi-Gel-10 (Bio-Rad), as recommended by the manufacturer. The anti-NaTrxh<sub>rec</sub> serum was precipitated with 50% saturated ammonium sulfate. After desalting, this IgG fraction was passed over the NaTrxh-Affi-Gel affinity column.

Specific antibodies against NaTrxh<sub>rec</sub> were eluted with 50 mM glycine, 50 mM NaCl, pH 2.6. The samples were neutralized by the addition of 1 M Tris.

**BSA-Affi-Gel and Gly-Affi-Gel Columns**—BSA (20 mg) in 0.1 M MOPS, pH 7.5, was immobilized to Affi-Gel-15 (Bio-Rad), as recommended by the manufacturer. Gly-Affi-Gel column was made by blocking Affi-Gel-15 with 1.0 M glycine, pH 8.0, as recommended by the manufacturer.

**Phylogenetic Analysis**—Amino acid sequences of plant Trxs were aligned by Clustal X (29). Based on the alignment, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method (30). A phylogenetic test was done based on 1,000 bootstrap replicates. Phylogenetic analysis was conducted using MEGA version 2.1 (31). The GenBank™ accession numbers used for this analysis are as follows: Trx type f, *A. thaliana* (Q9XFH8), *Pisum sativum* (X63537), and *Spinacia oleracea* (X14959); Trx-like proteins, *Hordeum bulbosum* (AF159385), *Lolium perenne* (AF159387), *Phalaris coarulescens* (AF159388), *Secale cereale* (AF159386), *A. thaliana* (AAG51342); Trxs type h, *Ipomea batatas* (AY344228), *A. thaliana* (AAG52561, AAD39316, S58119, S58118, S58123, S58120, and P29448), *Brassica napus* (U59379), *O. sativa* (D26547), *N. alata* (NaTrxh) (DQ021448), *Nicotiana tabacum* (Q07090 and X58527); Trxs type m, *A. thaliana* (AAF15949, O48737, Q9SEU6, and AAF15950), *P. sativum* (X76269), *S. oleracea* (X51462), *Zea mays* (LA0957), Trx type x, *A. thaliana* (AAF15952); and Trx type o, *A. thaliana* (AF396650).

**Protein Gel Blot Analysis and Immunostaining**—Proteins were fractionated in a 12.5% SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose, and immunostained with anti-S<sub>105</sub>-RNase (1:10,000 dilution), anti-NaTrxS (1:10,000 dilution) (32), or anti-NaTrxh<sub>rec</sub> (1:1,000 dilution).

**In Vitro Identification of NaTrxh Target Proteins**—Reduction of the disulfide bonds of target proteins was determined using the two-dimensional SDS-PAGE system (33) using the low salt buffer extract without Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Before the first dimension, proteins are labeled with mBBR after non-reducing (control) or reducing (with dithiothreitol (DTT) or NaTrxh<sub>rec</sub> plus NADPH and NTR) conditions. The second dimension gel was observed under UV light (Fluor-S, Fuji Corp., Saddle Brook, NJ).

Low salt protein extracts from *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> in 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, were passed over PAO resin (Invitrogen) after reduction by NaTrxh<sub>rec</sub>, 20 mM 2-mercaptoethanol, or without reduction. After washing, the unbound fraction was collected. Bound proteins were eluted by sequentially washing the resin twice with 1 mM 2-mercaptoethanol containing buffer, five times with 5 mM 2-mercaptoethanol, and three times with 500 mM 2-mercaptoethanol buffer. All the fractions were concentrated by lyophilization and were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Gels were blotted onto nitrocellulose and immunostained with anti-S<sub>105</sub>-RNase antibody.

**In Vitro Protein-Protein Interactions by Affinity Chromatography**—Protein extracts (1 mg) from *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> styles were obtained with binding buffer (BB, 50 mM Tris-HCl, pH 7.9) and passed over the NaTrxh-Affi-Gel affinity column. After recovering the unbound fraction, 10 bed volume washes were done with BB, and then the column was sequentially washed as follows: (a) BB plus 1% Tween 20, (b) BB plus 0.1 M NaCl, and (c) BB plus 0.2 M NaCl. Stronger interacting proteins were eluted with elution buffer (50 mM glycine, 50 mM NaCl, pH 2.6). The samples were neutralized by the addition of 1 M Tris. Fractions were concentrated by cold acetone precipitation and were analyzed by 12.5% SDS-PAGE. Gels were blotted onto nitrocellulose and immunostained with anti-S<sub>105</sub>-RNase antibody.

**Microscopy and Immunolabeling**—*N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> styles were harvested and fixed in 4% (v/v) formaldehyde in phosphate-buffered saline,

## Thioredoxin Type *h* Secretion

dehydrated in an ethanol series, and embedded in Paraplast Plus (Polysciences Inc., Warrington, PA). Sections of 6–7  $\mu\text{m}$  were blocked with phosphate-buffered saline plus 3% BSA, 0.01% sodium azide, 0.1% Triton X-100 for 4 h at 4 °C. Sections were simultaneously incubated with the primary rabbit anti-NaTrx<sub>rec</sub> antibody (1:50 dilution) and the primary mouse anti-S<sub>C10</sub>-RNase antibody (1:1,000 dilution) at 4 °C overnight. Sections were then incubated with both secondary goat anti-rabbit Alexa Fluor 568-fluorochrome (magenta signal) conjugated and goat anti-mouse fluorescein isothiocyanate-fluorochrome (green signal) conjugated antibodies for 4 h at 4 °C. Sections were observed using confocal fluorescence microscopy.

## RESULTS

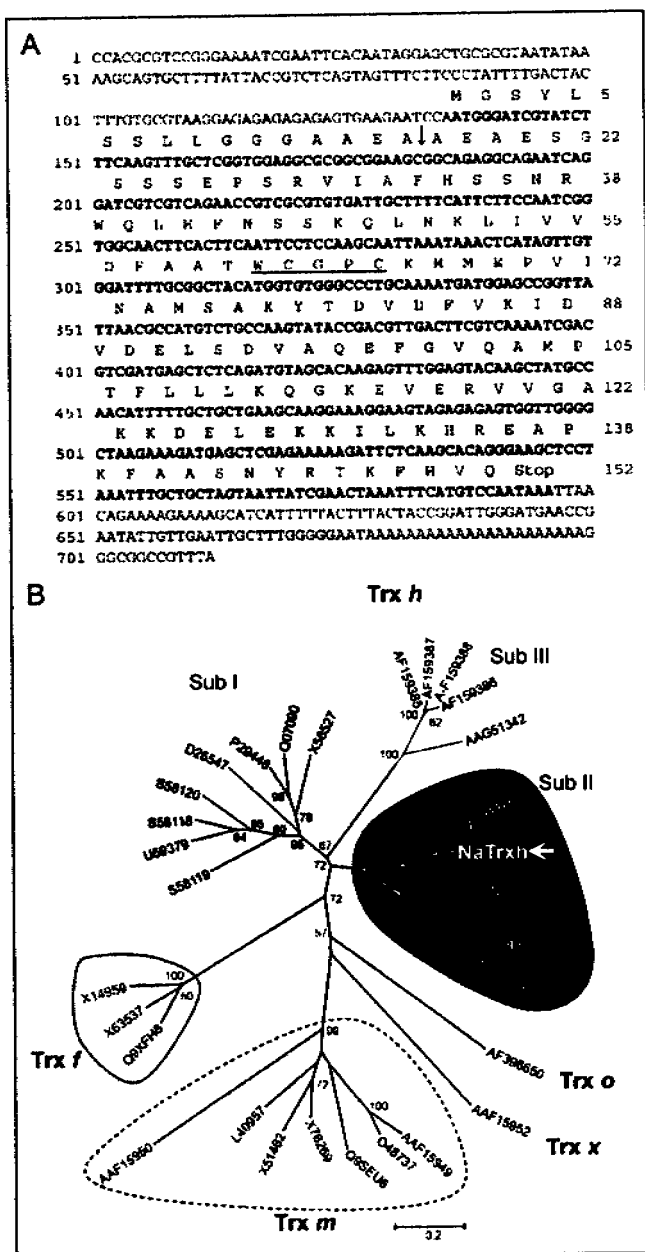
**Isolation of the *Trx h* cDNA**—We isolated a cDNA (AFLP25F), which is differentially expressed between *N. alata* cv Breakthrough, an SC mutant plant that does not express the S-RNase, and SC *N. plumbaginifolia*. The full-length cDNA sequence of this transcript (Fig. 1A) showed extensive sequence similarity with Trx genes from plants. The predicted open reading frame contains the sequence WCGPC, described as the conserved Trx active site (3, 4).

To identify the type of Trx encoded by the AFLP25F cDNA (*i.e.* *m*, *f*, *x*, or *h*), we performed a phylogenetic analysis using the deduced AFLP25F amino acid sequence and other plant Trxs. The phylogenetic tree in Fig. 1B displays five major groups. Four of those groups correspond to organellar thioredoxins (*f*, *m*, *x*, and *o* types). The AFLP25F protein sequence clearly clusters with Trxs *h*, subgroup II. The AFLP25F product was named NaTrx.

To evaluate the disulfide reductase activity of NaTrx, we expressed this gene in *E. coli* as a GST fusion protein. Fig. 2A shows the recombinant NaTrx (NaTrx<sub>rec</sub>) purified after cleavage from GST. Its ability to reduce insulin disulfide bonds using DTT as an electron donor (28) is shown in Fig. 2B. The results show that NaTrx<sub>rec</sub> was able to reduce insulin disulfide bridges with a similar qualitative activity profile as the recombinant *E. coli* Trx (34). Furthermore, when NaTrx<sub>rec</sub> was incubated with NADPH and recombinant *E. coli* NTR, the thiol groups of the reduced NaTrx<sub>rec</sub> were labeled with mBB. Fig. 2C shows NaTrx<sub>rec</sub> and recombinant *E. coli* Trx sulfhydryl labeling in a time-dependent manner only when NADPH and NTR were present. Thus, similar to other Trxs *h*, oxidized NaTrx<sub>rec</sub> can be regenerated by the addition of NADPH and NTR (12, 35).

**NaTrx Expression Pattern in *N. alata***—To analyze the expression pattern of NaTrx in plants, we prepared specific affinity-purified anti-NaTrx antibodies. Fig. 3A (right panel) shows that this antibody detects specifically NaTrx<sub>rec</sub> with no cross reaction to *E. coli* Trx. This antibody was used to analyze the presence of the NaTrx in different tissues of *N. alata*. NaTrx protein is detected in all the tissues analyzed (Fig. 3B, right panel). This protein is particularly abundant in floral tissues including petals, ovaries, and styles, and it is present in lower levels in anthers, sepals, and leaves.

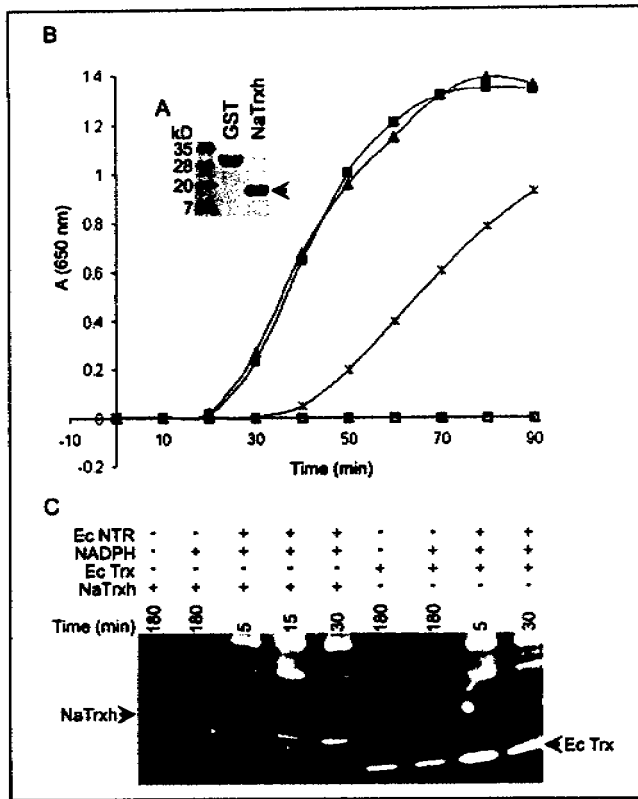
Biochemical fractionation studies suggest an extracellular location for NaTrx. SI *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> styles were hand-bisected, and the secreted proteins that accumulate in this tissue were differentially extracted using sequential washes with low salt and high salt buffers, as described (26). Using this procedure, soluble ECM proteins are eluted by a low salt buffer, whereas more tightly bound proteins are released only after the high salt buffer wash. The extraction profile obtained for the NaTrx protein was similar to S<sub>105</sub>-RNase and to the transmitting tissue-specific protein of *N. alata* (NaTTS) (Fig. 4). It is known that these two proteins are secreted and that they accumulate in the stylar TT ECM. NaTrx is eluted with the higher molecular mass (*i.e.* 55–110-



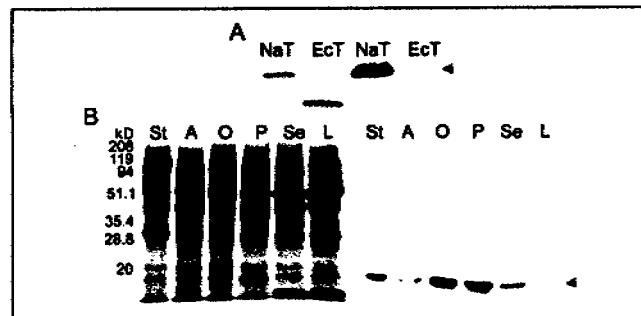
**FIGURE 1.** AFLP25F cDNA encodes a Trx *h* termed NaTrx. **A**, AFLP25F cDNA sequence. **Bold**, coding sequence (numbers at left). The amino acid sequence is numbered on the right side. The conserved Trx active site (WCGPC) is underlined. Arrow, cleavage site predicted by the hidden Markov algorithm (36). **B**, phylogenetic analysis of plant Trxs. Bootstrap values are shown (values <50% not shown). Four groups (Trx *f*, Trx *m*, Trx *o*, and Trx *x*) correspond to organellar Trxs. The fifth cluster contains Trxs *h*. Trxs are subdivided into three subgroups (Sub I, Sub II, and Sub III). NaTrx (**bold**) clusters with the subgroup II.

kDa) NaTTS isoforms (Fig. 4C, *LS* lane) that are thought to be present in the ECM (26), suggesting that NaTrx is also secreted into the ECM of the transmitting TT.

**NaTrx Is Secreted into the Extracellular Matrix of the Transmitting Tissue**—To further investigate NaTrx localization and its secretion to the stylar TT ECM, we performed an immunohistochemical analysis using three-dimensional confocal microscopy. Cross sections of SI *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> styles were simultaneously immunolabeled with a mouse anti-S<sub>C10</sub>-RNase antibody (32) and with the affinity-purified polyclonal anti-NaTrx antibody. Fig. 5, A2, A4 and A6, show that both



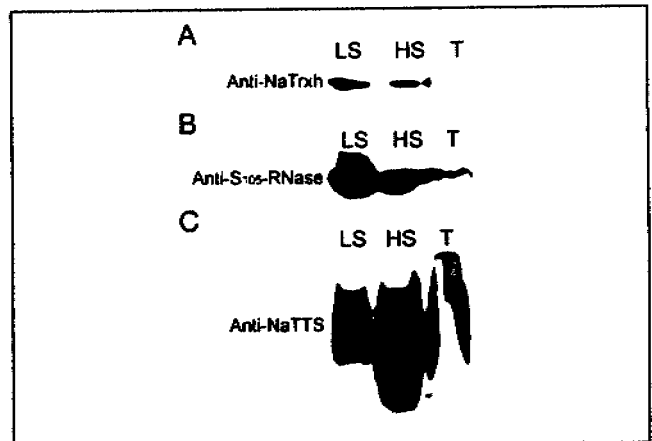
**FIGURE 2.** NaTrxh exhibits disulfide reductase activity, and its redox state is regenerated by NADPH and NTR. **A**, SDS-PAGE showing NaTrxh and GST after thrombin digestion. **B**, NaTrxh<sub>rec</sub> exhibits Trx activity. NaTrxh (squares) and *E. coli* Trx (triangles) were incubated with insulin with (filled) or without DTT (open) as electron donor. Insulin was reduced with DTT as control (asterisks). **C**, Trx reduction with NADPH/NTR. NaTrxh<sub>rec</sub> and *E. coli* Trx (*Ec* Trx) were incubated with NADPH and recombinant *E. coli* NTR (*Ec* NTR) and labeled with mBBr, which indicates reduction of NaTrxh<sub>rec</sub> and *E. coli* Trx.



**FIGURE 3.** NaTrxh protein expression pattern in *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub>. **A**, antibody specificity. Western blot analysis against the NaTrxh<sub>rec</sub> (NaT) and the *E. coli* Trx (*Ec*T) (right). **A**, Coomassie Blue-stained gel is shown as a loading control (left). **B**, NaTrxh protein expression. Total protein extracts from styles (St), anthers (A), ovaries (O), petals (P), sepals (Se), and leaves (L) were separated by SDS-PAGE. **A**, Coomassie Blue-stained gel is shown as a loading control. Arrow, NaTrxh protein in **A** and **B**.

NaTrxh and S<sub>C10</sub>-RNase colocalized outside of the TT cells, indicated by the yellow signal generated from the mixture of both green (S<sub>C10</sub>-RNase) and magenta (NaTrxh) fluorochrome signals. To show that the anti-NaTrxh antibody is specifically reacting with NaTrxh in the TT cells, we pretreated the antibody prior to apply to the tissue with NaTrxh<sub>rec</sub>. As shown in Fig. 5, A3 and A5, after pretreatment, only the green signal of S<sub>C10</sub>-RNase was detected.

The experiments shown in Figs. 4 and 5A demonstrate that NaTrxh is secreted into the ECM. However, NaTrxh does not possess a canonical



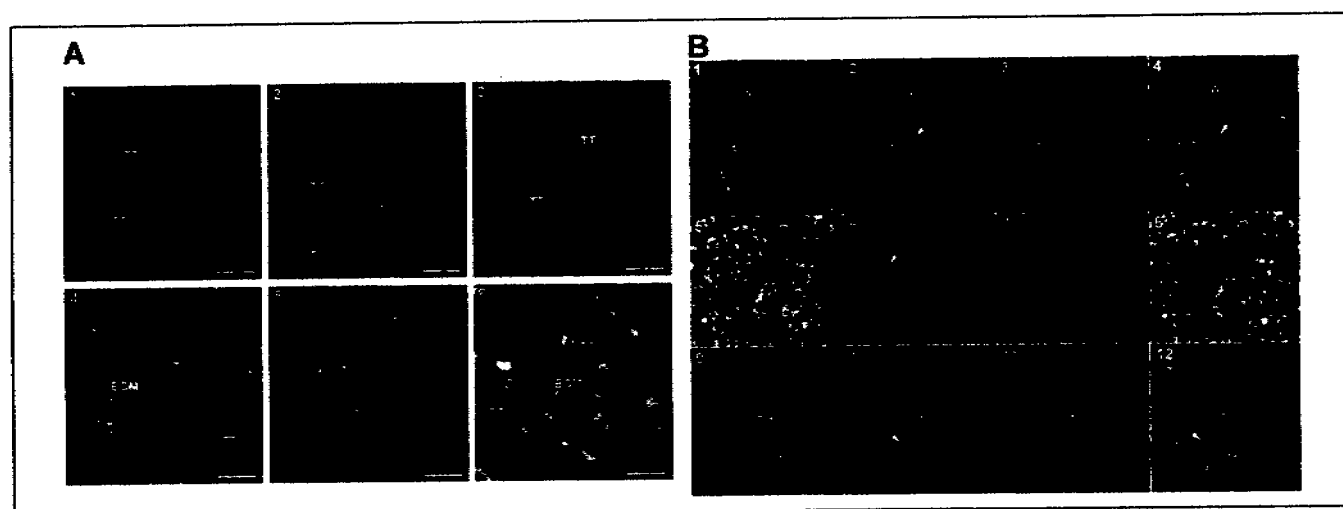
**FIGURE 4.** NaTrxh is a soluble TT ECM protein. **A–C**, sequential protein extractions using a low salt buffer (LS), high salt buffer (HS), and high salt buffer plus 1% Triton X-100 (T) from bisected *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> styles. Proteins were separated by SDS-PAGE and immunostained with anti-NaTrxh, anti-S<sub>105</sub>-RNase, or anti-NaTTS antibodies.

secretory signal peptide, and different secretion signal algorithms give conflicting results. For example, the Bendtsen neural network algorithm (36) does not predict any signal peptide, whereas the hidden Markov model algorithm predicts a signal peptide with a probability of 0.953 with a maximal cleavage site probability of 0.593 between amino acid residues 16 and 17 (Fig. 1A). Likewise, the Secretome 1.0 predictor (37) predicts that NaTrxh (NN-score 0.874) is a non-classical secreted protein.

**NaTrxh Sequence Contains the Information for Its Secretion**—To further corroborate that NaTrxh is indeed secreted in plants, an NaTrxh-GFP fusion protein expressed from the CaMV35S promoter (20) was constructed. This construct was used to analyze GFP expression pattern in transient assays in *N. benthamiana* and *A. thaliana* leaves (Fig. 5B). When the NaTrxh-GFP fusion protein is expressed, most of the GFP protein accumulates in the cell wall in either *N. benthamiana* (Fig. 5, B2 and B4) or *A. thaliana* (Fig. 5, B10 and B12). As expected, the GFP protein without fusion, used as control, was mainly localized in the cytoplasm (Fig. 5, B6 and B8). Thus, NaTrxh is sufficient to cause secretion of GFP, supporting the idea that this protein is targeted outside of the cell in *N. alata*.

**S-RNase Is Reduced by NaTrxh in Vitro**—To investigate possible substrates for NaTrxh, we performed *in vitro* reduction reactions with stylar proteins and NaTrxh<sub>rec</sub> plus NADPH and NTR. Reduced sulfhydryls were labeled with the fluorescent probe mBBr and visualized after separation in a two-dimensional SDS-PAGE system in which non-reducing conditions were used for the first dimension and reducing ones were used for the second dimension (33). For these experiments, we used the low salt extractable ECM stylar protein fraction from SI *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> prepared without a reducing agent in the extraction buffer. As shown in Fig. 6, A and B, there is a small amount of mBBr labeling where S<sub>105</sub>-RNase is the most prominent labeled protein observed (Fig. 6, B and G). Proteins reduced after the first dimension show altered mobility and shift off the diagonal in the second dimension. If reduction is incomplete, two spots are visible, as seen for S<sub>105</sub>-RNase (Fig. 6, A and B). Proteins fully reduced with DTT prior to mBBr labeling show brighter fluorescence and appear as a single spot after two-dimensional SDS-PAGE (Fig. 6, C and D). As expected, many proteins are reduced by DTT, and mBBr labeling is visible along the entire diagonal. Treatment with purified NaTrxh<sub>rec</sub>, NADPH, and NTR caused a specific increase in mBBr labeling of S<sub>105</sub>-RNase similar to the one obtained by DTT (Fig. 6,





**FIGURE 5. NaTrxh is a secretion protein.** A, NaTrxh colocalization with the secreted  $S_{C10}$ -RNase in the ECM of TT in *N. alata*  $S_{C10}$ . Immunohistochemical analysis of styles treated as follows. Image 1, no primary antibody control to show self-fluorescence; images 2, 4, and 6, co-staining with NaTrxh (magenta) and  $S_{C10}$ -RNase (green) antibodies; images 3 and 5, antibodies preincubated with NaTrxh<sub>rec</sub> purified protein; image 6, higher magnification of the transmitting tissue where the colocalization is observed in the extracellular matrix. Bars correspond to 68 (images 1–3), 55 (images 4 and 5), and 13.3 (image 6). B, NaTrxh-GFP fusion protein is secreted to the cell wall in *N. benthamiana* and *A. thaliana* leaves. Images 1–4, NaTrxh-GFP fusion protein was introduced into *N. benthamiana* and *A. thaliana* (images 9–12) leaves. The localization of the GFP in *N. benthamiana* leaves (images 5–8) was used as a control. After transfection, the leaves were analyzed under phase contrast microscopy (images 1, 5, and 9) and under fluorescence microscope for GFP (images 2, 6, and 10) and for chlorophyll fluorescence (images 3, 7, and 11). Images 4, 8, and 12, merged images shown for each assay. Arrows, GFP fluorescence. CW, cell wall; Cyt, cytoplasm; Chl, chlorophyll fluorescence. Bars correspond to 10  $\mu$ m (images 1–8) and 20  $\mu$ m (images 9–12).

E and F).  $S_{105}$ -RNase changed its mobility after reduction with 2-mercaptoethanol for the second dimension (i.e. it appears as two spots in the second dimension), suggesting that NaTrxh only partially reduced  $S_{105}$ -RNase before the first dimension. The specificity of NaTrxh reduction is apparent from comparison of the large number of proteins that shift mobility and appear off the diagonal after treatment with NaTrxh but not with the nonspecific reduction by DTT (compare Fig. 6, C and E).

PAO affinity chromatography provided further evidence that  $S_{105}$ -RNase is a substrate for NaTrxh. PAO matrices specifically bind proteins with vicinal thiols that can reversibly form a covalent bond with the resin (38). Low salt extracts from SI *N. alata*  $S_{105}$  either were applied directly to the PAO matrix or were first treated with 20 mM 2-mercaptoethanol or NaTrxh<sub>rec</sub> plus NADPH and *E. coli* NTR. Fig. 7 shows that little or no  $S_{105}$ -RNase bound to the PAO matrix unless it was first subjected to reducing conditions. Some  $S_{105}$ -RNase was weakly bound under all conditions and eluted with 1 mM or 5 mM 2-mercaptoethanol (Fig. 7A). Large amounts of  $S_{105}$ -RNase, however, bound tightly to this column after reduction by 2-mercaptoethanol (Fig. 7B) or NaTrxh<sub>rec</sub> (Fig. 7C). The tightly bound  $S_{105}$ -RNase eluted with 500 mM 2-mercaptoethanol (Fig. 7, B and C).

**$S_{105}$ -RNase Interacts with NaTrxh Independently of Disulfide Bridges—**We performed affinity chromatography experiments to prove that  $S_{105}$ -RNase specifically interacts with NaTrxh. An NaTrxh-Affi-Gel affinity column was prepared and used to pass over a stylar protein extract from SI *N. alata*  $S_{105}$  obtained without reducing agents. Fig. 8A shows that  $S_{105}$ -RNase is specifically retained in the NaTrxh-Affi-Gel matrix because  $S_{105}$ -RNase is not released from the column when this was washed under harsh conditions (1% Tween 20 and 0.2 M NaCl), but it is eluted only with a low pH buffer (Fig. 8A, B lane). Therefore, we conclude that  $S_{105}$ -RNase retention in the column is due to its specific interaction with NaTrxh because it was not retained when the BSA-Affi-Gel (Fig. 8B) or the Gly-Affi-Gel columns (Fig. 8C) were used.

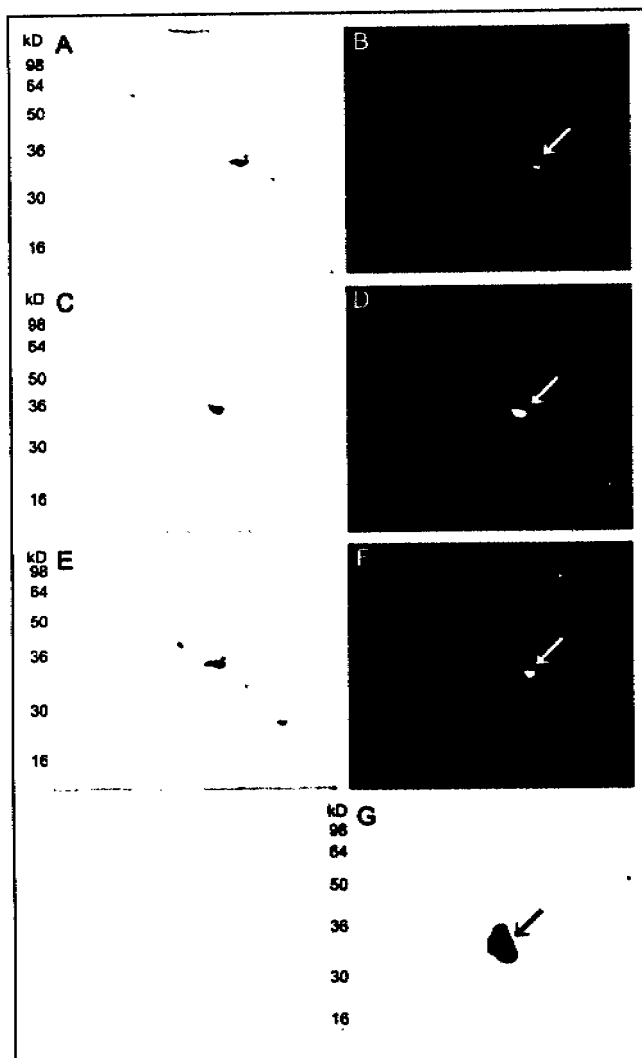
## DISCUSSION

In the present work, we identified a 16.8-kDa Trx h (NaTrxh). Sequence analysis of this protein showed that it belongs to the Trx h

subgroup II (13), and it also showed that it is a novel thioredoxin in *Nicotiana* since only two different Trxs h have been reported in *N. tabacum* (39), which are clustered in the subgroup I (Fig. 1B). Trx h subgroup II is characterized by the presence of an N-terminal extension thought to be important for targeting (16, 14). Despite the fact that this domain characterizes all the proteins of this subgroup, its function remains unclear. Scattered information has linked this domain to a particular function; the ability to move from cell to cell of a rice phloem sap Trx h has been associated with its N-terminal extension (16). Similarly, Gelhaye *et al.* (14) reported that poplar Ptxh2 is associated with mitochondria, proving that its N-terminal extension functions as a mitochondrial transit peptide.

Using different approaches in this work, we demonstrated that NaTrxh is secreted from the cell in different plant species. Moreover, the biochemical data showed that NaTrxh behaves as a soluble component in the ECM and that its fusion to GFP is sufficient to cause GFP secretion. To our knowledge, accumulation of Trx h in the extracellular space has not been previously reported. However, the mechanism by which this N-terminal extension promotes secretion is still unclear. This sequence might function as a non-canonical secretion signal for processing through the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus for eventual secretion. It is also possible that NaTrxh secretion occurs through an alternative pathway. In mammalian cells, it has been reported that a Trx is secreted through a pathway that does not involve the Golgi apparatus, the redox status of the cell, or its own Trx redox state (40).

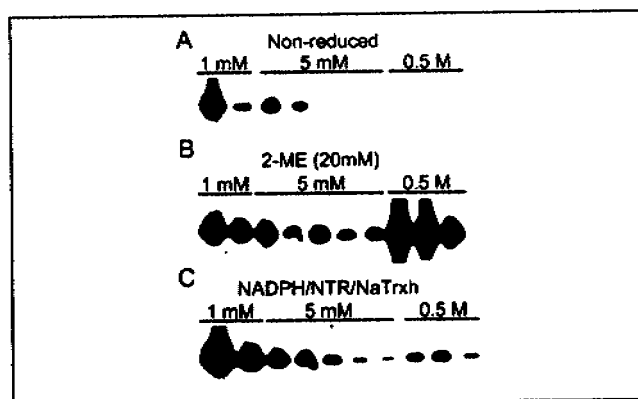
Trxs modify the structure and activity of target proteins by reducing disulfide bonds. They have been implicated in diverse physiological processes. For example, cytoplasmic Trxs are involved in the *Brassica* sporophytic SI system. Bower *et al.* (41) identified two Trxs h, THL-1 and THL-2, that specifically interact with the protein kinase domain of the S-locus receptor (SRK), the female determinant of S-specificity in *Brassica* (42). Cabrillac *et al.* (43) suggested that THL-1 binds to SRK and inhibits its auto-phosphorylation. When SRK binds SCR (S-locus cysteine-rich protein), the male determinant (44), it appears to release THL-1 concomitant with activation of kinase activity.



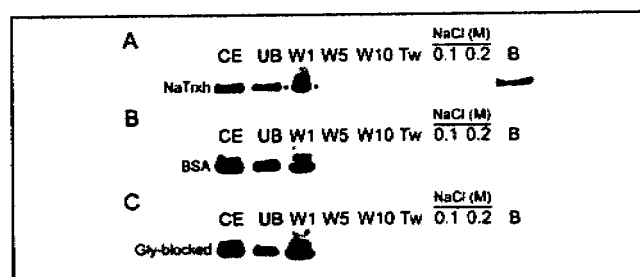
**FIGURE 6.** A two-dimensional SDS-PAGE system for analysis of protein disulfide reduction. **A**, **C**, and **E**, Coomassie Blue staining. **B**, **D**, and **F**, mBBR staining. **A** and **B**, control TT ECM proteins extracted from SI *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  without reducing agent and not subjected to reduction before running the first dimension. **C** and **D**, as in **A** and **B** but reduced with DTT before the first dimension. **E** and **F**, as in **A** and **B** but reduced with NaTrx plus NADPH/NTR before the first dimension. **G**,  $S_{105}$ -RNase immunostaining gel blot treated as in **E**.

Our results show that, similarly to other plant Trxs (THL-1, THL-2) (5, 41), NaTrxh is ubiquitously expressed in *N. alata*. This result suggests that NaTrxh may function in the regulation of the redox state of extracellular proteins. In the particular case of the style, the ECM in the TT is especially rich in secreted proteins including S-RNases and arabinogalactan proteins such as NaTTS (26). As NaTrxh appears to be able to regulate these proteins, it might explain its higher abundance in pistils when compared with other tissues. We have also observed that NaTrxh is expressed at approximately a 6-fold higher level in *N. alata* than in *N. plumbaginifolia* (data not shown), and this is consistent with its higher level of expression of secreted proteins in *N. alata*. The abundance of secreted proteins in the TT ECM afforded an opportunity to directly test whether they are substrates for NaTrxh reduction.

If NaTrxh functions to reduce ECM proteins, then the maintenance of its reduced active state would require NTR in the ECM as well. There is not yet evidence for a secreted NTR in plants. In animal systems,



**FIGURE 7.** Vicinal thiol groups are produced in  $S_{105}$ -RNase after NaTrxh reduction. **A**, soluble extracellular proteins treated without reducing agent (Non-reduced) were bound to a PAO matrix. The column was washed sequentially with 1 and 5 mM 2-mercaptoethanol, as indicated. Proteins with reduced disulfide bonds bind to PAO matrix and elute with 500 mM 2-mercaptoethanol, as indicated. Fractions were analyzed by anti- $S_{105}$ -RNase antibody immunostaining. **B** and **C**, same procedure as in **A**, but the proteins were previously treated with 20 mM 2-mercaptoethanol (2-ME (20 mM)) or with NaTrxh<sub>rec</sub> plus NADPH/NTR (NADPH/NTR/NaTrxh), respectively.



**FIGURE 8.**  $S_{105}$ -RNase specifically interacts with NaTrxh. **A**, stylar proteins from *N. alata*  $S_{105}S_{105}$  obtained without reducing agents (crude extract, CE) were passed over the NaTrxh-Aff-Gel affinity column. After recovering the unbound fraction (UB), the column was washed with 10 bed volumes of binding buffer (only the 1st, 5th, and 10th washes are shown: W1, W5, and W10) and then with 1% Tween 20 buffer (Tw), 0.1 M NaCl, and 0.2 M NaCl buffers, as indicated. The proteins that strongly bind to NaTrxh were eluted with elution buffer (B lane). Fractions were analyzed by anti- $S_{105}$ -RNase antibody immunostaining. **B** and **C**, same procedure as in **A**, but the stylar proteins were passed over the BSA-Aff-Gel or the Gly-Aff-Gel columns, respectively.

however, an NTR is secreted together with a Trx in monocytes and also in malignant leukemia or melanoma cell lines (45). Another possibility is that NaTrxh functions after uptake into the pollen tube cytoplasm, where NADPH and NTR are more likely to be present. In *N. alata*, NaTrxh could be taken up by the pollen tubes along with other stylar proteins, such as the S-RNase (46) and 120K (47).<sup>3</sup>

Using mBBR labeling and PAO chromatography, we showed that S-RNase is clearly a substrate for NaTrxh. S-RNase was preferentially labeled by mBBR even in the presence of other potential substrates such as NaTTS, 120K, and the class III pistil-specific extensin-like proteins (48).

We detected a stable interaction between S-RNase and NaTrxh, which is specific and independent of any disulfide bridge. It is known that the interactions based on disulfide bridges between a Trx and its target protein are ephemeral since it only depends on the intermolecular disulfide bridge that is formed when the first cysteine residue of the target protein is reduced by the N-terminal cysteine, and it is quickly attacked by the second cysteine of the Trx, releasing the reduced target protein (49, 50). Therefore, it seems that  $S_{105}$ -RNase reduction by

<sup>3</sup> B. A. McClure, unpublished data.

## Thioredoxin Type h Secretion

NaTrxh is specific and depends on previous substrate recognition by NaTrxh.

These observations may have significance for SI. The specific interaction of S-RNase with NaTrxh and its consequent reduction could favor its interaction with SLF (S-locus F-box protein), the pollen determinant of S-specificity (51). Alternatively, reduction of S-RNase may alter its conformation and facilitate its uptake. Oxley and Bacic (52) have observed changes in S-RNase conformation after reduction. Thus, because of its remarkable secretion into the ECM, NaTrxh may play a role in pollen rejection. Further studies of this possibility are warranted.

*Acknowledgments*—We thank Q. Laurel Fábila and Dr. Analilia Arroyo Becerra for technical support, Andrés Saraiegui Amaro for the confocal microscopy, and Melody Kroll for the assistance with the manuscript.

### REFERENCES

1. Arnér, E. S. J., and Holmgren, A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**, 6102–6109
2. Marchand, C., Le Maréchal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, F., and Decottignies, P. (2004) *Proteomics* **4**, 2696–2706
3. Holmgren, A. (1985) *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 237–271
4. Eklund, H., Gleason, F. K., and Holmgren, A. (1991) *Proteins* **11**, 13–28
5. Meyer, Y., Verdoucq, L., and Vignols, F. (1999) *Trends Plant Sci.* **4**, 388–394
6. Meyer, Y., Vignols, F., and Reichheld, J.-P. (2002) *Methods Enzymol.* **347**, 394–402
7. Johnson, T. C., Cao, R. Q., Kung, J. E., and Buchanan, B. B. (1987) *Planta* **171**, 321–331
8. Hartman, H., Syvanen, M., and Buchanan, B. B. (1990) *Mol. Biol. Evol.* **7**, 247–254
9. Hodges, M., Miginiac-Maslow, M., Decottignies, P., Jacquot, J.-P., Stein, M., Lepenic, L., Cretin, C., and Gadal, P. (1994) *Plant Mol. Biol.* **26**, 225–234
10. Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.-P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5620–5624
11. Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J. M., Bonnard, G., and Meyer, Y. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 14144–14149
12. Florencio, F. J., Yee, B. C., Johnson, T. C., and Buchanan, B. B. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **266**, 496–507
13. Gelhaye, E., Rouhier, N., and Jacquot, J.-P. (2004) *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 265–271
14. Gelhaye, E., Rouhier, N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y., and Jacquot, J.-P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14545–14550
15. Ishiwatari, Y., Honda, C., Kawashima, I., Nakamura, S. I., Hirano, H., Mori, S., Fujiwara, T., Hayashi, H., and Chino, M. (1995) *Planta* **195**, 456–463
16. Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K. C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M., and Lucas, W. J. (1998) *Planta* **205**, 12–22
17. Murfett, J., Bourque, J. E., and McClure, B. A. (1995) *Plant Mol. Biol.* **29**, 201–212
18. Murfett, J., Strabala, T. J., Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., and McClure, B. A. (1996) *Plant Cell* **8**, 943–958
19. Zurek, D. M., Mou, B., Beecher, B., and McClure, B. A. (1997) *Plant J.* **11**, 797–808
20. Sheen, J., Hwang, S., Niwa, Y., Kobayashi, H., and Galbraith, D. W. (1995) *Plant J.* **8**, 777–784
21. Jefferson, R. A. (1988) *Genet. Eng.* **10**, 247–263
22. Deblacq, R., Bytcbier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., and Leemans, J. (1985) *Nucleic Acids Res.* **13**, 4777–4788
23. Schöb, H., Kunz, C., and Meins, F., Jr. (1997) *Mol. Gen. Genet.* **256**, 581–585
24. Llave, C., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 13401–13406
25. Sanford, J. C. (1990) *Physiol. Plant.* **79**, 206–209
26. Wu, H. M., Wong, E., Ogdahl, J., and Chueung, A. Y. (2000) *Plant J.* **22**, 165–176
27. Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
28. Holmgren, A. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632
29. Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876–4882
30. Saitou, N., and Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406–425
31. Kumar, S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., and Nei, M. (2001) *Bioinformatics* **17**, 1244–1245
32. Cruz-García, F., Hancock, C. N., Kim, D., and McClure, B. (2005) *Plant J.* **42**, 295–304
33. Yano, H., Wong, J. H., Lec, Y. M., Cho, M. J., and Buchanan, B. B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 4794–4799
34. Hoog, J. O., von Bahr-Lindstrom, H., Josephson, S., Wallace, B. J., Kushner, S. R., Jorvall, H., and Holmgren, A. (1984) *Biosci. Rep.* **4**, 917–923
35. Baumann, U., and Juttner, J. (2002) *CMLS Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1042–1057
36. Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) *J. Mol. Biol.* **340**, 783–790
37. Bendtsen, J. D., Jensen, L. J., Blom, N., von Heijne, G., and Brunak, S. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.* **17**, 349–356
38. Kalef, E., Walfish, P. G., and Gitler, C. (1993) *Anal. Biochem.* **212**, 325–334
39. Brugidou, C., Marty, I., Chartier, Y., and Meyer, Y. (1993) *Mol. Gen. Genetics* **238**, 285–293
40. Tanudji, M., Hevi, S., and Cchuck, S. (2003) *Am. J. Physiol.* **284**, C1272–C1279
41. Bower, M.S., Matias, D. D., Fernandes-Carvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T., Rothstein, S., and Goring, D. R. (1996) *Plant Cell* **8**, 1641–1650
42. Mazzurco, M., Sulaman, W., Elina, H., Cock, J. M., and Goring, D.R. (2001) *Plant Mol. Biol.* **45**, 365–376
43. Cabrilla, D., Cock, J. M., Dumas, C., and Gaude, T. (2001) *Nature* **410**, 220–223
44. Schopf, C. R., Nasrallah, M. E., and Nasrallah, J. B. (1999) *Science* **286**, 1697–1700
45. Soderberg, A., Sahaf, B., and Rosén, A. (2000) *Cancer Res.* **60**, 2281–2289
46. McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., and Clarke, A. (1989) *Nature* **342**, 955–957
47. Lind, J. L., Bonong, I., Clark, A. E., and Anderson, M. A. (1996) *Sex. Plant Reprod.* **9**, 75–86
48. Bosch, M., Sommer-Knudsen, J., Derkensen, J., and Mariani, C. (2001) *Plant Physiol.* **125**, 2180–2188
49. Kallis, G. B., and Holmgren, A. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 10261–10265
50. Wynn, R., Cocco, M. J., and Richards, F. M. (1995) *Biochemistry* **34**, 11807–11813
51. Sijacic, P., Wang, X., Skirpan, A. L., Wang, Y., Dowd, P. E., McCubbin, A. G., Huang, S., and Kao, T.-H. (2004) *Nature* **429**, 302–305
52. Oxley, D., and Bacic, A. (1996) *Eur. J. Biochem.* **242**, 75–78