



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“NaTrxh activa a la S-RNasa para el rechazo del polen en *Nicotiana*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. María Daniela Torres Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Felipe Cruz García Maestría y Doctorado en
Ciencias Bioquímicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Alejandra Covarrubias Robles

Dr. Wilhelm Hansberg Torres

Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Cd.Mx., octubre, 2020



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).

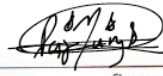
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

CGEP/PMDCB/763/2020
Asunto: jurado de examen

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 20 de abril del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del/la estudiante **Torres Rodríguez María Daniela**, con la tesis **"NaTrxh activa a la S-Rnasa para el rechazo del polen en Nicotiana"**, dirigida por el/la Dr(a). **Cruz García Felipe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Plasencia de la Parra Francisco Javier	Si__ No__	__/__/__ fecha	_____	firma
VOCAL	Cárdenas Torres Luis	Si__ No__	__/__/__ fecha	_____	firma
VOCAL	González Segura Lilian	Si__ No__	__/__/__ fecha	_____	firma
VOCAL	Sánchez Jiménez María de la Paz	Si <input checked="" type="checkbox"/> No__	__/__/__ fecha		firma
SECRETARIO	Georgellis Dimitris	Si__ No__	__/__/__ fecha	_____	firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de abril de 2020



Dra. Aana Brígida Clorinda Arias Álvarez
COORDINADORA

contacto: mdcbq@posgrado.unam.mx Tel.: 5623 7006



CGEP/PMDCB/763/2020
Asunto: jurado de examen

SINODALES DESIGNADOS
Presente

Estimado académico:
Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del día 20 de abril del presente año, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** del/la estudiante **Torres Rodríguez María Daniela**, con la tesis **"NaTrxh activa a la S-Rnasa para el rechazo del polen en Nicotiana"**, dirigida por el/la Dr(a). **Cruz García Felipe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

		Acepto			
PRESIDENTE	Plasencia de la Parra Francisco Javier	SI <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	18/5/2020		fecha firma
VOCAL	Cardenas Torres Luis	SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1/1		fecha firma
VOCAL	González Segura Lilian	SI <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	3/6/20		fecha firma
VOCAL	Sánchez Jiménez María de la Paz	SI <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	1/1		fecha firma
SECRETARIO	Georgellis Dimitris	SI <input checked="" type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/>	18/5/2020		fecha firma

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 20 de abril de 2020

Dra. Aana Brigida Clorinda Arias Álvarez
COORDINADORA

contacto: mdecbq@posgrado.unam.mx Tel: 5623 7006

Reconocimientos

Esta tesis 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 UNAM.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas.

Al comité tutor integrado por el Dr. Wilhelm Hansberg Torres, la Dra. Alejandra Covarrubias Robles y el Dr. Felipe Cruz García.

Al Dr. Bruce McClure de la Universidad de Columbia-Missouri por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar parte de este proyecto.

A la Dra. Lilian González Segura por el apoyo en la obtención de cristales de proteína y en la resolución de la estructura de NaTrxh.

Al Dr. Rogelio Rodríguez Sotres por el apoyo en los ensayos de dinámica molecular entre la S-RNasa y NaTrxh.

Al Structural Biology Center del Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory, y a los miembros de la línea 19-ID donde se difractaron los cristales de NaTrxh.

A la Facultad de Química.

A la M. en C. Yuridia Cruz Zamora por el apoyo técnico.

A todos los miembros del laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por otorgar el financiamiento para presentar mi proyecto en el XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, 2018 y para la realización de la estancia en la Universidad de Missouri.

A la American Society of Plant Biologist por otorgar el financiamiento para presentar este trabajo en el Annual Meeting of Plant Biology, 2018.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado (434975) y por la beca mixta para estancia en la Universidad de Missouri.

Este proyecto fue financiado por FQ-5000-9128, CONACyT (236602), PAPIIT-UNAM (IN220919).

Índice

1. Resumen.....	8
1.2 Abstract.....	10
2. Introducción.....	12
2.1 Autoincompatibilidad en angiospermas.....	12
2.2 Sistema de AI esporofítico.....	13
2.3 Sistema de AI gametofítico.....	15
2.4 Formación de complejos entre la S-RNasa y otras proteínas estilares.....	21
2.5 Búsqueda de nuevos GMs de AI en <i>Nicotiana</i>	22
2.6 Características de las tiorredoxinas.....	23
2.7 Tiorredoxinas vegetales.....	24
3. Antecedentes.....	26
3.1 Expresión de <i>NaTrxh</i> en <i>Nicotiana</i>	26
3.2 Interacción de NaTrxh con la S-RNasa.....	27
3.3 Reducción <i>in vitro</i> de la S-RNasa por NaTrxh.....	28
3.4 Interacción de NaTrxh con las proteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII.....	30
4. Hipótesis.....	32
5. Objetivos.....	32
5.1 Objetivo general.....	32
5.2 Objetivos particulares.....	32
6. Materiales y métodos.....	33
6.1 Material biológico.....	33
6.2 Generación del gen mutante <i>NaTrxh_{ss}</i>	33
6.3 Generación de la construcción pK2GWF7:NaTrxh _{ss} para transformación de <i>N. plumbaginifolia</i>	35
6.4. Transformación de <i>N. plumbaginifolia</i> mediante infección con <i>A. tumefaciens</i> y generación de híbridos con <i>N. alata</i>	37
6.5 Evaluación del crecimiento de los tubos polínicos mediante su tinción con azul de anilina	38
6.6 Extracción de RNA total de pistilo de los híbridos <i>N. plumbaginifolia</i> x <i>N. alata</i>	38
6.7 Síntesis de cDNA.....	40
6.8 Extracción de proteína total de pistilo.....	42
6.9 Purificación de la proteína NaTrxh.....	43
6.10 Purificación de la S-RNasa y de los complejos S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.....	45
6.11 Reducción <i>in vitro</i> de la S-RNasa.....	46
6.12 Cuantificación de la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.....	47
6.13 Electroforesis en doble dimensión para la reducción de los complejos S-RNasa-120K-NaTTS- NaPELPIII.....	48
6.14 Identificación de puentes disulfuro reducidos en la S-RNasa.....	49
6.15 Generación de las columnas de afinidad de GST y GST-NrTrxh.....	50
6.16 Cromatografía de afinidad para ver interacción proteína-proteína.....	50
6.17 Purificación de NaTrxh para su cristalización.....	51
6.18 Pruebas de cristalización para NaTrxh.....	52
6.19 Difracción de cristales de NaTrxh y resolución de su estructura tridimensional.....	53
6.20 Modelo de la interacción entre la S _{F11} -RNasa y NaTrxh.....	54

6.21 Modelo del complejo S _{F11} -RNasa-dinucleótido.....	55
7. Resultados y discusión.....	56
7.1 NaTrxh es un gen modificador de AI de <i>Nicotiana</i>	56
7.1.1 Generación de los híbridos transgénicos.....	56
7.1.2 NaTrxh es esencial para el rechazo del polen alelo S-específico.....	61
7.1.3 NaTrxh participa en el rechazo interespecífico del polen de <i>N. plumbaginifolia</i>	66
7.2 Proteínas involucradas en el rechazo del polen que son candidatos de reducción de NaTrxh..	68
7.2.1 El complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.....	68
7.2.2 La S-RNasa como blanco de NaTrxh.....	72
7.3 Posible participación de NaTrxh en el rechazo del polen en <i>Nicotiana</i>	74
7.3.1 La reducción específica de la S-RNasa por NaTrxh provoca un incremento en su actividad de ribonucleasa.....	74
7.3.2 Cambios estructurales en la S-RNasa que permiten el incremento en su actividad de ribonucleasa	76
7.3.3 La interacción a través del dominio N-terminal de NaTrxh con la S-RNasa es esencial para la reducción.....	80
7.3.4 Interacción entre NrTrxh y la S-RNasa a través del dominio C-terminal.....	82
7.3.5 El efecto de la expresión <i>NaTrxh_{SS}</i> en los híbridos transgénicos.....	85
7.4 Estructura tridimensional de NaTrxh por cristalografía y difracción de rayos X.....	87
7.4.1. Obtención de cristales de NaTrxh y difracción.....	87
7.4.2. Resolución de la estructura de NaTrxh.....	88
7.5 Interacción de NaTrxh con la S-RNasa para su reducción.....	95
7.6 Modelo de la participación de NaTrxh en el rechazo del polen en <i>Nicotiana</i>	98
8. Conclusiones.....	101
9. Perspectivas.....	101
10. Bibliografía.....	102
11. Anexos.....	111
12. Artículo “NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in <i>Nicotiana</i> by increasing S-RNase activity”.....	117
13. Artículo “High resolution crystal structure of NaTrxh from <i>Nicotiana alata</i> and its interaction with the S-RNase”.....	138

1. Resumen

Las angiospermas desarrollaron diversas estrategias reproductivas para generar y mantener su diversidad genética mediante la polinización cruzada. Una de éstas se basa en un mecanismo genético conocido como autoincompatibilidad sexual (AI), en el cual el órgano femenino reconoce y rechaza el polen propio y acepta solo aquel que proviene de individuos genéticamente distintos. Existen dos tipos de control genético: el gametofítico, donde la determinante masculina de especificidad es expresada por el polen (gametofito) y, el esporofítico, en el cual la determinante masculina es expresada por la pared de la antera (parte del esporofito).

La AI gametofítica en las familias Rosaceae, Solanaceae y Plantaginaceae, está controlada genéticamente por el locus multialélico *S*, el cual codifica las determinantes masculina y femenina, denominadas SLF (S-locus F-box protein) y S-RNasa, respectivamente. Durante la polinización, la S-RNasa ingresa a los tubos polínicos e interacciona físicamente con SFL en el citosol. Una interacción alelo *S*-específica desencadena el rechazo del polen, en donde la actividad citotóxica de la S-RNasa es crucial para la inhibición del crecimiento del tubo polínico.

SLF y la S-RNasa no son suficientes para el rechazo del polen, ya que otros genes, denominados Genes Modificadores (GMs), también son esenciales en la vía. Para profundizar en nuestro conocimiento acerca del mecanismo bioquímico que conduce a la inhibición del crecimiento del tubo polínico durante la respuesta de AI, nuestro grupo de investigación ha estado enfocado en identificar GM. Uno de nuestros candidatos es *NaTrxh* de *N. alata*, el cual codifica para una tiorredoxina (Trx) que se expresa mayoritariamente en pistilos de plantas autoincompatibles (AI) respecto a plantas autocompatibles (AC), además, la proteína NaTrxh interacciona con la S-RNasa y reduce puentes disulfuro de su estructura *in vitro*.

En el presente trabajo, se generaron híbridos de *N. plumbaginifolia* x *N. alata* que expresan una mutante de NaTrxh sin actividad reductora (denominada NaTrxh_{SS}). Las plantas transgénicas, que expresan ambas versiones de NaTrxh, la tipo silvestre y a NaTrxh_{SS}, pierden parcialmente la capacidad de rechazar su propio polen, indicando que la actividad reductora de NaTrxh es esencial en la respuesta de AI en *Nicotiana*.

Dado que la S-RNasa es reducida por NaTrxh, se evaluó el efecto sobre su actividad. Se determinó que NaTrxh rompe específicamente el puente disulfuro formado entre la Cys155 y la Cys185 en la S_{C10}-RNasa provocando un aumento de siete veces en su actividad de ribonucleasa, dicha reducción es mediada por la interacción entre la S-RNasa y el extremo N-terminal de la Trx. Además, se da evidencia de que la incubación *in vitro* de NaTrxh con NaTrxh_{SS}, impide la reducción de la S-RNasa por NaTrxh, ya que bajo esta condición NaTrxh_{SS} se une de manera irreversible a la ribonucleasa evitando su reducción. De tal manera que la pérdida parcial del fenotipo de AI en los híbridos transgénicos, podría explicarse por la unión irreversible de NaTrxh_{SS} a la S-RNasa en el citosol del tubo polínico, evitando la reducción de una cierta población de la S-RNasa por NaTrxh.

Además, en el presente estudio se determinó mediante cristalografía de rayos X, la estructura tridimensional de NaTrxh a 1.7Å de resolución. La estructura 3D de NaTrxh reveló que su extremo N-terminal está orientado hacia el sitio reactivo WCGPC, lo cual concuerda con resultados previos que indican que la falta de dicho dominio evita la reducción de la S-RNasa y el incremento en su actividad. Asimismo, a través de ensayos de dinámica molecular entre NaTrxh y la S_{F11}-RNasa se observó la posible interacción entre estas proteínas a través del extremo N-terminal de NaTrxh así como los posibles cambios conformacionales que ocurren en la S_{F11}-RNasa después de la reducción específica del puente disulfuro blanco de NaTrxh.

Con nuestros resultados proponemos a NaTrxh como una proteína crucial para la respuesta respuesta del rechazo del polen alelo S-específico en *Nicotiana* cuya función sería reducir y aumentar la actividad de la S-RNasa para que ésta ejerza su actividad citotóxica contra los tubos polínicos de cruzas incompatibles.

1.2 Abstract

Angiosperms have developed diverse reproductive strategies to generate and maintain their genetic diversity through cross-pollination. One of these strategies is based on a genetic mechanism known as self-incompatibility (SI), in which the female organ recognizes and rejects its own pollen and accepts the one that comes from a genetically different individual. There are two types of SI: the gametophytic, where the male specificity determinant is expressed in the pollen (gametophyte) and, the sporophytic, in which the specificity determinant is expressed in the anther (part of the sporophyte).

Gametophytic SI in the Rosaceae, Solanaceae and Plantaginaceae families, is genetically controlled by the multiallelic *S*-locus, which encodes both male and female determinants, called SLF (S-locus F-box protein) and S-RNase, respectively. During pollination, S-RNase enters the pollen tubes and physically interacts with SFL in the cytosol. An allele *S*-specific interaction triggers pollen rejection, where the cytotoxic activity of S-RNase is crucial for the inhibition of the pollen tube growth.

SLF and the S-RNase are not sufficient for pollen rejection, since other genes, called Modifier Genes (MGs), are also essential for the response. To get further insight into the biochemical mechanism that leads to the inhibition of pollen tube growth during SI response, our research group has focused on identifying new MGs. One candidate is NaTrxh from *N. alata*, which encodes for a thioredoxin (Trx) whose expression is higher in pistils of self-incompatible plants (SI) than in those of self-compatible plants (SC). In addition, the NaTrxh protein interacts with the S-RNase and reduces it *in vitro*.

In this work, we generated *N. plumbaginifolia* x *N. alata* hybrids that express a NaTrxh mutant without reducing activity (called NaTrxh_{SS}). Transgenic plants expressing both versions of NaTrxh, the wild type and NaTrxh_{SS}, partially lose the ability to reject their own pollen, indicating that NaTrxh reducing activity is essential in the SI response in *Nicotiana*.

Since S-RNase is reduced by NaTrxh, the effect on its ribonuclease activity was evaluated. It was determined that NaTrxh specifically reduces the disulfide bond formed between Cys155 and Cys185 in S_{C10}-RNase causing a seven-fold increase on its ribonuclease activity. This reduction is mediated by the interaction between S-RNase and the NaTrxh N-terminal. In addition, when NaTrxh is incubated with NaTrxh_{SS}, S-RNase reduction by NaTrxh does not occur, since under this condition NaTrxh_{SS} might bind irreversibly to the ribonuclease preventing its reduction. Thus, the partial loss of the SI phenotype in transgenic hybrids could be explained by the irreversible interaction between NaTrxh_{SS} and the S-RNase in pollen tube cytosol, which avoids the reduction of a certain population of the S-RNase by NaTrxh.

Furthermore, the three-dimensional structure of NaTrxh was determined by X-ray crystallography at 1.7Å of resolution. The 3D NaTrxh structure reveals that the NaTrxh N-terminal is oriented towards the WCGPC reactive site, which is consistent with previous results indicating that lack of

the NaTrxh N-terminal prevents S-RNase reduction. In addition, molecular dynamic assays performed with the 3D NaTrxh structure and the S_{F11}-RNase showed the possible interaction between these two proteins as well as the possible conformational changes in S-RNase derived from reduction of the disulfide bond targeted by NaTrxh.

With our results, we propose to NaTrxh as a crucial protein for the *S*-specific pollen rejection response in *Nicotiana* and its function would be to reduce and increase the S-RNase activity allowing it to exert its cytotoxic effect against incompatible pollen tubes.

2. Introducción.

2.1 Autoincompatibilidad en angiospermas.

Las angiospermas constituyen el grupo de plantas más diverso y su éxito evolutivo se debe en gran medida a las distintas adaptaciones que han desarrollado teniendo como objeto la reproducción. Este tipo de plantas se reproducen de manera asexual o sexual, siendo la segunda opción la que contribuye a la generación de variación genética en las poblaciones, lo cual es de gran importancia cuando se encuentran en un ambiente con condiciones cambiantes (Rea y Nasrallah, 2008).

La flor es la estructura reproductiva de las angiospermas y en ella se encuentran los órganos reproductivos que son el pistilo, que contiene a los óvulos, y las anteras, las cuales producen los granos de polen. Cuando un grano de polen llega al estigma, se hidrata y germina el tubo polínico que contiene a los núcleos espermáticos. El tubo polínico es una célula que crece a lo largo del tejido de transmisión del estilo hasta llegar al ovario donde se encuentran los óvulos, sitio en donde se liberarán los núcleos espermáticos para que se lleve a cabo la fecundación (Rea y Nasrallah, 2008).

En plantas cuyas flores son hermafroditas la autopolinización y autofecundación es muy frecuente; sin embargo, la fecundación cruzada es la que contribuye a la generación de variabilidad, por ello las angiospermas desarrollaron diversas barreras físicas y genéticas para evitar la autofecundación. La autoincompatibilidad sexual (AI), es una barrera genética que se define como la incapacidad de una planta fértil hermafrodita para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977).

La AI está controlada genéticamente por un único locus multialélico, denominado locus *S*, el cual contiene los genes que codifican para las determinantes de especificidad masculina y femenina que se expresan en el polen y el pistilo, respectivamente. El reconocimiento y rechazo del polen propio es posible gracias a la interacción alelo *S* específica entre las determinantes de especificidad, lo cual desencadena una respuesta celular que culmina con la inhibición del crecimiento del tubo polínico (Figura 1) (McClure y Franklin-Tong, 2006).

Se sabe que para determinar la compatibilidad de un grano de polen sobre un pistilo únicamente se requieren a la S-RNasa y a SLF por evidencias de experimentos de ganancia de función. Por ejemplo, cuando los híbridos de *N. alata* BT x *N. langsdorffii* (quienes son compatibles porque carecen de S-RNasa), fueron transformados y expresaron a la S-RNasa de haplotipo S_{A2} , adquirieron la habilidad de rechazar el polen S_{A2} , pero aceptaron el polen S_{C10} (Murfett *et al.*, 1994). Esto también se demostró en *P. inflata*, donde la expresión de la S_3 -RNasa en plantas de genotipo S_1S_2 , provocó el rechazo del polen S_3 (Lee *et al.*, 1994). Ahora bien, para el caso de SLF, se demostró que este confiere la especificidad a través de la generación de polen heteroalélico en *P. inflata*. El experimento consistió en introducir el alelo SLF_2 en plantas de genotipos S_1S_1 , S_1S_2 y S_2S_3 . Los granos de polen producidos que portaban el transgen S_2 junto con el alelo S_1 o S_3 , fueron aceptados

en autopolinizaciones. Por el contrario, los granos de polen que portaban dos alelos S_2 , fueron rechazados en autopolinizaciones (Sijacic *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de control genético en los sistemas de AI y son denominados esporofítico y gametofítico. En la AI esporofítica, el fenotipo de compatibilidad del polen lo otorga la antera que es un tejido diploide; mientras que en la AI gametofítica, el fenotipo de compatibilidad proviene del polen que es haploide (Rea y Nasrallah, 2008).

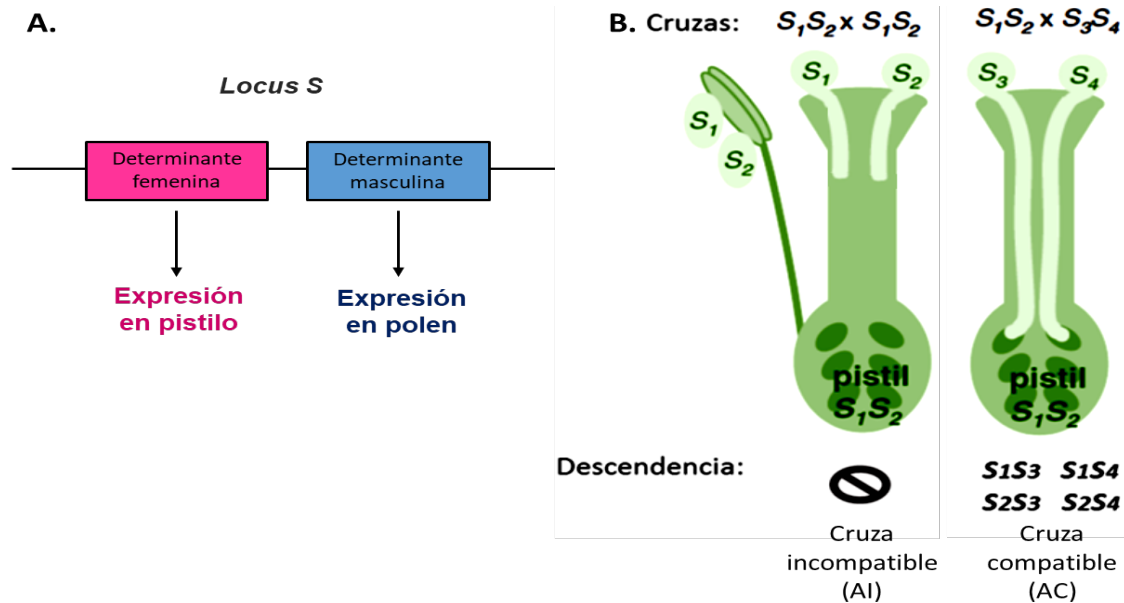


Figura 1. La incompatibilidad sexual en las angiospermas. A. Estructura del locus S. B. La AI promueve la fecundación cruzada a través del reconocimiento entre las determinantes de especificidad femenina y masculina. En un pistilo S_1S_2 , los granos de polen cuyo haplotipo sea S_1 o S_2 serán rechazados; mientras tanto, los granos de polen de haplotipos distintos (S_3 o S_4) serán aceptados y podrán llegar hasta el ovario para fecundar los óvulos (Tomado de McClure y Franklin-Tong, 2006).

2.2 Sistema de AI esporofítico.

La AI esporofítica descrita en la familia Brassicaceae opera a nivel de interacción del grano de polen con las células de la epidermis del estigma. Estas células discriminan a los granos de polen e inhiben la germinación de aquellos que poseen el mismo haplotipo S , permitiendo únicamente el desarrollo de aquellos cuyo haplotipo S es diferente. El rechazo del polen ocurre por la falta de hidratación del grano de polen y por una rápida inhibición del crecimiento del tubo polínico sobre la superficie de las papilas estigmáticas de aquellos que logran germinar (Takayama e Isogai, 2005).

La determinante femenina en la AI esporofítica es SRK (S -locus Receptor Kinase), la cual es una proteína transmembranal con actividad de cinasa de Serina/Treonina expresada exclusivamente en

la epidermis de las células papilares del estigma (Stein y Nasrallah, 1993); mientras que la determinante masculina corresponde a la proteína SCR (*S*-locus Cysteine-Rich, también denominada SP11, *S*-locus Protein 11), la cual es sintetizada por la antera y es depositada en la cubierta del grano de polen. La proteína SCR es el ligando de SRK (Kachroo *et al.*, 2001; Shiba *et al.*, 2001).

Una interacción haplotipo *S*-específica entre SCR y el dominio extracelular de SRK, activa a este receptor que se autofosforila iniciando la cascada de señalización para el rechazo del polen (Cabrillac *et al.*, 2001). Dos proteínas de suma importancia en el mecanismo son las tiorredoxinas THL1 y THL2, las cuales inhiben la fosforilación de SRK. Se propone que THL1/2 se encuentran constitutivamente unidas al receptor para regular su dominio cinasa inhibiendo su autofosforilación y así evitar que la respuesta de rechazo del polen se encuentre siempre activa; sin embargo, cuando inicia la respuesta de rechazo del polen estas proteínas se liberan de SRK permitiendo su fosforilación (Cabrillac *et al.*, 2001).

Después de la activación de SRK en las células estigmáticas, se desencadena una cascada de señalización que culmina en el rechazo del polen, aunque aún se desconoce exactamente cómo ocurre. Algunas proteínas han sido identificadas como posibles efectores en la respuesta, por ejemplo, MLPK (Proteína Cinasa del Locus *M*) de *Brassica rapa*, la cual está anclada a la membrana plasmática de las papilas estigmáticas y cuenta con un dominio de cinasa de Serina/Treonina en la región citosólica. Una mutación de MLPK afecta la capacidad del estigma de inhibir el polen del mismo haplotipo *S* (Murase *et al.*, 2004).

Otra proteína identificada es ARC1, quien se expresa solo en los estigmas e interacciona con el dominio cinasa de SRK cuando está fosforilado (Gu *et al.*, 1998). ARC1 tiene actividad ligasa E3 de ubiquitina, por lo que se propone que puede ubiquitilar a alguna proteína requerida para el crecimiento del tubo polínico y causar su degradación (Figura 2) (Rea y Nasrallah, 2008).

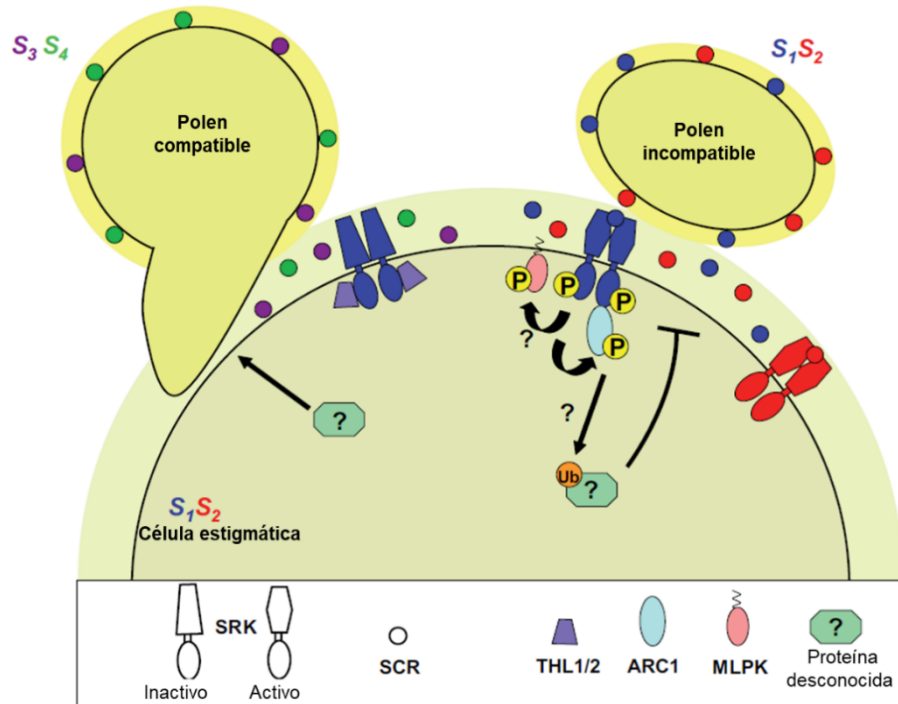


Figura 2. Mecanismo de AI esporofítica en Brassicaceae. Se muestra una célula de la epidermis del estigma cuyo genotipo es S_1S_2 , la cual tiene en su superficie dos granos de polen, uno derivado de la misma planta (S_1S_2) y otro derivado de una planta con genotipo distinto (S_3S_4). Dentro de las células estigmáticas, THL1/2 se encuentran unidas al receptor SRK (determinante femenina) lo cual lo mantiene inactivo y formando dímeros. SCR (determinante masculina), se encuentra en la cubierta del grano de polen y es reconocido por SRK. El reconocimiento del grano de polen AI activa a SRK quien se autofosforila después de la separación de THL1/2, esto provoca la respuesta de rechazo del polen en donde las proteínas ARC1 y MLPK también están involucradas (Tomado de Rea y Nasrallah, 2008).

2.3 Sistema de AI gametofítico.

La inhibición del crecimiento del tubo polínico en la AI gametofítica, estudiado en las familias Plantaginaceae, Solanaceae y Rosaceae, ocurre en el primer tercio del estilo. La determinante femenina fue identificada en *Nicotiana alata* y es una glicoproteína perteneciente a la familia de las ribonucleasas T2, conocida como S-RNasa (McClure *et al.*, 1989). Esta proteína se expresa en las células del tejido de transmisión estilar y es secretada a su espacio extracelular (Anderson *et al.*, 1989). Además de ser la determinante de especificidad, la S-RNasa participa en la degradación del rRNA del tubo polínico incompatible permitiendo la inhibición de su crecimiento (McClure *et al.*, 1990).

La determinante masculina está conformada por un conjunto de proteínas denominadas SLF (*S*-Locus F-box protein) que se expresan específicamente en el polen y en los tubos polínicos (Lai *et al.*, 2002; Qiao *et al.*, 2004; Wheeler y Newbiggin, 2007; Williams *et al.*, 2014). Las proteínas SLF incluyen en su extremo N-terminal un dominio con caja F y funcionan como proteínas E3 ligasas

formando parte del complejo SCF (Skp1-Cullin-F-Box) el cual media la poliubiquitilación de proteínas blanco para su degradación en el proteosoma 26S (Hua y Kao, 2006).

Existen dos modelos para explicar cómo ocurre la respuesta de AI gametofítica.

- Modelo colaborativo de reconocimiento no específico:

De manera general, la degradación de proteínas a través del proteosoma 26S es asistida por el sistema de ubiquitina, el cual incluye a las proteínas que desempeñan las actividades de E1 (activación de ubiquitina), E2 (conjugación de ubiquitina) y E3 (ligasa de ubiquitina) (Hershko y Ciechanover, 1998). El complejo SCF contiene la actividad de ligasa de ubiquitina. Está conformado por Spk1, Cullin 1, una proteína con dominio de caja F y Rbx1. Cullin 1 es una proteína de andamiaje, sus extremos N- y C-terminal interactúan con Spk1 y Rbx1, respectivamente. La proteína con caja F, se une a Spk1 a través de este dominio; además, le da especificidad al complejo ya que cuenta con otro dominio para el reconocimiento de la proteína blanco. Por su parte, Rbx1 interactúa con la enzima E2 para promover la transferencia de ubiquitina a la proteína blanco (Zhen *et al.*, 2002).

La determinante masculina SLF es la proteína con caja F del complejo SCF y específicamente es quien tiene la actividad de E3 ligasa que consiste en la transferencia de ubiquitina a la proteína blanco (Hua y Kao, 2006). Ya se han encontrado otros componentes que forman el complejo SCF con SLF (Figura 3. A). AhSSK1 fue identificada en *Antirrhinum* mediante ensayos de doble híbrido en levadura, usando como anzuelo a SLF2. Esta es una proteína ortóloga a Spk1 (Huang *et al.*, 2006), mientras que PiCUL1-G (cullin-1 de *Petunia inflata*) y PhUBC1 (proteína E2-like de *P. hybrida*) fueron identificadas mediante ensayos de doble híbrido en *Petunia* (Hua y Kao, 2006).

Inicialmente se propuso el modelo de la degradación de la S-RNasa para explicar el rechazo del polen, el cual postulaba que una SLF interactúa con la S-RNasa propia (por ejemplo, SLF₁ con la S₁-RNasa (cruza autoincompatible, AI) a través de dominios específicos previniendo la ubiquitilación de la S-RNasa. Por otro lado, si SLF y la S-RNasa eran de un haplotipo *S* distinto (cruza autocompatibles, AC), la interacción sería a través de un dominio conservado en todas las proteínas SLF y S-RNasa, respectivamente, permitiendo la ubiquitilación y degradación de la S-RNasa no propia; con ello el tubo polínico evadía la actividad citotóxica de la S-RNasa. Este modelo establecía que la interacción haplotipo *S*-específica era más fuerte que la que se da entre SLF y la S-RNasa con haplotipos *S* distintos (Qiao *et al.*, 2004 y Sijacic *et al.*, 2004).

Sin embargo, a través de ensayos de interacción proteína-proteína *in vitro*, se encontró que, en *P. inflata*, una determinada SLF interactúa con mayor afinidad con las S-RNasas de haplotipo *S* distinto (Hua y Kao, 2006). Con estos datos se propuso que, por ejemplo, en una cruce AI, el complejo SLF₁-S₁-RNasa, la interacción entre las dos determinantes era débil, por lo que el complejo SLF-S-RNasa sería inestable y como consecuencia, la S-RNasa estaría preferentemente libre para degradar el RNA del tubo polínico para detener su crecimiento. Por el contrario, en una

cruza AC, el complejo SLF₂-S₁-RNasa tendría mas afinidad y por lo tanto sería estable, lo que permitiría que SLF, ubiquitilara a la S-RNasa para su degradación (Hua y Kao, 2006).

El modelo de degradación de la S-RNasa se ha modificado debido a nueva información acerca del locus *S* y de SLF. Se sabe que dentro del locus *S* solamente existe un gen de la S-RNasa el cual, debido a su alto grado de polimorfismo, es el único responsable de la especificidad en el pistilo (Lee *et al.*, 1994 y McClure, 2004). Sin embargo, hay varios genes parálogos de *SLF* dentro del locus *S*. Por ejemplo, en el haplotipo S₂ de *Petunia inflata*, existen 17 genes *SLF*, mismos que existen en el haplotipo S₃ (Williams *et al.*, 2014). Las 17 proteínas codificadas son capaces de formar complejos SCF con Spk1 y Cullin1 (Li *et al.*, 2016). Asimismo, se han reportado 10 genes de *SLF* en el locus *S* de *N. alata* (Wheeler y Newbigin, 2007).

Para explicar la presencia de múltiples *SLFs* en un mismo haplotipo, el modelo colaborativo de reconocimiento no específico plantea que para un haplotipo *S* determinado, cada SLF funciona como una subunidad del complejo SCF para mediar la ubiquitilación de una S-RNasa de un haplotipo *S* distinto. Cada una de las proteínas SLF generadas por un haplotipo puede interactuar con algunas de las S-RNasas no propias provenientes de distintos haplotipos, por lo que la expresión de todas las SLF es necesaria para reconocer y ubiquitinar a todos los haplotipos de S-RNasas que puedan existir en la población. Sin embargo, ninguna SLF podrá ubiquitinar a la S-RNasa propia (mismo haplotipo *S*) de tal forma que esta degradará el RNA del tubo polínico e inhibirá su crecimiento (Figura 3. B) (Kubo *et al.*, 2010).

No se sabe con exactitud qué características deben cambiar en las proteínas SLF para ser reconocidas diferencialmente por las S-RNasas. Las secuencias de las 17 proteínas SLF que se han identificado en *P. inflata* son muy conservadas. A través de análisis *in silico* se han encontrado dos regiones dentro de la secuencia de los genes de *SLF* que tienen mayor variabilidad, de las cuales además se predice que se encuentran expuestas al solvente en la proteína; por ello se cree que están involucradas en la interacción y el reconocimiento de la S-RNasa. Estas regiones se localizan hacia el extremo C-terminal de SLF, contrario al sitio donde se encuentra el dominio de caja F, el cual está cercano al extremo N-terminal de la proteína (Williams *et al.*, 2014). Sin embargo, a la fecha, no se han realizado experimentos *in vitro* para ver específicamente la interacción de estas regiones con distintas S-RNasas.

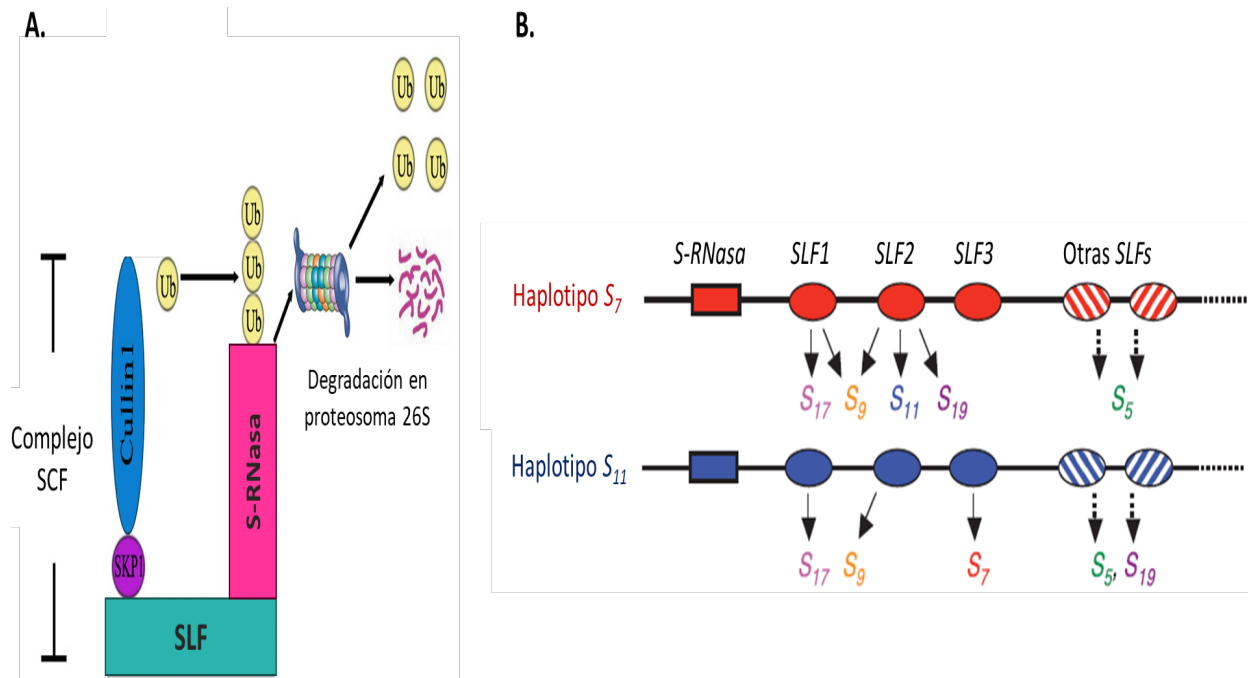


Figura 3. Modelo colaborativo de reconocimiento no específico. **A.** Estructura del complejo SCF (SLF-SPK1-Cullin1) para degradación de la S-RNasa a través del proteosoma 26S. **B.** Dentro del locus *S* se encuentra un gen *S-RNasa* y múltiples genes *SLF*. El haplotipo *S*₇ tendrá *S*₇-*RNasa* y *S*₇-*SLF1*, *S*₇-*SLF2*, *S*₇-*SLF3* hasta *S*₇-*SLFx*. Cada *SLF* interacciona y degrada a un haplotipo de S-RNasa distinto (los haplotipos están indicados como *S*₁₇, *S*₉, *S*₁₁, *S*₁₉ y *S*₅), pero ninguna reconocerá a la S-RNasa propia (*S*₇). Lo mismo ocurre para el haplotipo *S*₁₁ (Tomado de Kubo *et al.*, 2010).

- Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas

Este modelo fue propuesto por Goldraij *et al.* en 2006 y toma en cuenta la participación de otras proteínas además de las determinantes de especificidad. Estas proteínas están codificadas por genes modificadores (GMs), los cuales se encuentran codificados fuera del locus *S*, aunque por lo general tienen expresión específica en el polen o el pistilo (McClure *et al.*, 2000). De todos los GMs identificados a la fecha, se sabe que son esenciales para la respuesta del rechazo del polen porque su supresión genética provoca que las plantas AI sean capaces de aceptar su propio polen (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014 y García-Valencia *et al.*, 2017).

En el pistilo se han identificado a *NaStEP* (*N. alata* Stigma-Expressed Protein), *120K* y *HT-B* (High Top-Band); mientras que en el polen se han descrito a *MdABCF* (*Malus domestica* ABC sub-family F protein) y a *NaSIPP* (*N. alata* Self-Incompatibility Pollen Protein), además de los genes que codifican para las proteínas que forman el complejo SCF junto con SLF (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2006; Hua y Kao, 2006; Jiménez-Durán *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014 y García-Valencia *et al.*, 2017).

El modelo de la compartimentalización propone que las S-RNasas ingresan a los tubos polínicos independientemente de su haplotipo *S*. Las proteínas 120K y HT-B también entran a los tubos polínicos, aunque se desconoce la vía de ingreso (Lind *et al.*, 1996; Goldraj *et al.*, 2006). En el tubo polínico, la mayor cantidad de S-RNasas se almacenan dentro de una vacuola junto con 120K, mientras que HT-B se asocia al sistema endomembranoso. Una pequeña cantidad de S-RNasas se localiza en el citoplasma donde interacciona con SLF. En una cruce compatible, las S-RNasas permanecen secuestradas en la vacuola debido a que de alguna manera la proteína HT-B se degrada llevando a la estabilización de este compartimento. Por el contrario, cuando la cruce es incompatible, HT-B permanece estable, lo cual correlaciona con la ruptura de la vacuola que contiene a las S-RNasas. La liberación de las S-RNasas al citoplasma permite que éstas ejerzan su actividad citotóxica degradando el rRNA del tubo polínico, e inhibiendo así la síntesis de proteínas lo que detiene su crecimiento a través del estilo. Por otro lado, aunque se sabe la localización de 120K, su participación en el mecanismo aún es desconocida (Figura 4) (Goldraj *et al.*, 2006).

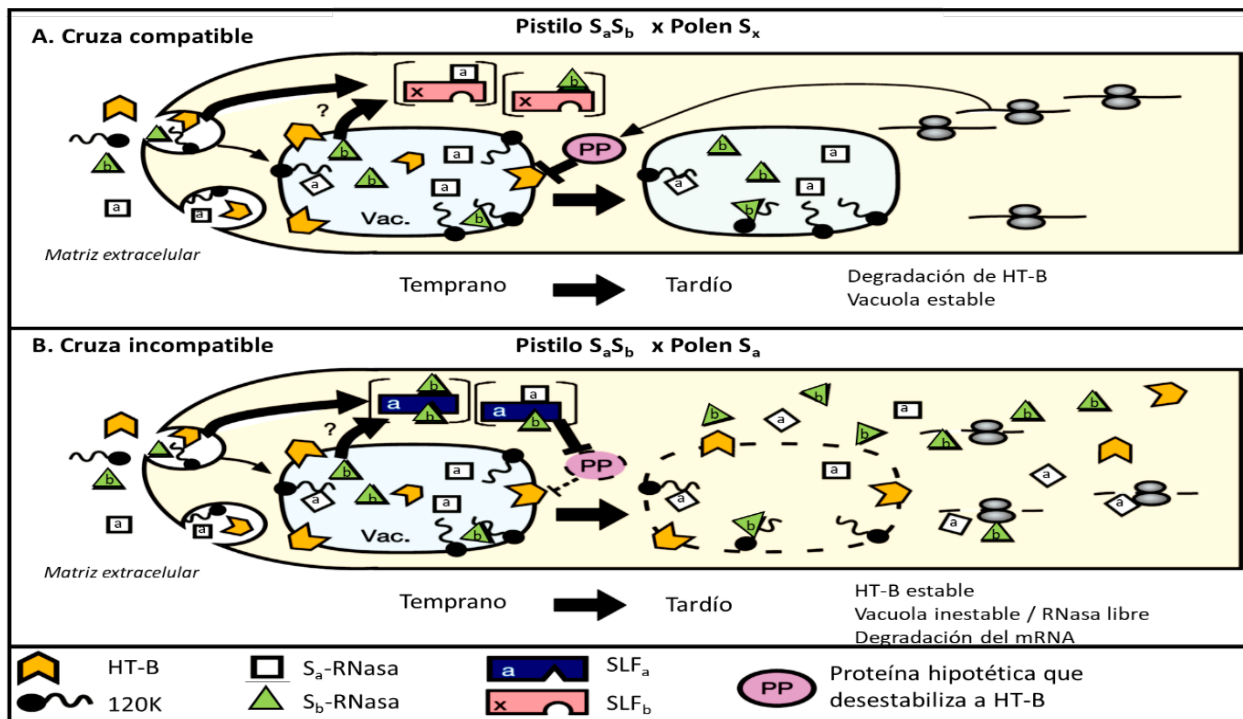


Figura 4. Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa. Las S-RNasas junto con otras proteínas estilares ingresan al tubo polínico probablemente por endocitosis y se van almacenando progresivamente dentro de vacuolas. Algunas S-RNasas alcanzan el citoplasma en donde pueden interactuar con SLF. **A.** En una cruce AC las S-RNasas permanecen dentro de la vacuola y no pueden ejercer su actividad citotóxica. La estabilidad de la vacuola está relacionada con la degradación de HT-B, probablemente dirigida por una proteína del polen. **B.** En una cruce AI hay ruptura de la vacuola y liberación de las S-RNasas al citosol del tubo polínico en donde ejercen su actividad citotóxica. La ruptura de la vacuola probablemente es mediada por la estabilidad de proteína HT-B (Tomado de Goldraj *et al.*, 2006).

Los GMs *NaStEP*, *MdABCF* y *NaSIPP*, fueron identificados después de que se propuso este modelo; sin embargo, se cuenta con alguna información acerca de sus funciones y se pueden incluir en el modelo.

NaStEP, quien se expresa en el estigma, ingresa a los tubos polínicos antes que la S-RNasa y los otros GMs presentes en el estilo. Experimentos de pérdida de función con RNAi dieron evidencia que *NaStEP* es esencial para la respuesta de rechazo del polen, y de manera notable se encontró que cuando *NaStEP* está suprimido, la proteína HT-B se degrada en los tubos polínicos tanto en cruza compatibles como incompatibles, un caso contrario a lo que ocurre en plantas silvestres de *N. alata*, en donde la degradación de HT-B ocurre únicamente los tubos polínicos de cruza compatibles (Jiménez-Durán *et al.*, 2012). Con ello se propone que *NaStEP* es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en los tubos polínicos y que posiblemente inhiba a la proteasa encargada de degradar a HT-B en una crusa compatible (Jiménez-Durán *et al.*, 2012).

NaSIPP se encontró como una proteína del polen que interacciona con *NaStEP* en mitocondrias de tubos polínicos (García-Valencia *et al.*, 2017). Se propone que *NaSIPP*, al ser un transportador de fosfato, podría formar parte del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (PTP) el cual, cuando se abre, permite el flujo de calcio hacia la matriz mitocondrial y provoca un incremento en la concentración de fosfato inorgánico en el interior mitocondrial. Lo anterior podría desencadenar un colapso en el potencial de membrana además de que está involucrado con eventos de muerte celular como la liberación de citocromo C. Se propone que la interacción entre *NaStEP* y *NaSIPP* podría ser parte del mecanismo de apertura del PTP, lo cual contribuiría a la inhibición del crecimiento del tubo polínico (García-Valencia *et al.*, 2017).

Por último, *MdABCF*, es un transportador tipo ABC el cual asiste el ingreso de la S-RNasa al tubo polínico en Rosaceae (Meng *et al.*, 2014). Este podría permitir la entrada de la S-RNasa directamente al citosol, ya que, en algún punto del rechazo del polen, ésta debe encontrarse ahí para interactuar con SLF.

La figura 5 incluye todos los hallazgos acerca del mecanismo bioquímico que conduce a la inhibición del tubo polínico en *Nicotiana*.

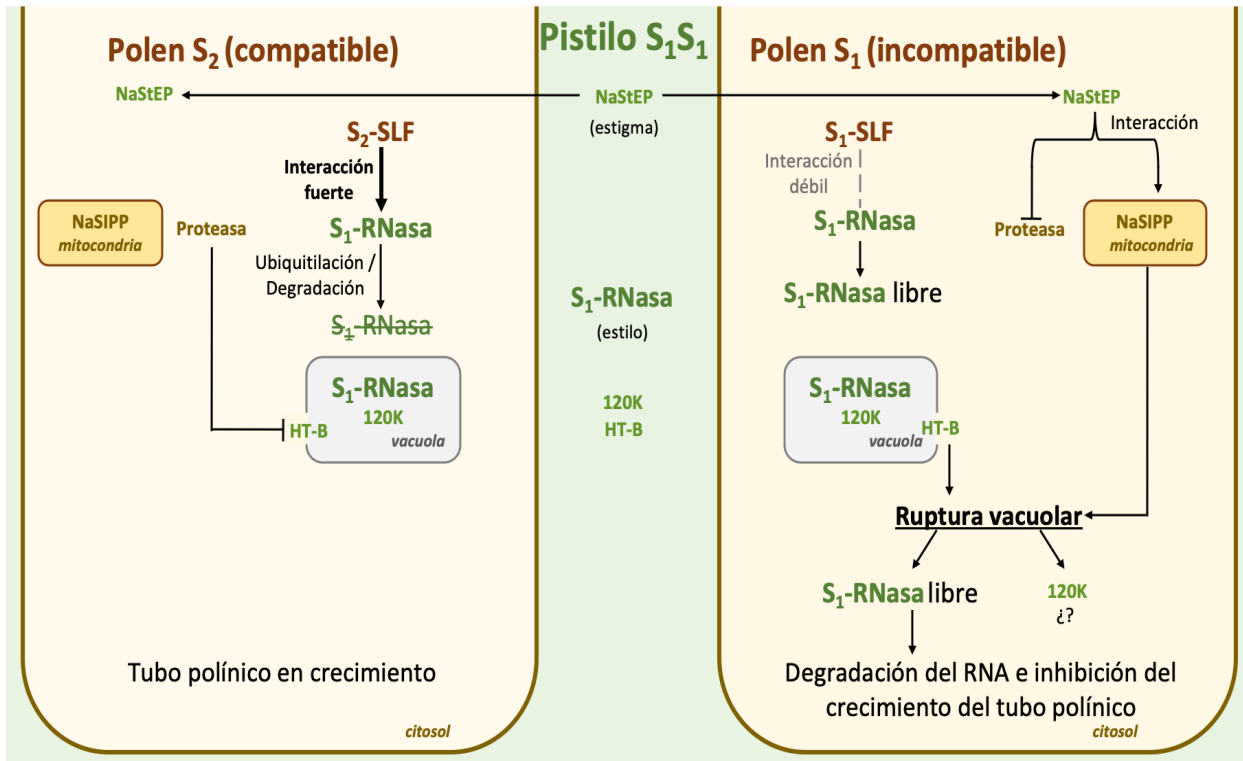


Figura 5. Eventos que permiten el rechazo del polen en *Nicotiana*. Las proteínas estilares que participan en el mecanismo de rechazo del polen ingresan a los tubos polínicos en crecimiento. NaStEP es la primera en ingresar ya que esta se localiza en el estigma. Posteriormente ingresan la S-RNasa, 120K y HT-B. La S-RNasa tiene dos destinos dentro del tubo polínico, uno es el citosol, donde interactuará con SLF, y otro es la vacuola, donde permanecerá junto con 120K y HT-B en la membrana. En la cruz compatible, la S-RNasa citosólica que interactuó con SLF será ubiquitinada y degradada, mientras que aquella que se encuentra en vacuola permanecerá secuestrada en dicho compartimento. Por el contrario, en la cruz incompatible, la S-RNasa estará libre en el citoplasma debido a que la interacción con SLF es débil. De alguna manera se desencadenan una serie de eventos que permitirán la inhibición del crecimiento del tubo polínico, entre estos se encuentra la doble función de NaStEP, la cual, por un lado está relacionada con la inhibición de la proteasa que degrada a HT-B y por el otro con su interacción con NaSIPP en mitocondria. Ambas funciones de NaStEP podrían señalar la ruptura de la vacuola que contiene a la S-RNasa, las cuales al ser liberadas degradarán al RNA del tubo polínico.

2.4 Formación de complejos entre la S-RNasa y otras proteínas estilares.

La matriz extracelular (ME) del tejido de transmisión estilar (TTE) es rica en lípidos, azúcares y proteínas que interactúan con el tubo polínico. Algunos de estos componentes lo nutren y lo guían permitiendo su crecimiento hasta llegar al ovario; mientras que otros, están involucrados en el reconocimiento y rechazo de tubos polínicos incompatibles, como es el caso de la S-RNasa, NaStEP y HT-B.

Otras glicoproteínas, además de la S-RNasa, también se encuentran de manera abundante en la ME del tejido de transmisión, como 120K, TTS y PELPIII (Lind *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1995; de Graff *et al.*, 2003). La proteína 120K es esencial en la respuesta de AI (Hancock *et al.*, 2005) y

también ingresa a los tubos polínicos donde colocaliza en sus vacuolas junto con la S-RNasa (Lind *et al.*, 1996). Cuando 120K es suprimida en plantas transgénicas, estas pierden la capacidad de rechazar el polen dependiente del alelo *S*.

La proteína TTS (Transmitting Tract Specific) tiene una masa molecular de 38 kDa; sin embargo, se modifica con diferentes cantidades de arabinogalactano generando glicofomas que van desde los 50 kDa hasta los 100 kDa. Estas glicofomas se distribuyen en un gradiente a lo largo del pistilo, desde el término del estigma hasta la base que se localiza cerca del ovario. TTS ingresa a los tubos polínicos donde se desglicosila y se asocia a la pared celular, lo cual es importante para guiar su crecimiento (Wu *et al.*, 1995). PELPIII (Pistil Extensin-like Protein III) se localiza en la pared celular de calosa de los tubos polínicos (de Graff *et al.*, 2003), aunque se desconoce cuál sea su función, su papel es esencial en el rechazo del polen en cruza interespecíficas en *Nicotiana* (Eberle *et al.*, 2013).

120K, TTS y PELPIII pertenecen a una familia de proteínas denominada AGPs (Arabinogalactan Protein) por el tipo de azúcar con el cual están modificadas, además poseen extremos C-terminales conservados ricos en Cys (Noyszewski *et al.*, 2017). Cruz-García *et al.* (2005) demostraron que, en *N. alata*, estas proteínas forman un complejo junto con la S-RNasa, el cual podría estabilizarse mediante puentes disulfuro generados entre los extremos C-terminal de las AGPs. A la fecha, se desconoce la función de este complejo, aunque se piensa podría permitir la entrada de todas las proteínas juntas al tubo polínico, ya que todas ellas desempeñan una función dentro de éste.

2.5 Búsqueda de nuevos GMs de AI en *Nicotiana*.

Dado que aún existen muchas interrogantes acerca del mecanismo de AI dependiente de S-RNasas, en nuestro laboratorio se han buscado nuevos GMs que permitan completar nuestro conocimiento acerca de cómo ocurre el rechazo del polen. Uno de estos candidatos es un gen que codifica para una tiorredoxina tipo *h* subgrupo 2, el cual se identificó porque los niveles de su mensajero son mayores en *N. alata* BT, quien tiene un entorno genético AI, respecto a sus niveles en la planta AC *N. plumbaginifolia* (McClure *et al.*, 2011).

A la fecha, se han encontrado más evidencias de su participación en el rechazo del polen en *Nicotiana*; por ejemplo, se ha observado su colocalización junto con la S-RNasa en la ME del estilo y su interacción *in vitro* con la S-RNasa y con las proteínas del complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014; Hernández-Navarro y Cruz-García sin publicar). Además, se encontró que NaTrxh reduce a la S-RNasa *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere su participación en el rechazo del polen.

2.6 Características de las tiorredoxinas.

Las tiorredoxinas (Trx) son pequeñas proteínas globulares de aproximadamente 12 kDa presentes en todos los organismos que pertenecen a una familia de oxidorreductasas tiol:disulfuro. Estas son proteínas reguladoras ya que catalizan la reducción de puentes disulfuro expuestos en otras proteínas utilizando NADPH como donador de protones (Gelhaye *et al.*, 2004b).

Las Trxs conservan en su sitio reactivo la secuencia WCGPC, en donde las dos Cys son las encargadas de la reducción del puente disulfuro de la proteína blanco (Laloi *et al.*, 2001). La Cys localizada hacia el extremo amino del sitio reactivo es la que realiza el primer ataque nucleofílico, lo que depende de su valor de pKa que es significativamente más bajo que el de la segunda Cys del sitio reactivo (Dillet *et al.*, 1998). Con este primer paso se genera un intermediario mixto Trx-proteína blanco que se mantiene unido mediante un puente disulfuro. En este momento el grupo tiol de la segunda Cys tiene que ser activado para romper este puente y permitir la disociación del complejo Trx-blanco. El ataque ocurre hacia la primer Cys del sitio reactivo de la Trx, permitiendo que cuando termine la reacción la proteína blanco quede reducida y la Trx se libere en su forma oxidada (Figura 6. A) (Dillet *et al.*, 1998, Meyer *et al.*, 1999).

La energía necesaria para la reducción proviene de una molécula de NADPH y los electrones son transferidos a través de una cascada que incluye tres proteínas. La primera es una flavoproteína homodimérica denominada Tiorredoxina Reductasa dependiente de NADPH (NTR), ésta colecta los electrones del NADPH y los utiliza para reducir un puente disulfuro localizado dentro de su sitio activo a través de su grupo prostético FAD. Posteriormente, los electrones son transferidos a una Trx oxidada en su sitio reactivo. La Trx reducida ahora transfiere esos electrones a la proteína blanco (Figura 6. B). Al final de todo el proceso, la tiorredoxina queda oxidada y lista para ser reducida nuevamente por NTR, mientras que la proteína blanco queda en su forma reducida. Todo este mecanismo se denomina sistema NADPH/NTR/Trx (Meyer *et al.*, 1999).

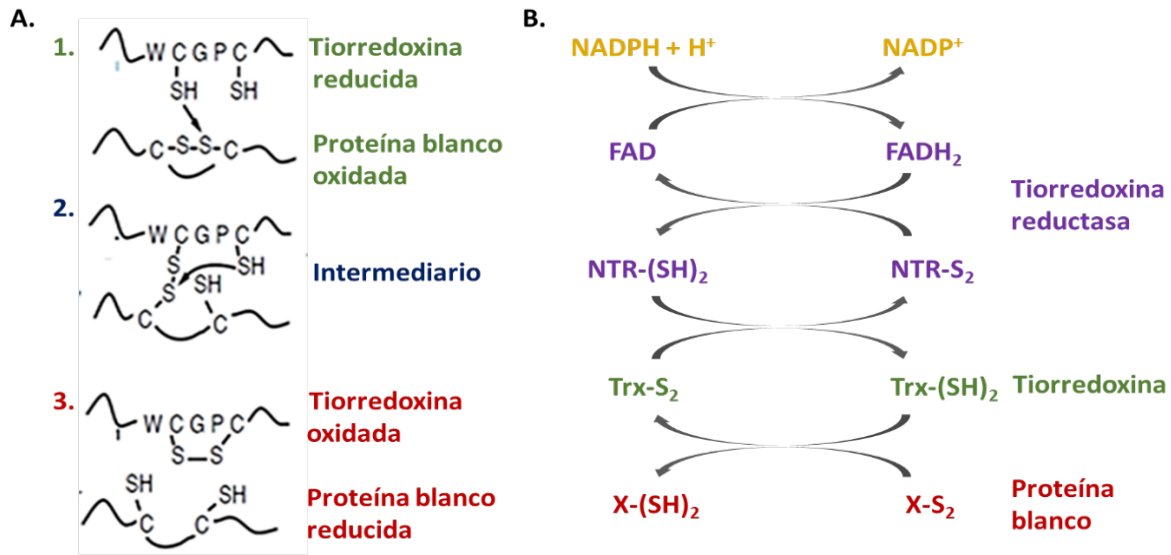


Figura 6. Reducción de proteínas por Trx. **A.** Mecanismo de acción. 1) El proceso inicia con el ataque nucleofílico de la primera cisteína del sitio activo a un átomo de azufre de la proteína blanco, 2) con ello se genera un intermediario inestable por medio de un puente disulfuro entre ambas proteínas. 3) La segunda cisteína del sitio activo rompe el puente disulfuro recién formado con lo cual se libera la proteína blanco reducida. **B.** Sistema NADPH/NTR/Trx donde los electrones son transferidos del NADPH al grupo prostético FAD de la NTR, la cual posteriormente reduce a una Trx quien finalmente transfiere los electrones a su proteína blanco (Tomado de Meyer *et al.*, 1999).

2.7 Tiorredoxinas vegetales.

Las Trxs están presentes en todos los seres vivos. Organismos como bacterias y animales poseen de una a dos Trxs codificadas en su genoma. Sin embargo, las Trxs de plantas son un grupo muy extenso. Por ejemplo, *Arabidopsis thaliana* tiene más de 20 genes que codifican para Trx y alrededor de 30 genes que codifican para Trx con sitio reactivo atípico o proteínas con dominios TRX-like (Meyer *et al.*, 2008).

Las Trxs vegetales se clasifican con base en su estructura primaria y su localización subcelular, en 8 tipos (Meyer *et al.*, 2002). En cloroplastos se localizan las Trxs de tipo *f*, *m*, *x*, *y* y *z*, las cuales participan en la regulación de proteínas del metabolismo de carbohidratos. En mitocondria, las Trxs de tipo *o* regulan procesos como fotorrespiración, ciclo de Krebs, metabolismo de lípidos, muerte celular programada, entre otros. Por otra parte, también existe un tipo de tiorredoxina asociada a retículo endoplasmático, la tiorredoxina *s* (Collin *et al.*, 2003; Gelhaye *et al.*, 2004a; Arsova *et al.*, 2006 y Alkhalfioui *et al.*, 2008).

Existen otro tipo de Trxs que son las del tipo *h*. Inicialmente se suponía que eran citoplasmáticas dado que no poseen una señal canónica de tránsito. Sin embargo, ahora se han inmunolocalizado en distintos compartimentos celulares. Por ejemplo, PtTrxh2 de *Populus trichocarpa* se localiza

en la mitocondria (Gelhaye *et al.*, 2004a), las Trxs Trxh1 y Trxh2 contienen una extensión N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos que la unen a la membrana plasmática (Shi y Bhattacharyya, 1996), y las Trxs THL1 y THL2 de *Brassica*, que están involucradas en el mecanismo de AI esporofítica, son citosólicas (Cabrillac *et al.*, 2001).

Las Trxs tipo *h* se clasifican a su vez en tres subgrupos (Gelhaye *et al.*, 2004b):

Subgrupo 1. Su reducción está mediada por NTR y la mayoría de los miembros son citosólicos. Trxs de este subgrupo se encuentran abundantemente en el floema de *A. thaliana* sugiriendo su participación en la regulación de los componentes del tejido vascular (Reichheld *et al.*, 2002).

Subgrupo 2. Se caracterizan porque poseen extremos N-terminal más largos y por la conservación de la secuencia WCGPC en su sitio reactivo en todos los miembros. No tienen una localización exclusiva a algún sitio celular, por ejemplo, PtTRXh2 de *P. tremula* está asociada a la mitocondria, mientras que NaTrxh de *N. alata* es una proteína de secreción (Reichheld *et al.*, 2002; Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Subgrupo 3. Los miembros de este subgrupo también poseen extremos N-terminal más largos, pero además contienen un residuo de Cys conservado en la cuarta posición. La secuencia WCGPC del sitio reactivo no está presente en todos los miembros. Algunos, como la PtTRXh4 de *P. tremula*, además son reducidos por un sistema distinto al que involucra a NTR, el cual es a través de la enzima glutatión reductasa, también dependiente de NADPH (Gelhaye *et al.*, 2004a).

3. Antecedentes.

3.1 Expresión de *NaTrxh* en *Nicotiana*.

En la búsqueda de nuevos GMs en *Nicotiana* utilizando la técnica de cDNA-AFLP se encontró el fragmento cDNA-AFLP25, el cual mostró mayor presencia en estilos de plantas con entorno genético de AI como el de *N. alata* BT en comparación con *N. plumbaginifolia* que es una planta AC (McClure *et al.*, 2011). El análisis de su secuencia completa reveló que el transcrito codifica para una Trx y mediante análisis filogenético se agrupó dentro del tipo *h*, subgrupo 2, observando la conservación de la secuencia del sitio reactivo WCGPC. La proteína fue denominada NaTrxh por ser de *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

La cuantificación de los niveles de expresión de *NaTrxh* mediante qRT-PCR, indica que el gen se expresa tanto en especies de *Nicotiana* AC como AI, con diferencias significativas en la cantidad del transcrito (Figura 7. A) (Torres-Rodríguez, 2016).

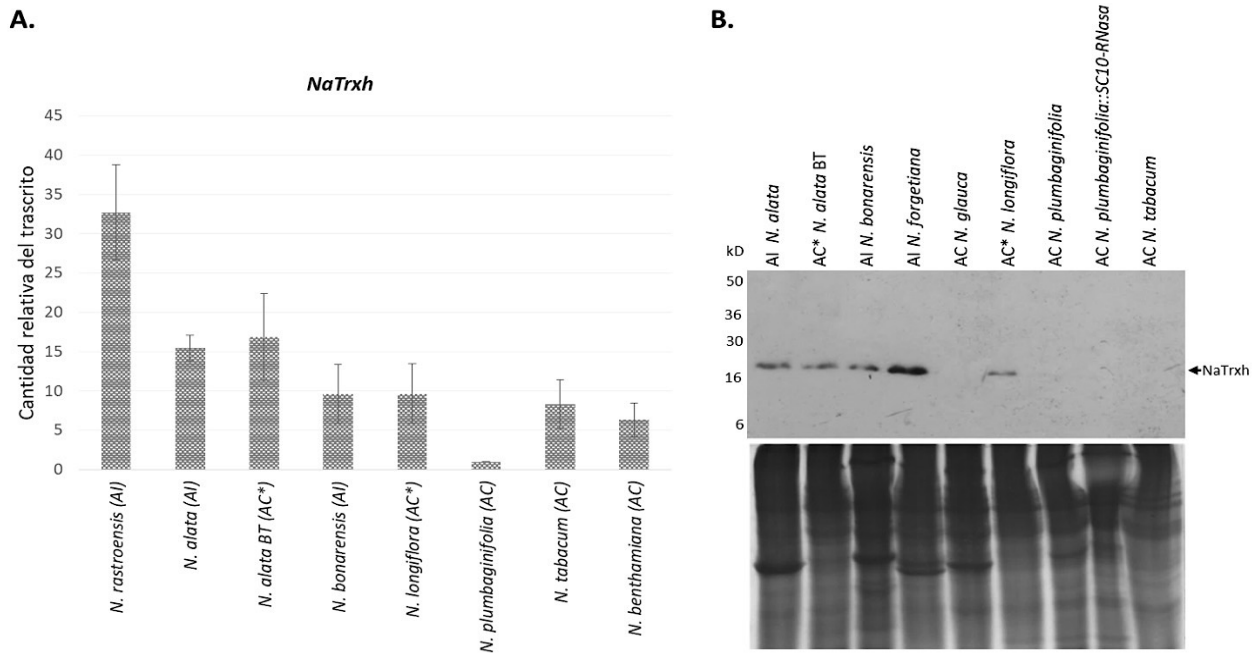


Figura 7. Expresión de NaTrxh en especies AC y AI de *Nicotiana*. A. Cuantificación relativa del transcrito de *NaTrxh* en pistilos maduros de distintas especies de *Nicotiana*. Los niveles del transcrito fueron normalizados con el rRNA 18S y comparados con los niveles de *N. plumbaginifolia* (Torres-Rodríguez, 2016) B. Inmunodetección de NaTrxh en extractos de proteína total de los estilos de plantas autocompatibles (AC), autocompatibles que carecen de S-RNasa (AC*) y autoincompatibles (AI) (Juárez-Díaz, 2006).

Por otro lado, mediante ensayos de inmunodetección, se demostró que la proteína está ausente en especies de *Nicotiana* que aceptan su propio polen (AC), pero está presente en especies con entorno genético de AI, las cuales incluyen tanto a las especies que pueden rechazar su propio polen (AI) como a las que poseen todos los elementos necesarios para la AI pero que pueden o no expresar a la S-RNasa (AC*) (Figura 7. B) (Juárez-Díaz, 2006). La ausencia de la proteína en pistilo de especies AC se puede deber a distintas razones, una de ellas es que exista una regulación a nivel del transcrito de *NaTrxh* en estas plantas. También es posible que la proteína no sea transportada a ese tejido. Juárez-Díaz *et al.* (2006) observaron que NaTrxh es producida por el ovario en *N. alata* y en este sitio podría ser secretada para ser transportada hacia el pistilo. Por último, existe la posibilidad de que se produzca la proteína pero que sea degradada rápidamente y que por ello no se detecte.

3.2 Interacción de NaTrxh con la S-RNasa.

NaTrxh es secretada a la matriz extracelular de las células del tejido de transmisión estilar en donde colocaliza con la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). De acuerdo con su clasificación, NaTrxh pertenece al subgrupo 2 de las Trxs tipo *h*, que se caracterizan porque su extremo N-terminal es más largo respecto a las demás Trxs; además, el extremo C-terminal de NaTrxh también es más extenso (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Previamente, se definieron tres dominios presentes en estas extensiones, los cuales fueron denominados N α , N β y C-terminal (Figura 8. A; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Mediante ensayos de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla con versiones mutantes de la proteína NaTrxh y fusionadas a GFP, se demostró que el dominio interno N β (que comprende desde la Ala₁₇ hasta la Pro₂₇), de naturaleza hidrofílica, dirige la secreción de NaTrxh al espacio extracelular a través de una vía que involucra el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y vesículas de secreción (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Además de NaTrxh, Gelhaye *et al.* (2000) demostraron que la extensión N-terminal de PtTrxh2 de *P. trichocarpa*, también está relacionada con su tránsito, aunque en este caso es hacia la mitocondria.

La secreción de NaTrxh al espacio extracelular del tejido de transmisión estilar también se observó por medio de análisis inmunohistoquímico utilizando microscopía confocal. Los ensayos fueron realizados en cortes de pistilo y utilizando un anticuerpo primario anti-NaTrxh y como secundario anti-conejo conjugado a un fluorocromo para detectar la fluorescencia de la proteína (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Además de colocalizar en la ME, la S-RNasa y NaTrxh también interaccionan (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Esta interacción fue estudiada a través de la cromatografía de afinidad utilizando columnas cuyos ligandos fueron distintas versiones de NaTrxh donde se eliminaron los dominios previamente definidos (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Los resultados corroboraron que NaTrxh interacciona con mayor afinidad con la S-RNasa; sin embargo, cuando el dominio C-terminal es

removido, la proteína se une con menor afinidad. Ávila-Castañeda *et al.* (2014) concluyen que el dominio C-terminal de NaTrxh es el responsable de la interacción entre estas dos proteínas, no obstante, analizando con mayor detalle sus resultados, es posible decir que los dominios N α y N β , también contribuyen con la interacción, ya que al ser removidos se reduce la afinidad de NaTrxh por la S-RNasa, aunque no de la misma manera como cuando se remueve dominio C-terminal (Figura 8. B).

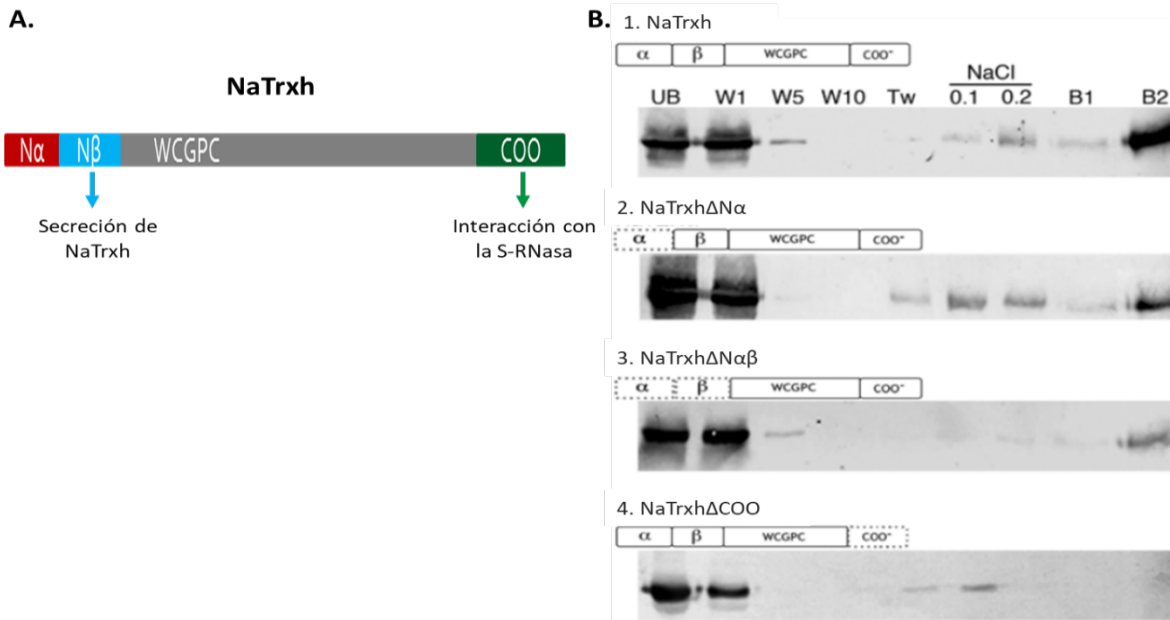


Figura 8. Interacción de NaTrxh con la S-RNasa. **A.** Esquema de NaTrxh mostrando los dominios N α , N β (Indispensable para su secreción al espacio extracelular) y C-terminal. **B.** Interacción de NaTrxh con la S₁₀₅-RNasa. Extractos de proteína total de estilos de *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅ se pasaron a través de las columnas de afinidad Affi-Gel-NaTrxh (1), Affi-Gel-NaTrxh Δ N α (2), Affi-Gel-NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (3), y Affi-Gel-NaTrxh Δ COO (4). La S-RNasa se une a la proteína NaTrxh completa, pero cuando la tiorredoxina carece de los dominios N α y N β la afinidad por la S-RNasa disminuye. La interacción se ve severamente afectada cuando se elimina el dominio C-terminal de NaTrxh, indicando que este dominio es quien contribuye mayoritariamente a la interacción entre ambas proteínas. UB (fracción no unida) W1, W5 y W10 (lavados 1, 5 y 10) Tw, NaCl (lavados con 1% de Tween 20 o 0.1 y 0.2 M de NaCl, respectivamente), B (elución con 50 mM glicina pH 2.6). Todas las fracciones se analizaron por inmunodetección con el anticuerpo Anti-S₁₀₅-RNasa (Tomado de Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

3.3 Reducción *in vitro* de la S-RNasa por NaTrxh.

Previamente, se realizó una búsqueda de los sustratos de NaTrxh en pistilos de *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Para ello se utilizó la metodología de Yano *et al.* (2001) en la cual, el extracto total de proteínas es reducido con la Trx y posteriormente es marcado con Monobromobimano (mBBR), el cual es un compuesto que se une a los sulfhidrilos y fluoresce al ser expuesto a luz UV. Las proteínas que son reducidas por la Trx se visualizan en una electroforesis de doble dimensión, donde la primera dimensión es no reductora y la segunda reductora. Aquellas proteínas con sulfhidrilos libres antes de la primera reducción, fluorescen por la presencia del mBBR y además

se localizan en una diagonal después de la segunda dimensión (Figura 9. A). Como resultado de estos experimentos se demostró que la S-RNasa es reducida por NaTrxh *in vitro* (Figura 9. B) (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

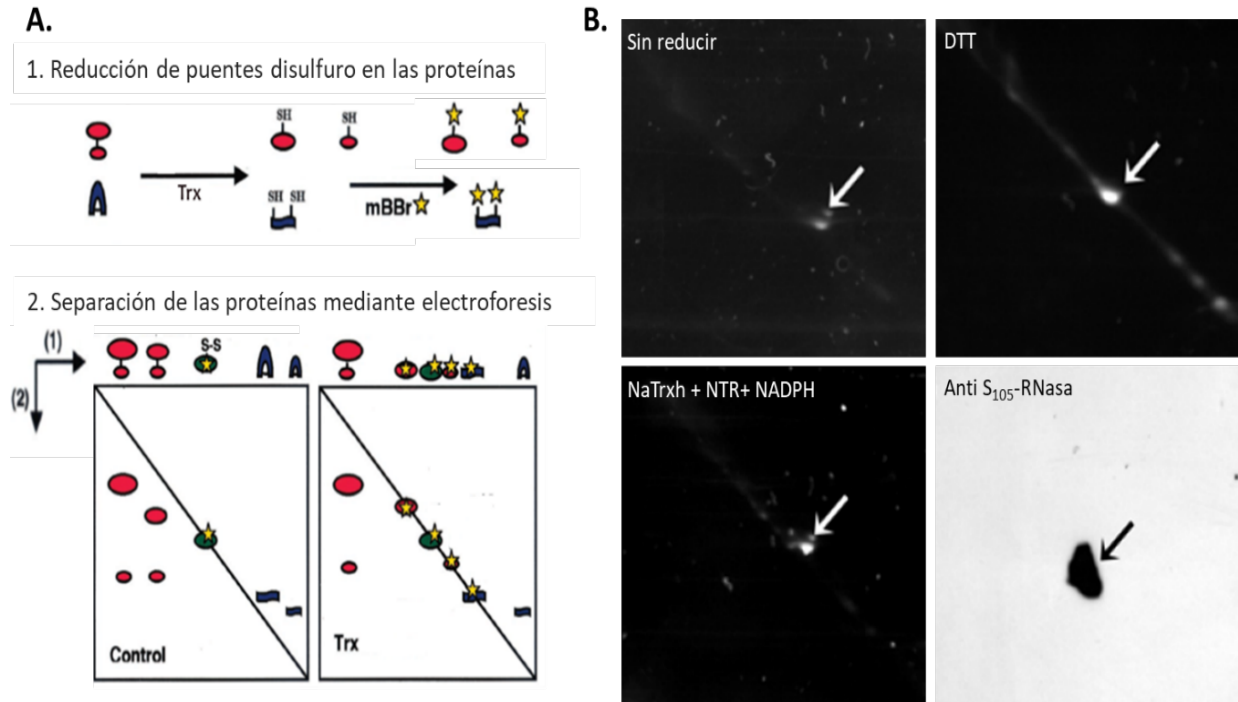


Figura 9. Reducción *in vitro* de la S-RNasa por NaTrxh. A. Estrategia para identificar blancos de Trxs a través de la fluorescencia de sulfhidrilos marcados con mBBr y electroforesis en doble dimensión (Yano *et al.*, 2001). B. Extractos de proteína total de matriz extracelular de tejido de transmisión estilar de *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅ sin reducir, reducidos con DTT o con NaTrxh + NADPH + NTR, se trataron con mBBr para marcar los sulfhidrilos expuestos en las proteínas. Después de la segunda dimensión es posible ver a la S-RNasa reducida tanto por DTT como por NaTrxh. Además, se muestra la inmunodetección de la S₁₀₅-RNasa que fue reducida con NaTrxh (Tomado de Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

La reducción de puentes disulfuro en las proteínas provoca cambios estructurales que pueden tener distintas consecuencias. Por ello es de gran importancia conocer cuáles son los efectos de la reducción de la S-RNasa por NaTrxh.

A la fecha solo se ha reportado una estructura cristalográfica de una S-RNasa, la cual es el haplotipo S_{F11} de *N. alata* (Ida *et al.*, 2001). Todas las S-RNasas poseen dos regiones hipervariables, que se propone están involucradas en el reconocimiento de SLF (Matton *et al.*, 1997). Independientemente de estas dos regiones, la estructura de las S-RNasas está altamente conservada y se sabe que es estabilizada por cuatro puentes disulfuro (Oxley y Bacic, 1996). Además de las Cys involucradas en la formación de los puentes disulfuro, todas las S-RNasas contienen una o dos Cys libres que se encuentran reducidas (Ida *et al.*, 2001; Oxley y Bacic, 1996).

La posición tan conservada de los puentes disulfuro en las S-RNAsas revela su gran importancia estructural. Asimismo, la ruptura específica de un determinado puente disulfuro podría provocar cambios estructurales muy precisos que tengan consecuencias importantes en la función de la proteína.

3.4 Interacción de NaTrxh con las proteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII.

Como se mencionó anteriormente, la S-RNasa forma complejos con las glicoproteínas estilares 120K, NaTTS y NaPELPIII (Cruz-García *et al.*, 2005), de las cuales 120K es esencial para la AI (Hancock *et al.*, 2005), mientras que NaTTS y NaPELPIII, si bien no están involucradas en el rechazo del polen, son cruciales para el crecimiento del tubo polínico (Wu *et al.*, 1995; de Graff *et al.*, 2003). Aunque no se conoce la arquitectura del complejo formado entre la S-RNasa y las glicoproteínas, se cree que, dado que es muy estable podría estar estabilizado mediante puentes disulfuro intermoleculares (Cruz-García *et al.*, 2005).

Previamente en nuestro laboratorio, se estableció un protocolo para la purificación de la proteína 120K. Después de pasar un extracto total de proteínas de pistilo a través de una columna de intercambio iónico, se obtiene una fracción enriquecida en las glicoproteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII. Cuando esta fracción es separada a través de cromatografía de afinidad en una columna que contiene a NaTrxh como ligando, las tres glicoproteínas son retenidas, siendo 120K la que se une con mayor afinidad a NaTrxh (Figura 10) (Hernández-Navarro y Cruz García, datos sin publicar).

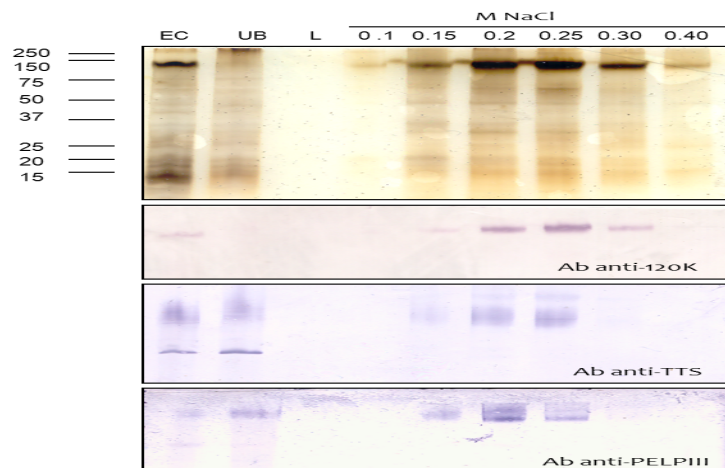


Figura 10. Interacción de NaTrxh con las proteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII. Las proteínas estilares 120K, NaTTS y NaPELPIII fueron retenidas en una matriz de afinidad que contenía a NaTrxh como ligando. 120K fue quien presentó mayor afinidad por NaTrxh. Panel superior: Tinción con plata. Paneles inferiores: Inmunodetección con los sueros anti-120K, TTS y PELPIII. EC=Extracto crudo, UB= Fracción no unida, L = Lavados, M NaCl= Eluciones con gradiente de NaCl. Nótese que las tres proteínas presentan afinidad por la matriz de NaTrxh, siendo 120K la que se une con mayor afinidad.

El hecho de que exista una interacción fuerte entre NaTrxh y las proteínas del complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPEPLIII, indica que esta tiorredoxina podría formar parte de dicho complejo. Además, dada su actividad reductora es posible que, además de la S-RNasa, alguna otra proteína del complejo sea blanco de su reducción y que esto provoque modificaciones sobre la estructura del complejo.

Aunque aún se desconoce cuál es la función de este complejo de proteínas estilares, se propone que permite el ingreso de todas las proteínas juntas al tubo polínico (Cruz-García *et al.*, 2005). De ser así, una vez que han alcanzado el citoplasma del tubo polínico, cada proteína debe desempeñar una función particular, para ello sería importante que se disociaran. En este punto, la reducción del complejo podría ser crucial para permitir dicha disociación.

Las evidencias anteriores colocan a NaTrxh como un fuerte candidato a ser un GM involucrado en la respuesta del rechazo del polen dependiente del locus *S* en *Nicotiana*, participando probablemente a través de su actividad reductora, ya sea sobre la S-RNasa o bien, sobre alguna otra proteína esencial en la AI como 120K.

4. Hipótesis.

Dado que NaTrxh se expresa mayoritariamente en pistilos de especies AI y además interacciona con 120K y con la S-RNasa a la cual reduce, se sugiere que esta tiorredoxina está involucrada en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

5. Objetivos.

5.1 Objetivo general.

Evaluar la participación de NaTrxh en el rechazo del polen en *Nicotiana*, así como su posible mecanismo bioquímico.

5.2 Objetivos particulares.

- I. Determinar mediante experimentos de ganancia de función en plantas transgénicas si NaTrxh es esencial en el rechazo del polen en *Nicotiana*.
- II. Evaluar el efecto de la reducción de la S-RNasa por NaTrxh sobre su actividad de ribonucleasa.
- III. Determinar si los extremos N y C-terminal de NaTrxh están involucrados con la reducción de la S-RNasa.
- IV. Determinar cuáles puentes disulfuro son reducidos en la S_{C10}-RNasa por NaTrxh.
- V. Evaluar la interacción entre NaTrxh y la S-RNasa mediante dinámica molecular.
- VI. Evaluar si NaTrxh forma parte o reduce los complejos S-RNasa-NaTTS-120K-NaPELPIII.

6. Materiales y métodos

6.1 Material biológico

Las plantas utilizadas en el presente estudio fueron *Nicotiana alata* AI (genotipos S_{A2}S_{A2}, S_{C10}S_{C10} and S₁₀₅S₁₀₅), *N. glauca* AC, *N. tabacum* 'Praecox' (Beecher y McClure, 2001; Murfett *et al.*, 1994), *N. plumbaginifolia* AC (inventario TW107, 43B), *N. longiflora* AC (Inventario TW79, 30A), *N. rastroensis* AI y *N. benthamiana* AC (Lee *et al.*, 2009). Todas las plantas se mantuvieron en invernadero.

6.2 Generación del gen mutante *NaTrxh_{SS}*.

Para generar la mutante en el sitio activo de NaTrxh se utilizó la metodología de mutagénesis sitio dirigida descrita por Ho *et al.* (1989). Mediante dos reacciones de PCR independientes se generan dos fragmentos de la secuencia del gen que se sobrelapan. Cada reacción utiliza un oligonucleótido que hibrida con uno de los extremos del gen y uno interno que hibrida con el sitio donde se realizará la mutación y que además contiene dentro de su secuencia las bases que serán reemplazadas, para que los productos incorporen la mutación. Con estas dos primeras reacciones de PCR se generan dos amplicones que se sobrelapan cerca del sitio de la mutación de manera que, en la siguiente reacción, éstos pueden ser alineados entre ellos. Durante el primer ciclo del tercer PCR, los extremos 3'OH de los dos fragmentos de DNA que se sobrelapan, son extendidos por la DNA polimerasa generando el producto mutado que será amplificado en los siguientes ciclos de la reacción de PCR (Figura 11).

Los oligonucleótidos utilizados para generar *NaTrxh_{SS}* fueron los siguientes FNaTrxh (*forward*) 5' CATGCCATGGATGGGATCGTATCTTTCAAG 3' y R1NaCS (*reverse*) 5' CTCCATCATTTTACTGGGCCCACTCCA 3', para amplificar *NaTrxh* en la región río arriba de los nucleótidos que codifican para el sitio reactivo, y F2NaCS (*forward*) 5' GCGGCTACATGGAGTGGGCCCACT 3' y RThypex (*reverse*) 5' GCGCGCGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA 3', para amplificar *NaTrxh* en la región río abajo de los nucleótidos que codifican para el sitio reactivo. Los nucleótidos reemplazados comprenden los codones TGT y TGC, los cuales codifican para las dos Cys del sitio reactivo de *NaTrxh*, y fueron reemplazados por AGT que codifica para Ser (subrayados en la secuencia de los oligonucleótidos). El DNA templado fue *NaTrxh* tipo silvestre clonado en el vector pEARLEY103.

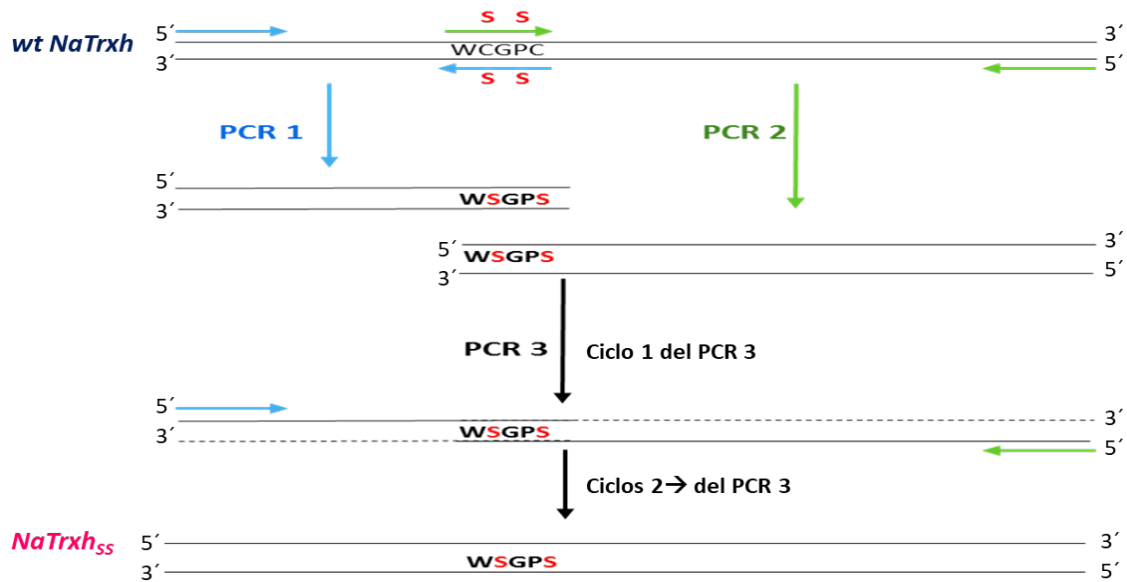


Figura 11. Mutagénesis sitio dirigida para la generación de *NaTrxh_{ss}* por medio de PCR. Los oligonucleótidos para el PCR 1 y 2 se muestran con flechas azules y verdes, respectivamente. Los oligonucleótidos *reverse* (azul) y *forward* (verde) de estas dos primeras reacciones contienen las mutaciones. Para el PCR 3 se utilizan los oligonucleótidos que amplifican el gen completo el cual ya contiene las mutaciones generadas.

La mezcla de reacción para PCR se realizó de la siguiente manera:

- 0.3 µl Oligonucleótido *forward* (10 µM)
- 0.3 µl Oligonucleótido *reverse* (10 µM)
- 5 µl Mix Dream Taq DNA polimerasa (Taq DNA polimerasa, 0.4 mM dNTPs, 4 mM MgCl₂)
- 50 ng DNA templado

Llevar a 10 µl con H₂O

Se utilizaron las condiciones para la amplificación por PCR indicadas en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones empleadas para la amplificación por PCR.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5 min	---
Desnaturalización	95	30 s	32
Alineamiento	59	30 s	
Elongación	72	60 min	
Elongación final	72	5 min	---

Los productos de las dos reacciones de PCR fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Posteriormente, se extrajeron del gel (Anexo 1) para ser utilizados como templado del PCR 3 que fusiona los dos fragmentos que contienen la mutación. Para esta amplificación se utilizaron los oligonucleótidos FDNaTrxh y RThypex. El producto resultado de esta última amplificación fue separado electroforéticamente y se extrajo del gel para clonarse en el vector pJET (Thermo Scientific) de la siguiente manera:

a) Mezclar los componentes de la reacción:

- 10 μ l 2X amortiguador de reacción
- 1 μ l producto de PCR purificado
- 1 μ l (50 ng/ μ l) pJET1.2/blut cloning vector
- Llevar a un volumen final de 20 μ l con H₂O

b) Mezclar y añadir 1 μ l de T4 DNA ligasa.

c) Mezclar con vórtex y centrifugar 5 s.

d) Incubar la mezcla de ligación a 22°C 5 min.

e) Transformar células químicamente competentes con 2 μ l de reacción de ligación (Anexo 2).

Las colonias transformadas se crecieron en 3 ml de medio LB líquido para extraer DNA plasmídico (Anexo 3). El plásmido extraído se mandó a secuenciar para verificar las mutaciones.

6.3 Generación de la construcción pK2GWF7:NaTrxh_{SS} para transformación de *N. plumbaginifolia*.

El gen mutado fue denominado *NaTrxh_{SS}*, y amplificado nuevamente utilizando los oligonucleótidos TRXcacc (*forward*) 5' CACCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCT 3' y RThypex (*reverse*) 5' GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA 3'. El fragmento generado contiene la secuencia 5'CACC 3' hacia el 5' del gen que es necesaria para su clonación en del vector pENTR (Figura 12. A) de acuerdo con el siguiente protocolo:

a) Mezclar:

- 4 μ l producto de PCR
- 1 μ l solución salina 1:4
- 4 μ l vector, pENTR

b) Incubar 5 min a TA.

c) Colocar en hielo y transformar células *E. coli* TOP10 químicamente competentes.

Posteriormente, el vector pENTR que contiene a *NaTrxh_{SS}* fue utilizado como vector de entrada para realizar una reacción de recombinación por medio del sistema *Gateway* con el vector binario pK2GW7 (Figura 12. B), el cual incluye el promotor y terminador *CAMV 35S*. La reacción de recombinación por el sistema *Gateway* se realizó de la siguiente manera:

a) Mezclar:

1 µl vector de entrada, pENTR:NaTrxh_{SS} (100 ng/µl)

1 µl vector destino, pK2GWF7 (200 ng/µl)

4 µl amortiguador TE pH 8.0

b) Mezclar la LR Clonasa por vórtex 2 s y añadir 1 µl a la mezcla anterior.

c) Incubar a 25°C durante 16 h.

d) Añadir 1 µl de proteinasa K (2 µg/µl)

e) Incubar 37°C durante 10 min.

f) Transformar células de *E. coli* TOP10 químicamente competentes.

Se verificaron las colonias transformantes por medio de análisis de restricción y secuenciación del inserto (*NaTrxh_{SS}*). El plásmido pK2GWF7::*NaTrxh_{SS}* fue purificado y se utilizó para transformar células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (Anexo 4).

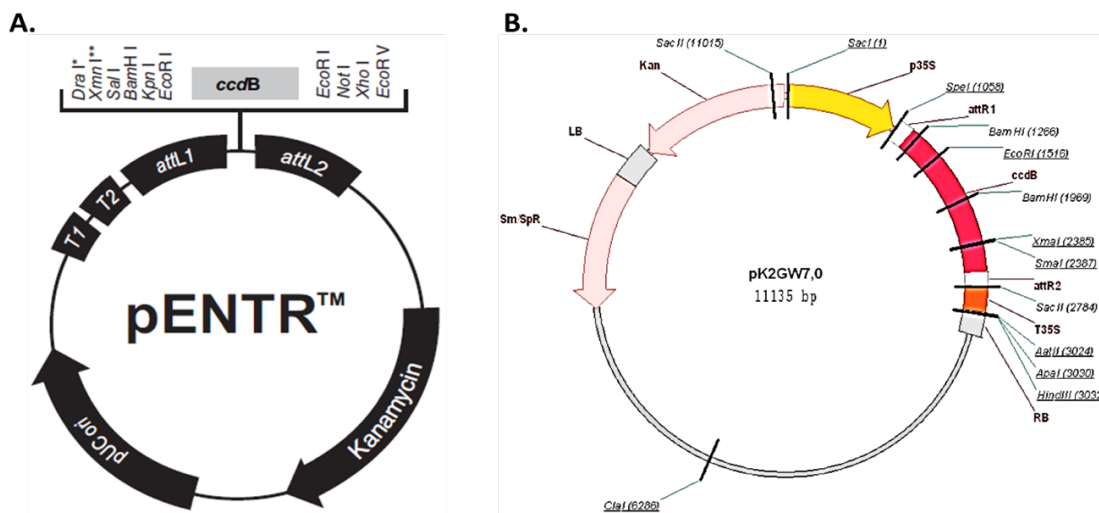


Figura 12. Vectores utilizados para la clonación de *NaTrxh_{SS}*. A. pENTR fue utilizado como vector de entrada, *NaTrxh_{SS}* se clonó entre los sitios attL1 y attL2. B. pK2GW7 es el vector binario para expresar *NaTrxh_{SS}* en *Nicotiana*. El gen entra por recombinación homóloga entre los sitios attR1 y attR2, reemplazando al gen *ccdB* (rojo) y su expresión está controlada por el promotor *CAMV 35S* (amarillo). Este plásmido tiene resistencia a Espectinomicina en bacterias y a Kanamicina en plantas (ambas mostradas en rosa).

6.4. Transformación de *N. plumbaginifolia* mediante infección con *A. tumefaciens* y generación de híbridos con *N. alata*.

La transformación de *N. plumbaginifolia* se llevó a cabo con *A. tumefaciens* que contiene al plásmido pK2GWF7::NaTrxhss, siguiendo la metodología aquí descrita:

- a) Inocular un tubo que contenga 5 ml de LB con *A. tumefaciens* que contenga la construcción pK2GWF7::NaTrxhss. Dejar creciendo a 28°C en agitación constante hasta obtener crecimiento denso (aproximadamente 2 a 3 días).
- b) Inocular con el pre-cultivo un matraz con 40 ml de medio LB e incubar hasta una D.O. de 0.5-0.6.
- c) Centrifugar en un tubo falcon estéril los 40 ml del cultivo durante 10 min a 5000 rpm a 4°C.
- d) Resuspender en 40 ml de medio líquido de infección NAP6-4 + 4 mg/L de 3',5-Dimethoxy-4'-hidroxiacetofena (acetosiringona) (Anexo 6) para generar la solución de infección y verter en 1 o 2 cajas de Petri grandes.
- e) Desinfectar hojas jóvenes en solución de Cloralex al 10 % con unas gotas de Tween 20 por 15 min en agitación constante.
- f) Lavar 3 veces con agua estéril por 5 min.
- g) Eliminar la nervadura de las hojas y cortar cuadros de 1 cm.
- h) Colocar los explantes en la solución de infección por un periodo de 15 min.
- i) Eliminar el exceso de solución de infección de los explantes y pasarlos a frascos con medio sólido de infección NAP6 + acetosiringona e incubarlos por 3 días en luz a 25°C. Los explantes deben ser colocados con el envés en contacto con el medio.
- j) Pasar los explantes a solución de lavado NAP6-4 + antibióticos (100 mg/L de kanamicina como antibiótico de selección y 100 mg/L Cefotaxima, 100 mg/L Vancomicina para eliminar a. *tumefaciens*) agitar por 5 min. Repetir este paso dos veces más.
- k) Eliminar el exceso de líquido de los explantes lavados y pasarlos a medio sólido de selección NAP6-4 + antibióticos. Incubar a 25°C con luz constante.
- l) Subcultivar cada 2 semanas en este mismo medio de selección por 6 semanas.
- m) Una vez que se han generado las primeras hojas, pasar las pequeñas plántulas individualizadas a medio MS (Anexo 5) para permitir la formación de raíces.
- n) Una vez que las plantas han desarrollado raíz, pasar a tierra y mantener en invernadero.

La presencia del transgen fue verificada en las plantas transformadas mediante PCR a partir de gDNA (Anexo 6). Los oligonucleótidos utilizados fueron FWTRXSS (*forward*) 5' GGAGAGGACTCCGGTATTTTAC 3', el cual se alinea a una secuencia dentro del promotor 35S del vector pK2GWF7, y RThypex (*reverse*) 5' GCGCGCGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA 3' que se alinea a *NaTrxh*.

Se obtuvieron 3 líneas transgénicas de *N. plumbaginifolia*. Una vez que estas llegaron a la etapa de floración, se realizaron polinizaciones con polen de *N. alata* S_{A2}S_{A2} o S_{C10}S_{C10}, para generar los híbridos *N. plumbaginifolia*:*NaTrxh*_{SS} x *N. alata* S₀S_{A2} o S₀S_{C10}. También se generaron híbridos control *N. plumbaginifolia* tipo silvestre x *N. alata* S₀S_{C10}.

La presencia del transgen *NaTrxh*_{SS} fue verificada en los híbridos mediante PCR utilizando como template DNA genómico y con los oligonucleótidos FWTRXSS y RThypex (descritos previamente).

6.5 Evaluación del crecimiento de tubos polínicos mediante su tinción con azul de anilina.

Se realizaron polinizaciones en los híbridos transgénicos y en los híbridos no transformados (control) con polen de *N. alata* tipo silvestre S_{A2}S_{A2} o S_{C10}S_{C10}, *N. plumbaginifolia* o *N. tabacum*.

- a) Emascular flores 48 h antes de la antesis.
- b) 48 h después polinizar.
- c) Después de 72 h de la polinización, coleccionar los pistilos polinizados y fijarlos en una solución de etanol: ácido acético (3:1) durante 1 día.
- d) Transferir los pistilos a una solución de sulfito de sodio 10% y reblandecer el tejido 5 min en autoclave.
- e) Transferir los pistilos a una solución de azul de anilina 0.1% durante 1 día en oscuridad.
- f) Montar los pistilos en portaobjetos adicionando un poco de la solución de azul de anilina. Colocar un cubreobjetos encima y aplastar con los dedos.
- g) Sellar con barniz de uñas transparente.
- h) Observar en microscopio de fluorescencia Olympus Provis AX70 a 360 nm.

6.6 Extracción de RNA total de pistilo de los híbridos *N. plumbaginifolia* x *N. alata*.

Se extrajo el RNA total de pistilo de los híbridos *N. plumbaginifolia*:*NaTrxh*_{SS} x *N. alata* utilizando el método que a continuación se describe:

- a) Pesar 100 mg de tejido fresco y pulverizar en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido. Pasar la muestra a un tubo de 1.5 ml y añadir inmediatamente 1 ml de Tri Reagent (Sigma). Agitar vigorosamente.
- b) Incubar la muestra homogenizada por 5 min a TA.
- c) Añadir 0.2 ml de cloroformo y mezclar por inversión durante 15 s. Incubar de 2 a 3 min a TA.
- d) Centrifugar la muestra a 12,000 g durante 15 min a 4°C.
- e) Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo. Añadir de 5 a 10 µg de glicógeno libre de RNasa y 0.5 ml de isopropanol al 100%. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
- f) Centrifugar 10 min a 12,000 g a 4°C.
- g) Remover por completo el sobrenadante y añadir 1 ml de etanol al 75%. Agitar con vórtex.
- h) Centrifugar 5 min a 7,500 g. Retirar el sobrenadante y secar el pellet al aire por 10 min.
- i) Resuspender el pellet 50 µl de H₂O DEPC.

Para eliminar la posible contaminación con DNA, el RNA extraído se sometió a un tratamiento con DNasa I (New England Biolabs) de la siguiente manera:

- a) Llevar la muestra a un volumen de 100 µl con amortiguador de reacción (Tris HCl 10 mM pH 7.6, MgCl₂ 2.5 mM y CaCl₂ 0.5 mM).
- b) Añadir 2 unidades de DNasa I
- c) Incubar a 37°C durante 10 min
- d) Añadir 1 µl de EDTA 0.5 M e incubar a 75°C durante 10 min para desactivar la enzima.

Posterior al tratamiento con DNasaI, el RNA total fue extraído nuevamente de la siguiente manera:

- a) Añadir 100 µl de PCI 50:49:1 (Fenol:Cloroformo:Alcohol isoamílico) y agitar vigorosamente.
- b) Centrifugar la muestra a 12,000 g durante 15 min a 4°C.
- c) Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo. Añadir 0.5 ml de isopropanol al 100%. Incubar a temperatura ambiente por 10 min.
- d) Centrifugar 10 min a 12,000 g a 4°C.
- e) Remover por completo el sobrenadante y añadir 0.5 ml de etanol al 75%. Agitar con vórtex.
- f) Centrifugar 5 min a 7,500 g. Retirar el sobrenadante y secar el pellet al aire por 10 min.

g) Resuspender el pellet en 50 μ l de H₂O DEPC.

Se cuantificó el RNA en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se ajustó la cantidad a 100 ng y se observó en un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturalizantes [MAE 1X pH 7.0 (MOPS 0.02%, acetato de sodio 5 mM pH 7.0, EDTA 1 mM), formaldehído 1.1%, bromuro de etidio 0.0015 mg/ml]. Se cargó en el gel 1 μ l de RNA mezclado con 4 μ l de amortiguador de carga [80% formamida, EDTA 1 mM pH 8.0, 0.1% (w/v) azul de bromofenol y 0.1% (w/v) xilen cyanol] previamente desnaturalizados por 5 min a 60°C.

6.7 Síntesis de cDNA.

El RNA total extraído se utilizó para la síntesis de cDNA, esto con el objetivo de evaluar la expresión del gen mutante *NaTrxh_{SS}* y de algunos genes estilares esenciales en la AI (S-RNasa, 120K, NaStEP y HT-B). Para la síntesis se empleó la enzima M-MLVRT (Sigma) con el siguiente protocolo:

a) Mezclar en un volumen final de 10 μ l con H₂O DEPC:

1 μ M Oligonucleótido DT
1 mM dNTP's
5 μ g RNA total

b) Incubar a 70°C durante 10 min.

c) Colocar en hielo 2 min y añadir:

2 μ l amortiguador 10X
1 μ l M-MLVRT (200U)
7 μ l H₂O DEPC

d) Incubar 10 min a temperatura ambiente.

e) Incubar 50 min a 37°C.

e) Incubar 10 min a 80°C para desactivar la enzima.

El cDNA sintetizado fue utilizado como molde para la amplificación por PCR de los transcritos que se enlistan en la tabla 2 con sus respectivos oligonucleótidos.

Tabla 2. Transcritos evaluados en el presente estudio y oligonucleótidos utilizados para su amplificación.

Transcrito	Oligonucleótidos	TM (Temperatura de alineamiento)	Longitud del amplicon esperado
<i>tipo silvestre NaTrxh</i>	FWWCGPC 5'GCTACATGGTGTGGGCCCTGC 3' RVNaTWT 5'CCAACCACTCTCTCTACTTCCTTTCCCTTGC 3'	72°C	188pb
<i>NaTrxh_{SS}</i>	FWWSGPS 5'GCTACATGGAGTGGGCCCAGT 3' RVNaTSS 5'GGACATGAAATTTAGTTCGATAATTACTAGCAGC 3'	63.5°C	279pb
<i>SC10-RNasa</i>	SC10P1 5' GACCTAACCACCGCAGAAAC 3' SC10P2 5'CATCGAGTCGAAACATATGCC 3'	60°C	300pb
<i>SA2-RNasa</i>	SA2P1 5' AAAGTACCATCGCGACTTCG 3' SA2P2 5' TGTGAAGTTATTCATCGTCGG 3'	60°C	400pb
<i>120K</i>	FC-120KpACT 5'CATGCCATGGAGAAGCCTCTAATCATCGTCGGCCA 3' 120KREVERSE 5'CGCGGATCCGGTCTTTCTAATAATGAAGAGCTCG 3'	65°C	500pb
<i>NaStEP</i>	KpnNaStEP 5'GTATCAGGTACCATGTTCTTCTTGCTTTCAACTAC 3' NaStePXhoI 5'GTACACTCGAGTTATGCATCAGTCTTCTGGAATTC 3'	57°C	750pb
<i>HT-B</i>	FECOHT-C 5' GAATTCATGGCACTTAAGGCAAATGTTCTTATTC 3' R-NOTHT-B 5' GCGGCCGCCTAACAACAAACGGTTTGACAGA 3'	59°C	300pb
<i>Ubiq</i>	FWUbiq 5' GACAAGGTGACGGGTTGACT 3' RvUbiq 5' AGATCCAGGACAAGGAGGGT 3'	59°C	400pb

Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

6.8 Extracción de proteína total de pistilo.

Para evaluar la presencia de las proteínas S-RNasa, 120K, NaStEP y HT-B en los pistilos de los híbridos transformados con *NaTrxh_{SS}*, se colectaron 100 mg de pistilos de cada planta y se extrajo proteína total de la siguiente manera:

- a) Triturar el tejido con N líquido hasta tener un polvo fino.
- b) Añadir 500 µl de buffer de extracción (acetato de sodio 50mM pH 5, NaCl 50mM, β-mercaptoetanol 1%).
- c) Mezclar perfectamente con vórtex y centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- d) Recuperar el sobrenadante y almacenar a -20°C hasta su uso.

El extracto total de proteínas se utilizó para realizar una electroforesis en un gel SDS-PAGE (Anexo 7). Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0.45 µm durante 20 min a 75 mA. Se realizaron 5 membranas, cada una para inmunodetectar a cada proteína (HT-B, NaStEP, 120K, S_{A2}-RNasa y S_{C10}-RNasa) de la siguiente manera:

- a) Incubar la membrana en solución de bloqueo (Leche baja en grasa 5% en PBS y Tween 20 0.1%) durante 1 h a TA en agitación.
- b) Retirar la solución de bloqueo y añadir el anticuerpo primario correspondiente (HT-B 1:2 000, NaStEP 1:10,000, 120K 1:10,000, S_{A2}-RNasa 1:10,000 y S_{C10}-RNasa 1:10,000) diluido en solución de bloqueo e incubar durante 4 h a TA en agitación.
- c) Retirar la solución con el anticuerpo primario y realizar dos lavados de 5 min cada uno con PBS.
- d) Incubar la membrana con el anticuerpo secundario correspondiente (Anti-conejo fosfatasa 1:10,000 para HT-B, NaStEP, 120K y S_{A2}-RNasa y Anti-ratón fosfatasa 1:10,000 para S_{C10}-RNasa) diluido en solución de bloqueo e incubar durante 2 h a TA en agitación.
- e) Retirar la solución con el anticuerpo secundario y realizar dos lavados de 5 min cada uno con PBS.

La proteína fue revelada con fosfatasa alcalina de la siguiente manera:

- a) Realizar un lavado de la membrana con amortiguador de fosfatasa (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 9.5) durante 10 min.
- b) Transferir la membrana a una solución de 1% de NBT y 1% de BCIP en amortiguador de fosfatasas. Incubar hasta que aparezca una señal púrpura.
- c) Detener la reacción con H₂O y 50 mM EDTA pH8.0.

6.9 Purificación de la proteína NaTrxh.

Previamente en el laboratorio se generaron las construcciones para sobreexpresar a la proteína NaTrxh fusionada a GST (Glutathión-S-Transferasa) en células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Las construcciones contienen distintas versiones del gen *NaTrxh* (Figura 13. A), y están clonadas dentro del vector pGEX 4T-2 (Figura 13. B) el cual permite la expresión de la proteína fusionada al extremo C-terminal de GST (Juárez-Díaz, 2005 y Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). *NaTrxh_{SS}* fue clonada en el mismo vector para su sobreexpresión.

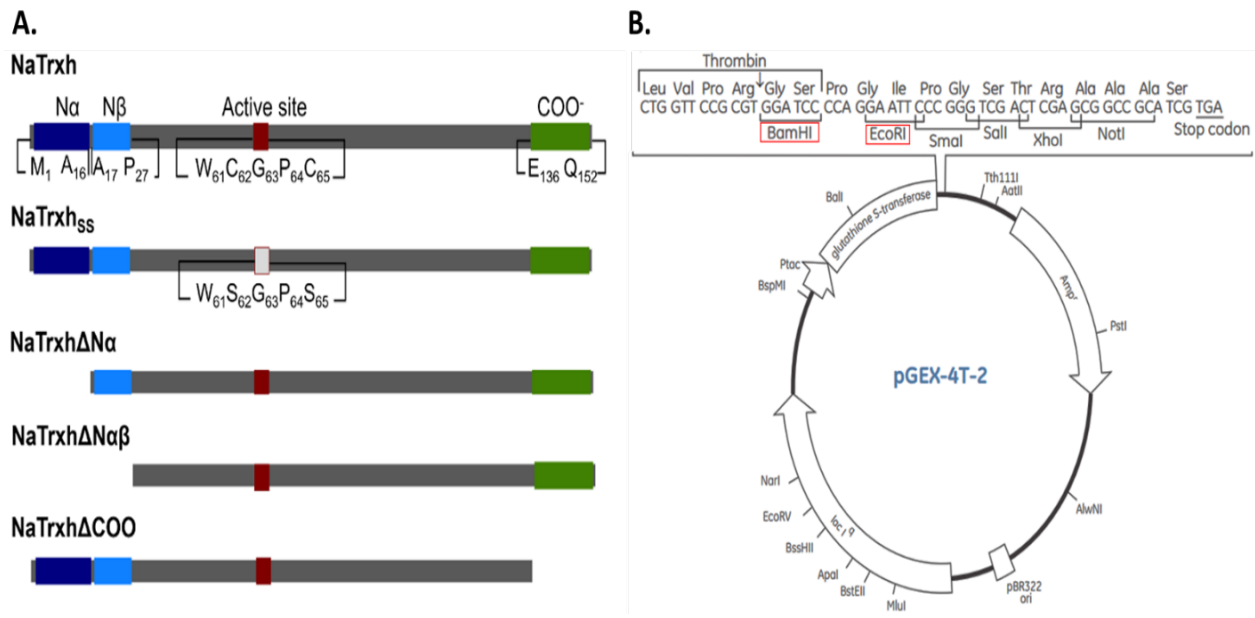


Figura 13. A. Distintas versiones de NaTrxh clonadas para su sobreexpresión. Se indican los aminoácidos que constituyen los dominios Na α , Na β y C-terminal, así como el sitio activo. En cada una de las versiones, se eliminaron los nucleótidos que codifican para el dominio que se indica. **B.** Esquema del vector pGEX-4T-2 mostrando el sitio de clonación múltiple. *NaTrxh* está clonado dentro de los sitios BamHI y EcoRI señalados, y fusionado a la proteína GST sin alterar el marco de lectura. El sitio de reconocimiento para la proteasa trombina se encuentra en el C-terminal de la GST y el vector presenta el gen de resistencia a Ampicilina (*Amp^r*).

El protocolo para sobreexpresar las proteínas de fusión es el siguiente:

- Tomar 15 μ l de un cultivo congelado en glicerol e inocularlos en 10 ml de medio LB con 100 mg/L de Ampicilina. Incubar a 37°C en agitación de 12 a 15 h.
- Inocular 100 ml de medio LB con el precultivo. Incubar a 37°C en agitación hasta llegar a una D.O. de 0.5 a 0.7.
- Agregar IPTG a los cultivos a una concentración final de 0.1 mM para inducir la expresión. Continuar con la incubación de 3 h.

- d) Centrifugar el cultivo a 8,000 rpm durante 10 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y drenar el pellet (ponerlo en hielo).
- e) Resuspender por completo el pellet en 50 µl de PBS 1X a 4°C por cada ml de cultivo.
- f) Lisar las células con sonicador por periodos de 15 a 30 s, entre un intervalo de 30 s con 1 min de reposo a una frecuencia de 20 a 30 MHz hasta que la solución sea un poco transparente (sonicar en hielo).
- g) Agregar Tritón X-100 al 20% hasta llegar a una concentración final de 1%. Mezclar suavemente durante 30 min en hielo para mejorar la solubilización de la proteína de fusión.
- h) Centrifugar a 10,000 rpm y pasar el sobrenadante (fracción soluble) a un tubo nuevo.

La purificación de la proteína se realizó a partir de la fase soluble del sonicado bacteriano por cromatografía de afinidad utilizando la resina Glutación-Agarosa (Sigma) de acuerdo con los los siguientes pasos:

- i) Añadir a la fracción soluble del sonicado 0.2 ml de resina Glutación-Agarosa hidratada por cada 10 ml de fracción soluble. Incubar durante 1 h a TA con agitación.
- j) Sedimentar la matriz por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Recuperar el sobrenadante por pipeteo (fracción no unida) y tomar una alícuota de 10 µl para analizar en un SDS-PAGE.
- k) Hacer un lavado con 1 ml de PBS por cada ml de volumen cama. Centrifugar a 1,000 rpm durante 5 min. Retirar el sobrenadante. Repetir el lavado dos veces más.
- l) Para eluir la proteína de fusión añadir 1 ml de buffer de elución (10 mM Glutación reducido, Tris 50 mM pH 9.0) por cada ml de volumen cama.
- m) Repetir la elución 3 veces y juntar los eluatos.

La GST presenta afinidad al glutatión oxidado, el cual está unido covalentemente a la matriz de agarosa. La elución de la proteína se logra por competencia con glutatión reducido, ya que este presenta una mayor afinidad que GST. El eluato contiene a la proteína de fusión, sin embargo, para los ensayos posteriores se requiere a la NaTrxh libre de GST, por lo que se trató a la proteína de fusión eluida de Glutación-Agarosa con 25 U de la proteasa trombina (Amersham) resuspendida en PBS (1 U/µl) durante 14 h en agitación a TA. La trombina es una proteasa que rompe a la cadena polipeptídica entre los residuos Arg y Gly dentro de la secuencia Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser. Este sitio de corte se encuentra justo en el extremo carboxilo terminal de la GST (Figura 13. B).

Posteriormente, el eluato tratado con trombina fue dializado con amortiguador PBS durante toda la noche a 4°C en agitación utilizando membranas de diálisis Spectra/Pro 6-8 kDa.

Para purificar a NaTrxh de GST, se utilizó la columna HiLoad Superdex 16/600, 200 µg (GE Healthcare) de filtración molecular, la cual previamente se equilibró con 5 volúmenes cama de PBS. La proteína se pasó a través de la columna con un flujo de 1 ml/min y se colectaron fracciones de 3 ml.

El resultado de la purificación fue analizado por SDS-PAGE.

6.10 Purificación de la S-RNasa y de los complejos S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.

Se purificó a la S_{C10}-RNasa de acuerdo con el protocolo de Murfett *et al.*, 1994, en el cual se utilizan las resinas de intercambio catiónico CM-Sefarosa y SP-Sefarosa de la siguiente manera:

- a) Colectar 1 g de pistilos de *N. alata* S_{C10}S_{C10} y pulverizar en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido.
- b) Pasar el tejido triturado a un tubo que contenga 5 ml de buffer de extracción frío (MES 0.05 M pH 6.5, EDTA 0.005 M, Ascorbato de sodio 0.05 M, 1% de Mercaptoetanol). El buffer de extracción debe estar fresco al momento de usarse.
- c) Inmediatamente homogenizar el tejido utilizando Politron a velocidad alta durante 1 min.
- d) Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- e) Remover la película de aceite que se forma después de la centrifugación utilizando un hisopo.
- f) Filtrar a través de una gasa.
- g) Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- h) Aplicar el sobrenadante a 1 ml de la columna CM-sefarosa previamente lavada con 3 ml de las siguientes soluciones en el orden que se mencionan: NaOH 2 M, NaCl 5 M y H₂O, seguido de 1 ml de MES 0.5 M pH 6.5 y 5 ml de buffer de extracción para equilibrar.
- i) Lavar la columna con 3 ml de buffer de extracción.
- j) Eluir secuencialmente con 1 ml de buffer de extracción que contenga las siguientes concentraciones de NaCl: 0.175 M, 0.35 M y 0.7 M.
- k) Analizar los eluatos en SDS-PAGE.
- l) El eluato que contiene a la S_{C10}-RNasa (0.35 M de NaCl) se cambia al buffer HEPES 0.05M pH 8 utilizando Amicon Ultra 4 10K (Millipore).

m) Aplicar el eluato que contiene a la S_{C10}-RNasa a la columna SP-sefarosa previamente lavada con 3 ml de las siguientes soluciones en el orden que se mencionan: NaOH 2 M, NaCl 5 M y H₂O, seguido de 1 ml de HEPES 0.5 M pH 8 y 5 ml de HEPES 0.05 M pH 8 para equilibrar.

n) Lavar la columna con 3 ml de HEPES 0.05 M pH 8.

ñ) Eluir secuencialmente con 1 ml de HEPES 0.05 M pH 8 que contenga las siguientes concentraciones de NaCl: 0.06 M, 0.12 M, 0.24 M y 0.7 M.

o) Analizar los eluatos en SDS-PAGE.

El eluato que contiene a la S_{C10}-RNasa fue dializado con amortiguador PBS durante toda la noche a 4°C en agitación utilizando membranas de diálisis Spectra/Pro 20 kDa. Posteriormente se aplicó a la columna HiLoad Superdex 16/600, 200 pg (GE Healthcare) de filtración molecular. Las fracciones fueron analizadas en SDS-PAGE. Algunas contienen a la S_{C10}-RNasa pura y otras a la S_{C10}-RNasa en complejo con 120K, NaTTS y NaPELPIII.

6.11 Reducción *in vitro* de la S-RNasa.

Se incubaron 6 µg de S_{C10}-RNasa purificada en un volumen final de 30 µl de Tris HCl 50 mM pH 7.9 durante 3 h bajo las siguientes condiciones (Juárez-Díaz *et al.*, 2006):

- Sin agentes reductores
- DTT 10 mM
- 3 µg de Trx [NaTrxh completa, NaTrxh_{SS}, NaTrxhΔNαβ, NaTrxhΔNα, NaTrxhΔCOO, NrTrxh o Trx de *E. coli* (Sigma)] + 2 µg de Tiorredoxina reductasa recombinante de *E. coli* (Sigma) + 0.125 µmol NADPH (Sigma).
- 2 µg de Tiorredoxina reductasa recombinante de *E. coli* + 0.125 µmol NADPH (control sin NaTrxh, se utiliza para el cálculo de la actividad de la S-RNasa).

Para el ensayo de competencia entre NaTrxh y NaTrxh_{SS} se pre incubaron 3.8 µg de S_{C10}-RNasa purificada (equivalente a 150 µM) con 1, 2, 3 y 4 µg de NaTrxh_{SS} (20, 40, 60 y 80 µM, respectivamente) en Tris HCl 50 mM pH 7.9 durante 1 h previo a la reducción con 4 µg de NaTrxh (equivalente a 80 µM). Asimismo, se realizó el ensayo de competencia de manera invertida pre incubando 3.8 µg de S_{C10}-RNasa purificada y 4 µg de NaTrxh_{SS} durante 1 h previo a la reducción con 1, 2, 3 y 4 µg de NaTrxh.

6.12 Cuantificación de la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.

Preparación del RNA sustrato:

- a) Disolver 2.5 g de RNA Torula Yeast (SIGMA) en 10 ml de H₂O desionizada con adición por goteo de NH₄OH (aproximadamente 1 ml permite la disolución del RNA).
- b) Precipitar el RNA añadiendo 1 volumen de acetato de amonio 10 M y 3 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C.
- c) Decantar y resuspender en 10 ml de H₂O desionizada. Repetir una vez más la precipitación.
- d) Lentamente añadir de 10-20 ml de LiCl 8 M frío hasta que se forme un precipitado.
- e) Centrifugar 10 min a 2,500 rpm a 4°C. Resuspender en 10 ml de H₂O desionizada.
- f) Añadir 15 ml de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar.
- g) Centrifugar 10 min a 4,000 rpm a 4°C y resuspender en 10 ml de H₂O desionizada. Repetir los incisos f y g.
- h) Precipitar el RNA añadiendo 1 volumen de acetato de amonio 10M y 3 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a 2,500 rpm durante 10 min a 4°C.
- i) Decantar y resuspender en 10 ml de H₂O desionizada. Repetir una vez más la precipitación.
- j) Lavar el pellet secuencialmente con etanol al 95% y con metanol al 100%.
- k) Secar el pellet y pesarlo. Almacenar a -70°C hasta su uso.

El RNA purificado se empleó para los ensayos de actividad de ribonucleasa en donde se cuantifica RNA degradado después de ser incubado con la S-RNasa. La cuantificación se lleva a cabo a 260 nm; por lo tanto, a mayor actividad debe haber mayor absorbancia.

El ensayo de actividad se realizó como sigue:

- a) Enfriar tubos de 1.5 ml 5 min en hielo.
- b) Añadir a cada tubo 200 µl de amortiguador de actividad frío (glicerol 25% v/v, fosfato de potasio 0.1 M pH7, 0.05 M de cloruro de potasio y 4 mg/ml de RNA purificado).
- c) Añadir 6 µg de RNasa bajo las diferentes condiciones de reducción (se utilizaron 3.8 µg de RNasa en el caso de los ensayos con competencia entre NaTrxh y NaTrxh_{SS}), además de añadir un control sin RNasa. Agitar con vórtex e incubar inmediatamente a 37°C durante 30 min (20 min en los ensayos de competencia).
- d) Añadir a cada tubo 40 µl de solución de término de reacción (25% v/v ácido perclórico y 0.75% w/v uranilacetato). Agitar con vórtex y dejar precipitando en hielo al menos 15 min.
- e) Centrifugar 20 min a máxima velocidad a 4°C. Leer el sobrenadante a 260 nm.

Para el cálculo de la actividad, se resta la absorbancia de la muestra que no tiene S-RNasa a todas las pruebas. Además, la absorbancia de la S-RNasa sin NaTrxh, pero con NADPH y NTR, se resta sólo a aquellas reacciones que contienen NADPH. La actividad entonces es calculada con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad} = A_{260}/\text{ml} \cdot \text{min} \cdot \text{mg}$$

6.13 Electroforesis en doble dimensión para la reducción de los complejos S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.

Para conocer si NaTrxh forma parte de los complejos S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII se realizaron electroforesis en doble dimensión donde la primera separación fue una electroforesis nativa y la segunda desnaturalizante (Figura 14).

La primera dimensión nativa se realizó de la siguiente manera:

Preparación del gel separador al 6.5%:

1.44 ml de Agua

2.5 ml de Amortiguador para gel separador (Acetato de potasio 0.15 M, pH 6.7)

1.06 ml de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)

25 μ l de PSA 20%

5 μ l de Temed

Mezclar todo y vaciar rápidamente dentro de los vidrios. Agregar isopropanol para mantener un nivel adecuado en la parte superior del gel. Una vez que polimeriza, preparar el gel concentrador.

Preparación gel concentrador:

0.72 ml de Agua

1 ml de Amortiguador para el gel concentrador (Acetato de potasio 0.125M pH 4.7)

265 μ l de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)

10 μ l de PSA 20%

2 μ l de Temed

Mezclar todo y vaciar rápidamente sobre el gel separador.

Una vez polimerizado, cargar las muestras en buffer de carga (Sacarosa 10%, Azul de metileno 0.1%). La electroforesis se efectuó durante 1.5 h a 120 V en buffer de corrida para geles nativos (β -alanina 0.07 M, ácido acético 0.012 M, pH 4.5).

Después de la primera dimensión se recortó todo el carril y se incubó en buffer de carga para SDS-PAGE (Tris:HCl 0.28 M pH6.8, glicerol 30%, SDS 1%, azul de bromofenol 0.0012%, DTT 0.5

M) durante 10 min en agitación. Posteriormente se colocó sobre el gel un gel preparado en condiciones desnaturalizantes (Anexo 7) y se realizó la electroforesis durante 1.5 h a 120 V.

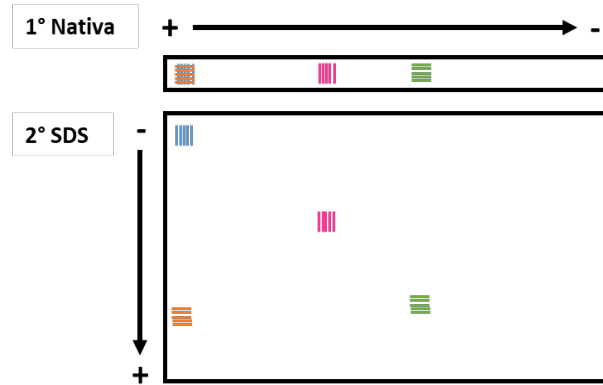


Figura 14. Representación esquemática de la electroforesis en dos dimensiones utilizada para evaluar proteínas en complejo. Las proteínas son separadas en una electroforesis nativa seguida de una electroforesis desnaturalizante. Si las proteínas están en complejo, migrarán juntas en la primera dimensión, pero se separarán por su masa en la segunda dimensión (barras azules y anaranjadas). Si las proteínas no están en complejo migrarán en la misma posición en ambas dimensiones (barras rosas y verdes).

Se sometieron a este sistema las siguientes condiciones:

- 50 μg del complejo incubado durante 3 h con 3 μg de NaTrxh (Para ver sólo interacción entre NaTrxh y los complejos).
- 50 μg del complejo incubado durante 3 h con 3 μg de NaTrxh, 2 μg de NTR y 0.125 μmol de NADPH (Para ver reducción de los complejos por NaTrxh).
- 50 μg del complejo incubado durante 3 h con 0.01 M de DTT (Para ver reducción de los complejos con DTT).

6.14 Identificación de puentes disulfuro reducidos en la S-RNasa.

Se realizó la identificación de Cys reducidas en la S_{C10}-RNasa purificada sometida a tres diferentes tratamientos:

- 20 μg de S_{C10}-RNasa sin agente reductor.
- 20 μg de S_{C10}-RNasa reducida con 3 μg de NaTrxh, 2 μg de NTR y 0.125 μmol de NADPH, durante 3 h a 37°C.

- 20 μg de S_{C10}-RNasa reducida con 0.1 M de [Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride] (TCEP) durante 1 h a 37°C.

Después de la reducción se marcaron los sulfhidrilos libres utilizando 20 μg de N-etilmaleimida (NEM) incubando durante 1 h a 37°C. Posteriormente, las proteínas se precipitaron con 3 volúmenes de acetona y se analizaron en el *Gehrke Proteomics Center* de la Universidad de Missouri-Columbia.

6.15 Generación de las columnas de afinidad de GST y GST-NrTrxh.

NaTrxh fue descrita para *N. alata* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), sin embargo, la proteína está presente en otras especies del genero *Nicotiana*. En *N. glauca*, quien también es una especie AI, la proteína NrTrxh carece de 10 aminoácidos del dominio C-terminal, pero el resto de la proteína es exactamente idéntica a NaTrxh (Torres-Rodríguez, 2016). Dado que el dominio C-terminal presenta una gran afinidad por la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), NrTrxh se utilizó para evaluar si la falta de 10 aminoácidos en este dominio afecta la interacción entre ambas proteínas.

Para ello, se generó una columna de afinidad con GST-NrTrxh como ligando y una con sólo GST como control. GST y GST-NrTrxh se sobreexpresaron en *E. coli* BL21 y se purificaron de acuerdo con protocolo descrito para GST-NaTrxh del apartado 6.9 (“Purificación de la proteína NaTrxh”), sin realizar el corte con trombina. Las columnas de afinidad se realizaron utilizando la resina Affi-Gel 10 (Bio Rad) de la siguiente manera:

- Lavar 1 ml de la resina Affi-Gel 10 con 3 ml de H₂O desionizada fría.
- Mezclar la resina con 27 mg de GST o GST-NrTrxh diluidos en 3 ml de PBS.
- Incubar con rotación continua a 4°C durante 12 h.
- Lavar la columna con 10 ml de PBS.
- Lavar la columna con 2 ml de solución de Glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6 para bloquear los grupos ésteres que hayan quedado reactivos.
- Lavar la columna con 2 ml de etanolamina 1 M incubándola por 1 h a TA.
- Lavar extensivamente con PBS para quitar los reactivos no unidos. El lavado se realiza hasta que ya no se detecte proteína cuando se mide la absorbancia a 260 nm.

6.16 Cromatografía de afinidad para ver interacción proteína-proteína.

Para evaluar la interacción entre NrTrxh y la S-RNasa se utilizó el buffer Tris 50 mM pH 7.9 para extraer proteína total de pistilo de *N. alata* S_{C10}S_{C10}. El extracto de proteínas se utilizó en las

cromatografías de afinidad con las columnas Affi-Gel-GST-NrTrxh o Affi-Gel-GST como control, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- a) Equilibrar la columna con 10 ml de amortiguador de extracción (Tris 50 mM pH 7.9).
- b) Pasar 1 mg de extracto total de proteína disuelto en 1 ml de buffer de extracción.
- c) Lavar la columna con 10 ml de amortiguador de extracción.
- d) Realizar una elución con 1 ml 1 % de Tween 20 disuelto en amortiguador de extracción.
- e) Realizar una elución con 1 ml de NaCl 0.1 M disuelto en amortiguador de extracción.
- f) Realizar una elución con 1 ml de NaCl 0.2 M disuelto en amortiguador de extracción.
- g) Eluir las proteínas fuertemente unidas con 1 ml de Glicina 50 mM, NaCl 50 mM, pH 2.6.

Todas las fracciones fueron analizadas en SDS-PAGE (Anexo 7) y la SC10-RNasa se inmunodetectó con anticuerpos específicos.

6.17 Purificación de NaTrxh para su cristalización.

Para la purificación en gran escala de NaTrxh para su cristalización se utilizó el procedimiento descrito en el apartado 6.9 (“Purificación de la proteína NaTrxh”), con las diferencias que se enlistan a continuación:

- La sobreexpresión se realizó en 1 L de cultivo (divididos en 4 matraces de 2 L con 250 ml de medio en cada uno).
- Después de centrifugar las células se resuspendieron en 60 ml de PBS (paso f).
- Se utilizaron 4 ml de resina glutatión-agarosa hidratada.
- La purificación de GST-NaTrxh se realizó 3 veces utilizando la misma resina de glutatión agarosa (3 repeticiones de los pasos i -m).

Después de la obtención de la proteína de fusión, la proteína se cambió a PBS utilizando tubos Amicon Ultra 4 10K (Millipore) y centrifugando a 6000 g a 4°C. Además, se concentró la proteína hasta tener un volumen de 5 ml.

Posteriormente, se realizó la proteólisis con 100 U de trombina (Amersham) resuspendida en PBS (1 U/ μ l) y se incubó durante 14 h en agitación a TA. Para purificar a NaTrxh de GST, se utilizó la columna HiLoad Superdex 16/600, 200 pg (GE Healthcare) de filtración molecular, previamente se equilibrada con 5 volúmenes cama de PBS. La proteína se pasó a través de la columna con un flujo de 1 ml/min y se colectaron fracciones de 3 ml.

Las fracciones obtenidas de la cromatografía de exclusión molecular se analizaron mediante SDS-PAGE y aquellas que contenían a NaTrxh purificada se juntaron y se concentraron utilizando tubos

Vivaspin 6 3 kDa (GE Healthcare) en el amortiguador acetato de amonio 10 mM pH 6.0, hasta llegar a una concentración de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

6.18 Pruebas de cristalización para NaTrxh.

La determinación de la estructura tridimensional de NaTrxh se realizó mediante cristalografía de rayos X, por ello fue necesario generar cristales de esta proteína. Un cristal es un arreglo tridimensional y periódico que se forma debido a la precipitación de las moléculas en solución hasta quedar en su estado de menor energía libre, lo cual ocurre únicamente en ciertas condiciones favorables específicas para cada molécula. Existen kits que contienen distintas condiciones que permiten evaluar en cuál de ellas es posible la formación de cristales de la proteína de interés (Ilari y Savino, 2008).

Asimismo, existen varias técnicas para la cristalización de proteínas. En el presente trabajo se utilizó la técnica de difusión de vapor en la cual la proteína en altas concentraciones se mezcla con el mismo volumen de condición de cristalización (por ejemplo, 2 μl de proteína + 2 μl de condición, denominada gota 2 + 2), aparte se coloca un volumen determinado de la condición en un pozo grande adyacente el cual se denomina reservorio (Figura 15). La solución que se encuentra en el pozo posee una elevada concentración de precipitante, por tanto, tiene una presión de vapor inferior a la de la solución proteica. El agua de la gota se evapora sobre la solución del pozo, con ello la concentración proteica y de los demás componentes de la condición de la gota aumentan, permitiendo la formación de cristales.

Las pruebas de cristalización de NaTrxh se realizaron utilizando la técnica de difusión de vapor en las modalidades de gota apoyada y gota colgante, los cuales se muestran en la figura 15.

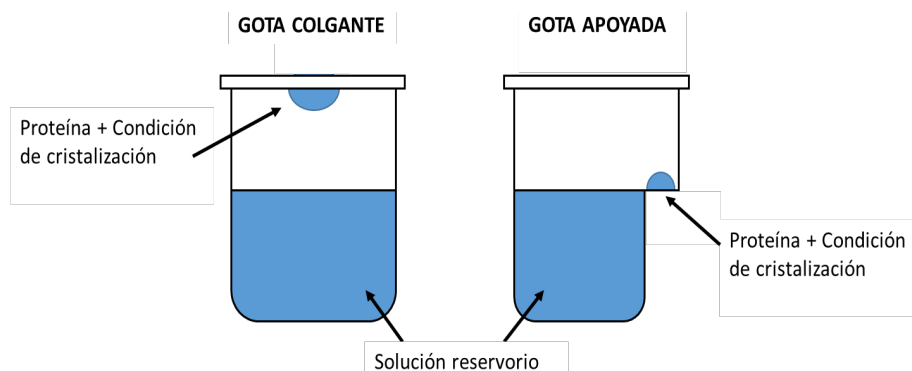


Figura 15. Método de cristalización de proteínas por difusión de vapor. En gota colgante (izquierda) la proteína se mezcla con el mismo volumen de la condición de cristalización y se coloca en un cubreobjetos con el que se cubre al pozo donde se encuentra la solución reservorio. En gota apoyada (derecha), la proteína mezclada con el mismo volumen de la condición de cristalización se coloca en un pequeño pozo adyacente al pozo que contiene a la solución reservorio. En ambos casos el agua se evapora de la gota permitiendo que aumente la concentración de la proteína y se formen los cristales.

Las pruebas de cristalización de NaTrxh se realizaron inmediatamente después de concentrar la proteína para evitar que esta permaneciera mucho tiempo en altas concentraciones y pudiera formar agregados. Se realizó un *screening* inicial utilizando el kit de cristalización JBScreen Wizard 3 (Jena Biosciences). Se probaron las 48 condiciones del kit en el método de difusión de vapor en gota apoyada utilizando gotas 2 + 2 y 40 μl de reservorio; adicionalmente, se probaron 7 condiciones en gota colgante con gotas 3 + 3 y 500 μl de reservorio, estas condiciones se eligieron por ser similares a las que se utilizaron para la cristalización de la tiorredoxina HvTrx2 de *Hordeum vulgare* (Anexo 8) (Maeda *et al.*, 2006). Las pruebas se incubaron a 18°C y se monitoreó la formación de cristales cada semana.

Los primeros cristales de NaTrxh se observaron en la condición # 4 (20% de PEG 3,350, 200 mM de Formato de amonio) después de 60 días de incubación. Esta se utilizó para nuevas pruebas con el kit de aditivos Additive Screen HT (Hampton Research) para el mejoramiento de los cristales. Se probaron los 96 aditivos en el método de difusión de vapor en gota apoyada utilizando por pozo 40 μl de aditivo al 10% en la condición de cristalización. Se realizaron gotas 2 + 2 con NaTrxh a 10, 12 y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, se incubaron a 18°C y se monitoreó la aparición de cristales cada semana. Los cristales generados se mantuvieron a esta temperatura hasta su difracción.

6.19 Difracción de cristales de NaTrxh y resolución de su estructura tridimensional.

La cristalografía de rayos X es una técnica que nos permite conocer la estructura tridimensional de las proteínas a un nivel de resolución atómico. A una resolución baja (8 a 3.5 Å), solo es posible observar los elementos de estructura secundaria que están presentes en la molécula; a una resolución media (3.5 a 2.5 Å), se pueden identificar las cadenas laterales de los aminoácidos de la cadena polipeptídica; mientras que a una resolución alta (2.5 a 1 Å), los átomos individuales pueden localizarse y se puede identificar su ordenamiento respecto al solvente (Parker, 2003).

Los cristales tienen un ordenamiento determinado. La unidad más pequeña de un cristal es conocida como celda unitaria y dentro de ella la proteína tiene un arreglo que, por sus características de simetría, se clasifica dentro de un grupo espacial determinado, el cual nos sirve para resolver su estructura (Parker, 2003).

Los cristales de proteína se irradian con un haz de rayos X; la difracción de estos al chocar con los electrones de los átomos contenidos en el cristal da lugar a un patrón de difracción. La intensidad y coordenadas de las difracciones se utilizan para generar un mapa de densidad electrónica, el cual posteriormente será interpretado en términos de átomos y moléculas individuales. Técnicas como el reemplazo molecular nos permiten resolver una estructura a partir de su mapa de densidad electrónica y utilizando como referencia una estructura ya conocida que tenga un porcentaje de identidad mayor al 25% (Ilari y Savino, 2008).

La primera prueba de difracción de los cristales de NaTrxh se realizó con un cristal que se obtuvo en ausencia de aditivos utilizando el ánodo rotatorio Rigaku MicroMax 007HF con detector

Dectris Pilatus 3R 200K en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas, Instituto de Química, UNAM con ayuda de la Dra. Adela Rodríguez Romero. Este cristal se difractó a una temperatura de -173 grados centígrados utilizando como crioprotector la solución de cristalización, a la cual se le adicionó glicerol al 20%.

Los cristales que se formaron en las condiciones con aditivos fueron crioprottegidos utilizando la solución de cristalización más glicerol al 20%. Posteriormente los cristales se almacenaron en nitrógeno líquido 5 días antes de la difracción. La difracción se realizó en la línea 19ID del Advanced Photon Source del Argonne National Laboratory (Illinois, USA).

La determinación del grupo espacial, el indexado, la integración, el ordenamiento y escalado de los datos se realizó con el programa HKL 3000 (Minor *et al.*, 2006). La estructura se obtuvo mediante reemplazo molecular utilizando el programa HKL 3000, tomando como molde la estructura de la HvTrxh2 de *H. vulgare* (PDB 2IWT) cuya secuencia tiene un 40 % de identidad con la secuencia de NaTrxh.

Una vez que se cuenta con una estructura resuelta es necesario realizar varios ciclos de afinamiento. Este paso consiste en el cambio de posición de algunos átomos y se realiza con la finalidad de producir el modelo que mejor concuerde con el patrón de difracción (Parker, 2003). Los afinamientos de la estructura de NaTrxh se realizaron con los protocolos estándar de Phenix (Adams *et al.*, 2011) y se visualizaron en Coot (Emsley *et al.*, 2010).

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Lilian González Segura del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, quien realizó la colecta de los datos, la determinación y el afinamiento de la estructura.

6.20 Modelo de la interacción entre la S_{F11}-RNasa y NaTrxh.

Los segmentos no observados en el cristal de proteína de NaTrxh se predijeron utilizando un modelo publicado previamente de esta proteína (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014) y simulaciones de Dinámica Molecular (DM). Las simulaciones DM se realizaron utilizando GROMACS (Abraham *et al.*, 2015) AMBER99SB-ILDN (Lindorff-Larsen *et al.*, 2010) con campo de fuerza en solvente explícito con electrostática PME y tratamiento PME-like de fuerzas Van de Waals. Las simulaciones MD se realizaron utilizando presión constante (~ 1 atm) y 298K.

Se obtuvieron varias conformaciones posibles para el complejo inicial entre NaTrxh (PDB: 6X0B) y la S_{F11}-RNasa (PDB: 110O, Ida *et al.*, 2001) con el módulo de acoplamiento de ROSETTA (Kaufmann *et al.*, 2010) con restricciones para recuperar aquellas conformaciones donde las Cys reactivas de NaTrxh y el disulfuro de sustrato estaban a menos de 12 Å. Las simulaciones se realizaron sin restricciones y se repitieron de 3 a 5 veces. Para las simulaciones de recocido simulado (SA-MD), la temperatura se incrementó a 373 K durante 3 ns y se redujo gradualmente a 298 K en ciclos de 15 ns. Se introdujo una ligera fuerza de tracción en algunas simulaciones MD

para acelerar la formación del complejo. Se utilizaron las herramientas de análisis estándar de GOMACS y VMD (Humphrey *et al.*, 1996) para analizar las trayectorias.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, quien realizó las simulaciones de dinámica molecular.

6.21 Modelo del complejo S_{F11}-RNasa-dinucleótido.

Se realizó un modelo *in silico* de un dinucleótido 5'OH-CC-3'OH y se acopló repetidamente en la S_{F11}-RNasa (PDB: 1I00) utilizando AUTODOCK vina (Trott y Olson, 2010) para dar más de 250 posiciones. La caja se restringió a ± 10 Å (en direcciones X, Y y Z) de las His del sitio activo (H32, H91). Se seleccionaron complejos significativos basados en lo que se conoce por el mecanismo catalítico de las RNasas, basándose en la conformación de los aminoácidos catalíticos reportada en la estructura tridimensional de la RNasa LE de *Solanum lycopersicum* (PDB: 1DIX), además de diversas RNasas en complejo con varios ligandos (RNasa NT de *N. glutinosa* en complejo con 5' GMP, PDB: 1VCZ; RNasa T1 en complejo con guanosina-3',5'-difosfato, PDB: 3URP; RNasa MC1 mutante N71T en complejo con 5'-GMP, PDB: 1J1F; ribonucleasa T1 en complejo con 2',3'-CGPS, PDB: 1GSP). Los complejos se refinaron adicionalmente usando MD y el complejo que tenía las características esperadas del sustrato enzimático para este tipo de enzimas se simuló con el puente disulfuro C153-C186 oxidado y reducido (*in silico*).

7. Resultados y discusión

7.1 NaTrxh es un gen modificador de AI de *Nicotiana*.

Diversas evidencias indicaban la participación de NaTrxh en el rechazo del polen en *Nicotiana*, por ejemplo, la elevada expresión de esta proteína en pistilos de especies AI y su interacción con la determinante femenina, la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006 y McClure *et al.*, 2011). Para probar la participación de un gen en cualquier mecanismo biológico una opción es generar plantas transgénicas donde se suprime su expresión. El caso de *NaTrxh* causó dificultades para su supresión debido a que la proteína es expresada en varios órganos de la planta (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) pero se desconoce si lleva a cabo alguna función en un sitio diferente a los órganos reproductivos; además de que no se cuenta con un promotor bien caracterizado que dirija la expresión en pistilo desde etapas tempranas de su desarrollo, que es cuando *NaTrxh* se expresa mayoritariamente (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

7.1.1 Generación de los híbridos transgénicos *N. plumbaginifolia::NaTrxh_{SS}* x *N. alata*.

Previamente, como parte de este trabajo, se generaron dos construcciones para producir un RNAi de *NaTrxh* para su silenciamiento, el cual se clonó tanto con el promotor constitutivo *CAMV 35S* (Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter), como con el promotor *ChiP* (Pistil Chitinase chi2; 1 *Solanum lycopersicum*; Harikrishna *et al.*, 1996), el cual es específico de etapas tardías del desarrollo de pistilo, aunque no está completamente caracterizado. Con estas dos construcciones se transformaron hojas de *N. plumbaginifolia*; sin embargo, nunca se lograron obtener plantas transgénicas debido a la muerte inmediata del tejido. Esto pudo deberse a que posiblemente el RNAi silenció a *NaTrxh* en hoja, sitio en el cual la proteína podría tener alguna función esencial. Además, dado que existen diferentes Trxs que se expresan en la planta, también existe la posibilidad de que se haya silenciado alguna otra cuya función sea esencial en hoja.

Por ello, se utilizó una estrategia alternativa para evaluar la participación de NaTrxh en el rechazo del polen, la cual consistió en la expresión de una mutante de NaTrxh que carece de actividad reductora. El gen mutante, denominado *NaTrxh_{SS}*, presenta tres mutaciones puntuales que dan como resultado la sustitución de las dos Cys del sitio reactivo de NaTrxh por Ser (W₆₁C₆₂G₆₃P₆₄C₆₅ à W₆₁S₆₂G₆₃P₆₄S₆₅) (Figura 16).

Ya se han realizado mutantes de otras Trxs donde una o las dos Cys del sitio reactivo se mutan por Ser. La sustitución por este aminoácido es porque contiene un grupo hidroxilo en su cadena lateral a diferencia del grupo tiol de la Cys, y el cual permite la reducción de la proteína blanco. La presencia de Ser en lugar de Cys en el sitio reactivo de las Trxs no afecta la estructura de la proteína o su comportamiento en solución, por lo que es una buena elección cuando se requiere afectar sólo la actividad de una o las dos Cys de su sitio reactivo (Dyson *et al.*, 1994).

NaTrxh_{SS} se clonó en el vector binario pK2GWS7 para que su expresión fuera dirigida por el promotor *CAMV 35S*. Con esta construcción se transformaron fragmentos de hojas de *N. plumbaginifolia*, los cuales después se colocaron en medio con hormonas para inducir la formación de callo y posteriormente su diferenciación para dar lugar a plantas completas que son transformantes estables. Las plantas transgénicas contienen las dos versiones de *NaTrxh* en su genoma (tipo silvestre y mutante) y aunque *N. plumbaginifolia* expresa a *NaTrxh* en pistilo, su transcrito debe tener alguna regulación negativa debido a que no se ha podido detectar a la proteína (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011 y Torres-Rodríguez, 2016).

CLUSTAL O (1.2.4) multiple sequence alignment

```

NaTrxhSS      ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAA
NaTrxhWT      ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAA

NaTrxhSS      TCAGGATCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAA
NaTrxhWT      TCAGGATCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAA

NaTrxhSS      CTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGCGGCTACA
NaTrxhWT      CTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGCGGCTACA

                W  S  G  P  S
NaTrxhSS      TGGAGTGGGCCCGAGTAAAATGATGGAGCCGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATAACC
NaTrxhWT      TGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATAACC
                W  C  G  P  C

NaTrxhSS      GACGTTGACTTCGTCAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGGGA
NaTrxhWT      GACGTTGACTTCGTCAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGGGA

NaTrxhSS      GTACAAGCTATGCCAACATTTTTGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTT
NaTrxhWT      GTACAAGCTATGCCAACATTTTTGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTT

NaTrxhSS      GGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTT
NaTrxhWT      GGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTT

NaTrxhSS      GCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA
NaTrxhWT      GCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA

```

Figura 16. Alineamiento entre *NaTrxh* y *NaTrxh_{SS}* mostrando los nucleótidos que codifican para el sitio activo y las tres mutaciones puntuales generadas para la sustitución de Cys por Ser.

Se obtuvieron tres líneas transgénicas estables independientes de *N. plumbaginifolia::NaTrxh_{SS}*. *N. plumbaginifolia* *S₀S₀* (alelos *S₀* nulo), la cual es AC, es decir, no rechaza su propio polen, por lo que para estudiar su papel en el rechazo del polen fue necesario generar híbridos con una especie AI como *N. alata*. Para ello, una vez que las tres líneas transgénicas de *N. plumbaginifolia::NaTrxh_{SS}* llegaron a la etapa de floración, se polinizaron con polen de *N. alata* de genotipo *S_{A2}S_{A2}* o *S_{C10}S_{C10}*. De estas cruza se obtuvieron 14 híbridos transgénicos *N.*

plumbaginifolia X *N. alata* (S_0S_{A2}) o *N. plumbaginifolia* X *N. alata* (S_0S_{C10}), los cuales se denominaron como híbridos S_{A2} o S_{C10} , respectivamente). El alelo S_0 en los híbridos transgénicos se refiere a que *N. plumbaginifolia* no posee ningún gen para la S-RNasa, por lo que los híbridos solo presentan el alelo proveniente de *N. alata*.

La presencia del transgen *NaTrxh_{SS}* y el haplotipo de *S-RNasa* correspondiente, fueron verificados por PCR en cada uno de los híbridos transgénicos, utilizando DNA genómico como molde. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para cada haplotipo de *S-RNasa*; mientras que para *NaTrxh_{SS}* se utilizó un par de oligonucleótidos donde el *forward* es específico para una secuencia del promotor *35S* y el *reverse* es específico para una secuencia de *NaTrxh*, esto para asegurar que la amplificación es del transgen y no del gen tipo silvestre.

Se realizaron reacciones de PCR utilizando dos pares de oligonucleótidos (para la *S-RNasa* y para *NaTrxh_{SS}*). Para el caso de los híbridos S_{A2} se amplificaron 400 pb de la *S-RNasa* y 630 pb de *NaTrxh_{SS}*; mientras que para los híbridos S_{C10} se amplificaron 300 pb de *S-RNasa* y 430 pb de *NaTrxh_{SS}* (Figura 17). Adicionalmente, se generaron dos híbridos no transgénicos de genotipo S_0S_{C10} , los cuales sirvieron como control.

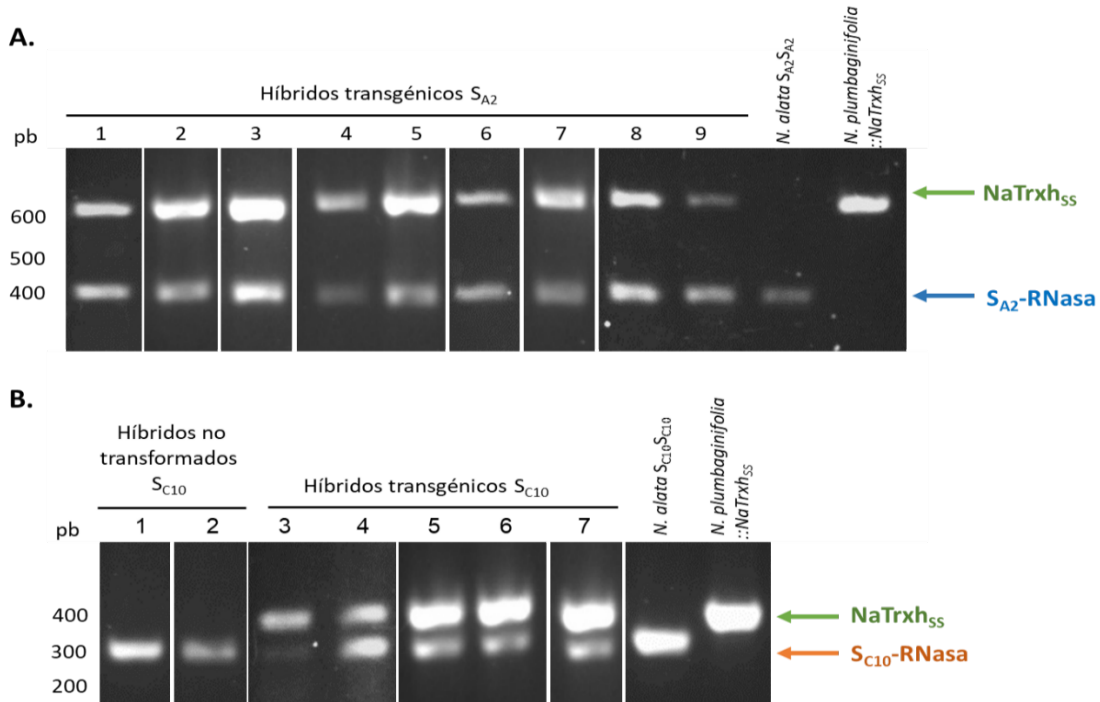


Figura 17. Amplificación de *NaTrxh_{SS}* y la *S-RNasa* en DNA genómico de los híbridos transgénicos. Se utilizó DNA de *N. plumbaginifolia* $::NaTrxh_{SS}$ como control positivo para la amplificación de *NaTrxh_{SS}* y DNA de *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ o $S_{C10}S_{C10}$ como control positivo para la amplificación de las *S-RNasas*. **A.** Híbridos transgénicos S_0S_{A2} **B.** Híbridos transgénicos S_0S_{C10} e híbridos no transformados S_0S_{C10} .

Una vez que los híbridos llegaron a la etapa de floración, se evaluó la expresión de *NaTrxh* tipo silvestre y *NaTrxh_{SS}* en pistilos mediante RT-PCR con oligonucleótidos específicos que reconocen los sitios donde se encuentran las mutaciones puntuales. Antes de realizar el análisis de expresión y para asegurar que la amplificación es específica de cada par de oligonucleótidos con la versión del gen correspondiente, se realizaron PCRs utilizando distintas *T_m*'s y tomando como DNA molde los plásmidos con el cDNA de la versión tipo silvestre o mutante de *NaTrxh*.

Como se muestra en la figura 18, los oligonucleótidos para *NaTrxh_{SS}* son específicos para esta versión del gen a una *T_m* de 63°C, ya que a esta temperatura ya no hubo amplificación del gen tipo silvestre, mientras que los oligonucleótidos diseñados para *NaTrxh* tipo silvestre, son específicos para esta versión hasta los 72°C.

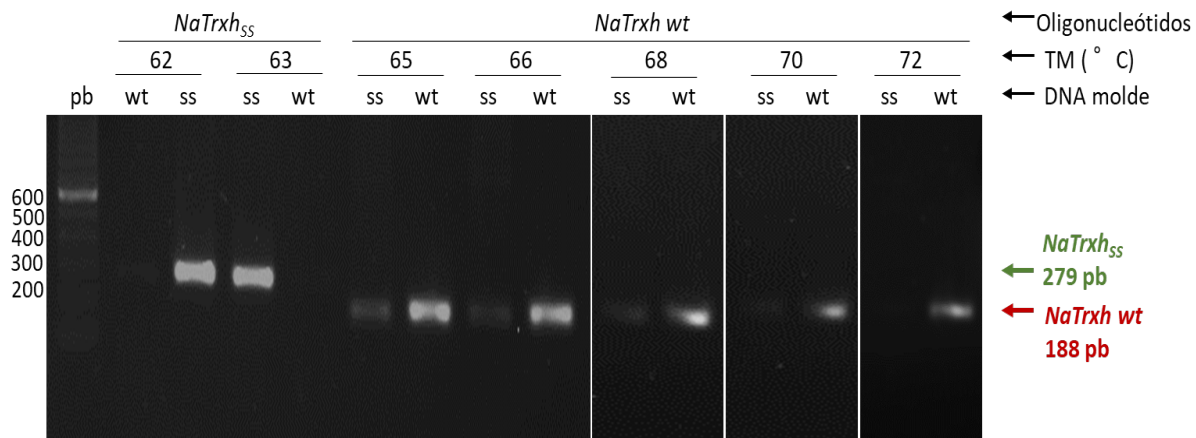


Figura 18. Establecimiento de las condiciones de PCR (temperatura de alineamiento óptima) para la amplificación específica de *NaTrxh* tipo silvestre o *NaTrxh_{SS}*. Los oligonucleótidos fueron probados a diferentes *T_m*'s en reacciones donde se utilizó como DNA molde el plásmido que contenía el gen tipo silvestre, (188 pb) o el mutante (ss, 279 pb). Los oligonucleótidos para *NaTrxh_{SS}* son específicos hasta 63°C, mientras que para *NaTrxh_{SS}* lo son a los 72°C.

Utilizando las temperaturas de alineamiento 63°C y 72°C para *NaTrxh_{SS}* y *NaTrxh* tipo silvestre, respectivamente, se evaluó la expresión de ambas versiones del gen en pistilo de los híbridos transgénicos. La figura 19 muestra que todos los híbridos transgénicos expresan tanto a la versión tipo silvestre de *NaTrxh* como a la mutante *NaTrxh_{SS}*, a diferencia de los híbridos no transformados los cuales solo expresan a *NaTrxh* tipo silvestre. Sin embargo, a pesar de que la expresión del transgen *NaTrxh_{SS}* está dirigida por el promotor constitutivo *CAMV 35S* el cual es un promotor fuerte en dicotiledoneas, los niveles del transcrito de *NaTrxh_{SS}* en los híbridos transgénicos son menores a los observados para el gen silvestre. Lo anterior concuerda con reporte previo que mostró que en pistilos de *N. plumbaginifolia* la expresión de un gen dirigido por el promotor *CAMV 35S* es menor a la de promotores específicos de pistilo como *ChiP* de *S. lycopersicum* o el promotor de *SLG-13* de *Brassica oleracea* (Murfett y McClure, 1998).

Por otro lado, en las plantas transgénicas también se evaluó la expresión de la S-RNasa y los GM estilares (Figura 19) para asegurar que el fenotipo de rechazo o aceptación del polen que se llegue a observar se deba a la expresión de *NaTrxh_{SS}*, y no a que algún otro elemento esencial en la vía hubiera sido afectado. Como puede observarse, la presencia de *NaTrxh_{SS}* no afectó la expresión de los transcritos de los genes evaluados en 14 distintos individuos transgénicos. A pesar de este resultado, fue necesario evaluar la presencia de las proteínas ya que si alguna de ellas no se produce, las plantas son compatibles y esto podría afectar nuestras conclusiones respecto a *NaTrxh*. La figura 20 muestra la detección de todas las proteínas en 6 híbridos transgénicos. Por lo anterior, podemos atribuir el fenotipo de estas plantas únicamente a la expresión del gen mutante *NaTrxh_{SS}*.

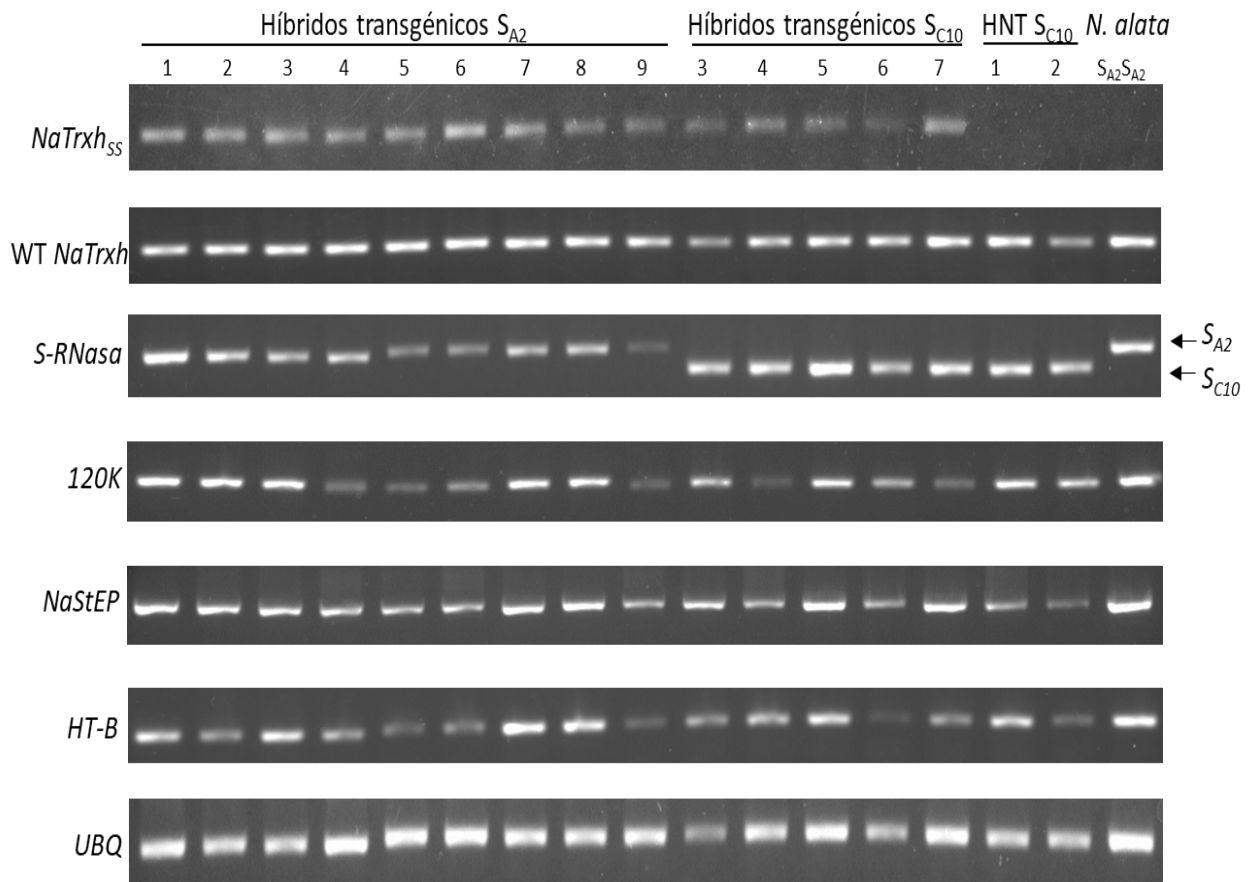


Figura 19. Expresión de *NaTrxh*, *NaTrxh_{SS}*, la *S-RNasa* y los genes modificadores estilares *S-RNasa*, *HT-B*, *120K* y *NaStEP* en pistilos de los híbridos transgénicos *S_{A2}* y *S_{C10}*. Se evaluaron 9 híbridos transgénicos *S_{A2}* (enumerados de 1 a 9) y 5 *S_{C10}* (enumerados de 3 a 7). Como se observa, todos los genes evaluados se expresan en los híbridos transgénicos. De igual manera hay expresión en dos híbridos no transformados (HNT *S_{C10}* 1 y 2), en donde el único que no se expresa es *NaTrxh_{SS}*. Ubiquitina (*UBQ*) fue utilizado como control.

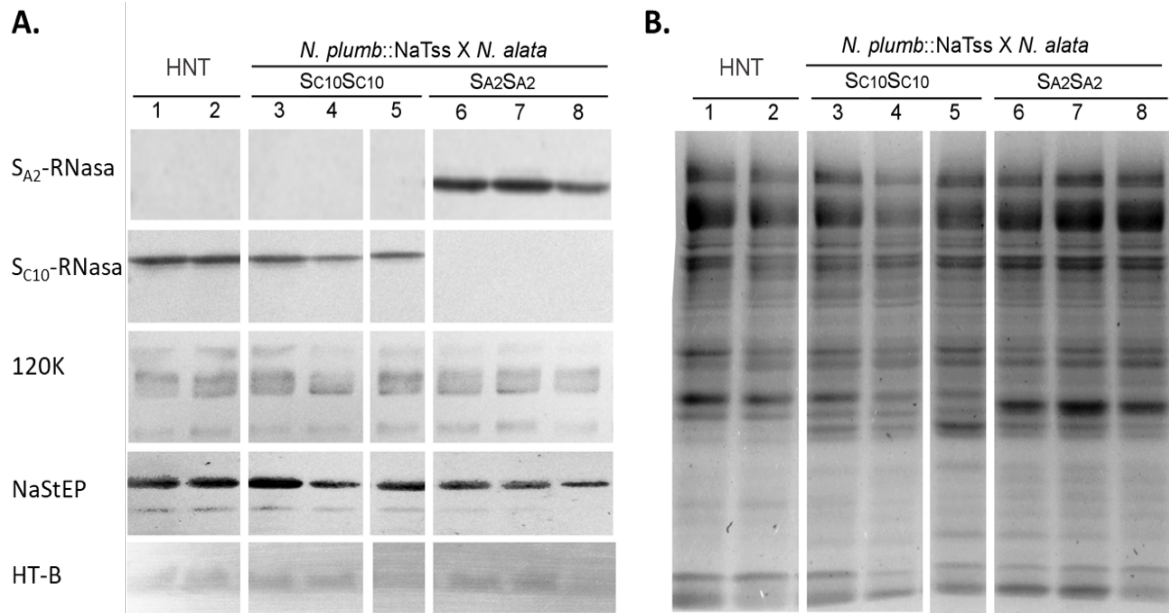


Figura 20. Inmunodetección de las proteínas estilares S-RNasa, HT-B, 120K y NaStEP, esenciales para el rechazo del polen en híbridos transgénicos que expresan *NaTrxh_{SS}*. Se utilizaron anticuerpos específicos contra las proteínas indicadas del lado izquierdo. Tanto los híbridos no transformados (HNT, plantas 1 y 2) como los híbridos que expresan *NaTrxh_{SS}* (*N. plumb::NaTrxh_{SS}* x *N. alata* S_{C10}S_{C10} (plantas 3-5) o S_{A2}S_{A2} (plantas 6-7)) muestran niveles similares de la S-RNasa, 120K, NaStEP, y HT-B. A la derecha se muestra el control de carga de proteínas totales teñidas con azul de Coomassie.

7.1.2 *NaTrxh* es esencial para el rechazo del polen alelo *S*-específico.

La participación *NaTrxh* en el mecanismo de AI se evaluó a través de cruces en los híbridos transgénicos que expresan *NaTrxh_{SS}*. Se realizaron polinizaciones con polen proveniente de *N. alata* S_{A2}S_{A2} o S_{C10}S_{C10}. Los pistilos polinizados se colectaron después de 72 horas, para este tiempo los tubos polínicos que no son rechazados ya han llegado a la base del estilo. Los depósitos de calosa que representan el crecimiento de los tubos polínicos se visualizaron ya que se pueden teñir con azul de anilina para ser observados en un microscopio de fluorescencia.

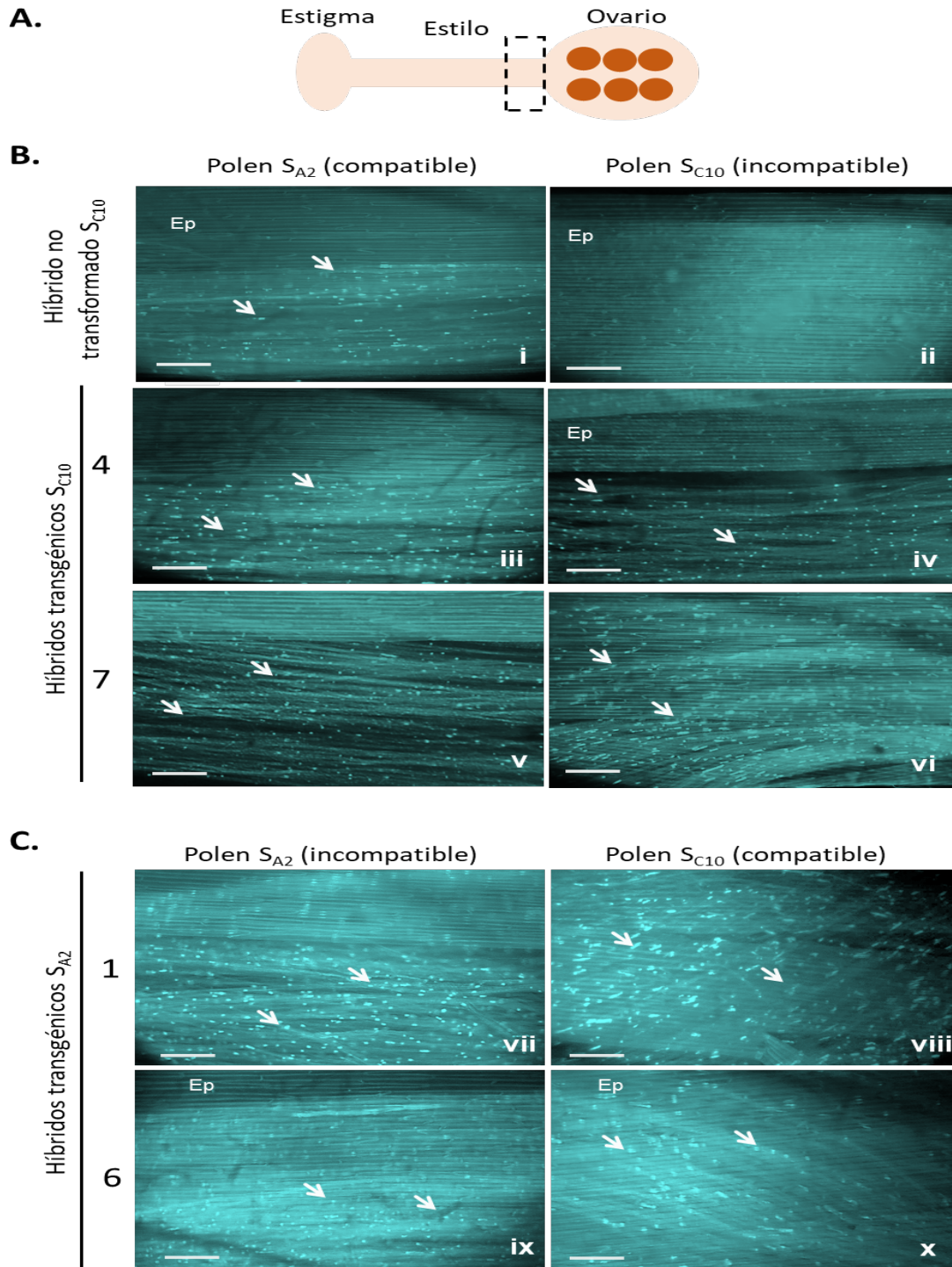


Figura 21. La expresión de *NaTrxhss* revierte el rechazo del polen en *Nicotiana*. Se observó el crecimiento de los tubos polínicos en la base del estilo como se indica en **A**. **B**. El híbrido sin transformar S_{C10} muestra un rechazo del polen alelo *S*-específico (i vs ii), pero los híbridos transgénicos S_{C10} que expresan a *NaTrxhss*, permiten el crecimiento de tubos polínicos hasta la base del estilo en ambas cruas (iii-vi). El mismo comportamiento es observado en los híbridos transgénicos S_{A2} quienes aceptan el polen compatible e incompatible (vii-x). Los tubos polínicos se señalan con flechas blancas. EP: Epidermis.

La figura 21 muestra que los híbridos no transformados (control) rechazan el polen de una manera alelo *S*-específica, ya que no se observan tubos polínicos creciendo hasta la base del estilo cuando la cruce es AI (Híbrido no transformado $S_{C10} \times N. alata S_{C10}S_0$), pero sí los hay cuando la cruce es AC (Híbrido no transformado $S_{C10} \times N. alata S_{A2}S_0$). Por el contrario, cuando los híbridos expresan *NaTrxh_{SS}*, aceptan el polen en ambas cruces lo cual significa que el mecanismo de rechazo del polen está afectado en estos individuos debido a la presencia de *NaTrxh_{SS}* (Cruzas AC: Híbrido transgénico $S_{C10} \times N. alata S_{A2}S_{A2}$ e Híbrido transgénico $S_{A2} \times N. alata S_{C10}S_{C10}$; Cruzas AI: Híbrido transgénico $S_{C10} \times N. alata S_{C10}S_{C10}$ e Híbrido transgénico $S_{A2} \times N. alata S_{A2}S_{A2}$).

Cabe recordar que los híbridos transgénicos también expresan a *NaTrxh* tipo silvestre proveniente de *N. alata*, por lo que el fenotipo esperado para el rechazo del polen debería ser intermedio. Por ello, se realizaron polinizaciones con aproximadamente 200 granos de polen para observar si había diferencias en el número de tubos polínicos que llegaron a la base del estilo en las diferentes cruces.

Primero se realizaron polinizaciones en el control sin transformar y se observó que el rechazo del polen ocurre temprano después de la polinización y se da entre el estigma y el estilo, ya que en la cruce AI sí se observa germinación de granos de polen sobre el estigma, aunque los tubos polínicos no penetran el estilo (Figura 22; Cruza AI: Híbrido tipo silvestre $S_0S_{C10} \times N. alata S_{C10}S_{C10}$).

En los híbridos transgénicos que expresan *NaTrxh_{SS}*, la cruce AI (Híbrido transgénico $S_0S_{A2} \times N. alata S_{A2}$) muestra aproximadamente la mitad de tubos polínicos creciendo a lo largo del estilo respecto a la cruce AC (Híbrido transgénico $S_0S_{A2} \times N. alata S_{C10}S_{C10}$), además, si se hace un acercamiento en la zona de la base del estilo, se aprecia que el número de tubos polínicos que llegan a este sitio es aún menor de los que se observan a la mitad del estilo (Figura 23). Lo anterior confirma que los híbridos que expresan *NaTrxh_{SS}* aceptan su propio polen pero hay algunos tubos polínicos que sí son rechazados por el pistilo, es decir, no hay una pérdida completa de la AI y esto podría deberse a la presencia de *NaTrxh* tipo silvestre.

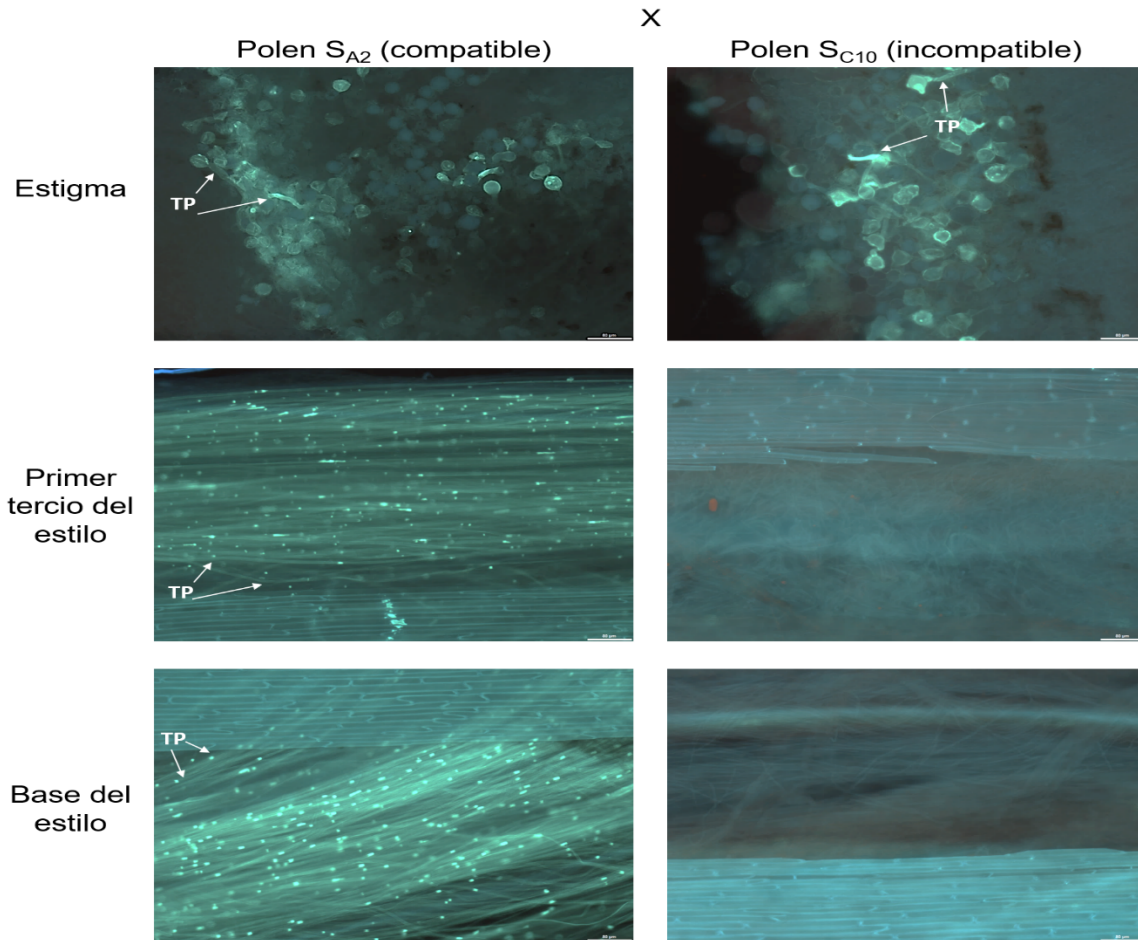


Figura 22. El rechazo del polen en los híbridos *N. plumbaginifolia* x *N. alata* ocurre entre el estigma y el estilo. Pistilos de híbridos *N. plumbaginifolia* tipo silbvestre x *N. alata* S_{C10}S_{C10}, fueron polinizados con aproximadamente 200 granos de polen S_{A2} (cruza AC, columna izquierda) o S_{C10} (cruza AI, columna derecha). Después de 72 horas de la polinización, se colectaron los pistilos, los tubos polínicos se tiñeron con azul de anilina y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia. Las fotografías fueron tomadas en el estigma, el primer tercio del estilo y en la base. Como se puede observar los granos de polen germinan en el estigma pero los tubos polínicos logran penetrar al estilo únicamente en la cruza AC. Las flechas señalan los tubos polínicos (TP), Ep: epidermis.

Un fenotipo intermedio similar se reportó en plantas transgénicas de *Brassica napus* donde se suprime la expresión de las tiorredoxinas THL1 y THL2 a través de un RNA antisentido, con el cual se logró disminuir considerablemente los niveles de mRNA sin suprimir por completo su expresión. En ese estudio, las plantas que tienen bajos niveles de expresión de THL1 y THL2, aceptan algunos tubos polínicos propios y llegan a tener una producción de semillas reducida; con ello se demuestra la participación de estas Trx en el rechazo del polen de *Brassica* (Haffani *et al.*, 2004).

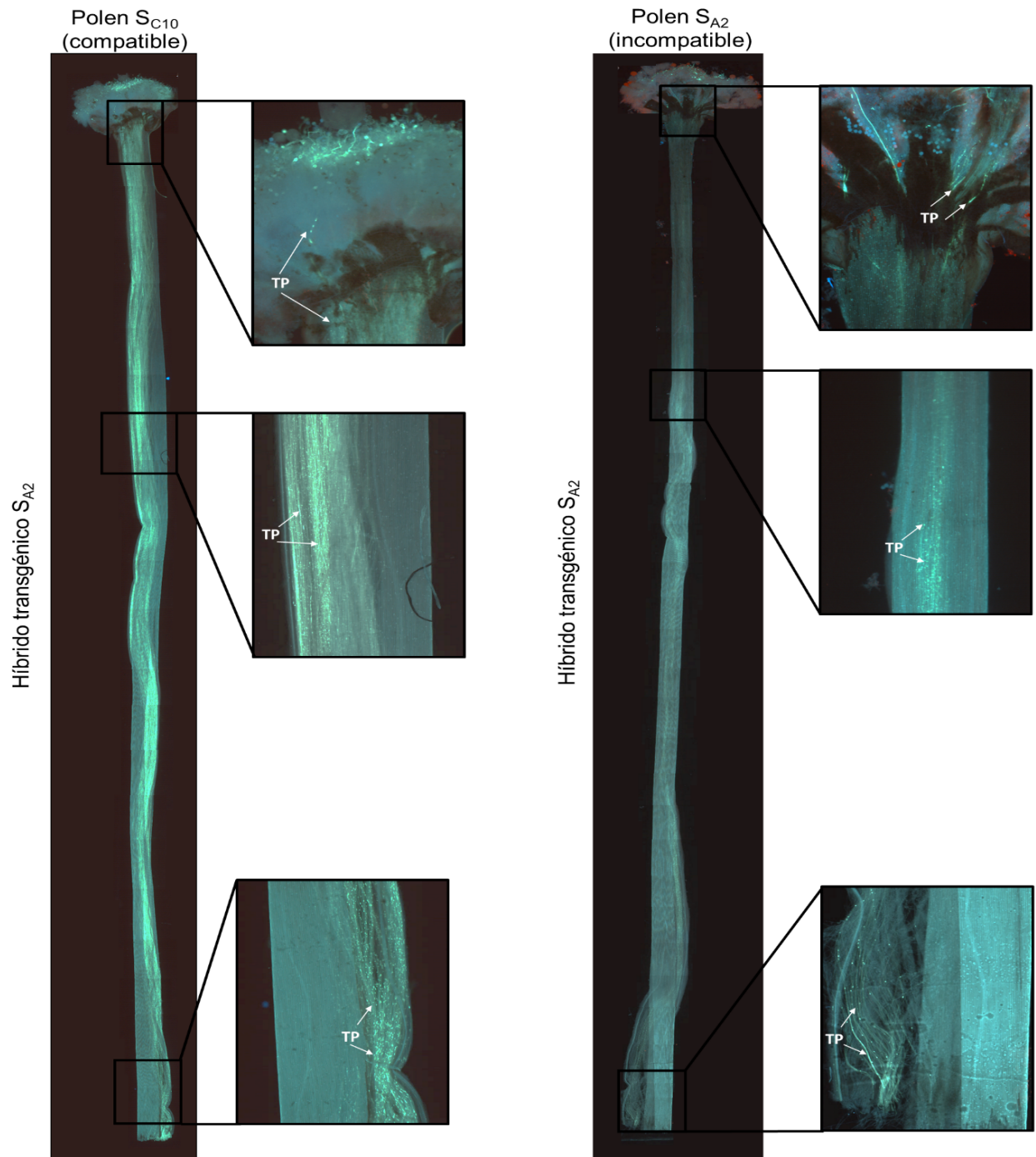


Figura 23. Los híbridos que expresan NaTrxhss pierden parcialmente la capacidad de rechazar su propio polen. Pistilos de híbridos transgénicos S_{A2} , fueron polinizados con aproximadamente 200 granos de polen S_{C10} (cruza AC) o S_{A2} (cruza AI). Después de 72 horas de la polinización, se colectaron los pistilos, los tubos polínicos se tiñeron con azul de anilina y se observaron bajo el microscopio de fluorescencia. Se tomaron fotografías a lo largo de todo el pistilo. Como se puede observar, todos los tubos polínicos que germinan en el estigma crecen a lo largo del estilo en la crucea AC, pero aproximadamente la mitad de tubos polínicos logran penetrar al estilo en la crucea AI, en donde además se observa una menor cantidad de tubos polínicos alcanzando la base del estilo. Las flechas señalan los tubos polínicos (TP).

Aunque no existe un fenotipo completo de rechazo del polen en los híbridos que expresan NaTrxh_{SS}, nuestros resultados sí dan evidencia de la participación de esta proteína en el mecanismo de AI, aunque aún falta dar una explicación bioquímica de cuáles son sus funciones. Evidencias previas sugieren que su papel está en la regulación de la actividad de la S-RNasa ya que ésta se ha identificado como blanco de NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

7.1.3 NaTrxh participa en el rechazo interespecífico del polen de *N. plumbaginifolia*.

En las flores, la polinización se da a través de insectos o por el viento, lo cual hace muy frecuente la llegada de polen de cualquier especie a un determinado pistilo. Por ello, las angiospermas también han tenido que desarrollar estrategias para impedir la fecundación por gametos de polen de diferentes especies, éstas se llaman barreras de rechazo del polen interespecíficas, cuyo objetivo es mantener el aislamiento reproductivo en las especies (Baek *et al.*, 2016). Algunas especies pueden reconocer a los granos de polen de otras especies que llegan a su superficie estigmática e impiden su hidratación, con ello, nunca hay germinación ni crecimiento de los tubos polínicos (Fiebig *et al.*, 2004). Sin embargo, entre especies que son muy cercanas y que incluso pertenecen a la misma familia, el tubo polínico sí comienza su crecimiento, en algunos casos hay rechazo en algún punto en el estilo, pero en otras ocasiones las barreras interespecíficas están afectadas y no hay rechazo. Como consecuencia se tiene la generación de híbridos no fértiles (Bedinger *et al.*, 2017).

La familia Solanaceae presenta varios mecanismos de rechazo del polen interespecífico (Bedinger *et al.*, 2017). Aunque estos mecanismos son distintos entre especies, de manera general se sigue la regla de unilateralidad AI X AC. Esta indica que el polen de especies AI (capaces de rechazar su propio polen) es aceptado por el pistilo de especies AC (aquellas que se pueden autofecundar), por ejemplo, *N. plumbaginifolia* AC acepta el polen de *N. alata* AI, tal como se obtuvieron los híbridos en el presente estudio. Sin embargo, la crucea recíproca no es posible (el polen de *N. plumbaginifolia* AC es rechazado en el pistilo de *N. alata* AI) (Lewis, 1958).

Las barreras interespecíficas de rechazo del polen han sido poco estudiadas en Solanáceas, específicamente en el género *Nicotiana* se cuenta con alguna información relevante. Se sabe que, en *N. plumbaginifolia* AC, la S-RNasa está involucrada con el rechazo del polen de *N. tabacum* AC (McClure *et al.*, 2000). Por otro lado, además de la S-RNasa, algunos GMs de AI como *HT-B* y *NaStEP* también participan en el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia* (Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2012).

Por lo anterior, se evaluó la participación de NaTrxh en el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia* y de *N. tabacum* a través de polinizaciones. Como puede observarse en la figura 24. A, los híbridos no transformados rechazan el polen de *N. plumbaginifolia* (debido a que poseen el entorno genético de AI de *N. alata*); sin embargo, los híbridos transgénicos que expresan NaTrxh_{SS}, lo aceptan ya que se observaron tubos polínicos en la base del estilo.

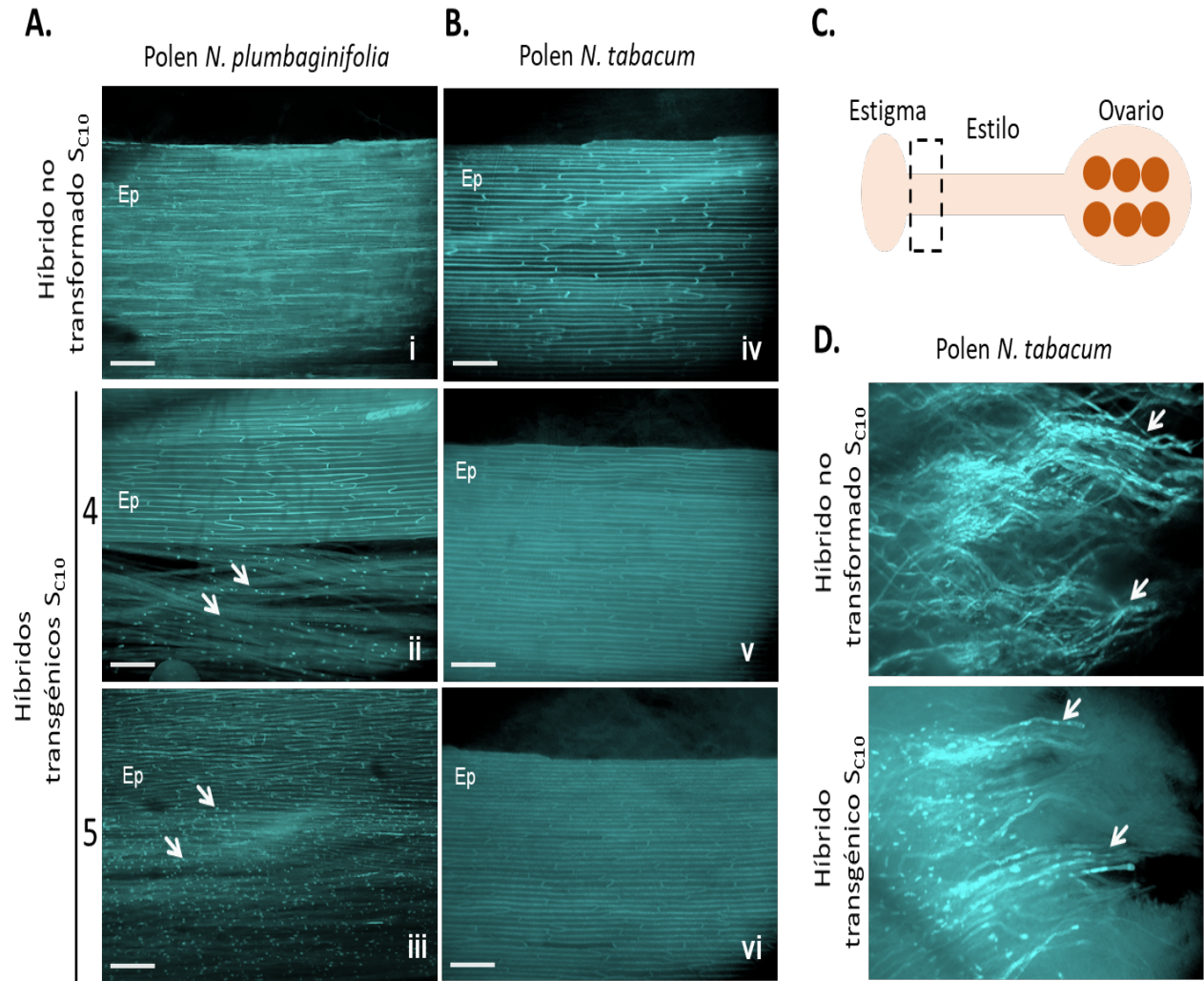


Figura 24. NaTrxh participa en el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia*, pero no en el rechazo de *N. tabacum*.
A. Los híbridos transgénicos que expresan a *NaTrxh_{SS}* aceptan el polen de *N. plumbaginifolia* (ii, iii), contrario al individuo control quien lo rechaza (i). **B.** En contraste, los híbridos transgénicos que expresan a *NaTrxh_{SS}* rechazan el polen de *N. tabacum* (v, vi) igual al control (iv). Todas las fotografías en **A** y **B** fueron tomadas en la base del estilo. **C.** Fotografías tomadas en el inicio del estilo que muestran que los tubos polínicos de *N. tabacum* sí son capaces de germinar en el estigma de los híbridos. Los tubos polínicos se señalan con flechas blancas. EP: Epidermis.

Lo anterior indica que NaTrxh participa en el rechazo del polen interespecífico de *N. plumbaginifolia* y forma parte de la vía en la que también están involucradas la S-RNasa, NaStEP y HT-B.

Aunque no se ha descrito este mecanismo en *N. plumbaginifolia*, el hecho de que varias proteínas esenciales en la AI también lo sean para el rechazo interespecífico, podría hablar de que los mecanismos bioquímicos que llevan a la inhibición del crecimiento del tubo polínico son similares. Se ha propuesto que para el caso de 120K, quien no participa en el rechazo interespecífico de *N.*

plumbaginifolia, hay otras proteínas que podrían desempeñar una función similar, por ejemplo, NaTTS o NaPELPIII quienes pertenecen a la misma familia de proteínas (Hancock *et al.*, 2005).

Respecto a *N. tabacum*, tanto en las plantas control como en las transgénicas se observó el rechazo del polen (Figura 24. B). En estas cruces sí hubo germinación de los granos de polen pero el rechazo fue casi inmediato, ya que no se detectó crecimiento de los tubos polínicos más allá del estigma (Figura 24. C). Lo anterior es contrastante con el sitio donde ocurre la AI y el rechazo interespecífico del polen de *N. plumbaginifolia*, que es en el primer tercio del estilo, lo cual sustenta que las vías de rechazo interespecífico son distintas entre *N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*.

Ya que el rechazo del polen de *N. tabacum* ocurre muy cercano al estigma y se sabe que la S-RNasa es esencial, podemos proponer que el RNA es degradado inmediatamente para evitar el crecimiento de los tubos polínicos. Sin embargo, en *N. plumbaginifolia*, la S-RNasa actuaría más tarde, quizás porque en esta vía las otras proteínas involucradas (NaStEP, HT-B y NaTrxh) actúan antes que la S-RNasa, siendo el mecanismo más similar a la AI. Probablemente, estas similitudes entre la AI y el rechazo interespecífico del polen de *N. plumbaginifolia* se deban a que esta especie es más cercana filogenéticamente a *N. alata* que *N. tabacum* (Chase *et al.*, 2003).

Por otro lado, es probable que NaTrxh participe en el rechazo interespecífico en otras especies AC de *Nicotiana*, y que el mecanismo para el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia* este conservado en varias de ellas, como es el caso del género *Solanum* donde diferentes especies comparten la misma vía para el rechazo del polen interespecífico (Bedinger *et al.*, 2017).

7.2 Proteínas involucradas en el rechazo del polen que son candidatos de reducción de NaTrxh.

Las tiorredoxinas reducen puentes disulfuro específicos en una proteína blanco, lo cual puede tener consecuencias sobre su estructura y actividad. Además, se sabe que una Trx puede tener diversos blancos (Yano *et al.*, 2001). Por lo tanto, conocer a las proteínas involucradas en el rechazo del polen que son reducidas por NaTrxh y el efecto de su reducción, contribuirá a tener una mejor comprensión de la participación de esta tiorredoxina en la AI.

De acuerdo con resultados previos del laboratorio, hay dos candidatos que son reducidos por NaTrxh: la S-RNasa y las proteínas del complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.

7.2.1 El complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII.

Como se describió anteriormente, las proteínas estilares S-RNasa, 120K, NaTTS y NaPELPIII forman un complejo del cual aún se desconoce si tiene alguna función para el rechazo del polen (Cruz-García *et al.*, 2005). De las proteínas que conforman este complejo, NaTrxh interactúa con

la S-RNasa reduciéndola *in vitro*, aunque no se ha evaluado el efecto de dicha modificación (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Las glicoproteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII se caracterizan por tener extremos C-terminal ricos en Cys (Cruz-García *et al.*, 2005). Estas cisteínas podrían formar puentes disulfuro intra o intermoleculares que estabilicen el complejo en el estilo; sin embargo, una vez dentro del tubo polínico, cada proteína desempeña una función distinta y por lo tanto el complejo debería disociarse. Con esto en mente, se decidió evaluar si NaTrxh reduce a estos complejos y modifica su estructura.

Para ello se purificaron los complejos a partir de pistilos de *N. alata*. El complejo contiene a NaTTS, quien tiene una masa de 38 KDa, pero debido a su modificación con distintas cantidades de arabinogalactano, tiene una migración que va desde los 50 hasta los 100 kDa en un SDS-PAGE; a NaPELPIII, de 78 kDa y a la glicoproteína 120K de 120 kDa (Cruz-García *et al.*, 2005). El complejo se incubó con NaTrxh recombinante purificada (para evaluar su interacción), con NaTrxh más NTR y NADPH (para evaluar la reducción), o con DTT. Posteriormente, se realizó una electroforesis en doble dimensión en donde la primera separación fue en un gel nativo y la segunda fue un gel desnaturizante (Ver figura 14), para finalmente detectar la presencia de NaTrxh y las proteínas del complejo con anticuerpos específicos.

En el experimento, dado que la primera dimensión es una electroforesis nativa, si las proteínas están en complejo migran juntas; en este caso, dado que el complejo es muy grande, las proteínas migran muy poco en el gel. Sin embargo, en la segunda dimensión que es desnaturizante, las proteínas se separarán de acuerdo a su masa. Como se muestra en la figura 25 (i-v) las proteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII presentan este patrón de migración característico de proteínas en complejo, lo cual ya había sido observado previamente por Cruz-García *et al.* (2005). La S-RNasa también muestra este patrón de migración (proteína detectada del lado izquierdo de la membrana, indicada con flecha negra), lo que significa que forma parte del complejo; sin embargo, también presenta una movilidad distinta (proteína detectada del lado derecho de la membrana, indicada con flecha roja), la cual es proteína que no formó parte del complejo, ya que migró separada de este en la primera dimensión (Figura 25, i). Este resultado ya había sido reportado previamente por Cruz-García *et al.* (2005).

El patrón de migración de la S-RNasa también se observó para NaTrxh (Figura 25, v). Esto puede tener dos explicaciones: una es que una fracción de NaTrxh forme parte del complejo y la otra no interactúe con ninguna de ellas; o bien, que aquella que no interactúa con todo el complejo sólo interactúe con la S-RNasa y por ello presentan una movilidad similar durante la electroforesis.

A pesar de que NaTrxh migra junto con todas las proteínas del complejo no es posible asegurar que esta asociación ocurra *in vivo*; ya que NaTrxh interactúa con gran afinidad tanto con la S-RNasa como con 120K, es posible que una de estas interacciones la atraiga hacia el complejo en las condiciones en las que se evaluó.

La S-RNasa, 120K, NaTTS y NaPELPIII entran al tubo polínico aunque se desconoce la vía de ingreso. A la fecha solo se conoce que el ingreso de la S-RNasa de *Malus domestica* al citoplasma del tubo polínico es mediado por el transportador MdABCF (Meng *et al.*, 2014), pero se desconoce para el resto de las proteínas del complejo. Por otro lado, Cruz-García *et al.* (2005) proponen que las proteínas S-RNasa, 120K, NaTTS y NaPELPIII ingresan en forma de complejo lo cual puede ser a través de endocitosis. Si NaTrxh forma parte de este complejo, esta podría ser también su vía de ingreso al tubo polínico.

Cuando el complejo fue incubado con NaTrxh más NTR y NADPH (Figura 25, vi-ix), las proteínas presentaron una movilidad similar a cuando no hay reducción (Figura 25, i-iv), indicando que NaTrxh no modifica la estructura del complejo. Sin embargo, este complejo sí se estabiliza por puentes disulfuro, dado que al ser reducido con DTT, las proteínas cambian su movilidad electroforética en la segunda dimensión (Figura 25, x-xiii).

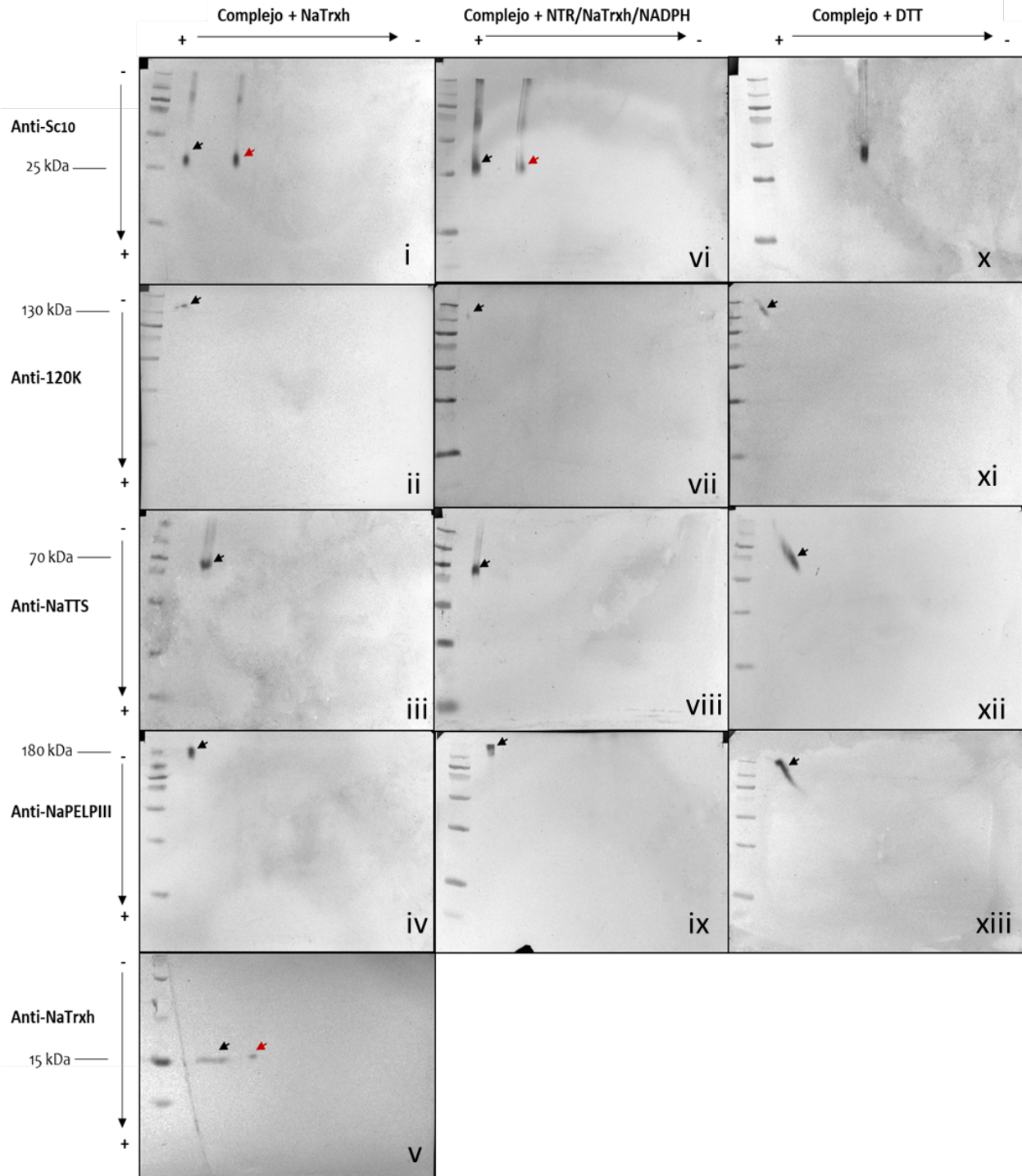


Figura 25. Inmunodetección de las proteínas del complejo SC_{10} -RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII y de NaTrxh en el sistema de dos dimensiones. Cuando se incubaron las proteínas del complejo con NaTrxh (i-v), todas mostraron una movilidad electroforética característica de proteínas en complejo, pero la S-RNasa y NaTrxh presentaron además un corrimiento que indica que una cantidad de ellas están fuera del complejo. La movilidad de las proteínas del complejo no se ve alterada cuando se reducen con NaTrxh (vi-ix); sin embargo, el complejo si se disocia después de la reducción con DTT (x-xiii). n = 2 (réplicas biológicas).

Aún con lo anterior, no se descarta la posibilidad de que haya ocurrido reducción por NaTrxh dentro del complejo, pero de acuerdo con los resultados, ésta no provoca su disociación. De hecho, se sabe que NaTrxh reduce a la S-RNasa *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) y estando dentro del complejo también podría reducirla.

7.2.2 La S-RNasa como blanco de NaTrxh.

Previamente en nuestro grupo se encontró que NaTrxh, además de interactuar con la S-RNasa, la reduce *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). No obstante, no se ha estudiado a detalle la reducción. En el presente trabajo se evaluó cuáles son los puentes disulfuro que son reducidos en la S_{C10}-RNasa.

Las S-RNasas pertenecen a la familia de ribonucleasas T2, de las cuales el miembro más estudiado es la RNasa Rh de *Rhizopus niveus* (Deshpande y Shankar, 2002). A la fecha se ha resuelto la estructura cristalográfica de la S_{F11}-RNasa de *N. alata* (Ida *et al.*, 2001); también se han realizado algunos estudios bioquímicos para conocer la posición tanto de los puentes disulfuro como de los sitios de glicosilación de distintos haplotipos de S-RNasas de solanáceas (Oxley y Bacic, 1996; Parry *et al.*, 1997; Parry *et al.*, 1998).

En todas las S-RNasas estudiadas se ha visto que hay 9 o 10 residuos de Cys y solo se forman cuatro puentes disulfuro (Oxley y Bacic, 1996). La comparación de las estructuras primarias de las S-RNasas muestra que la posición de las Cys involucradas en la formación de puentes disulfuro y de las Cys libres está conservada (Anderson *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1990; Brisolara-Corrêa *et al.*, 2015).

Para la identificación de los puentes disulfuro reducidos por NaTrxh, se trató a la S_{C10}-RNasa purificada con NaTrxh + NTR + NADPH; como control se utilizó a la S_{C10}-RNasa sin agente reductor o reducida con TCEP. Los sulfhidrilos expuestos después de la reducción se marcaron con NEM y se identificaron mediante espectrometría de masas en el Centro de Proteómica de la Universidad de Columbia-Missouri.

Los puentes disulfuro en la S_{C10}-RNasa son: Cys16-Cys21, Cys45-Cys94, Cys155-Cys185 y Cys168-Cys179, mientras que los residuos Cys77 y Cys95 están libres (Figura 26). Los resultados mostrados en la Tabla 3 confirman que el residuo Cys77 no forma ningún puente disulfuro, ya que se encontró con la modificación con NEM en la S_{C10}-RNasa con los tres tratamientos. La Cys95 tampoco forma ningún puente disulfuro pero no fue identificada con la modificación posiblemente debido a que no se encontró accesible al NEM. Cuando la S_{C10}-RNasa fue reducida con NaTrxh se detectó que los residuos Cys155 y Cys185 se modificaron con NEM, indicando que este puente disulfuro es reducido por NaTrxh *in vitro*. Por otro lado, TCEP redujo todos los puentes disulfuro presentes en la S_{C10}-RNasa ya que es un agente reductor no específico.

S _{C10} -RNasa	AFEYMQLVLQWPTAFCHHTTPCKRI-PNNFTIHGLWPDNVSTTLNYCAAKENFKNIEDDTK	59
S _{F11} -RNasa	DFEYLQVLVTPASF ^C YANH ^C CERIAPNNFTIHGLWPDNVKTRLHNC ^C KPKPTYSYFTG-KM	59
S _{C10} -RNasa	KDDLKRWPDLT ^T TAETY ^C KQHQNFWRHEYNKHGK ^{CC} SESYNREQYFDLALMLKDKFDLLS	119
S _{F11} -RNasa	LNDLDKHWMQLKFEQDYGRTEQPSWKYQYIKHGS ^{CC} QKRYNQNTYFGLALRLKDKFDLLR	119
S _{C10} -RNasa	SLRNHGIIIPGRGMKYTVQKINSTIKKITQGYPNLS ^C ---TKGIMELVEIGI ^C FDSMVKNV	176
S _{F11} -RNasa	TLQTHRIIPGSS--YTFQDIFDAIKTVSQENPDIK ^C AEVTKGTPELYEIGI ^C FTPNADSM	177
S _{C10} -RNasa	INC ^C PHPKT ^C KPTGSNEIKFP	196
S _{F11} -RNasa	FRCPQSDT ^C DKTAKVLFRR-	196

C-C Puentes disulfuro

Figura 26. Alineamiento entre la S_{F11}- y la S_{C10}-RNasa. Se indican los puentes disulfuro conservados y las Cys libres para la S_{C10}-RNasa (flechas).

Tabla 3. Reducción *in vitro* de la S_{C10}-RNasa por NaTrxh. Los resultados se basan en el porcentaje de Cys modificadas con NEM en la S_{C10}-RNasa sin reducir, reducida con TCEP o con NaTrxh (+ NADPH + NTR). La Cys77 (remarcada en azul) no forma puente disulfuro. NaTrxh redujo específicamente en puente formado entre las Cys155 y Cys185 (remarcada en rojo).

Péptido	Posición	Modificación con NEM		
		No reducida	TCEP	NaTrxh
AFEYMQLVLQWPTAFCHHTTPCK	Cys-16	-	+	-
	Cys-21	-	+	-
PDNVSTTLNYCAAKENFKNIE	Cys-45	-	+	-
WPDLT ^T TAETY ^C KQHQNFWRHE	Cys-77	+	+	+
WRHEYNKHGKCCSESYNREQY	Cys-94	-	+	-
	Cys-95	-	+	-
KITQGYPNLS ^C TKGIMELVEI	Cys-155*	-	+	+
GIMELVEIGICFDSMVKNVIN	Cys-168	-	+	-
FDSMVKNVINCPHPKTCKPTG	Cys-179	-	+	-
NVINCPHPKT ^C KPTGSNEIKF	Cys-185*	-	-	+

La reducción del puente disulfuro Cys155-Cys185 por NaTrxh, podría ocurrir también *in vivo*, ya que ambas proteínas se encuentran en el pistilo, así como también el NADPH y la enzima NTR; sin embargo, esto debe estudiarse a detalle. Por otro lado, el hecho de que la reducción sea específica para solo un puente disulfuro, indica que podría ser un tipo de regulación de alguna de las funciones de la S-RNasa. De hecho, de manera general, la reducción específica de puentes

disulfuro por Trxs puede activar o desactivar a una proteína, o bien, modificar su estructura para exponer u ocultar algunos sitios de reconocimiento para otras proteínas (Gelhaye *et al.*, 2004b).

7.3 Posible participación de NaTrxh en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

La S-RNasa participa en el rechazo del polen desempeñando diversas funciones. En primer lugar, es la determinante de especificidad (McClure *et al.*, 1989). Otra función está relacionada con la dinámica del citoesqueleto, ya que se ha visto que su interacción con los filamentos de actina provoca su despolimerización (Roldán *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018).

Por otro lado, la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa es de gran interés, ya que la degradación del RNA del tubo polínico es uno de los principales eventos que provoca su muerte en una cruz incompatible (McClure *et al.*, 1990). La S-RNasa ingresa a los tubos polínicos independientemente de su haplotipo *S* (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), pero los tubos compatibles resisten a la degradación de su RNA, proceso que aún no se comprende en su totalidad. Los dos modelos propuestos para el rechazo del polen se enfocan en explicar cómo el tubo polínico evade la actividad de la ribonucleasa cuando la cruz es compatible (Goldraij *et al.*, 2006; Kubo *et al.*, 2010).

Dada la importancia de la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la reducción específica de la S-RNasa por NaTrxh sobre dicha actividad.

7.3.1 La reducción específica de la S-RNasa por NaTrxh provoca un incremento en su actividad de ribonucleasa.

Se realizaron ensayos de actividad con la S_{C10}-RNasa sin reducir, reducida con DTT, NaTrxh, NaTrxh_{SS} (mutante en las Cys catalíticas), y la Trx de *E. coli* como control. Como se observa en la figura 27, la S_{C10}-RNasa tiene una actividad basal que disminuye considerablemente al ser reducida con DTT, lo que podría estar ocurriendo porque este agente reductor podría desnaturalizar a la proteína si reduce sus cuatro puentes disulfuro, o si reduce algún puente disulfuro cercano al sitio activo, afectando severamente su actividad catalítica.

La reducción con NaTrxh tiene el efecto contrario al DTT, ya que provoca un aumento de siete veces en la actividad de la S_{C10}-RNasa (Figura 27). Como se señaló anteriormente, la reducción es específica de un puente disulfuro (Cys155-Cys185) y quizás esta ruptura provoca que la S-RNasa tenga una conformación más favorable para la catálisis.

El tratamiento con NaTrxh_{SS}, quien no tiene actividad catalítica, corrobora que el incremento en la actividad de la S_{C10}-RNasa se debe a la reducción y no es consecuencia de algún tipo de interacción entre ambas proteínas, ya que la S_{C10}-RNasa tratada con NaTrxh_{SS} no mostró efecto en su actividad. De igual manera, en el tratamiento con la Trx de *E. coli*, la S-RNasa no tuvo

incremento es su actividad. Esta Trx es más pequeña que NaTrxh ya que sus extremos N y C-terminal son más cortos y esto podría significar que no interacciona con la S-RNasa, tal como ocurre en la mutante de NaTrxh que carece de los extremos N y C-terminal (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Por lo tanto, NaTrxh es la única de las Trxs evaluadas que puede reducir específicamente el puente disulfuro Cys155-Cys185 en la S_{C10}-RNasa (Figura 27).

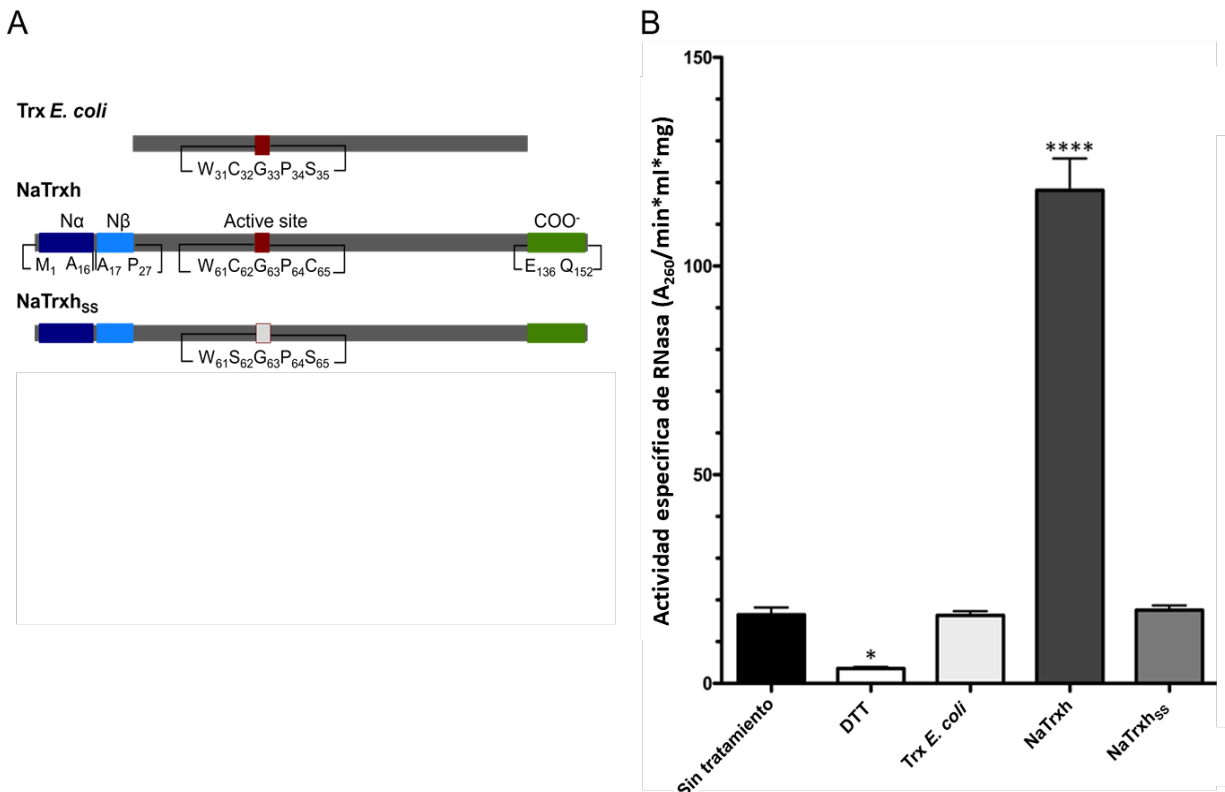


Figura 27. NaTrxh reduce a la S-RNasa e incrementa su actividad. Se midió la actividad de la S_{C10}-RNasa sin tratamiento o después de la reducción con DTT, con la Trx de *E. coli*, con NaTrxh silvestre y la mutante NaTrxh_{SS}, las cuales se esquematizan en **A**. **B**. El DTT redujo la actividad de la S-RNasa cuatro veces mientras que NaTrxh aumentó la actividad de ribonucleasa siete veces. Por su parte, NaTrxh_{SS} y la Trx de *E. coli* no tuvieron efecto en la actividad. Las reacciones con las Trxs se realizaron con NTR y NADPH. Las barras indican el error estándar, n = 3 (réplicas biológicas). * y **** indican diferencias significativas a una probabilidad de 0.05 y 0.00001, respectivamente.

Como se mencionó en el apartado anterior, la S-RNasa forma parte de un complejo con las proteínas 120K, NaTTS y NaPELPIII. Se ha propuesto que su función es facilitar el ingreso estas proteínas al tubo polínico ya que todas desempeñan una función dentro de éste; sin embargo, una vez que se localizan en el citoplasma del tubo polínico la S-RNasa, 120K, NaTTS y NaPELPIII podrían disociarse para llevar a cabo sus funciones. Por ello, la S-RNasa podría estar disponible para ser reducida por NaTrxh, como se observó *in vitro*. Por otro lado, en caso de que el complejo no se disociara, si la S-RNasa o su región de interacción con NaTrxh están expuestas al solvente,

la reducción también podría ocurrir. Sin embargo, si la reducción de la S-RNasa por NaTrxh ocurre *in vivo*, y ésta provoca un incremento en la actividad, lo más probable es que ocurra cuando es necesaria la degradación del RNA, para lo cual la S-RNasa debería estar fuera del complejo.

7.3.2 Cambios estructurales en la S-RNasa que permiten el incremento en su actividad de ribonucleasa.

La estructura 3D de la S_{F11}-RNasa se resolvió mediante cristalografía de rayos X (Ida *et al.*, 2001). Tomando esta estructura como molde, se generó un modelo por homología de la S_{C10}-RNasa para visualizar la posición del puente disulfuro blanco de reducción de NaTrxh (Cys155-Cys185).

En la figura 28 se observa la conservación de los cuatro puentes disulfuro, dos de ellos, Cys16-Cys21 y Cys45-Cys94 en la S_{C10}-RNasa se encuentran muy cerca del sitio activo de la enzima. Se ha reportado que estos puentes ayudan a los residuos involucrados en la catálisis (His31 e His91) a mantenerse en las distancias correctas para la reacción y son tan importantes que no solo están conservados en las S-RNasas, sino que también lo están en todas las RNasas de la familia T2 (Irie, 1999). El hecho de que ninguno de estos puentes haya sido reducido por NaTrxh explica porque la S-RNasa puede degradar al RNA antes y después de ser reducida específicamente por NaTrxh.

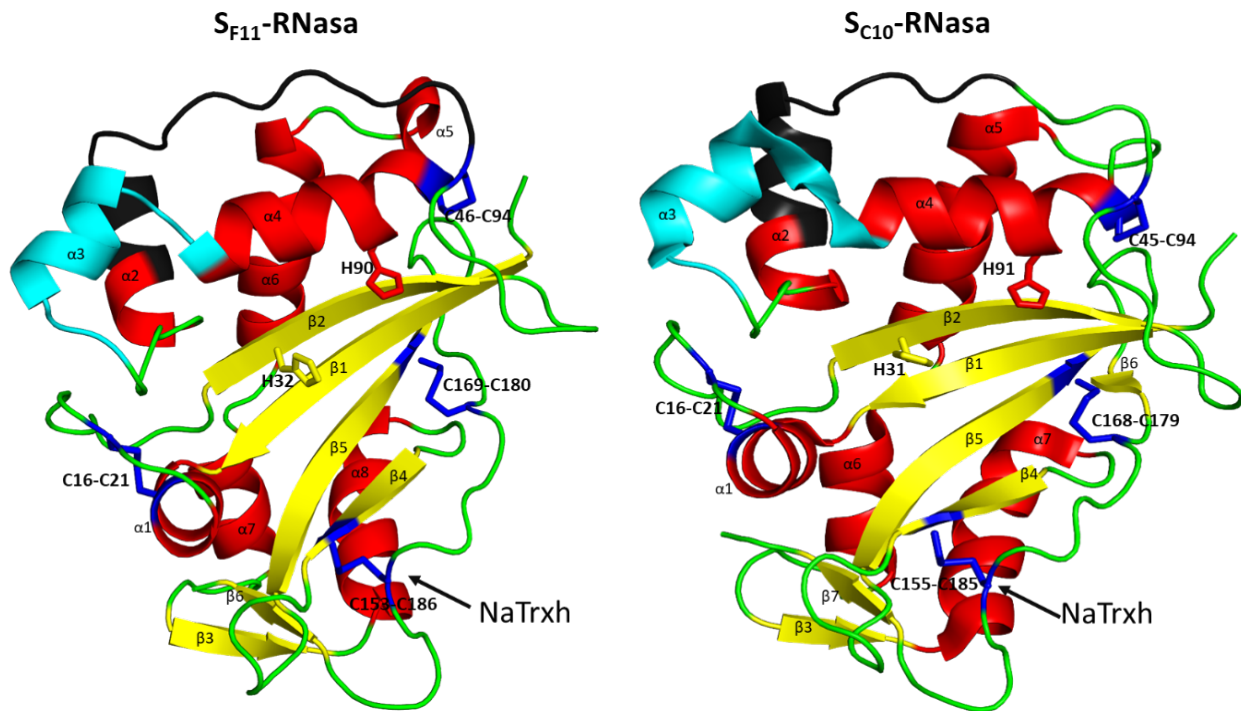


Figura 28. Estructura tridimensional de la S_{F11}-RNasa (PDB: 1I00) y modelo de la S_{C10}-RNasa. En azul cielo y negro se muestran las dos regiones hipervariables, los cuatro puentes disulfuro conservados se indican en azul y se muestran las cadenas laterales de las 2 His que conforman el sitio catalítico. La flecha negra señala el puente disulfuro blanco de NaTrxh.

Comparando las estructuras tridimensionales de la S_{C10}-RNasa y la S_{F11}-RNasa (Figura 28) se observa que la estructura de la proteína alrededor del puente disulfuro blanco de NaTrxh también está muy conservada. Este puente, el cual está formado por las Cys155 y Cys185 de la S_{C10}-RNasa (Cys153 y Cys186 en la S_{F11}-RNasa), une a la hebra β 4 de la S-RNasa con el asa formada después de la hebra β 5. Aunque éste no se encuentra manteniendo los aminoácidos del sitio activo, su ruptura podría afectar la actividad de la ribonucleasa quizás a través de la interacción, el posicionamiento o la liberación de su sustrato, el RNA. Para comprender los cambios conformacionales se requiere obtener la estructura tridimensional de la S-RNasa con y sin el puente disulfuro Cys155-Cys185 y observar las diferencias estructurales. Por el momento sólo se ha trabajado *in silico* debido a las dificultades para obtener suficiente cantidad de esta proteína para su cristalización, la cual es citotóxica para *E. coli* y no se ha logrado sobreexpresar.

Se simuló la ruptura del puente disulfuro Cys153-Cys186 de la S_{F11}-RNasa y se observó que hay cambios conformacionales muy leves en la estructura de la proteína, esto es debido al movimiento de la hebra β 4, el cual no es muy evidente (Figura 29. A y B). Este ligero movimiento afecta poco a las hebras que forman parte del “core” de la S-RNasa (β 1, β 2 y β 5) y provoca un cambio en la orientación de las His catalíticas, especialmente en la His32 que se localiza sobre una de estas hebras (β 2).

Para comprender este cambio conformacional en el sitio activo de la S-RNasa, se completó la simulación en presencia de un dinucleótido CC como sustrato (Figura 29. C y D). El dinucleótido se simuló tomando como molde. En esta simulación y de acuerdo con el mecanismo catalítico de la RNasa tipo A (Figura 30, Irie *et al.*, 1994). En la S_{F11}-RNasa los residuos His32 y Lys90 se encuentran cargados mientras que la His91 está protonada en el N δ . El supuesto complejo enzima-sustrato se identificó por el posicionamiento correcto de los residuos catalíticos cerca de los átomos que influyen durante la catálisis. Tanto en la S_{F11}-RNasa formando el puente disulfuro Cys153-Cys186, como en la proteína reducida, se encontraron conformaciones favorables en donde la His32 e His91 están a las distancias adecuadas para efectuar la catálisis.

En las figuras 29 E y F se muestra la estructura del dinucleótido CC y algunos posibles residuos implicados en la catálisis en ambas versiones de la S_{F11}-RNasa. Se propone que la His32 protona el 3'OH del nucleótido saliente mientras que la His91 forma un puente de hidrógeno con el 2'OH y promueve su activación como nucleófilo para que ataque al fósforo del enlace fosfoéster. La Lys90 también forma puentes de hidrógeno tanto con el fosfato como con el 2'OH del nucleótido saliente. Por otro lado, el Glu165 se une a la His32 y promueve su activación. A pesar de que los cambios estructurales observados después de la ruptura del puente disulfuro Cys153-Cys183 son sutiles, estos se propagan a toda la estructura de la S_{F11}-RNasa.

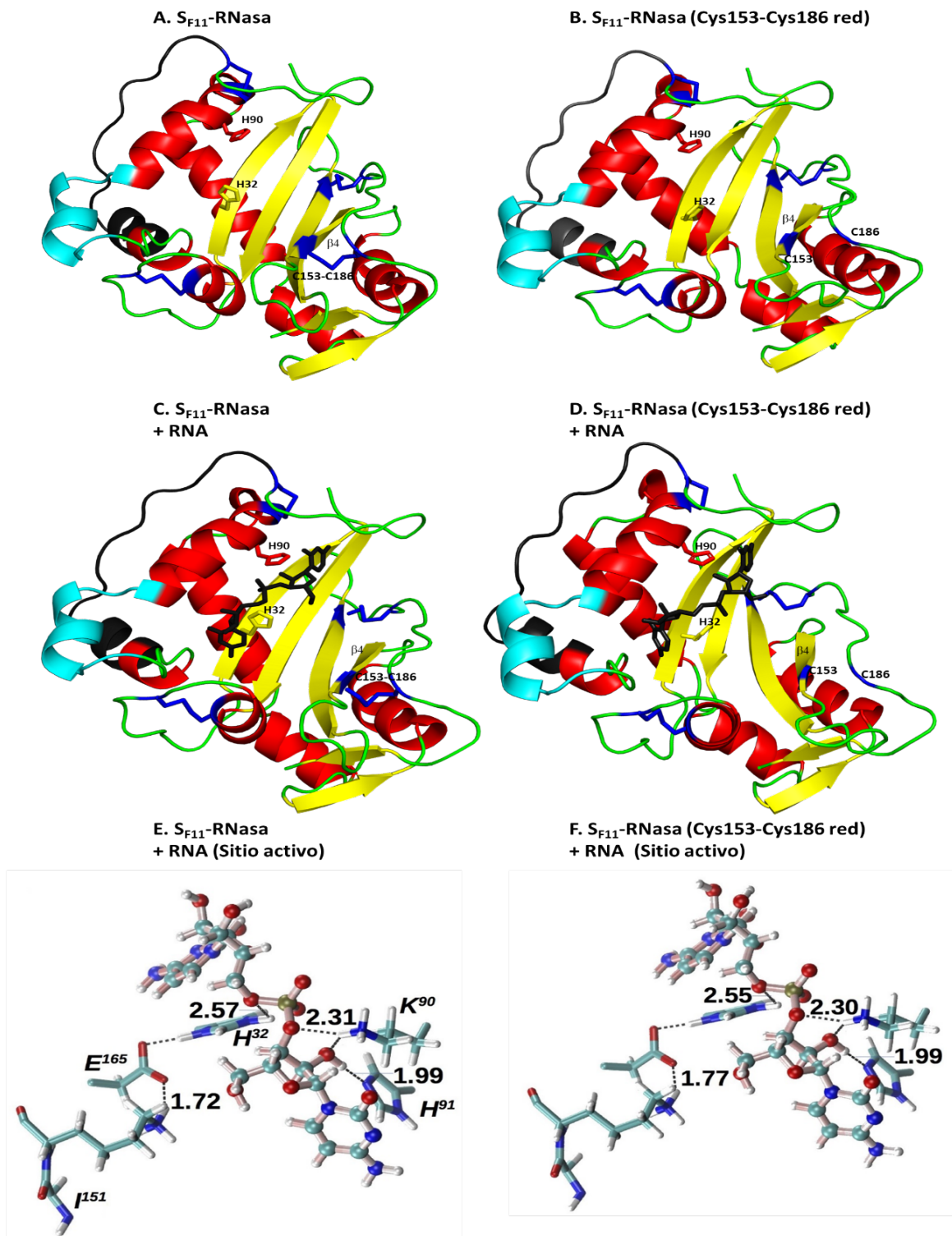


Figura 29. Cambios conformacionales en la S_{F11} -RNasa derivados de la ruptura del puente disulfuro Cys153-Cys186. Se muestra la estructura de la S_{F11} -RNasa sin reducir (A), reducida en el puente disulfuro Cys153-Cys186 (B) y en complejo con un dinucleótido CC (C y D el RNA se muestra en negro). Algunos aminoácidos del sitio activo de la S_{F11} -RNasa (H32, K90, H91 y E165) se ven afectados sutilmente debido a la ruptura del puente disulfuro Cys153-Cys186 (E y F).

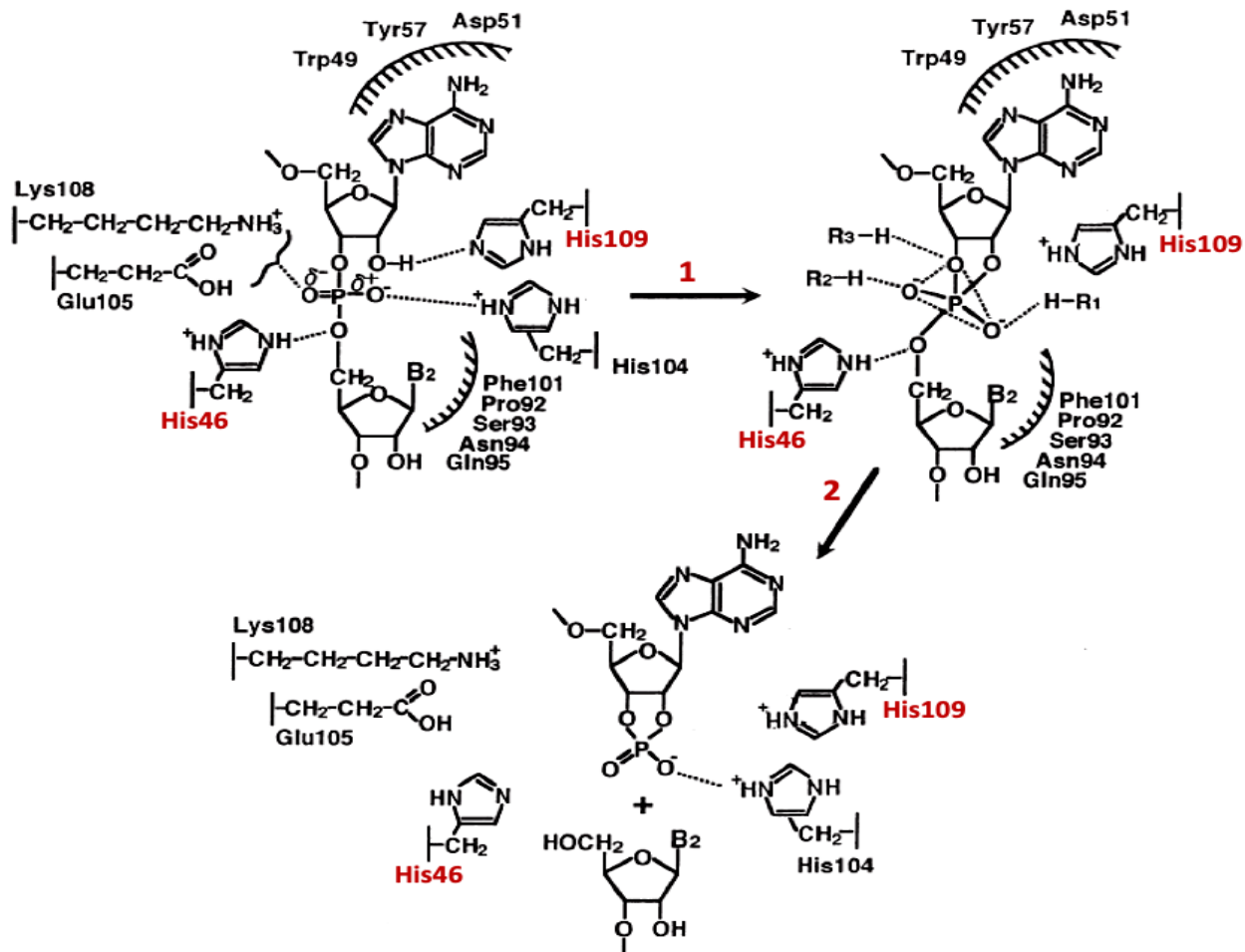


Figura 30. Mecanismo catalítico de las RNasa tipo A. Los aminoácidos catalíticos son la His46 y la His 109. En el primer paso de la degradación del RNA (1), la His109 actúa como catalizador base removiendo el hidrógeno de la posición -2'OH de la ribosa, mientras que la His46 participa en la reacción como un catalizador ácido que interacciona con el oxígeno 5' del enlace fosfodiéster que será escindido y actúa como donador de protones para el nucleótido que será liberado. En el segundo paso de la reacción (2), el cual consiste en la hidrólisis del RNA, la función de los dos aminoácidos catalíticos se revierte y ahora la His46 funciona como catalizador base mientras que la His109 es un catalizador ácido. Todos los demás aminoácidos participan en la estabilización del RNA (Tomado de Irie *et al.*, 1994).

A pesar de que se observan algunas diferencias en el sitio activo de la enzima, no se tiene suficiente información para asegurar que estos ligeros cambios son los que provocan el aumento en la actividad de la S-RNasa después de ser reducida por NaTrxh. Dado que no se ha obtenido una estructura de una RNasa con un fragmento más grande de RNA, no se evaluó la posible interacción entre el sustrato con regiones alejadas del sitio activo de la enzima; por ejemplo, los residuos localizados en la hebra β_4 , los cuales son estabilizados por el puente disulfuro Cys153-Cys186. Como se mencionó anteriormente, el aumento en la actividad de la S-RNasa podría no estar relacionado con la catálisis, sino con la entrada o liberación del sustrato.

No obstante, no hay duda de que hay una regulación positiva en la actividad de la S-RNasa al ser reducida específicamente por NaTrxh *in vitro* y una evidencia que apoya estos hallazgos es la presencia de una mutante natural en *Solanum peruvianum* (antes *L. peruvianum*), la S₃-RNasa que no forma este puente disulfuro debido a una mutación en uno de los residuos involucrados (sustitución de Asn en la Cys185 de la S₃-RNasa). Esta mutante sí tiene actividad; sin embargo, cuando la Cys150 que está libre es bloqueada con iodoacetato, la actividad de ribonucleasa desciende 80% (Parry *et al.*, 1997). En este ejemplo, la pérdida de la actividad cuando se bloquea a la Cys150 podría deberse a que la presencia del iodoacetato impide de alguna manera la interacción con el RNA. Aunque aún no se ha estudiado a detalle esta mutante, estos resultados revelan la importancia de los aminoácidos cercanos al puente disulfuro que se reduce en la S-RNasa por NaTrxh.

7.3.3 La interacción a través del dominio N-terminal de NaTrxh con la S-RNasa es esencial para la reducción.

NaTrxh pertenece a las Trxs tipo h subgrupo 2 (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Su clasificación dentro de este grupo se debe a la presencia de un extremo N-terminal más largo, respecto a las demás Trxs; pero en NaTrxh también el extremo C-terminal es más extenso. Previamente, se definieron tres dominios en NaTrxh, dos hacia el N-terminal (N α y N β) y uno en el C-terminal. La función de estos fue evaluada y se observó que N β media la secreción de NaTrxh hacia el espacio extracelular. Por otro lado, todos ellos participan en la interacción de esta Trx con la S-RNasa, siendo el dominio C-terminal el que presenta una mayor afinidad por la ribonucleasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Las extensiones presentes hacia el N y C-terminal de NaTrxh podrían estar involucradas con la reducción de la S-RNasa. Una evidencia que apoya esta hipótesis es que la Trx de *E. coli*, quien carece de estas extensiones, no fue capaz de activar a la S-RNasa (Figura 27). Para abordar lo anterior, se utilizaron versiones de NaTrxh que carecían de estos dominios para reducir a la S_{C10}-RNasa y medir su actividad. Las proteínas mutantes generadas fueron NaTrxh Δ N α (carece del dominio N α , desde la Met1 hasta la Ala16) NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (carece del extremo N terminal completo, desde la Met1 hasta la Pro27) y NaTrxh Δ COO (carece del dominio C-terminal desde el Glu136 hasta la Gln₁₅₂). La mutante NaTrxh Δ N β no se pudo obtener debido a que después de su sobreexpresión, la proteína es insoluble, dificultando su purificación. El mismo comportamiento para esta mutante fue observado previamente (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), llevando a proponer que el dominio N β también participa en la estabilidad de la proteína.

Los resultados mostraron que cuando NaTrxh carece únicamente del dominio N α , sí provoca el aumento en la actividad de la S_{C10}-RNasa, pero no al mismo nivel que la proteína completa. Sin embargo, cuando NaTrxh carece de ambos dominios hacia el extremo N-terminal, no hay ningún efecto en la actividad de la S-RNasa. Retomando los resultados de Ávila-Castañeda *et al.* (2014), la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh se debilita cuando se elimina el dominio N α de NaTrxh,

y lo hace aún más cuando se elimina también el Nβ. Por lo tanto, la falta de la interacción a través del extremo N-terminal de NaTrxh, especialmente la del dominio Nβ, puede ser la clave de que esta proteína no reduzca a la S-RNasa (Figura 31).

Por otro lado, la mutante que carece del dominio C-terminal tiene el mismo efecto sobre la S_{C10}-RNasa que la proteína completa, es decir, la reduce y activa (Figura 31). Previamente se observó que al eliminar este dominio de NaTrxh la interacción entre esta proteína y la S-RNasa disminuía casi por completo, lo cual indica que existe una gran afinidad entre el C-terminal de NaTrxh y la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014); sin embargo, basándonos nuestros resultados, podemos concluir que esta fuerte interacción no está involucrada con la reducción.

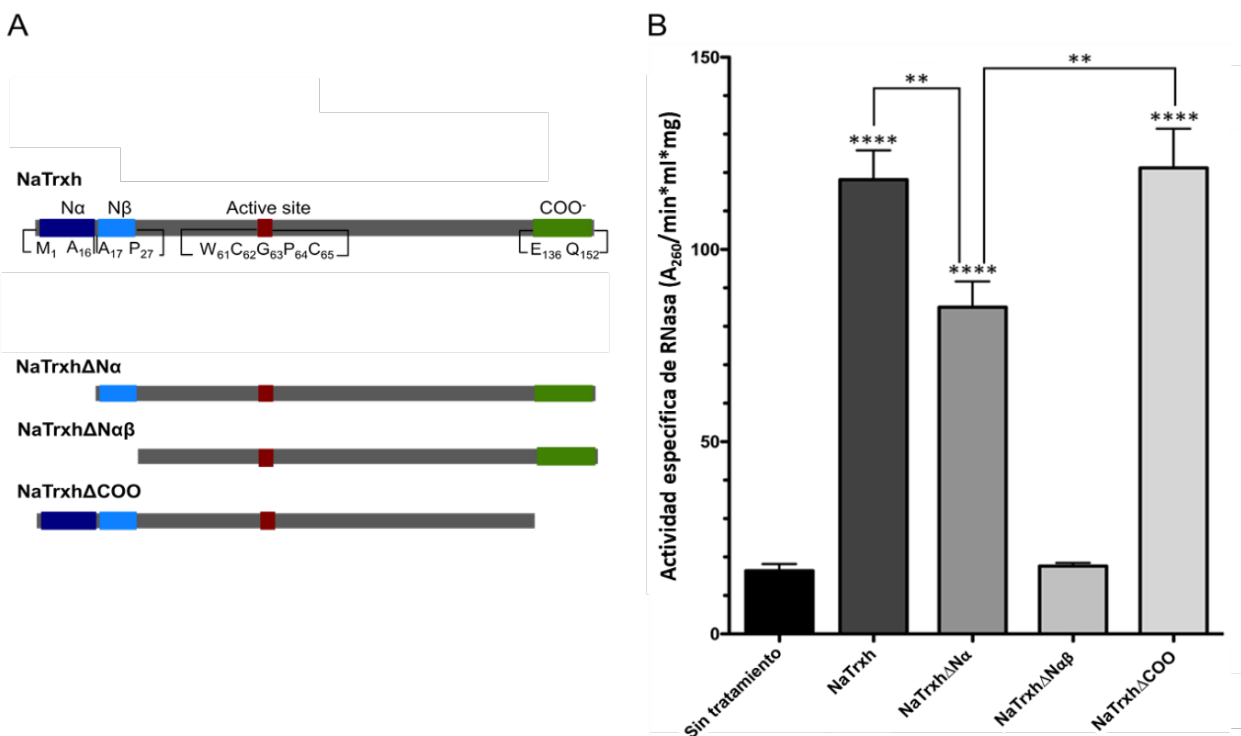


Figura 31. El dominio Nβ de NaTrxh es esencial para la reducción de la S-RNasa. Se midió la actividad de la S_{C10}-RNasa sin tratamiento, con NaTrxh completa o con las versiones NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNαβ o NaTrxhΔCOO, las cuales se esquematizan en A. B. Mientras que la reducción con NaTrxhΔCOO activa a la S-RNasa de la misma manera que NaTrxh completa, en el tratamiento con NaTrxhΔNα no se alcanzan los mismos niveles de activación. En contraste, la falta del extremo N-terminal completo en NaTrxh (tratamiento con NaTrxhΔNαβ) provoca que se pierda por completo la reducción y la activación de la S-RNasa. Las reacciones con las Trxs se realizaron con NTR y NADPH. Las barras indican el error estándar, n = 3 (réplicas biológicas). ** y **** indican diferencias significativas a una probabilidad de 0.01 y de 0.00001, respectivamente.

La participación del extremo N-terminal de NaTrxh en la reducción de la S-RNasa coincide con reportes que indican que la interacción entre una Trx y su proteína blanco es efímera (Wynn *et al.*, 1995). Sí existe una interacción débil entre el N-terminal de NaTrxh y la S-RNasa, una vez que

ocurra la reducción, estas proteínas se podrían disociar fácilmente para que la S-RNasa actúe degradando el RNA del tubo polínico. A pesar de que esta interacción podría darse cuando ambas proteínas se encuentran en la matriz extracelular del tejido de transmisión, la reducción no tendría lugar hasta que haya NADPH disponible y NTR esté presente, lo cual sería en el citoplasma del tubo polínico.

Por otro lado, la interacción a través del C-terminal debe tener otra función. Esta podría ser permitir el ingreso de ambas proteínas al tubo polínico dentro del complejo S-RNasa-120K-NaTTS-NaPELPIII descrito anteriormente. En este caso, una interacción fuerte sería necesaria para poder mantenerse dentro del complejo hasta alcanzar su localización final en el citoplasma del tubo polínico donde desempeñará sus funciones en el rechazo del polen.

7.3.4 Interacción entre NrTrxh y la S-RNasa a través del dominio C-terminal.

El dominio C-terminal de NaTrxh comprende 17 aminoácidos (desde el Glu₁₃₆ hasta la Gln₁₅₂) (Avila-Castañeda *et al.*, 2014). El gen ortólogo, denominado *NrTrxh*, presente en la especie AI *N. rastroensis*, no presenta ninguna sustitución a nivel de aminoácidos, pero la proteína es 10 residuos más corta, quedando con un extremo C-terminal de solo 7 aminoácidos (Figura 32). Esta diferencia se debe a que en *N. alata* ocurre una modificación postranscripcional en el mRNA de *NaTrxh* que consiste en la eliminación de una citosina; el corrimiento del marco de lectura provoca que el triplete adyacente ya no sea un codón de termino y que se traduzcan 10 aminoácidos más hasta encontrar el siguiente codón de término (Torres-Rodríguez, 2016).

A.

	<u>Nα</u>	<u>Nβ</u>	
NaTrxh	MGSYLSSLLGGGAAEAAEAE	SGSSSEPSRVIAFHSSNRWQLHFNSKQLNKLI	60
NrTrxh	MGSYLSSLLGGGAAEAAEAE	SGSSSEPSRVIAFHSSNRWQLHFNSKQLNKLI	60

NaTrxh	WCGPCKMMEPVINAMSAKYTDVDFVKIDVDELSDVAQ	QEFVQAMPTFLLLKQGKEVERVV	120
NrTrxh	WCGPCKMMEPVINAMSAKYTDVDFVKIDVDELSDVAQ	QEFVQAMPTFLLLKQGKEVERVV	120

NaTrxh	GAKKDELEKKILKHREAPKFAASNYRTK	FHVQ	152
NrTrxh	GAKKDELEKKILKHREAPKFAA-----		142

C-terminal

B.

mRNA <i>N. alata</i>	5' GAAGCUCCUAAAUUUGCUGCUAGUAAUUAUCGAACUAAAUUUCAUGUCCAAUAA 3'
	E A P K F A A S N Y R T K F H V Q Stop
mRNA <i>N. rastroensis</i>	5' GAAGCUCCUAAAUUUGCUGCCUAGUAAUUAUCGAACUAAAUUUCAUGUCCAATAA 3'
	E A P K F A A Stop

Figura 32. Alineamiento de secuencias de NaTrxh y NrTrxh. A. Alineamiento de secuencias de aminoácidos entre NaTrxh y NrTrxh mostrando los tres dominios definidos para NaTrxh (N α , N β y C-terminal). **B.** Secuencia del mRNA de *NaTrxh* y *NrTrxh* de los codones que codifican para el dominio C-terminal. En *NaTrxh* la ausencia de una citosina (marcada en rojo en *NrTrxh*) provoca el corrimiento del marco de lectura generando una proteína 10 aminoácidos más larga hacia el extremo C-terminal. Tomado de Torres-Rodríguez, 2016.

Dada la importancia del dominio C-terminal de NaTrxh para la interacción con la S-RNasa, se evaluó si NrTrxh tiene la misma afinidad por la S-RNasa aún con la falta de 10 aminoácidos en este dominio. Para ello se sobreexpresó y purificó a NrTrxh fusionada a GST y se generó una matriz de afinidad con la proteína de fusión como ligando y otra con sólo GST como control. Se pasó un extracto total de pistilo de *N. rastroensis* que expresa a la S_{C10}-RNasa. Después de realizar 10 lavados con amortiguador de unión se hicieron eluciones con NaCl (0.1M y 0.2M) y Tween 20 (1%); posteriormente, se realizó una última elución para separar proteínas fuertemente unidas con 50mM Glicina y 50mM NaCl, pH 2.6, tal como lo reportó Ávila-Castañeda *et al.* (2014).

Como se observa en la Figura 33. A, en una columna de afinidad de NaTrxh, la S-RNasa comienza a eluir con NaCl, indicando que se rompen algunas interacciones iónicas entre la Trx y S-RNasa; sin embargo, la mayor cantidad de proteína eluye hasta que se modifica el pH para recuperar la proteína fuertemente unida (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Por otro lado, NrTrxh interacciona con menor afinidad con la S-RNasa debido a la ausencia de 10 aminoácidos. Esto se ve reflejado en que toda la S-RNasa que se unió a la columna fue eluída con NaCl y Tween. Esto también indica que la S-RNasa y NrTrxh interaccionan únicamente a través de interacciones débiles. En el control de la columna sólo con GST, se ve un poco de unión de la S-RNasa, pero ésta se eluye con 0.2M

de NaCl, además de que no es una cantidad importante de proteína unida a la columna (Figura 33. B).

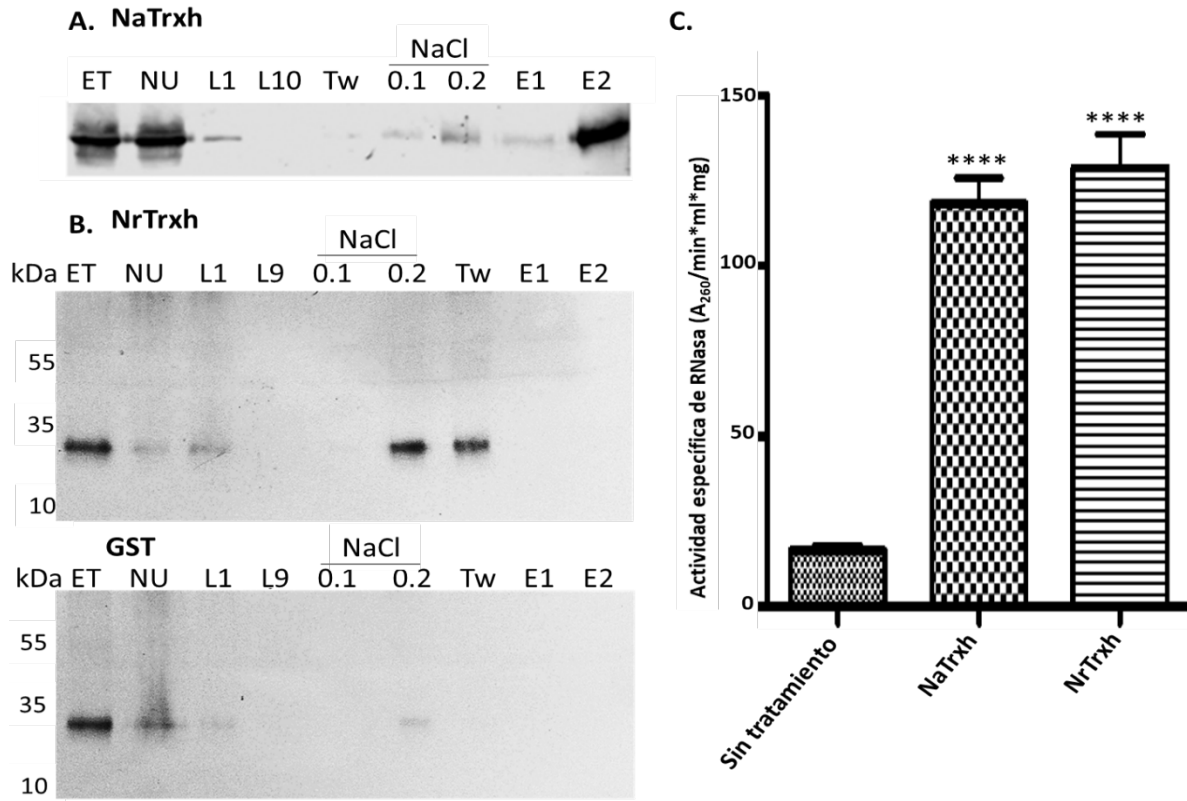


Figura 33. NrTrxh interacciona con la S-RNasa con menor afinidad que NaTrxh pero también es capaz de reducirla *in vitro*. **A.** Cromatografía de afinidad con NaTrxh para evaluar su interacción con la S-RNasa. A pesar de que la mayor cantidad de S-RNasa se unió fuertemente y eluye sólo al modificar el pH (B1 y B2), hay S-RNasa que interacciona con menor afinidad la cual eluye con 0.1 y 0.2M de NaCl (Tomado de Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). **B.** Columna de afinidad de GST (control, superior) y GST-NrTrxh (inferior) para evaluar su interacción con la S-RNasa. A diferencia que con NaTrxh, la S-RNasa se une con menor afinidad a NrTrxh, ya que toda la proteína que se une eluye con 0.2M de NaCl y con Tween. (UB/NU = No unido, W/L = Lavado, B/E = Elución de proteínas fuertemente unidas). **C.** Se midió la actividad de la S_{C10}-RNasa sin tratamiento o después de la reducción con NaTrxh y NrTrxh (de *N. raströensis*). No hay diferencias significativas entre la activación de la S-RNasa reducida con NaTrxh o con NrTrxh. Las reacciones con las Trxs se realizaron con NTR y NADPH. Las barras indican el error estándar, n = 3. **** indica diferencias de 0.00001.

NrTrxh podría participar en el mecanismo de rechazo del polen dado que *N. raströensis* también es una especie AI. A pesar de sus diferencias en el dominio C-terminal respecto a NaTrxh, la reducción de la S-RNasa está dirigida por la interacción a través del extremo N-terminal y no existe ninguna diferencia entre el N-terminal de NaTrxh y NrTrxh (Figura 32), indicando que la reducción y la activación de la S-RNasa debe ocurrir de igual manera. Lo anterior fue evaluado a

través de ensayos de actividad, los cuales mostraron que efectivamente, ambas proteínas activan de manera similar a la S-RNasa (Figura 33. C).

Los resultados anteriores refuerzan la hipótesis de que existe una regulación redox en la S-RNasa que es crucial para que se dé la respuesta de rechazo del polen ya que en dos especies distintas, ambas AI, se encuentra la Trx encargada de la reducción de la S-RNasa.

7.3.5 El efecto de la expresión *NaTrxh_{SS}* en los híbridos transgénicos.

La reducción específica de la S-RNasa por NaTrxh provoca un aumento en su actividad; además, como se mencionó en apartados previos, la coexpresión de NaTrxh_{SS} junto con NaTrxh tipo silvestre en plantas transgénicas afecta el rechazo del polen, siendo este un claro ejemplo de dominancia negativa.

Para dar una posible explicación a este efecto se realizó el ensayo de actividad de la S_{C10}-RNasa incubada con concentraciones equimolares de NaTrxh tipo silvestre y mutante, con las condiciones necesarias para su reducción. Los resultados muestran que la actividad de ribonucleasa aumenta cuando están presentes tanto NaTrxh_{SS} como la proteína tipo silvestre, respecto a cuando no se añadió ningún agente reductor, pero esta activación no alcanza los niveles observados cuando sólo NaTrxh tipo silvestre está presente para reducir a la S-RNasa (Figura 34. A). Lo anterior indica que en presencia de ambas versiones de NaTrxh, tipo silvestre y mutante, no toda la S-RNasa es reducida.

Estos resultados permiten hipotetizar que la presencia de NaTrxh_{SS} impide que NaTrxh reduzca a su blanco adecuadamente y esto podría deberse a que la S-RNasa que interacciona con NaTrxh_{SS} en lugar de con NaTrxh tipo silvestre, queda secuestrada impidiendo que sea reducida y activada. Para evaluar esta posibilidad se incubó a la S-RNasa con distintas concentraciones de NaTrxh_{SS} durante una hora antes de realizar la reducción con NaTrxh. Posteriormente, se calculó la actividad de ribonucleasa. Como puede observarse en la Figura 34. B, el incremento en la actividad de ribonucleasa fue menor conforme aumentó la concentración de la proteína mutante, por lo tanto, los niveles de actividad observados se deben a aquella S-RNasa que no interaccionó con NaTrxh_{SS} y que estuvo libre para poder ser reducida por NaTrxh tipo silvestre.

Lo anterior también es evidencia de que los complejos NaTrxh_{SS}-S-RNasa son estables y que el sitio de interacción podría estar ocultando el puente disulfuro blanco de reducción en la S-RNasa (Cys155-Cys185). Dado que NaTrxh interacciona con gran afinidad con la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), es posible que la proteína tipo silvestre pueda desplazar a la mutante cuando esta se encuentra en complejo con la S-RNasa. Para evaluar esto, se pre-incubó a la S-RNasa con la concentración de NaTrxh_{SS} con la cual ya no se observan cambios en la actividad (80µM) y se realizó la reducción con concentraciones crecientes de NaTrxh. Posteriormente, se calculó la actividad de ribonucleasa. La Figura 34. B muestra que NaTrxh tipo silvestre no puede

desplazar a NaTrxh_{SS} ya que no hay diferencias en la actividad de ribonucleasa calculada a pesar de incrementar la concentración de NaTrxh tipo silvestre.

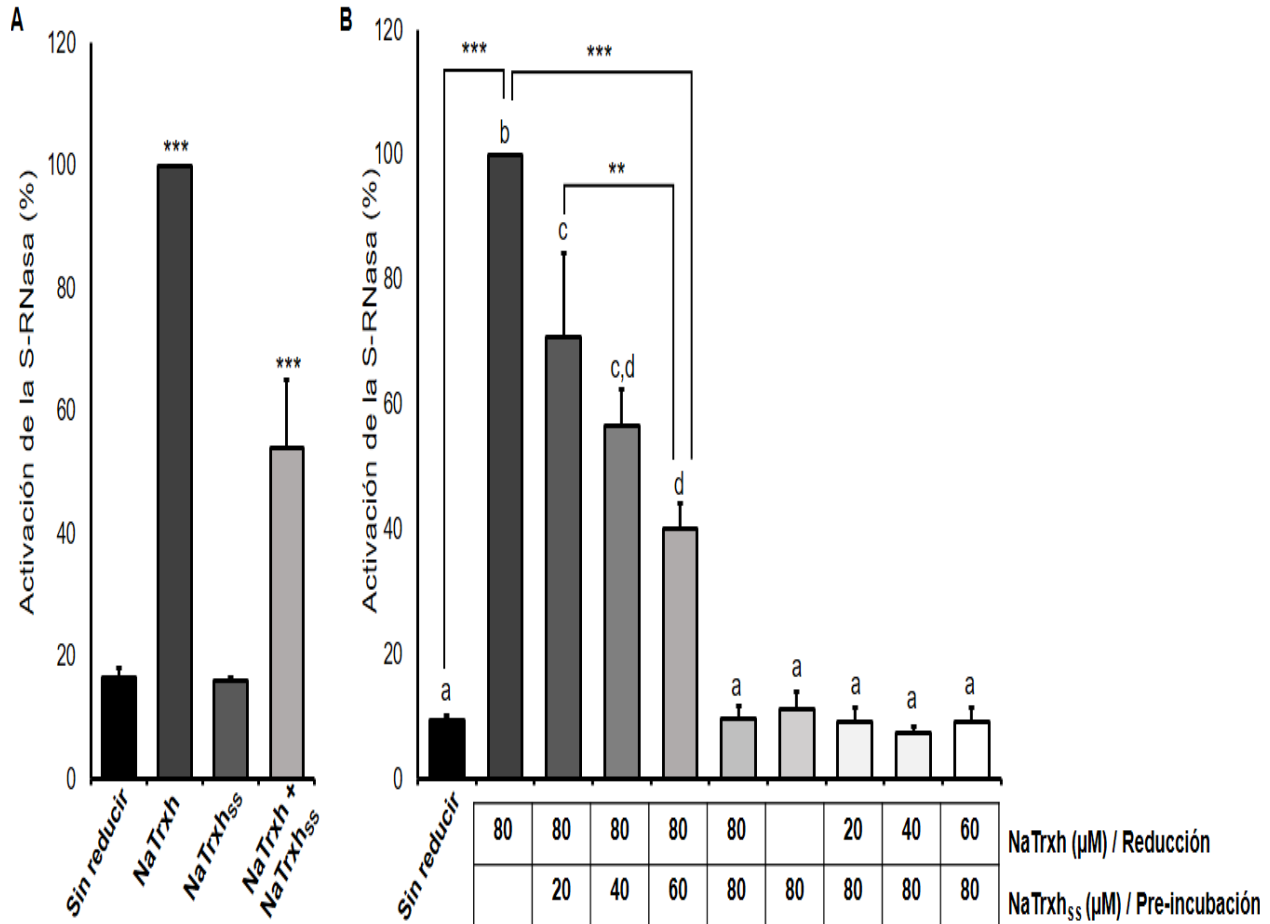


Figura 34. La presencia de NaTrxh_{SS} impide que NaTrxh tipo silvestre reduzca a la S-RNasa. **A.** Se midió la actividad de la S_{C10}-RNasa sin tratamiento o después de la reducción con NaTrxh tipo silvestre, NaTrxh_{SS}, o tratada con ambas versiones de NaTrxh en la misma proporción. Al añadir ambas versiones de NaTrxh en cantidades equimolares (60μM) se observa que la actividad de la S-RNasa no alcanza los niveles observados cuando NaTrxh la reduce por completo. **B.** La S-RNasa fue pre-incubada con distintas concentraciones de NaTrxh_{SS} previo a realizar la reducción con NaTrxh, de la cual también se varió la concentración de proteína utilizada para la reacción. Posteriormente, se midió la actividad de ribonucleasa. Se observa el incremento en la actividad de la S-RNasa al ser reducida con NaTrxh, como había ocurrido anteriormente; sin embargo, al aumentar la concentración de NaTrxh_{SS} utilizada para pre-incubar, el incremento en la actividad es cada vez menor. A 80μM de NaTrxh_{SS} no hay cambios en la actividad de ribonucleasa respecto al control sin reducir y esto se mantiene a pesar de aumentar la concentración de la proteína tipo silvestre. Las reacciones con las Trxs se realizaron con NTR y NADPH. Las barras indican el error estándar, n = 5. *, ** y *** indican diferencias significativas a una probabilidad de 0.05, 0.001 y de 0.0001, respectivamente.

Los resultados anteriores contribuyen a explicar el fenotipo intermedio de aceptación del propio polen observado en los híbridos transgénicos. Nuestra hipótesis es que, en una cruce incompatible, en algunos tubos polínicos se reduce suficiente S-RNasa para que esta tenga suficiente actividad para llevar a cabo el rechazo, pero otros, donde NaTrxh_{SS} mantiene inaccesible a la S-RNasa, la reducción no ocurre y los tubos polínicos son aceptados por el pistilo ya que la S-RNasa no tiene actividad suficiente para atacarlos.

Sin embargo, en los híbridos transgénicos no se midió la cantidad de proteína producida por los pistilos, además tampoco se demostró la actividad de las dos versiones de NaTrxh. Una manera indirecta de saber si NaTrxh silvestre funciona en estas plantas es midiendo la actividad de la S-RNasa. En los híbridos transgénicos ésta debería ser menor a la cuantificada en los híbridos sin transformar ya que, de acuerdo a nuestra hipótesis, NaTrxh_{SS} impediría la reducción de una fracción de la S-RNasa. Sin embargo, en este experimento lo ideal sería medir solo la actividad de la S-RNasa que entre a los tubos polínicos ya que en el pistilo polinizado habría mucha actividad de fondo de toda la S-RNasa que no ingresó; ésto podría alterar nuestra interpretación. Otra alternativa es purificar a la S-RNasa de los pistilos de los híbridos transgénicos polinizados, marcarla con NEM y ver la proporción de la S-RNasa que está reducida en el puente disulfuro C155-C185, respecto a la que está oxidada en este sitio. En este caso, la proporción de S-RNasa reducida será baja ya que solo la S-RNasa que haya entrado a los tubos polínicos podrá ser reducida; en este segundo experimento también hay que tomar en cuenta que otra cantidad dentro de los tubos polínicos no se reducirá por la presencia de NaTrxh_{SS} y que además, la cantidad de S-RNasa que no entra a los tubos polínicos es muy elevada y esta no estará reducida. Los experimentos anteriores también corroborarían que el fenotipo observado es una dominante negativa.

Por otro lado, se desconoce cuál es la cantidad mínima de S-RNasa que se requiere para rechazar el propio polen; sin embargo, este es un punto importante a considerar, sobretodo tomando en cuenta los modelos descritos para explicar el rechazo del polen, los cuales proponen que existe un momento en el tubo polínico en donde hay S-RNasa libre en el citoplasma pero esta no degrada al RNA. Con nuestros resultados, ahora proponemos que esta carece de actividad suficiente hasta que no es reducida por NaTrxh.

7.4 Estructura tridimensional de NaTrxh por cristalografía y difracción de rayos X

7.4.1. Obtención de cristales de NaTrxh y difracción.

La cristalización de una proteína ocurre en dos pasos. Primero la nucleación, que significa el paso de la proteína de un estado completamente desordenado a un estado ordenado, esta requiere que la proteína esté sobresaturada. Si la formación de núcleos es demasiado rápida los cristales

resultantes son muchos y muy pequeños, por lo que lo ideal es tener pocos núcleos que puedan generar cristales de mayor tamaño. La segunda etapa consiste en el crecimiento del cristal a partir de los núcleos. Las condiciones adecuadas para la formación de cristales dependen de cada proteína, por ello es necesario realizar un *screening* empleando distintas condiciones hasta encontrar aquella que permite la cristalización de la proteína de interés (McPeterson y Gavira, 2014).

Las primeras pruebas de cristalización con NaTrxh se realizaron con una concentración de 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en un amortiguador con acetato de amonio 10 mM, pH 6.0, ya que bajo estas condiciones se logró la cristalización de la Trx HvTrx2 en complejo con su proteína blanco, BASI (Maeda *et al.*, 2006). Se realizaron 48 pruebas con el kit de cristalización Wizard 3 y únicamente se encontraron cristales en la condición 4 (Formato de amonio 200 mM y 20% de PEG 3,350 como agente precipitante) y utilizando el método de gota apoyada (Figura 35. A).

Uno de estos primeros cristales de NaTrxh fue difractado en el Laboratorio Nacional de Estructura de Macromoléculas del Instituto de Química de la UNAM en colaboración con la Dra. Adela Rodríguez Romero. Se obtuvo una estructura preliminar a una resolución media de 3.2Å, en la cual no se resolvieron 52 aminoácidos contenidos en los extremos N y C-terminal de NaTrxh.

Con el objetivo de mejorar los cristales para obtener la estructura de NaTrxh a mayor resolución y determinar más aminoácidos, se realizaron pruebas en gota apoyada con la misma condición, pero añadiendo los aditivos del kit de Hampton. Los aditivos químicos mejoran el proceso de cristalización, ya sea porque favorecen la formación de núcleos o porque promueven el crecimiento del cristal (McPeterson y Gavira, 2014). En las pruebas con los aditivos también se evaluaron tres concentraciones de proteína 10, 12 y 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se obtuvieron cristales en 25 condiciones con aditivos (Anexo 9, Figura 35. B). La concentración óptima de NaTrxh para su cristalización es 12 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ya que en esta se formaron cristales de mayor tamaño. Cabe mencionar que, al añadir los aditivos, el tiempo de aparición de los cristales fue de aproximadamente 15 días, contrastando con 60 días que fue el tiempo de formación de los cristales sin aditivo.

De igual manera se realizaron pruebas en gota colgante, únicamente con 12 aditivos en los que previamente se había observado crecimiento en el método de gota apoyada. A pesar de que se observaron cristales en todas las condiciones, estos fueron muy pequeños por lo cual no fueron difractados (Figura 35. C).

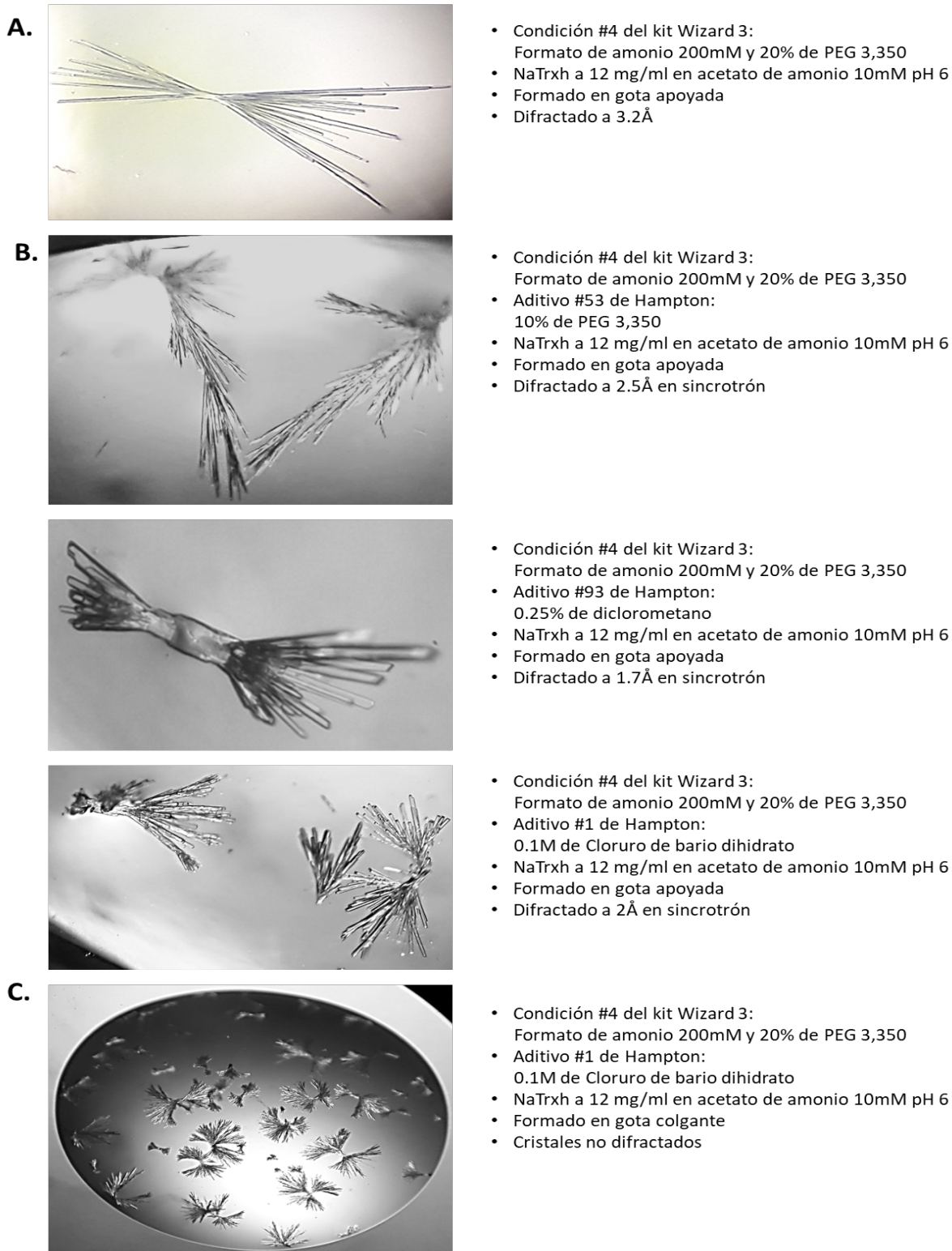


Figura 35. Morfología de los cristales de NaTrxh. **A.** Cristales obtenidos sin aditivo en el método de difusión de vapor en gota apoyada. **B.** Cristales obtenidos con aditivos en el método de difusión de vapor en gota apoyada. **C.** Cristales obtenidos con aditivos método de difusión de vapor en gota colgante. A la derecha de cada imagen se enlistan las condiciones de la cristalización.

Tabla 4: Condiciones de cristalización de la proteína NaTrxh para su difracción de rayos X.

Condición de cristalización	Resolución	# de cristales difractados
Formato de amonio 200mM + 20% PEG 3,350 Aditivo 1: 0.1M de Cloruro de bario dihidrato	2Å	1
Formato de amonio 200mM + 20% PEG 3,350 Aditivo 7: 0.1M de Cloruro de manganeso (II) tetrahidrato	1.85Å	1
Formato de amonio 200mM + 20% PEG 3,350 Aditivo 53: 10% PEG 3,350	2.5Å	1
Formato de amonio 200mM + 20% PEG 3,350 Aditivo 93: 0.25% de Diclorometano	1.7Å* y 2.8Å	2

* Datos correspondientes a la estructura mostrada en el presente trabajo.

Se seleccionaron los cristales de mayor tamaño para crioprotgerse y difractarse. La difracción se realizó en la línea 19ID del *Advanced Photon Source del Argonne National Laboratory* en colaboración con la Dra. Lilian González Segura. Se obtuvieron cinco juegos de datos (Tabla 4), de los cuales aquí se reporta el de mayor resolución que fue a 1.7Å.

Para los cinco cristales difractados se colectaron 600 imágenes con un tiempo de exposición de 0.5 seg y 0.5° de oscilación.

7.4.2. Resolución de la estructura de NaTrxh

La estructura de NaTrxh obtenida a a 1.7Å de resolución se muestra en la figura 35. Existen distintos parámetros estadísticos que reflejan la calidad y confiabilidad de nuestros datos:

- *Completeness*: Indica el porcentaje de reflexiones colectadas en comparación con el número de reflexiones posibles para un cristal dependiendo de su simetría. Este debe ser mayor a 90% para todos los datos y mayor a 70% en la última capa de resolución (Arkhipova *et al.*, 2017).
- R_{merge} : Es el valor de error de la colecta de los datos, indica la concordancia entre múltiples medidas de una reflexión dada. Su valor debe ser de 0.1 para todos los datos (Karplus y Diederich, 2012).
- Multiplicidad: Es el número de mediciones por cada reflexión. El valor mínimo aceptado de multiplicidad es 3 (Wlodawer *et al.*, 2008).
- CC1/2: Este parámetro refleja si la mitad de los datos pueden predecir la otra mitad y se calcula con el valor CC, el cual es la relación entre las señales efectivas y las señales de ruido. El valor CC1/2 debe ser cercano a 1 en para todos los datos y superior a 0.8 en la última capa de resolución (Karplus y Diederichs, 2015).

- I/σ (I): Indica cual es la señal de ruido. Este debe ser un valor cercano a 2 en la última capa de resolución (Karplus y Diederichs, 2015).
- $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$: Valores de error que indican la concordancia entre las difracciones y el modelo generado. R_{free} no debe ser mayor al 10% del valor de la resolución; mientras que R_{work} puede variar en un radio de 0.05 a 0.08 respecto al R_{work} (Read *et al.*, 2011).

En la Tabla 5 se muestran los parámetros estadísticos de la estructura de NaTrxh obtenida por difracción de rayos X. Si se comparan con los valores de referencia se puede asegurar que la estructura obtenida para NaTrxh es de buena calidad.

A la fecha, se han reportado numerosos ejemplos de estructuras de Trxs de diversos organismos (Holmgren *et al.*, 1975; Neira *et al.*, 2001; Maeda *et al.*, 2006; Collet y Messens, 2010; Fritz-Wolf *et al.*, 2011; Campos-Acevedo *et al.*, 2013) las cuales presentan un plegamiento muy conservado. La primera estructura reportada fue la de la Trx de *E. coli* cuyo plegamiento consiste en cinco hebras β rodeadas por cuatro α -hélices. Hacia el N-terminal se encuentran β_1 , α_1 , β_2 , α_2 y β_3 , donde las hebras β son paralelas; posteriormente, se forma la α -hélice tres la cual conecta con β_4 , β_5 y α_4 , estas últimas dos hebras β son antiparalelas (Holmgren *et al.*, 1975). NaTrxh conserva este plegamiento, con la única diferencia de que no presenta la hebra β_5 (Figuras 36 y 37).

Tabla 5. Parámetros estadísticos de la colecta de datos de la difracción de rayos X y del afinamiento del modelo de NaTrxh

<i>Colecta de datos</i>	
Longitud de onda (Å)	0.9795
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Dimensiones de la celda unitaria	
<i>a, b, c</i> (Å)	45.99, 68.85, 70.80
<i>α, β, γ</i> (°)	90, 90, 90
Monómeros por unidad asimétrica	2
Rango de resolución (Å)	49.36/1.7
Reflecciones totales	215,966
Reflecciones únicas	25,159 (1,235)
Completeness (%)	99.3 (99.4)
<i>R</i> _{merge} (%)	10.6 (103.2)
Mean <i>I</i> / <i>σ</i> (<i>I</i>)	25.2 (2.6)
Multiplicidad	8.6 (7.5)
CC _{1/2}	1.00 (0.86)
<i>Estadística del afinamiento</i>	
Rango de resolución (Å)	49.36/1.7
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free} (%)	18.54/22.02
Número de átomos	
Proteína	1910
Agua	126
Etilen glycol	8
Factor B (Å ²)	
Proteína	30.09
Agua	44.67
Etilen glycol	62.92
<i>RMSD para estequiometría ideal</i>	
Longitud de enlaces (Å)	0.006
Ángulos de enlaces (°)	0.772
<i>Estadísticos del gráfico de Ramachandran</i>	
Residuos en regiones más favorables (%)	98.46
Residuos en regiones permitidas (%)	1.54
Residuos en regiones no permitidas (%)	0
<i>Código PDB</i>	6X0B

^a Los valores entre paréntesis corresponden a la última capa de resolución

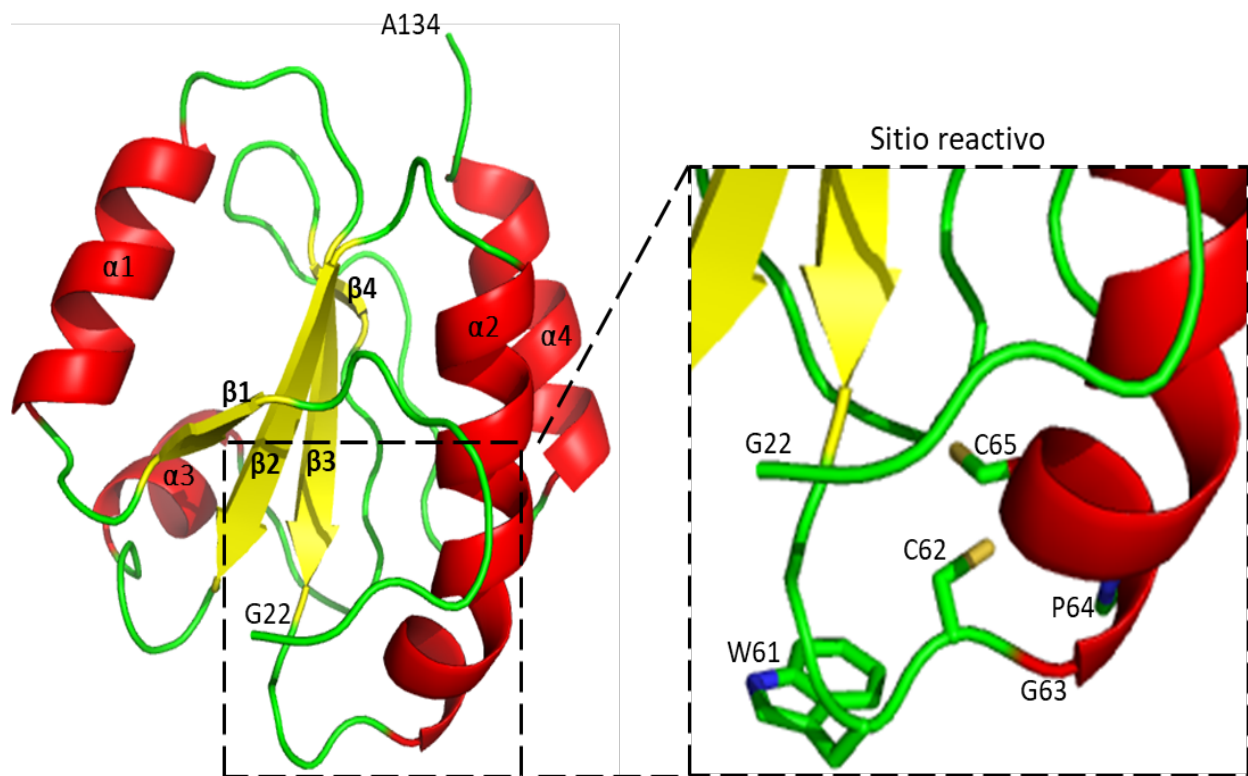


Figura 36. Estructura tridimensional de la proteína NaTrxh a 1.7Å de resolución. Vista completa de la estructura de NaTrxh mostrando el plegamiento típico de Trx que incluye cuatro hebras β y cuatro α -hélices. Los extremos N y C-terminal se indican con los residuos G22 y A134, respectivamente. A la derecha se muestra un acercamiento de la región donde se encuentran los residuos catalíticos.

La posición del sitio reactivo de NaTrxh ($W_{61}CGPC_{65}$) también está conservada. Trp61 y Cys62 se encuentran en el asa formada entre la hebra β_2 y la α -hélice 2, mientras que Gly63, Pro64 y Cys65 se encuentran al inicio de la α -hélice dos (Figura 36). Además del sitio reactivo y de las Cys catalíticas, otros residuos están muy conservados en las Trxs. Entre ellos se incluyen tres residuos de Pro, uno de ellos es el que se ubica dentro del sitio reactivo y es un residuo clave que determina el poder reductor de la Trx (Ross *et al.*, 2007). La segunda Pro conservada se sitúa cinco residuos hacia el C-terminal del sitio reactivo y es de gran importancia estructural, dado que produce un pequeño pliegue en la hélice α_2 que separa al sitio reactivo del resto de la hélice, además es requerida para la estabilidad de la proteína (de Lamotte-Guéry *et al.*, 1997). Por último, el tercer residuo de Pro conservado se localiza detrás del sitio reactivo y siempre se encuentra en posición *cis* para ayudar a mantener su conformación y el potencial redox (Gleason, 1992). Estos tres residuos se encuentran conservados en NaTrxh (Pro64, Pro70 y Pro105) (Figura 37).

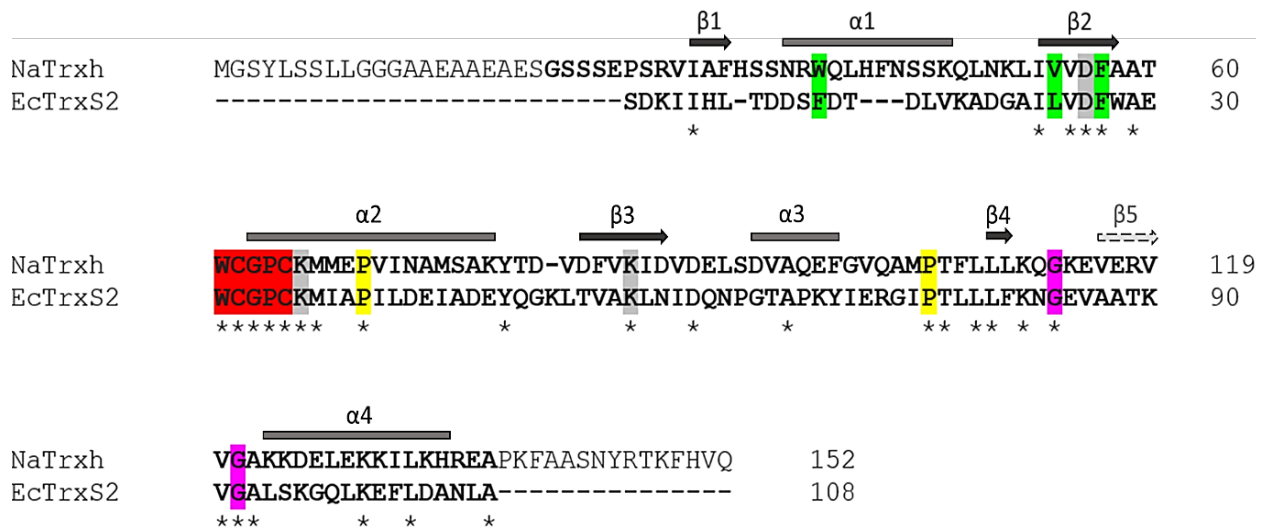


Figura 37. Alineamiento de secuencias de las tioredoxinas NaTrxh de *N. alata* y Trx S2 de *E. coli*. El alineamiento muestra la conservación de los elementos de estructura secundaria entre ambas Trxs (indicados en la parte superior). NaTrxh únicamente carece de la hebra β5 (indicada con línea punteada). Además del sitio reactivo (rojo), otros aminoácidos como Pro (amarillo), Gly (magenta) y aminoácidos cargados (gris) se encuentran conservados en la estructura de las Trxs. Los residuos que forman el *core* hidrofóbico se muestran en verde.

Tres residuos de Gly también son esenciales en las Trxs. Uno de ellos, el cual está localizado dentro el sitio activo, es esencial para mantener su conformación y el potencial redox; los otros dos residuos definen la longitud de la hebra β5 en la Trx de *E. coli* (Collet y Messens, 2010). Esta hebra no se forma en NaTrxh, pero los dos residuos de Gly si se encuentran conservados, indicando que podrían desempeñar otra función importante en la proteína (Gly63, Gly113 y Gly121 en NaTrxh; Figura 37).

Estudios previos en la Trx de *E. coli* señalan la importancia de ciertos aminoácidos aromáticos, específicamente dos residuos de Phe, localizados en el extremo N-terminal de la α-hélice uno y en el C-terminal de la hebra β2, respectivamente. Estos mantienen el plegamiento de la Trx, ya que sus cadenas laterales se posicionan hacia el interior hidrofóbico (Collet y Messens, 2010). Para NaTrxh, el interior hidrofóbico está formado por las cadenas laterales de los residuos Val54, Phe57 y Trp39 (Figura 37).

Finalmente, para que se lleve a cabo la catálisis, es necesaria la presencia de aminoácidos con carga que activen a las Cys del sitio reactivo para que estas puedan llevar a cabo los ataques nucleofílicos durante la reducción del puente disulfuro blanco. Se han encontrado algunos residuos con carga conservados, que se localizan principalmente en las hebras β2 y β3 de las Trxs; sin embargo, a la fecha no se han generado mutantes para confirmar su funcionamiento (Eklund *et al.*, 1984). En NaTrxh se encuentran algunos residuos cercanos al sitio reactivo que podrían desempeñar dicha función como la Lys66, la Lys86 y el Asp56 (Figura 37).

Como se mencionó anteriormente, los extremos N y C-terminal de NaTrxh son más extensos en comparación con las demás Trxs (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) y comprenden 27 y 17 residuos, respectivamente, de los cuales sólo se resolvieron cinco aminoácidos correspondientes al extremo N-terminal y dos al C-terminal en la estructura. Previamente se había generado un modelo de NaTrxh donde se mostraba que los extremos N- y C-terminal eran regiones altamente desordenadas (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Esto se corrobora con nuestros resultados, ya que ambos extremos de la proteína no presentaron densidad electrónica debido a su gran movilidad. También se sabe que estas regiones son muy importantes para la interacción con la S-RNasa. Las regiones altamente desordenadas pueden estabilizarse cuando interactúan con algún ligando, en este caso, la cristalización y difracción de estas regiones podría lograrse si NaTrxh estuviera en complejo con la S-RNasa.

7.5 Interacción de NaTrxh con la S-RNasa para su reducción.

Existen algunos reportes de Trxs cristalizadas junto con su proteína blanco (Maeda *et al.*, 2006). Para esto se genera un complejo estable que se mantiene unido por un puente disulfuro, el cual se logra debido a que se introduce una mutación en la segunda Cys del sitio reactivo de la Trx. Dado que durante la reducción esta Cys participa en la ruptura del puente disulfuro del intermediario Trx-proteína blanco, en una mutante el intermediario nunca se disocia y el complejo permanece unido covalentemente (Motohashi *et al.*, 2001).

Gracias a las estructuras obtenidas de una Trx con su sustrato, ha sido posible visualizar la interacción entre ambas proteínas cuando se está llevando a cabo la reducción. Por ejemplo, la tiorredoxina HvTrxh2 de *Hordeum vulgare*, establece interacciones de van der Waals y puentes de hidrógeno con la proteína BASI que es su sustrato, a través de las cadenas laterales de los residuos localizados en las asas adyacentes al sitio reactivo, los cuales se localizan entre la hebra β_2 y la α -hélice dos, la α -hélice tres y la hebra β_4 , y entre la hebra β_5 y la α -hélice cuatro; mientras que en el sustrato, el sitio de interacción se da a través de los átomos del esqueleto de tres aminoácidos hidrofóbicos (Maeda *et al.*, 2006). A diferencia de NaTrxh, HvTrxh2 no tiene un extremo N-terminal tan extenso (27 aminoácidos en NaTrxh y 11 aminoácidos en HvTrxh2), el cual además no se resolvió en su estructura y no hay evidencia de que esté involucrado en la interacción con su blanco para permitir su reducción, en contraste a lo observado para NaTrxh y la S-RNasa.

A pesar de que las Trxs son muy específicas al reducir puentes disulfuro, éstas pueden tener diversos blancos (Yano *et al.*, 2001). Con cada blanco se podría establecer una interacción distinta para la reducción. En NaTrxh, la interacción que permite la reducción de la S-RNasa se establece a través del extremo N-terminal; sin embargo, para otros blancos de NaTrxh, ésta podría no ser relevante como en el caso de la interacción entre HvTrx2 y BASI (Maeda *et al.*, 2006).

En la estructura obtenida de NaTrxh solo es posible apreciar seis residuos del N-terminal, que forman parte del dominio N β . Estos residuos están orientados hacia el sitio reactivo, mientras que el dominio C-terminal se dirige al lado opuesto (Figura 35). Esta conformación concuerda con la propuesta de que la interacción a través del N-terminal permite la reducción de su puente disulfuro.

Para tener una mejor visualización de la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh, se realizó una simulación utilizando el protocolo de docking proteína-proteína con ROSETTA, en colaboración con el Dr. Rogelio Rodríguez Sotres. Se seleccionaron aquellos complejos donde la Cys62 de NaTrxh, la cual se encuentra en el sitio reactivo, estaba a menos de 10Å de los residuos Cys153 y Cys186 de la S_{F11}-RNasa (correspondientes a la Cys155 y la Cys185 de la S_{C10}-RNasa) debido a que son los que forman el puente disulfuro que es reducido por NaTrxh. Sobre esta simulación se modelaron los extremos N- y C-terminal para determinar sus posibles conformaciones.

Ninguna de las conformaciones iniciales condujo a la formación de un complejo estable, sin embargo, esto era de esperarse ya que estas proteínas no forman un dímero permanente y su interacción, al menos a través del N-terminal de NaTrxh, debe durar el tiempo suficiente para permitir el primer ataque nucleofílico por parte de la Cys62 de NaTrxh, el cual llevará a la formación de un puente disulfuro momentáneo entre las proteínas. El complejo se establecía por pocas décimas de ns y se desintegraba, pero esto fue información suficiente para identificar algunos residuos importantes que participan en su estabilidad (Figura 38).

Para mejorar el muestreo de la conformación del complejo, se introdujo una fuerza de atracción equivalente a la energía a un puente de hidrógeno entre los átomos de azufre de la Cys62 de NaTrxh y la Cys186 de la S_{F11}-RNasa. Esta estrategia permitió identificar contactos persistentes (presentes en más del 60% de los marcos de simulación). Una interacción significativa fue el contacto entre el Glu155 de la S_{F11}-RNasa con la cadena lateral de la Cys62 y la cadena principal de la Met104 de NaTrxh (Figura 38). El Glu155 de la S_{F11}-RNasa podría tener una participación importante durante la reducción ya que, estando bajo la influencia de la nube de electrones del Trp61 de NaTrxh (presente en el sitio reactivo), podría abstraer el protón del grupo tiol de la Cys62 de NaTrxh lo que conduciría a un tiolato. Después de un cambio conformacional, el tiolato podría atacar el puente disulfuro Cys153-Cys186 de la S_{F11}-RNasa. Además de este contacto, hubo contactos adicionales que agregaron estabilidad entre los residuos en el extremo N-terminal de NaTrxh, como la Ser6 de NaTrxh (Figura 38).

Durante la simulación se observó que el extremo N-terminal de NaTrxh, a pesar de su gran movilidad, la mayor parte del tiempo se encuentra interaccionando con la S-RNasa, en una región expuesta que comprende varias asas y que está opuesta al sitio donde se localizan las regiones hipervariables (Figura 38). Esta región contiene residuos cargados positivamente como Lys158, Lys188 y Lys191, mientras que la extensión N-terminal de NaTrxh contiene residuos cargados negativamente, como Glu15 y Glu18, que podrían favorecer la interacción. El hecho de observar interacción a través de una región conservada entre las S-RNasas apoya la hipótesis de que NaTrxh podría interaccionar con cualquier haplotipo y reducir específicamente el mismo puente disulfuro.

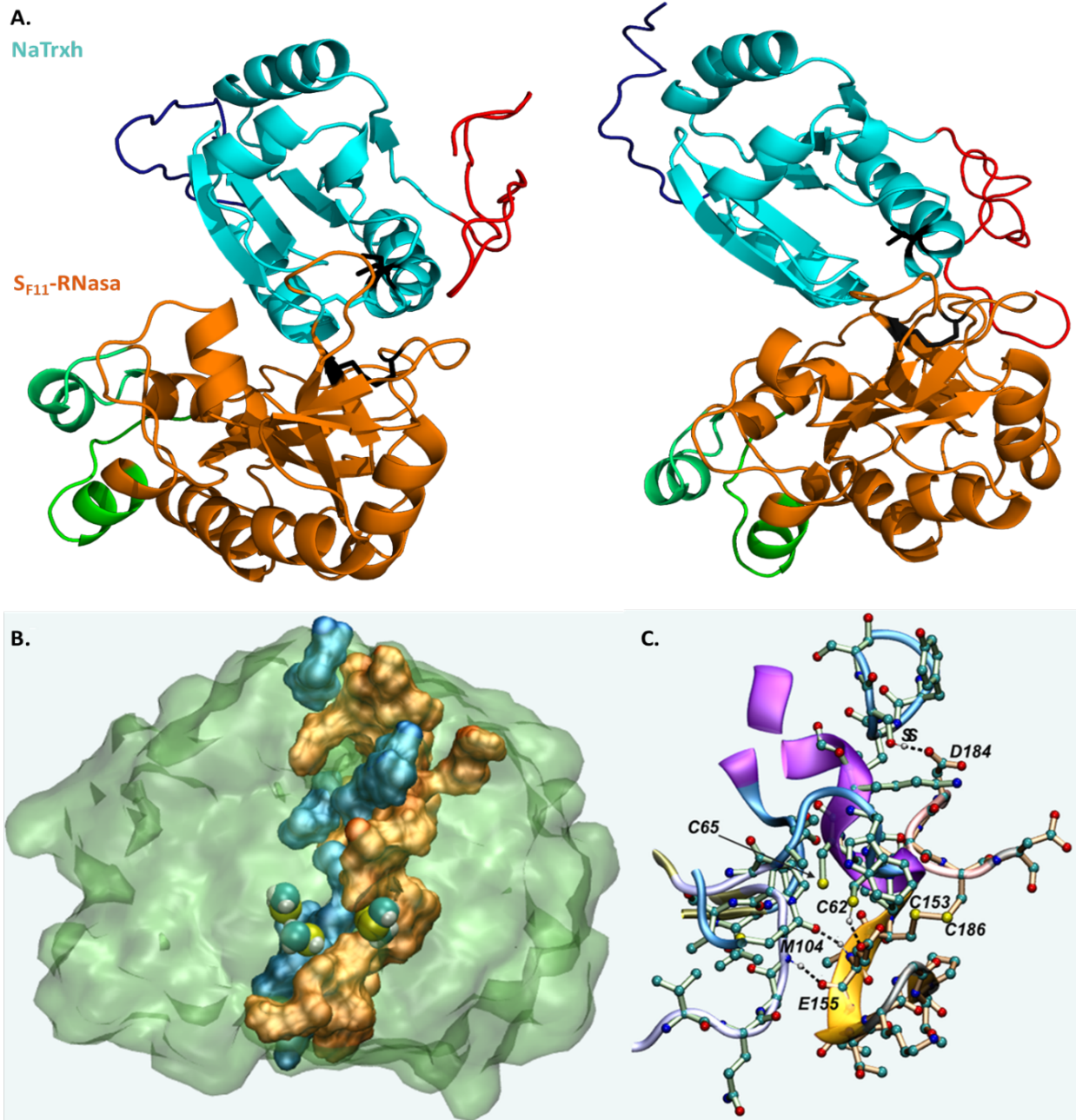


Figura 38. Simulación de la interacción entre NaTrxh y la S-RNasa para su reducción. A. Se muestra la simulación de la interacción entre NaTrxh (azul cielo) y la SF11-RNasa (naranja) donde el sitio reactivo de NaTrxh (negro, las cadenas laterales corresponden a los residuos catalíticos C62 y C65) se acerca al puente disulfuro blanco de reducción en la S-RNasa (C153-C186, negro). A lo largo de la simulación, el extremo N-terminal de NaTrxh (rojo) interactúa con la S-RNasa y se mantiene en movimiento cerca de varias asas en la S-RNasa, mientras que el extremo C-terminal (azul marino) se orienta hacia el lado opuesto. Como puede observarse, las regiones hipervariables en la S-RNasa (verde) se localizan alejadas de esta interacción a través del extremo N-terminal de NaTrxh. B. Zona de contacto entre NaTrxh y la SF11-RNasa La superficie del complejo (verde) se muestra en translúcida, mientras que en colores sólidos se muestran los residuos de NaTrxh (azul) y de la SF11-RNasa (naranja) donde se localizan los contactos. C. Detalle atómico de contactos más representativos entre NaTrxh (C62, C65 y M104) y la SF11-RNasa (C153, E155, D184 y C186).

Por otro lado, con los parámetros utilizados en la simulación, no se observó interacción entre estas proteínas a través del extremo C-terminal de NaTrxh, lo cual concuerda con nuestros resultados que mostraron que este extremo no participa en la reducción de la S-RNasa. El extremo C-terminal podría tener otra función al interactuar con la S-RNasa, la cual no se ha estudiado a profundidad, pero también podría ser relevante para el rechazo del polen, ya que, por ejemplo, podría contribuir a que ambas proteínas ingresen al tubo polínico.

A pesar de que la dinámica molecular nos da un acercamiento para entender cómo interactúan las proteínas, aún son posibilidades y podrían no reflejar precisamente lo que ocurre a nivel molecular. Para tener una explicación más acertada sería necesario generar varias mutantes y cristalizarlas para captar distintos momentos en la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh. Sin embargo, para el propósito de este trabajo, las simulaciones nos permitieron tener una mejor visión para comprender los resultados obtenidos *in vitro* acerca de las interacciones necesarias para la activación de la S-RNasa por reducción específica por NaTrxh.

7.6 Modelo de la participación de NaTrxh en el rechazo del polen en *Nicotiana*.

El hecho de que la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh tenga un efecto positivo sobre su actividad de ribonucleasa es de gran importancia porque esta función es crucial para inhibir el crecimiento del tubo polínico en las cruza incompatibles (McClure *et al.*, 1989). Lo anterior junto con nuestros resultados acerca de que NaTrxh es esencial para el rechazo del polen, lleva a proponer que la S-RNasa entra inactiva al tubo polínico o que la actividad que tiene no es suficiente para rechazar al polen, por ello al inicio su función sería la del reconocimiento de SLF. Sin embargo, la S-RNasa podrá tener su actividad citotóxica suficiente para inhibir el crecimiento del tubo polínico una vez que sea reducida por NaTrxh, lo cual ocurriría en una etapa posterior.

Con esto se explicaría el porqué la S-RNasa entra a todos los tubos polínicos independientemente de su haplotipo, pero tiene actividad sólo en contra de aquellos provenientes de una crusa incompatible. El modelo colaborativo explica que esto es porque SLF ubiquitina y degrada a la S-RNasa compatible; sin embargo, bajo este modelo aún queda la duda de si este evento es lo suficientemente rápido para detoxificar toda la S-RNasa antes de que esta comience a degradar el RNA. Además, en una crusa incompatible, la degradación del RNA del tubo polínico no ocurre inmediatamente y tampoco se explica por qué la S-RNasa no es citotóxica desde un inicio. En contraste, el modelo de la compartimentalización explica que la mayor parte de la S-RNasa compatible está secuestrada en una vacuola y hay poca S-RNasa en el citosol. Este modelo tampoco explica por qué la S-RNasa que está en el citosol no ataca al RNA del polen. Con base en nuestro trabajo proponemos que, para inhibir el crecimiento del tubo polínico, no es suficiente que la S-RNasa entre al tubo polínico y se localice en el citosol, sino que es necesaria su reducción por NaTrxh para ser citotóxica.

Un punto importante para considerar es la localización de NaTrxh. NaTrxh es producida por las células del tejido de transmisión del estilo y es secretada a su espacio extracelular (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Los tubos polínicos crecen a través de esta matriz extracelular que va desde el estigma hasta el ovario. A lo largo de este trayecto, los tubos polínicos se alimentan de los componentes de la matriz extracelular que incluyen proteínas que sirven de guía para que los tubos polínicos alcancen su destino final que es el ovario, o bien proteínas que lo nutren y que están involucradas con su crecimiento. También aquellas proteínas que participan en los mecanismos de reconocimiento y rechazo del polen, ingresan a los tubos polínicos y desempeñan funciones esenciales dentro del mismo (Rea y Nasrallah, 2008). Por tal motivo, se propone que NaTrxh desempeña sus funciones para el rechazo del polen dentro del tubo polínico.

Cabe recordar que las tiorredoxinas por sí solas no pueden reducir a su blanco, si no que requieren de NTR (quien reduce a la Trx) y de NADPH (Gelhaye *et al.*, 2004b). Para el caso de NaTrxh no se ha encontrado a la NTR encargada de su reducción; sin embargo, análisis transcriptómicos de tubos polínicos de *N. tabacum* revelan la expresión de una NTR citosólica (Conze *et al.*, 2017), lo cual apoya la idea de que NaTrxh actúe en este sitio, en donde también hay NADPH disponible (Cárdenas *et al.*, 2016).

Nuestra propuesta es que NaTrxh activa a la S-RNasa que está disponible en el citoplasma del tubo polínico (Figura 39), la cual es compatible con los dos modelos vigentes del rechazo del polen. La S-RNasa ingresa al tubo polínico independientemente de su haplotipo *S* y lo podría hacer a través de dos vías: una sería directamente al citoplasma, posiblemente a través de un transportador como MdABCF reportado en *M. domestica* (Meng *et al.*, 2014) o por endocitosis. Una vez en el citoplasma y después de interactuar con SLF, solo la S-RNasa incompatible será ubiquitilada y degradada a través del proteosoma 26S, tal como lo indica el modelo colaborativo. Por su parte, la S-RNasa compatible permanecerá libre en el citoplasma y será activa para degradar el RNA del tubo polínico solo hasta que NaTrxh la reduzca.

De acuerdo con el modelo de la compartimentalización de la S-RNasa, el ingreso de la S-RNasa sería preferentemente a través de endocitosis, aunque no se descarta su incorporación por un transportador. La incorporación al interior del tubo polínico por endocitosis dirigiría a la S-RNasa masivamente a una vacuola en donde permanecerá hasta su ruptura, lo cual ocurrirá sólo en una cruce incompatible. La S-RNasa liberada al citoplasma debido a la ruptura de la vacuola será activada por NaTrxh para degradar el RNA del tubo polínico y culminar la respuesta de rechazo del polen.

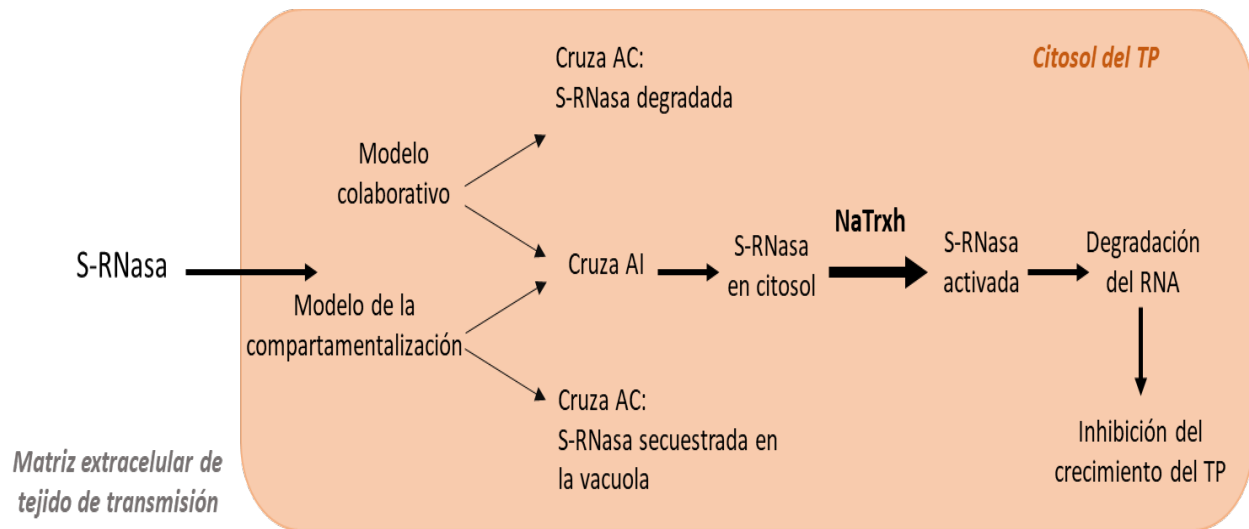


Figura 39. Participación de NaTrxh en el rechazo del polen a través de la activación de la S-RNasa. NaTrxh activará a la S-RNasa libre en el citosol del tubo polínico. De acuerdo con el modelo colaborativo, la S-RNasa libre será aquella que no interaccionó con SLF porque la cruce fue AI, mientras que, de acuerdo con el modelo de compartimentalización, la S-RNasas se liberan de la vacuola. Solo hasta que la S-RNasa es reducida específicamente por NaTrxh, podrá ser activa para degradar el RNA del tubo polínico e inhibir su crecimiento.

No se había demostrado la participación de proteínas reductoras en la AI gametofítica; sin embargo, se reportó una mutante natural en polen de *Prunus armeniaca* (Rosaceae) que es autocompatible debido a la inserción de un transposon que evita la expresión de una oxidoreductasa denominada ParMDO (*Prunus armeniaca* locus M Disulfide bond A-like Oxidoreductase) (Muñoz-Sanz *et al.*, 2017). La AI en Rosaceae, como en Solanaceae, depende de S-RNasas (Vilanova *et al.*, 2006). Los autores proponen que la función de ParMDO en el mecanismo podría ser afectando la actividad de alguna de las determinantes de especificidad en Rosaceae (Muñoz-Sanz *et al.*, 2017). Lo anterior refuerza nuestra propuesta de que existe una regulación redox en el mecanismo de AI gametofítica.

8. Conclusiones

- NaTrxh es una proteína esencial para el rechazo del polen alelo *S*-específico, el cual participa a través de la reducción y activación de la S-RNasa.
- NaTrxh participa en un mecanismo de incompatibilidad interespecífica donde también están involucradas HT-B y NaStEP para el rechazo del polen de *N. plumbaginifolia*.
- El incremento en la actividad de la S-RNasa se da por la reducción de uno de sus cuatro puentes disulfuro (formado entre las Cys155 y Cys185 de la S_{C10}-RNasa), el cual está conservado en todas las S-RNasas.
- La interacción dada entre el dominio N β de NaTrxh y la S-RNasa, media la reducción específica de la ribonucleasa.

9. Perspectivas

- Generar dos mutantes de la S_{C10}-RNasa, una en su sitio activo y otra tanto en el sitio activo como en las Cys155 y Cys185; sobreexpresarlas en *E. coli*, purificarlas y cristalizarlas. Esto permitiría determinar los cambios conformacionales derivados de la reducción del puente disulfuro blanco de NaTrxh.
- Obtener un complejo estable entre la S-RNasa y NaTrxh para su cristalización.
- Evaluar si la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh a través de su extremo C-terminal permite el ingreso de ambas proteínas al tubo polínico.

10. Bibliografía.

Abraham M. J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. (2015) GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. **1-2**: 19-25.

Adams P. D., Pavel V. A., Bunkóczi G., Chen V. B., Echols N., Headd J. J., Hung L-W., Jain S., Kapral G. J., Kunstleve R. W. G., McCoy A. J., Moriarty N. W., Oeffner R. D., Read R. J., Richardson D. C., Richardson J. S., Terwilliger T. C., Zwarta P. H. (2011) The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods*. **55**: 94–106.

Alkhalfioui F., Renard M., Frendo P., Keichinger C., Meyer Y., Gelhaye E., Hirasawa M., Knaff D.B., Ritzenthaler C., Montrichard F. (2008) A novel type of thioredoxins dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol*. **148**: 424-435.

Allen G. C., Flores-Vergara M. A., Krasynanski S., Kumar S., Thompson W. F. (2006) A modified protocol for rapid DNA isolation from plant tissue using cetyltrimethylammonium bromide. *Nature Protocol*. **5**: 2320-2325.

Anderson M. A., Cornis E. C., Goeffrey I., Bernatzky R., Altkinson A., Orpin T., Dedman H., Tregear G., Fernley R., Clarke A. E. (1989) Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*. **1**: 483-491.

Arkhipova V., Guskov A., Slotboom D.-J. (2017) Analysis of the quality of crystallographic data and the limitations of structural models. *J Gen Physiol*. **149**: 1091-1103.

Arsova B., Hoja U., Wimmelbacher M., Greiner E., Ustün S., Melzer M., Petersen K., Lein W., Börnke F. (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*. **22**: 1498-1515.

Ávila-Castañeda A., Juárez-Díaz J. A., Bravo-Alberto C. E., Ibarra Sánchez C., Zavala-Castillo A., Cruz-González Y., Martínez-Castilla L., Márquez-Guzmán J., Cruz-García F. (2014) A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase *in vitro*. *BMC Plant Biol*. **14**: 147.

Baek Y. S., Royer S. M., Broz A. K., Covey P. A., López-Casado G., Nuñez R., Kear P. J., Bonierbale M., Orillo M., van der Knaap E., Stack S. M., McClure B., Chetelat R. T., Bedinger P. A. (2016) Interspecific reproductive barriers between sympatric populations of wild tomato species (*Solanum* section *Lycopersicon*). *Am J Bot*. **103**:1964-1978.

Baumann U., Juttner J. (2002) Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. *Cell Mol Life Sci*. **59**: 1042-1057.

Beecher B., McClure B.A. (2001) Expressing self-incompatibility RNases (S-RNases) in transgenic plants. *Methods Mol Biol*. **160**: 65-85.

- Bower M. S., Matias D. D., Fernandes-Carvalho E., Mazzurco M., Gu T., Rothstein S. J., Goring D. R. (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.
- Brisolara-Corrêa L., Thompson C. E., Fernandes C. L., de Freitas L. B. (2015) Diversification and distinctive structural features of S-RNase alleles in the genus *Solanum*. *Mol Genet Genomics*. **290**: 987-1002.
- Brunger A. T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*. **355**: 472-475.
- Cabrillac D., Cock J. M., Dumas C., Gaude T. (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*. **410**: 220–223.
- Campos-Acevedo A. A., Garcia-Orozco K. D., Sotelo-Mundo R. R., Rudiño-Piñera E. (2013) Expression, purification, crystallization and X-ray crystallographic studies of different redox states of the active site of thioredoxin 1 from the whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*. **69**: 488-493.
- Cárdenas L., McKenna S. T., Kundel J. G., Helper P. K. (2006) NAD(P)H oscillates in pollen tubes and is correlated with tip growth silvestreh. *Plant Physiol*. **142**: 1460-1468.
- Chase M. W., Knapp S., Cox A. V., Clarkson J. J., Butsko Y., Joseph J., Savolainen V., Parokonny A. S. (2003) Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot*. **92**: 107-127.
- Chen J., Wang P., de Graaf B. H. J., Zhang H., Jiao H., Tang C., Zhang S., Wu J. (2018) Phosphatidic acid counteracts S-RNase signaling in pollen by stabilizing the actin cytoskeleton. *Plant Cell*. **30**: 1023-1039.
- Clark K. R., Okuley J. J., Collins P. D., Sims T. L. (1990) Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-compatible *Petunia*. *Plant Cell*. **2**: 815-826.
- Collet J. F., Messens J. (2010) Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal*. **13**: 1205-1216.
- Collin V., Issakidis-Bourguet E., Marchand C., Hirasawa M., Lancelin J. M., Knaff D. B. (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem*. **278**: 23747-23752.
- Conze L. L., Berlin S., Bail A. L., Kost B. (2017) Transcriptome profiling of tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen and pollen tubes. *BMC Genomics*. **18**: 581.
- Cruz-García F., Hancock C. N., Kim D., McClure B. A. (2005). Styolar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J*. **42**: 295-304.

- Dillet V., Dyson H. J., Bashford D. (1998). Calculations of electrostatic interactions and pKas in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*. **37**: 10298-10306.
- Dyson H. J., Jeng M. F., Model P., Holmgren A. (1994). Characterization by ¹H NMR of a C32S, C35S double mutant of *Escherichia coli* thioredoxin confirms its resemblance to the reduced wild-type protein. *FEBS Letters*. **339**: 11-17.
- de Graff D. H., Knuiman B. A., Derksen J., Mariani C. (2003). Characterization and localization of the transmitting tissue specific PELP III proteins of *Nicotiana tabacum*. *J. Exp. Bot.* **54**: 55-63.
- de Lamotte-Guéry F., Pruvost C., Minard P., Delsuc M. A., Miginiac-Maslow M., Schmitter J. M., Stein M., Decottignies P. (1997) Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Eng.* **10**: 1425-1432.
- Eberle C. A., Anderson N. O., Clasen B. M., Hegeman A. D., Smith A. G. (2013) PELP III: the class III pistil-specific extensin-like *Nicotiana tabacum* proteins are essential for interspecific incompatibility. *Plant J.* **74**: 805-814.
- Eklund H., Cambillau C., Sjöberg B. M., Holmgren A., Jornvall H., Hoog J. O., Branden C. I. (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* **3**: 1443-1449.
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G., Cowtton S., Silvestrean K. (2010) Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **66**: 486-501.
- Fiebig A., Kimport R., Preuss D. (2004) Comparisons of pollen coat genes across Brassicaceae species reveal rapid evolution by repeat expansion and diversification. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 3286-3291.
- Fritz-Wolf K., Kehr S., Stumpf M., Rahlfs S., Becke K. (2011) Crystal structure of the human thioredoxin reductase–thioredoxin complex. *Nat Commun.* **2**: 383.
- García-Valencia L. E., Bravo-Alberto C. E., Wu H. M., Rodríguez-Sotres R., Cheung A. Y., Cruz-García F. (2017). SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol.* **175**: 1105-1120.
- Gelhaye E., Rouhier N., Gérard J., Jolivet Y., Gualberto J., Navrot N. (2004a) 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., Rouhier N., Jacquot J. P. (2004b) The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol Biochem.* **42**: 265-271.
- Gleason F. K. (1992) Mutation of conserved residues in *Escherichia coli* thioredoxin: effects on stability and function. *Protein Sci.* **1**: 609–616.

- Goldraj A., Kondo K., Lee C. B., Hancock C. N., Sivaguru M., Vazquez-Santana S., Kim S., Phillips T. E., Cruz-García F., McClure B. (2006). Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*. **439**: 805-810.
- Gu T., Mazzurco M., Sulaman W., Matias D. D., Goring D. (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., Kent L., McClure B. A. (2005) The 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J*. **43**: 716–723.
- Harikrishna K., Jampates-Beale R., Milligan S., Gasser C. S. (1996) An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Mol Biol*. **30**: 899–911.
- Hershko A., Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*. **67**: 425-479.
- Ho S. N., Hunt H. D., Horton R. M., Pullen J. K., Pease L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. **77**: 51-59.
- Holmgren A., Soderberg B. O., Eklund H., Branden C. I. (1975) Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*. **72**: 2305-2309.
- Hua Z. H., Kao T. H. (2006) Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell*. **18**: 2531–2553.
- Huang J., Zhao L., Yang Q., Xue Y. (2006). AhSSK1, a novel SKP1-like protein that interacts with the S-locus F-box protein SLF. *Plant J*. **46**: 780–793.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph*. **14**: 33-38.
- Ida K., Norioka S., Yamamoto M., Kumasaka T., Yamashita E., Newbiggin E., Clarke A. E., Sakiyama F., Sato M. (2001) The 1.55Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol*. **314**: 103-112.
- Ilari A., Savino C. (2008) Protein Structure Determination by X-Ray Crystallography. En: Keith J.M. (eds) Bioinformatics. Methods in Molecular Biology, vol 452. Humana Press.
- Irie M. (1999) Structure-function relationships of acid ribonucleasas: lysosomal, vacuolar and periplasmic enzymes. *Pharmacol. Ther*. **81**: 77-89.
- Irie M., Ohgi K., Watanabe H., Iwama M., Nakamura K. T., Kurihara H., Nonaka T., Mitsui Y., Horiuchi H., Takagi M. (1994) pH profile of kinetic constants of RNase Rh from *Rhizopus niveus* and its mutant enzymes towards UpU, and possible mechanisms of RNase Rh. *J Biochem*. **115**: 1083-1087.

Juárez-Díaz J. A., McClure B., Vázquez-Santana S., Guevara-García A., Leon-Mejía P., Márquez Guzmán J., Cruz-García F. (2006) A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase *in vitro*. *J Biol Chem.* **281**: 3418-3424.

Jiménez-Durán K., McClure B., García-Campusano F., Rodríguez-Sotres R., Cisneros J., Busot J., Cruz-García F. (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**: 97-107.

Kachroo A., Schopfer C. R., Nasrallah M. E., Nasrallah J. B. (2001) Allele-specific receptor-ligand interactions in *Brassica* self-incompatibility. *Science.* **293**: 1824-1826.

Karplus P. A., Diederichs K. (2012) Linking crystallographic model and data quality. *Science.* **336**: 1030-1033.

Karplus P. A., Diederichs K. (2015) Assessing and maximizing data quality in macromolecular crystallography. *Curr Opin Struct Biol.* **34**: 60-68.

Kaufmann K.W., Lemmon G.H., Deluca S.L., Sheehan J.H., Meiler J. (2010) Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry.* **49**: 2987-2998.

Kawano S., Kakuta Y., Kimura M. (2002) Guanine binding site of the *Nicotiana glutinosa* ribonuclease NW revealed by X-ray crystallography. *Biochemistry.* **41**: 15195-15202.

Kubo K., Entani T., Takara A., Wang N., Fields A. M., Hua Z., Toyoda M., Kawachima S., Ando T., Isogai A., Kao T. H., Takayama S. (2010). Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science.* **5**: 796-799.

Lai Z., Ma W., Han B. (2002) An F-box gene linked to the self incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol.* **50**: 29-42.

Laloi C., Rayapuram N., Chartier Y., Grienenberger J. M., Bonnard G., Meyer Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 14144-14149.

Lee C. B., Kim S., McClure B. A. (2009) A pollen protein, NaPCCP, that binds pistil arabinogalactan proteins also binds phosphatidylinositol 3-phosphate and associates with the pollen tube endomembrane system. *Plant Physiol.* **149**: 791-802.

Lee H.-S., Huang S., Kao T.-h. (1994). S proteins control rejection of incompatible pollen in *Petunia inflata*. *Nature.* **367**: 560–563.

Li S., Williams J. S., Sun P., Kao T.-H. (2016) All 17 S-locus F-box proteins of the S2 - and S3 - haplotypes of *Petunia inflata* are assembled into similar SCF complexes with a specific function in self-incompatibility. *Plant J.* **87**: 606-616.

Lind J. L., Böning I., Clarke A. E., Anderson M. A. (1996) A style-specific 120kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana alata* *in vivo*. *Sex. Plant Reprod.* **9**: 75-86.

- Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J. L., Dror R. O., Shaw D. E. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins*. **78**: 1950-1958.
- Luu D.-T., Xike Q., Morse D., Cappadocia M. (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*. **407**: 649-651.
- Maeda K., Hagglund P., Finnie C., Svensson B., Henriksen A. (2006) Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. *Structure* **14**: 1701.
- Matton D. P., Maes O., Laublin G., Xike Q., Bertrand C., Morse D. and Cappadocia M. (1997). Hypervariable domains of Self-Incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell*. **9**: 1757-1766.
- McClure B. A. (2004) S-RNase and SLF determine S-haplotype-specific pollen recognition and rejection. *Plant Cell*. **16**: 2840-2847.
- McClure B. A., Cruz-García F., Romero C. (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot*. **108**: 647-658.
- McClure B. A., Gray J. E., Anderson M. A., Clarke A. E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*. **347**: 757-760.
- McClure B. A., Franklin-Tong V. E. (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in “self” pollen tube inhibition. *Planta*. **224**: 233-245.
- McClure B. A., Mou B., Canevascini S., Bernatzky R. (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana glauca*. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**: 13548–13553.
- McClure B. A., Haring V., Ebert P. R. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*. **342**: 955-957.
- McPeterson A., Gavira J. A. (2014) Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*. **70**: 2-20.
- Meng D., Gu Z., Li W., Wang A., Yuan H., Yang Q., Li T. (2014) Apple MdABCF assists in the transportation of S-RNase into pollen tubes. *Plant J*. **78**: 990-1002.
- Meyer Y., Siala W., Bashandy T., Riondet C., Vignols F., Reichheld J. P. (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta*. **1783**: 589-600.
- Meyer Y., Verdoucq L., Vignols F. (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci*. **4**: 388-394.
- Meyer Y., Vignols F., Reichheld J. P. (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol*. **347**: 394–402.

- Minor W., Cymborowski M., Otwinowski Z., Chruszcz M. (2006) HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **62**: 8598-8566.
- Motohashi K., Kondoh A., Stumpp M., Hisabori T. (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 11224-11229.
- Murase K., Shiba H., Iwano M., Che F. S., Watanabe M., Isogai A., Takayama S. (2004) A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science.* **303**: 1516-1519.
- Muñoz-Sanz J. V., Zuriaga E., Badenes M. L., Romero C. (2017) A disulfide bond A-like oxidoreductase is a strong candidate gene for self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) pollen. *J Exp Bot.* **68**: 5069-5078.
- Murfett J., Atherton T. L., Mou B., Gasser C. S., McClure B. A. (1994) S-RNase expressed in transgenic *Nicotiana* causes S-allele-specific pollen rejection. *Nature.* **367**: 563-566.
- Murfett J., McClure B. A. (1998) Expressing foreign genes in the pistil: a comparison of S-RNase constructs in different *Nicotiana* backgrounds. *Plant Mol Biol.* **37**: 561-569.
- Neira J. L., González C., Toiron C., Prat-Gay G., Rico M. (2001) Three-dimensional solution structure and stability of thioredoxin m from spinach. *Biochemistry.* **50**: 15246-15256.
- deNettancourt D. (1977) Incompatibility in angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag, USA.
- Noyszewski A. K., Liu Y., Tamura K., Smith A. G. (2017) Polymorphism and structure of style-specific arabinogalactan proteins as determinants of pollen tube growth tip silencing in *Nicotiana*. *BMC Evolutionary Biology.* **17**: 186.
- Oxley D., Bacic A. (1996) Disulfide bonding in a stilar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana glauca*. *Eur J Biochem.* **242**: 75-80.
- Parker M. W. (2003) Protein structure from X-ray diffraction. *J Biol Phys.* **29**: 341-362.
- Parry S., Newbigin E., Craik D., Nakamura K. T., Bacic A., Oxley D. (1998) Structural analysis and molecular model of self-incompatibility RNase from wild tomato. *Plant Physiol.* **116**: 463-469.
- Parry S., Newbigin E., Currie G., Bacic A., Oxley D. (1997) Identification of active-site histidine residues of a self-incompatibility ribonuclease from a wild tomato. *Plant Physiol.* **115**: 1421-1429.
- Qiao H., Wang F., Zhao L., Zhou J., Lai Z., Zhang Y., Robbins T.P., Xue Y. (2004) The F-box protein AhSLF-S2 controls the pollen function of S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell.* **16**: 2307-2322.

- Rea A. C., Nasrallah J. B. (2008) Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *Int. J. Dev. Biol.* **52**: 627-636.
- Read R. J., Adams P. D., Arendall W. B., Brunger A. T., Emsley P., Joosten R. P., Kleywegt G. J., Krissinel E. B., Lütke T., Otwinowski Z., Perrakis A., Richardson J. S., Sheffler W. H., Smith J. L., Tickle I. J., Vriend G., Zwart P. H. (2011) A new generation of crystallographic validation tools for the protein data bank. *Structure.* **19**:1395-1412
- Reichheld J. P., Mestres-Ortega D., Laloi C., Meyer Y. (2002) The multigenic family of thioredoxin in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol Biochem.* **40**: 685-690.
- Roldán J. A., Rojas H. J., Goldraij A. (2012). Disorganization of F-actin cytoskeleton precedes vacuolar disruption in pollen tubes during the in vivo self-incompatibility response in *Nicotiana glauca*. *Ann Bot.* **110**: 787–795.
- Roos G., García-Pino A., Van belle K., Brosens E., Wahni K., Vandebussche G., Wyns L., Loris R., Messens J. (2007) The conserved active site Proline determines the reducing power of *Staphylococcus aureus* thioredoxin. *J Mol Biol.* **368**: 800-811.
- Shi J., Bhattacharyya K. (1996) A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Mol Biol.* **32**: 653-662
- Shiba H., Takayama S., Iwano M., Shimosato H., Funato M., Nakagawa T., Che F. S., Suzuki G., Watanabe M., Hinata K., Isogai A. (2001). A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiol.* **125**: 2095-2103.
- Sijacic P., Wang X., Skirpan A. L., Wang Y., Dowd P. E., McCubbin A. G., Huang S., Kao T.-h. (2004). Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility. *Nature.* **429**: 302–305.
- Stein J. C., Nasrallah. (1993) A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase or *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **101**: 1103-1106.
- Takayama S., Isogai A. (2005) Self-incompatibility in plants. *Annu Rev Plant Biol.* **56**: 467-489.
- Torres-Rodríguez M.D. (2016) NaTrxh regula positivamente la actividad catalítica de la S-RNasa. Tesis de Maestría. UNAM.
- Trott O., Olson A. J. (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* **31**: 455-461.
- Wheeler D., Newbigin E. (2007) Expression of 10 S-class SLF-like genes in *Nicotiana glauca* pollen and its implications for understanding the pollen factor of the S locus. *Genetics.* **177**: 2171–2180.

- Williams J. S., Der J. P., dePamphilis C.W., Kao T.-H. (2014) Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus F-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *Plant Cell*. **26**: 2873-2888.
- Wlodawer A., Minor W., Dauter Z., Jaskolski M. (2013) Protein crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determination. *FEBS J*. **280**: 5705-5736.
- Wong J.H., Kim Y.B., Ren P.H., Cai N., Cho M.J., Hedden P., Lemaux P.G., Buchanan B.B. (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA*. **99**: 16325-16330.
- Wu H.M., Wang H., Cheung A.Y. (1995) A pollen tube growth tip silvestreh stimulatory glycoprotein is deglycosylated by pollen tubes and displays a glycosylation gradient in the flower. *Cell*. **82**: 395-403.
- Wynn R., Cocco M. J. y Richards F. M. (1995) Mixed disulphide intermediates during the reduction of disulphides by *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*. **34**: 11807-11813.
- Yano H., Wong J. H., Lee Y. M., Cho M. J. y Buchanan B. B. (2001) A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*. **98**: 4794-4799.
- Zheng, N., Schulman B. A., Song L., Miller J. J., Jeffrey P. D., Wang P., Chu C., Koepp D. M., Elledge S. J., Pagano M., Conaway R. C., Conaway J. W., Harper J. W., Pavletich N. P. (2002). Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F-box^{Skp2} ubiquitin-protein ligase complex. *Nature*. **416**: 703–709.

11. Anexos

Anexo 1. Protocolo para extracción de banda de gel con el Kit GeneJET Gel Extraction Kit Thermo Scientific.

- a) Cortar la banda del gel que contiene el fragmento de DNA deseado y pasar a un tubo de 1.5 ml.
- b) Añadir 1 volumen de *Binding Buffer* e incubar a 60°C durante 10 min, mezclando por inversión cada 2 min para facilitar la subilización.
- c) Transferir el DNA solubilizado a una columna de purificación sobre un tubo colector. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min.
- d) Añadir 100 µl de *Binding Buffer* y centrifugar a 12,000 g durante 1 min. Descartar el sobrenadante del tubo colector.
- e) Añadir 700 µl de *Washing Buffer* y centrifugar a 12,000 g durante 1 min. Descartar el sobrenadante del tubo colector.
- f) Centrifugar a 12,000 g durante 1 min para eliminar todo el *Washing Buffer*.
- g) Situar la columna en un tubo de 1.5 ml y añadir 50 µl de *Elution Buffer* al centro de la columna. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min y almacenar a -20°C hasta su uso.

Anexo 2. Transformación de células de *E. coli* químicamente competentes.

- a) Agregar a 100 µl de células competentes 1 ng del plásmido con el que se desea transformar.
- b) Incubar en hielo durante 30 min.
- c) Incubar a 42°C durante 30 segundos.
- d) Incubar en hielo durante 2 min.
- e) Adicionar 500 µl de medio LB e incubar en agitación (200 rpm) 37°C durante 1 hr.
- f) Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante y resuspender en 100 µl de LB.
- g) Verter 50 µl en una placa de agar con antibióticos y dispersar con perlas de vidrio h) Incubar toda la noche a 37°C.
 - Medio LB:
 - 1 gr de Peptona o Triptona
 - 0.5 gr de NaCl
 - 1 gr de Extracto de levadura

Disolver en 100 ml de H₂O desionizada y esterilizar en autoclave.

Si se desea realizar medio sólido, añadir 1.5 gr de agar previo a la esterilización.

Anexo 3. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* con el kit GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

- a) Tomar un cultivo de 3 ml crecido durante toda la noche a 37°C y centrifugarlo a 13,000 rpm durante 1 min. Desechar el sobrenadante.
- b) Resuspender con vórtex el botón celular en 250 µl de *Resuspension Buffer*.
- c) Añadir 250 µl de *Lysis solution* y mezclar por inversión 6 veces.
- d) Añadir 350 µl de *Neutralization Buffer* y mezclar por inversión 6 veces.
- e) Centrifugar durante 5 min a 12,000 g.
- f) Transferir el sobrenadante a una columna de purificación colocada sobre un tubo colector.
- g) Centrifugar durante 5 min a 12,000 g y eliminar el sobrenadante del tubo colector.
- h) Añadir 500 µl de *Wash solution* y centrifugar durante 1 min a 12,000 g. Eliminar el sobrenadante del tubo colector.
- i) Repetir el paso h
- j) Centrifugar a 12,000 g durante 1 min.
- k) Situar la columna en un tubo de 1.5 ml y añadir 50 µl de *Elution Buffer* al centro de la columna. Centrifugar a 12,000 g durante 1 min y almacenar a -20°C hasta su uso.

Anexo 4. Transformación de células de *A. tumefaciens* electrocompetentes.

- a) Vertir 2 ng de DNA en un vial de células electrocompetentes.
- b) Pasar la mezcla anterior a una celda de electroporación estéril previamente enfriada en hielo.
- c) Dar un pulso de 1820 V en electroporador.
- d) Recuperar las células de la celda con 1 ml de medio LB mezclando suavemente y pasarlo a un tubo de 1.5 ml.
- e) Incubar 2 h a 37°C con agitación (200 rpm).
- f) Centrifugar a 13,000 rpm durante 1 min. Descartar el sobrenadante y resuspender en 100 µl de LB.
- g) Verter 50 µl en una placa de agar con antibióticos y dispersar con perlas de vidrio.

g) Incubar de 12 a 15 h a 37°C.

Anexo 5. Medios utilizados en cultivo de tejidos.

- NAP6-4 (Medio para regeneración). Las cantidades son para preparar 1 L de medio.
 - 40 µl de BA (6-bencilaminopurina) a 50 mg/ml
 - 200 µl de mioinositol a 50 mg/ml
 - 2 µl de ácido nicotínico a 50 mg/ml
 - 2 µl de piridoxina·HCl a 50 mg/ml
 - 20 µl de tiamina·HCl a 50 mg/ml
 - 10 µl de AIA (ácido 3-indolacético) a 50 mg/ml
 - 10 ml de glicina a 0.5 g/L
 - 4.4 g de MS (Medio Murashige & Skoog)
 - 1 g de MES
 - 30 g de sacarosa

Ajustar a pH 5.7 y esterilizar en autoclave. Si se desea medio sólido, añadir 0.12 gr de Phytigel por cada 100 ml de medio antes de esterilizarse.

Antes de utilizar el medio, añadir 100 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico como antioxidantes.

- MS (Medio para enraizar). Las cantidades son para preparar 1 L de medio.
 - 200 µl de mioinositol a 50 mg/ml
 - 2 µl de ácido nicotínico a 50 mg/ml
 - 2 µl de piridoxina·HCl a 50 mg/ml
 - 20 µl de tiamina·HCl a 50 mg/ml
 - 4.4 gr de MS (Medio Murashige & Skoog)
 - 0.6 gr de MES
 - 20 g de sacarosa

Ajustar a pH 5.7, añadir 0.25 gr de Phytigel por cada 100 ml de medio y esterilizarse en autoclave.

Antes de utilizar el medio, añadir 100 mg/L de ácido ascórbico y 100 mg/L de ácido cítrico como antioxidantes.

Anexo 6. Extracción de DNA genómico por el método de CTAB (Allen *et al.*, 2006)

a) Triturar 200 mg de tejido en un mortero con pistilo frío y con N líquido.

- b) Transferir el tejido molido a un tubo de 1.2 ml y añadir buffer de extracción (Tris 0.1M pH 8.0, NaCl 1.4 M, EDTA 0.02 M, 2% CATB, 1% β -mercaptoetanol) precalentado a 65°C.
- c) Incubar a 65°C durante 30 min, agitando cada 5 min.
- d) Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a TA.
- e) Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y adicionar 800 μ l de PCI. Mezclar agitando con la mano.
- f) Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a TA.
- g) Transferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo y adicionar 200 μ l de isopropanol frío. Mezclar bien e incubar 10 min a TA.
- h) Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C.
- i) Eliminar el sobrenadante y secar el pellet.
- j) Resuspender en 250 μ l de TE.
- k) Adicionar 2.5 μ l de RNasa A (Sigma) e incubar a 37°C durante 30 min.
- l) Adicionar 25 μ l de acetato de sodio 3M y mezclar bien.
- m) Adicionar 1.2 ml de etanol 100% frío e incubar a -20°C durante 20 min.
- n) Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante y secar bien el pellet.
- ñ) Resuspender en 50 μ l de TE y almacenar a -20°C hasta su uso.

Anexo 7. SDS-PAGE

La electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida se efectuó en dos fases: el gel apilador o concentrador y el gel separador con concentración de acrilamida de 4% y 12%, respectivamente.

Preparación del gel separador:

- 1.4 ml de Agua
- 1 ml de Amortiguador pH 8.8 [Tris 1.5 M pH 8.8, SDS 0.4%]
- 1.3 ml de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)
- 25 μ l de PSA 20%
- 2.5 μ l de Temed

Mezclar todo y vaciar rápidamente dentro de los vidrios. Agregar isopropanol para mantener un nivel adecuado en la parte superior del gel. Una vez que polimeriza, preparar el gel concentrador.

Preparación gel concentrador

- 1 ml de Agua
- 444 µl de Amortiguador pH 6.8 [Tris 0.5 M pH 6.8, SDS 0.4% (w/v)]
- 300 µl de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)
- 20 µl de PSA 20%
- 5 µl de Temed

Mezclar todo y vaciar rápidamente sobre el gel separador.

Una vez polimerizado, cargar las muestras previamente desnaturalizadas por 5 min en buffer de carga para proteínas [Tris-HCl 0.28 M pH 6.8, glicerol 30% (v/v), SDS 1% (w/v), azul de bromofenol 0.0012%, DTT 0.5 M]. La electroforesis se efectuó durante 1.5 h a 120 V en buffer de corrida de glicina (glicina 14.4 g, Tris 3 g, SDS 1 g en 1 L de H₂O).

Anexo 8. Composición de las condiciones (Kit Wizard 3) para las pruebas de cristalización de NaTrxh.

Número de condición	Agente precipitante	Buffer
4	20% Polietilenglicol 3,350	Formato de amonio 200 mM
14*	20% Polietilenglicol 6,000	Citrato de tri-sodio 100 mM pH 5.0
15*	Citrato de tri-sodio 1.6 M	-
18*	20% Polietilenglicol 6,000	Citrato de tri-sodio 100 mM pH 4.0
20*	10% Polietilenglicol 6,000	HEPES 100 mM pH 7.0
30*	25.5% Polietilenglicol 4,000	-
37*	Sulfato de amonio 3.2 M	Citrato de tri-sodio 100 mM pH 5.0
43*	30% Polietilenglicol 8,000	-

* Condiciones probadas en gota colgante.

Anexo 9. Composición de los aditivos (Kit de Hampton) para la cristalización de NaTrxh.

Número de aditivo	Composición del aditivo
1	0.1M de Cloruro de bario dihidrato
2	0.1M de Cloruro de cadmio hidrato
3	0.1M de Cloruro de calcio dihidrato
4	0.1M de Cloruro de cobalto (II) hexahidrato
5	0.1M de Cloruro de cobre (II) dihidrato
6	0.1M de Cloruro de magnesio hexahidrato
7	0.1M de Cloruro de manganeso (II) tetrahidrato
8	0.1M de Cloruro de estroncio hexahidrato

9	0.1M de Cloruro de itrio (III) hexahidrato
10	0.1M de Cloruro de zinc
11	0.1M de Cloruro de hierro (III) hexahidrato
12	0.1M de Cloruro de níquel (II) hexahidrato
16	1M de Cloruro de potasio
17	1M de Cloruro de litio
23	1M de Citrato de sodio tribásico dihidrato
40	0.1M de Cloruro de cobalto (III) hexamina
53	10% de Polietilenglicol 3,350
62	30% de Glicerol
63	3M de NDSB-195
64	2M de NDSB-201
65	2M de NDSB-211
68	0.5% de 1,2,3-heptanetriol
72	5% de n-dodecil- β -D-maltosido
82	30% de Etanol
93	0.25% de Diclorometano

12. Artículo “NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity”

NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity

Maria D. Torres-Rodríguez¹, Yuridia Cruz-Zamora¹, Javier A. Juárez-Díaz², Brian Mooney³, Bruce A. McClure⁴ and Felipe Cruz-García^{1*}

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx, 04510, México,

²Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx, 04510, México,

³Charles W. Gehrke Proteomics Center, University of Missouri, Columbia, MO, 65211, USA, and

⁴Department of Biochemistry, University of Missouri, Columbia, MO, 65211, USA

Received 28 November 2019; revised 20 March 2020; accepted 28 April 2020.

*For correspondence (e-mail fcg@unam.mx)

SUMMARY

In self-incompatible Solanaceae, the pistil protein S-RNase contributes to S-specific pollen rejection in conspecific crosses, as well as to rejecting pollen from foreign species or whole clades. However, S-RNase alone is not sufficient for either type of pollen rejection. We describe a thioredoxin (Trx) type h from *Nicotiana glauca*, NaTrxh, which interacts with and reduces S-RNase *in vitro*. Here, we show that expressing a redox-inactive mutant, NaTrxh_{SS}, suppresses both S-specific pollen rejection and rejection of pollen from *Nicotiana glauca*. Biochemical experiments provide evidence that NaTrxh specifically reduces the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond of S_{C10}-RNase, resulting in a significant increase of its ribonuclease activity. This reduction and increase in S-RNase activity by NaTrxh helps to explain why S-RNase alone could be insufficient for pollen rejection.

Keywords: NaTrxh, *Nicotiana glauca*, Self-incompatibility, S-RNase.

INTRODUCTION

Because flowering plants rely on extrinsic vectors, such as insects and wind to disperse pollen, they often deploy pollen–pistil interactions to control mating success. For example, self-incompatibility (SI) mechanisms favour outcrossing by preventing self-fertilization and interspecific pollen rejection mechanisms help to avoid crosses between species.

Self-incompatible species in Solanaceae, Plantaginaceae, and Rosaceae display S-RNase-based SI, which is genetically controlled by the S-locus (de Nettancourt, 2001). Self-crosses are prevented because pollen with an S-haplotype identical to the pistillate parent is rejected. The S-locus includes two or more tightly linked genes that encode the pistil and pollen S-specificity determinants: a ribonuclease, called S-RNase (McClure *et al.*, 1989), and one or more S-locus F-box proteins, SLF or SFB (Lai *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2014), respectively. S-RNases are secreted into the extracellular matrix of the stylar transmitting tract (Anderson *et al.*, 1989) and are taken up by growing pollen tubes (PTs) regardless of whether the cross is incompatible (self-pollen) or compatible (non-self-pollen) (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006), although only the RNA of incompatible PTs is degraded (McClure *et al.*, 1990).

The pollen S-determinant, SLF in Solanaceae, is encoded by a suite of pollen-expressed genes (Lai *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2014). SLF proteins form SCF complexes (Spk1-Cullin1-F-box protein) that are involved in the ubiquitination of proteins destined for degradation (Hua and Kao, 2006). Recognition between S-RNase and SLF in PTs determines whether the pollen is accepted or rejected depending on the S-haplotype (de Nettancourt, 2001; McClure and Franklin-Tong, 2006; McClure *et al.*, 2011).

Because S-RNase acts as a cytotoxin, pollen-side SI functions are assumed to provide resistance to S-RNase in compatible crosses. The collaborative non-self-recognition model (Kubo *et al.*, 2010) suggests that, together, the suite of SLF proteins encoded by a given S-haplotype allows ubiquitination and degradation of all S-RNases except, crucially, the single self-S-RNase encoded by that haplotype. In this model, self-S-RNase causes PT rejection because it evades degradation. The alternative S-RNase compartmentalization model suggests that PTs are resistant to S-RNase because it is initially sequestered into membrane compartments and rejection occurs when large amounts of S-RNase are released (Goldraij *et al.*, 2006).

S-RNase and SLF proteins also contribute to some types of interspecific pollen rejection, although these mechanisms are less well understood. Both S-RNase and SLF proteins have been directly implicated in interspecific pollen rejection in the tomato clade (Bedinger *et al.*, 2017). In *Nicotiana*, S-RNase is implicated in both *Nicotiana plumbaginifolia* and *Nicotiana tabacum* pollen rejection (Murfett *et al.*, 1996; Beecher *et al.*, 1998), although via distinct mechanisms. *Nicotiana plumbaginifolia* pollen rejection is similar to SI (although not S-specific), whereas *N. tabacum* pollen rejection differs in several respects (Li and Chetelat, 2010; Tovar-Méndez *et al.*, 2014).

Modifier genes (MGs) are also essential for both SI and interspecific pollen rejection (Murfett *et al.*, 1996; Bedinger *et al.*, 2017). The *in vivo* functions of several MGs have been confirmed through loss- or gain-of-function studies (McClure *et al.*, 1999; Kondo *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2005; Puerta *et al.*, 2009; Jiménez-Durán *et al.*, 2013; García-Valencia *et al.*, 2017), although their biochemical functions are unknown. For example, suppressing either of the two pistil-side MGs *HT-B* and *NaStEP* causes loss of S-specific pollen rejection (McClure *et al.*, 1999; Jiménez-Durán *et al.*, 2013). The exact function of *HT-B* is unknown, although it is degraded in compatible PTs (Goldraij *et al.*, 2006). When *NaStEP* is suppressed, *HT-B* is degraded in both compatible and incompatible PTs, suggesting that it protects *HT-B* in incompatible crosses (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). *NaSIPP*, identified as a mitochondrial phosphate-carrier pollen protein that interacts with *NaStEP*, also results in SI disruption when suppressed (García-Valencia *et al.*, 2017). Importantly, immunolocalization experiments show normal S-RNase uptake in *HT-B* and *NaStEP* suppressed lines (Goldraij *et al.*, 2006; Jiménez-Durán, 2013). Thus, the mere presence of S-RNase inside PTs is not sufficient for pollen rejection.

We previously described a putative MG from *Nicotiana alata* that encodes a thioredoxin (Trx) type *h* called *NaTrxh* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Trxs comprise small proteins (12–17 kDa) widely distributed, in prokaryotes and eukaryotes, with thiol-disulphide reductase activity, that modify other proteins by reducing disulphide bonds through their conserved active site (WCXXC) (Holmgren, 1985). Both Cys residues contained in this motif form a disulphide bond when the Trx is inactive/oxidized (Trx-S₂). Reduction of target protein by Trxs takes place when NADPH and NADPH-dependent Trx reductase (NTR) are present. Reducing equivalents are provided from NADPH via NTR to reduce Trx active site [Trx-(SH)₂], which is necessary to break the disulphide bond on the target protein (Holmgren, 1985).

In eukaryotes, Trxs generally exhibit a ubiquitous expression profile, indicating that they are involved in different physiological roles. Furthermore, plant Trxs are highly polymorphic (Arnér and Holmgren, 2000; Marchand *et al.*, 2004) which regarding their primary structure, eight types of Trxs have been identified so far (Meyer *et al.*, 2002). Trxs type *h*

(Trx *h*) form the largest and the most heterogenous group of these proteins and are classified into three subgroups (Gelhay *et al.*, 2004). *NaTrxh* clusters within subgroup 2 (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), which includes Trxs that possess an extension towards their N-terminal, although *NaTrxh* contains a C-terminal extension as well (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

In Arabidopsis, Trxs are expressed in the whole plant, although some of them are differentially expressed under different conditions and/or different organs, suggesting their participation in a wide diversity of processes according to their presumably specific target proteins (Arnér and Holmgren, 2000). Trxs targets include key proteins of mechanisms such as the Calvin–Benson cycle, the antioxidative stress system, germination and seedling development, to mention just some examples (Zhang and Portis, 1999; Marx *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2004). Regarding the specificity of Trxs on particular events, two Trxs from *Brassica* have been found to be involved in sporophytic SI (Cabrillac *et al.*, 2001; Haffani *et al.*, 2004).

NaTrxh is preferentially expressed in SI *N. alata* pistils compared to those from self-compatible (SC) *N. plumbaginifolia* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; McClure *et al.*, 2011), which, in addition to the *in vitro* studies where *NaTrxh* was not only found to reduce S-RNase, but also to form a stable protein-protein interaction with it, suggests that *NaTrxh* might play a key role in gametophytic S-RNase-based SI (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

To test the above hypothesis, several attempts at *NaTrxh* silencing were carried out, although we were unable to recover plants. This might be explained by the fact that *NaTrxh* is expressed in several *N. alata* organs (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) and it is therefore possible that it could be involved in other physiological roles during early developmental stages, similar to other plant thioredoxins (Marx *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2004). As a solution, we generated transgenic hybrid plants expressing a redox-inactive mutant *NaTrxh* (*NaTrxh_{SS}*) protein and found disruption of S-specific pollen rejection and rejection of pollen from SC *N. plumbaginifolia*. Biochemical studies show that *NaTrxh* reduction occurs specifically at the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide in S_{C10}-RNase and that this results in a seven-fold increase in its ribonuclease activity. We conclude that *NaTrxh* is required for full S-RNase function in pollen rejection *in vivo*. The *in vitro* results provide unusually good insight into the biochemical mechanism of the MG and suggest that it functions in the gametophytic SI pathway to achieve S-specific pollen rejection.

RESULTS

NaTrxh is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*

NaTrxh was originally identified in a cDNA-amplified fragment length polymorphism screen between SC

N. plumbaginifolia and *N. alata* cv. BT, a horticultural *N. alata* selection that is SC because it does not express S-RNase (McClure *et al.*, 2011). Protein blot analysis shows that NaTrxh is only detected in *N. alata* and other self-incompatible (SI) species, indicating a role in pollen rejection (Figure S1a); however, quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis confirms that all species assayed express the *NaTrxh* transcript, although with differences in expression levels, with *N. plumbaginifolia* being present at the lowest levels (Figure S1b). The presence of *NaTrxh* mRNA and its absence in pistils of *N. plumbaginifolia* suggests a translational regulation of NaTrxh in this species, which needs further research.

In Solanaceae, *in vivo* studies are best for testing whether potential MGs function directly in SI. We previously reported that NaTrxh colocalizes with S-RNase in the *N. alata* stylar transmitting tissue extracellular matrix, that it interacts with S-RNase, and that it is capable of reducing S-RNase disulphides (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). To test whether NaTrxh functions in pollen rejection, we expressed a redox-inactive mutant of NaTrxh, *NaTrxh_{SS}*, with both cysteines substituted for serine in the conserved WCGPC motif. Because *N. alata* cannot be transformed (Beecher *et al.*, 1998), we generated three independent *N. plumbaginifolia*:NaTrxh_{SS} lines and crossed them with *N. alata* S_{C10}⁻ or S_{A2}-pollen. Fourteen transgenic *N. plumbaginifolia*:NaTrxh_{SS} × *N. alata* S_{A2}S₀ and S_{C10}S₀ hybrids reached maturity and six were selected for testing NaTrxh_{SS} expression and pollen rejection phenotype. For brevity, these are referred to as S_{A2}-hybrids and S_{C10}-hybrids, respectively. Specific primers were designed to amplify *NaTrxh_{SS}* and wild-type (wt) *NaTrxh* transcripts (differing in only three nucleotides, Figure S2). RT-PCR using *NaTrxh_{SS}* specific primers confirmed *NaTrxh_{SS}* transcript expression (Figure 1a), for which levels are lower than the wt *NaTrxh* transcript. Differences in expression levels might be a result of the promoters that drive their transcription. *NaTrxh_{SS}* is under the control of the CaMV35S promoter, which may exhibit weaker expression in reproductive tissues than in vegetative ones (Williamson *et al.*, 1989; Murfett *et al.*, 1992, 1995), whereas the native *NaTrxh* is under its own promoter, which, in *N. alata*, leads to high expression levels (Figure S1b). Immunoblots showed that NaTrxh_{SS} expression did not affect S-RNase, HT-B, NaStEP or 120 K protein levels (Figure S3).

Pollination tests showed that NaTrxh_{SS} expression prevents S-RNase dependent pollen rejection. Untransformed controls and S_{C10}-hybrids expressing NaTrxh_{SS} were pollinated with S_{C10}⁻ (incompatible) or S_{A2}-pollen (compatible), and PT growth near the base of the style was checked after 72 h. Controls showed a normal S-specific pollen rejection response: S_{C10}-PTs were rejected, although numerous S_{A2}-PTs reached the base of the style (Figure 1c, i, ii). However,

three independent S_{C10}-hybrids expressing NaTrxh_{SS} lost S-specific pollen rejection, showing numerous PTs of both types at the base of the styles (Figure 1c, iii–vi). Five independent S_{A2}-hybrids expressing NaTrxh_{SS} also showed this phenotype, in which both S_{C10}⁻ and S_{A2}-PTs were compatible (Figure S4). Because redox-inactive NaTrxh_{SS} prevented S-specific pollen rejection, we conclude the redox activity of NaTrxh is essential for SI.

Because transgenic hybrids expressing NaTrxh_{SS} also express wt NaTrxh from *N. alata*, the pollen rejection phenotype was expected to be partial. To test this, we performed pollinations with fewer amounts of pollen grains aiming to determine whether there was a difference in the percentage of pollen tubes reaching the base of the style. S-specific pollen rejection in wt *N. plumbaginifolia* × *N. alata* S_{C10}S_{C10} hybrids occurred between the stigma and one-third of the style, where uncountable number of pollen tubes were observed in the lower zones when pollinated with *N. alata* S_{A2}S_{A2} pollen and 0% (*n* = 4) when pollinated with *N. alata* S_{C10}S_{C10} pollen (Figure S5). When *NaTrxh_{SS}*-expressing S_{A2}-hybrids were pollinated with S_{C10}⁻-pollen, we found that all pollen tubes grew towards the base of the style, as expected in a compatible cross (Figure 2). Conversely, when we pollinated *NaTrxh_{SS}*-expressing S_{A2}-hybrids with S_{A2}-pollen (incompatible cross), 56.96 ± 20.6% (*n* = 3) of PTs reached the base of the style (Figure 2). Similar results were obtained when *NaTrxh_{SS}*-expressing S_{C10}-hybrids were tested: all PTs reached the base of the style in a compatible cross and 55.15 ± 10.2% (*n* = 4) in an incompatible cross. Thus, an increase in the number of PTs that reached the bottom of the style in the incompatible cross indicates that, in these PTs, there was a dominant-negative effect by competition between the wt NaTrxh and the mutant NaTrxh_{SS} for its substrate, the S-RNase. In addition, the low PTs acceptance could correlate with the expression levels of *NaTrxh_{SS}* in transgenic hybrids (Figure 1a).

NaTrxh is required for *N. plumbaginifolia* pollen rejection

Because other MGs (i.e. HT proteins and NaStEP) are essential for interspecific pollen rejection (Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2006), we evaluated the role of NaTrxh in this mechanism for *N. plumbaginifolia*. Figure 1d shows that untransformed S_{C10}-hybrids rejected *N. plumbaginifolia* pollen; however, the hybrids expressing NaTrxh_{SS} were compatible and showed *N. plumbaginifolia* PTs at the base of the style. The dominant-negative effect of NaTrxh_{SS} suggests that NaTrxh is required for *N. plumbaginifolia* pollen rejection, a mechanism in which NaStEP and HT-B are also involved.

A biochemical mechanism for NaTrxh action

The negative effect of redox-inactive NaTrxh_{SS} suggests that the S-RNase reduction by NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*,

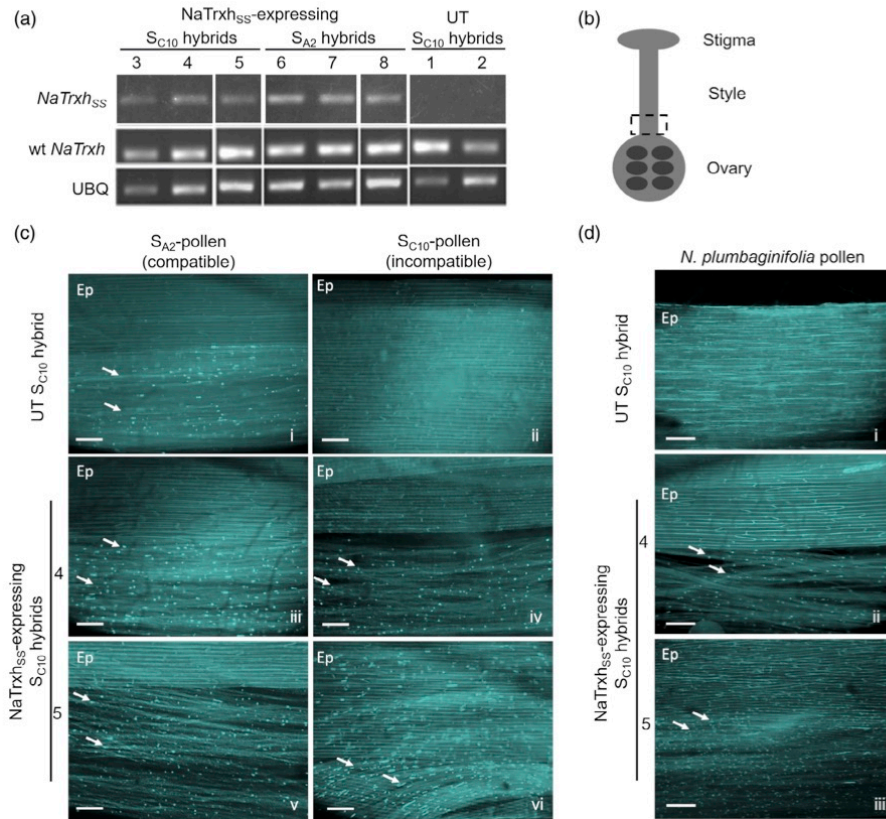


Figure 1. NaTrx_{SS} prevents pollen rejection in *Nicotiana*. (a) A reverse transcriptase-polymerase chain reaction shows NaTrx_{SS} expression only in transgenic S_{C10}- and S_{A2}-hybrids. Wild-type (wt) NaTrx transcript is expressed in both transgenic and untransformed (UT) hybrids. Ubiquitin (UBQ): loading control. (c) Untransformed (UT) and NaTrx_{SS}-expressing S_{C10}-hybrids were challenged with compatible S_{A2}-pollen or with incompatible S_{C10}-pollen and imaged at the base of the style (b) after 72 h. UT control shows S-specific pollen rejection (i versus ii) but hybrids expressing NaTrx_{SS} are compatible with both S-genotypes (iii versus iv; v versus vi). (d) UT hybrids reject *Nicotiana plumbaginifolia* pollen (i) but NaTrx_{SS}-expressing hybrids are compatible (ii and iii). Ep, epidermis; arrows, callose plugs of the growing PTs; scale bar = 100 μm; n = 12.

2006) is important for both S-specific and *N. plumbaginifolia* pollen rejection. We evaluated the effect of NaTrx on S-RNase enzyme activity and disulphide bond reduction aiming to better understand its biochemical activity.

Purified S_{C10}-RNase was obtained in accordance with a previously reported method (Cruz-García *et al.*, 2005) and was assayed after treatment with dithiothreitol (DTT), *Escherichia coli* Trx, and a series of NaTrx constructs (Figure 3a,b). Figure 3c shows that treatment with the strong thiol reducing agent DTT decreased S_{C10}-RNase ribonuclease activity to < 25% (*t* test, *P* = 0.0148*). *Escherichia coli* Trx was chosen as a second non-specific control because it is active on a variety of proteins (Kumar *et al.*, 2004), although it had no effect on S_{C10}-RNase activity (ANOVA,

P > 0.99999999) (Figure 3c). NaTrx, NaTrx_{SS}, and three deletion constructs (Figure 3a, b) were expressed in bacteria to test whether redox activity and specific NaTrx motifs are required for function (NTR and NADPH were added for electron transfer). The results confirmed that redox activity is required because NaTrx caused seven-fold increase in enzyme activity (ANOVA, *P* < 0.00000001) (Figure 3c), whereas the redox-inactive NaTrx_{SS} did not show any effect (ANOVA, *P* = 0.99999981) (Figure 3c).

NaTrx displays N- and C-terminal extensions outside its catalytic core (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014) (Figure 3a). These extensions are not required for redox activity (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014) in standard Trx assays (Holmgren, 1979). Thus, they may be specific to NaTrx functions. The

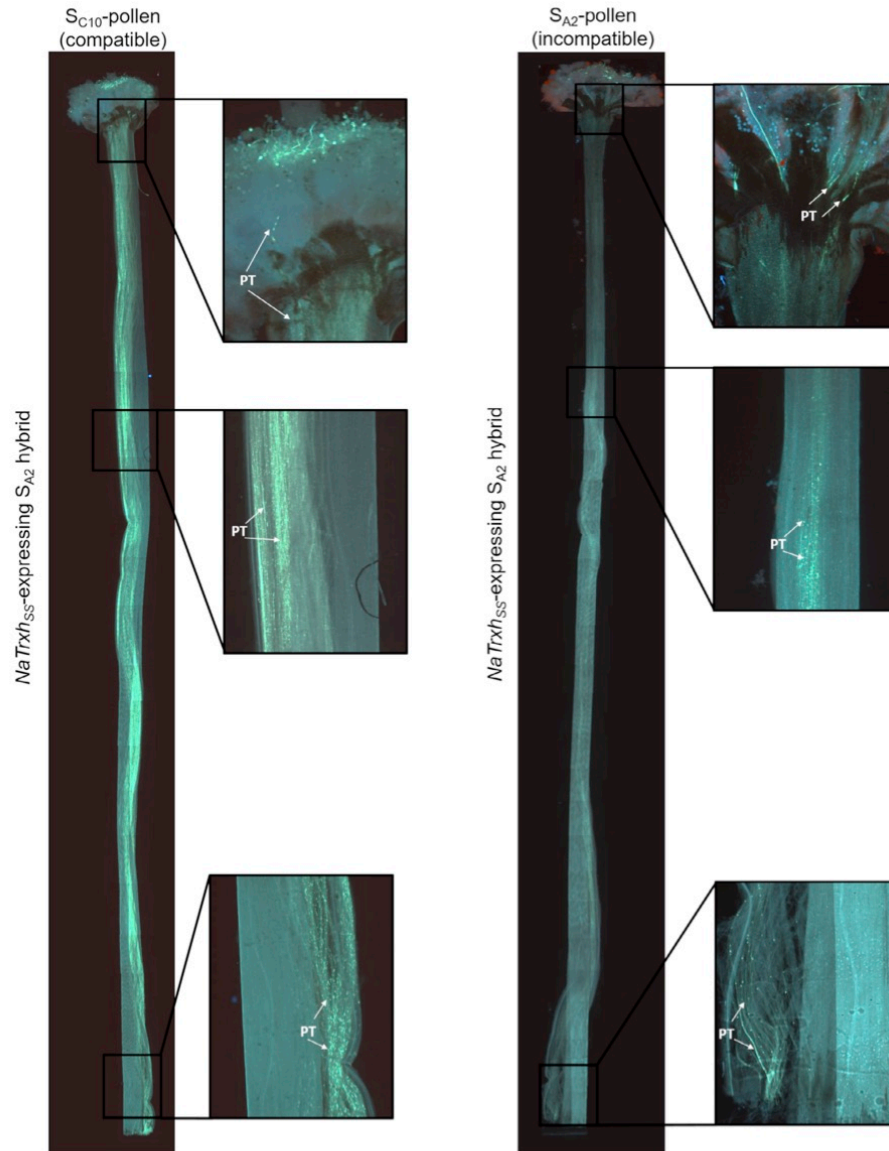


Figure 2. Co-expression of NaTrxh_{SS} along with NaTrxh partially disrupts pollen rejection phenotype. S_{A2}-hybrids expressing NaTrxh_{SS} were pollinated with low amount of pollen grains from S_{C10}- or S_{A2}-pollen wild-type (wt) *Nicotiana glauca*. In the compatible cross (S_{C10}-pollen), all pollen tubes grew until the base of the style; in the incompatible cross (S_{A2}-pollen), 56.96 ± 20.6% (n = 3) tubes were accepted by the pistil and grew along the style reaching the base, near the ovary. Arrows: pollen tubes (PT); scale bar = 80 μm.

NaTrxh N-terminal extension includes two motifs: N α and N β . Previous studies showed that N β is involved in NaTrxh secretion, although the function of N α is unknown (Ávila-

Castañeda *et al.*, 2014). The C-terminal extension is important for S-RNase interaction (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Figure 3c shows that reduction with an N α deletion mutant

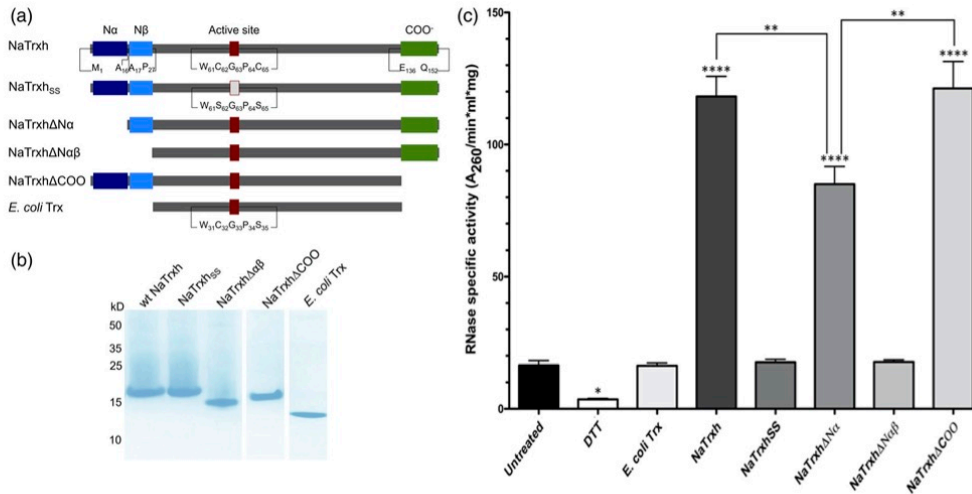


Figure 3. NaTrxh reduces S-RNase and increases its ribonuclease activity. Structural features (a) and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of NaTrxh and the different constructs assayed for effects on S_{C10} -RNase (b). (c) Ribonuclease activity of purified S_{C10} -RNase (untreated) or S_{C10} -RNase after reduction with dithiothreitol (DTT) or the Trx shown in (a). Reactions with each Trx also included NADPH and NADPH-dependent Trx reductase (NTR). DTT decreased ribonuclease activity by 4-fold; NaTrxh, NaTrxhΔNα, and NaTrxhΔCOO increased this activity; NaTrxhΔNαβ, NaTrxhSS, and *E. coli* Trx had no effect on the ribonuclease activity. Data are shown as the mean \pm SE ($n = 3$). The results differ at * $P > 0.05$, ** $P > 0.01$, and **** $P > 0.00001$, respectively.

(NaTrxhΔNα) increased S_{C10} -RNase activity (ANOVA, $P = 0.0000015$), albeit to a lesser extent than intact NaTrxh (ANOVA, $P = 0.00616719$). However, the NaTrxhΔNαβ mutant, with both Nα and Nβ deleted, had no effect on S_{C10} -RNase activity (ANOVA, $P = 0.99999967$) similar to NaTrxhSS and *E. coli* Trx (ANOVA, $P > 0.99999999$ and $P = 0.99999925$, respectively) (Figure 3c). Removal of the C-terminal extension results in a protein (NaTrxhΔCOO) that, although unable to form a stable complex with S-RNase (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), nevertheless enhances S-RNase activity (ANOVA, $P < 0.00000001$) (Figure 3c) similarly to intact NaTrxh (ANOVA, $P = 0.99983127$). These results suggest that NaTrxh specifically reduces S-RNase, leading to an increase in its ribonuclease activity. Moreover, the N- and the C-terminal extensions function differently, and the Nβ motif appears to be particularly important for specific reduction.

On the other hand, our results indicate that NaTrxhSS must be affecting S-RNase reduction by NaTrxh in transgenic hybrids, provoking the observed breakdown of pollen rejection response in the NaTrxhSS-expressing hybrids (Figure 2). To investigate the effect of NaTrxhSS on S-RNase activation, we treated S_{C10} -RNase with a mix containing equimolar amounts of NaTrxh and NaTrxhSS and measured the ribonuclease activity. As shown in Figure 4a, when both redox-active and inactive NaTrxh proteins are present, S_{C10} -RNase did not reach activity levels similar to those when NaTrxh is alone. This result confirms that the

presence of NaTrxhSS negatively affects S-RNase reduction, which would explain why S-RNase activity is not fully enhanced in the presence of both NaTrxhSS and wt NaTrxh.

The hypothesis is that the interaction NaTrxhSS with S-RNase *in vivo* is sufficiently stable to prevent reduction by NaTrxh. To test this possibility, we pre-incubated S_{C10} -RNase with different amounts of NaTrxhSS for 1 h before performing the NaTrxh reduction assay and then, the ribonuclease activity was determined. The results showed that, by adding NaTrxhSS before reduction, the increase of the S-RNase activity is negatively affected in a dose-dependent manner (Figure 4d), with lower activity enhancement being detected with 20 μ M NaTrxhSS (ANOVA, $P = 0.0072$, compared with fully activated S-RNase) and no effect when 80 μ M NaTrxhSS was used in the pre-incubation treatment (ANOVA, $P < 0.0001$), being similar to the untreated S-RNase (ANOVA, $P > 0.9999$). These data indicate that the NaTrxhSS: S-RNase interaction is sufficiently strong to prevent the interaction of S-RNase with NaTrxh and its subsequent reduction, which would suggest that NaTrxhSS acts as a competitive inhibitor.

Binding assays, via affinity chromatography using NaTrxhSS as bait, showed that S-RNase is strongly retained (Figure 4c), which suggests that there is a stable protein-protein interaction similar to the previously observed between NaTrxh and S-RNase (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Because the interaction

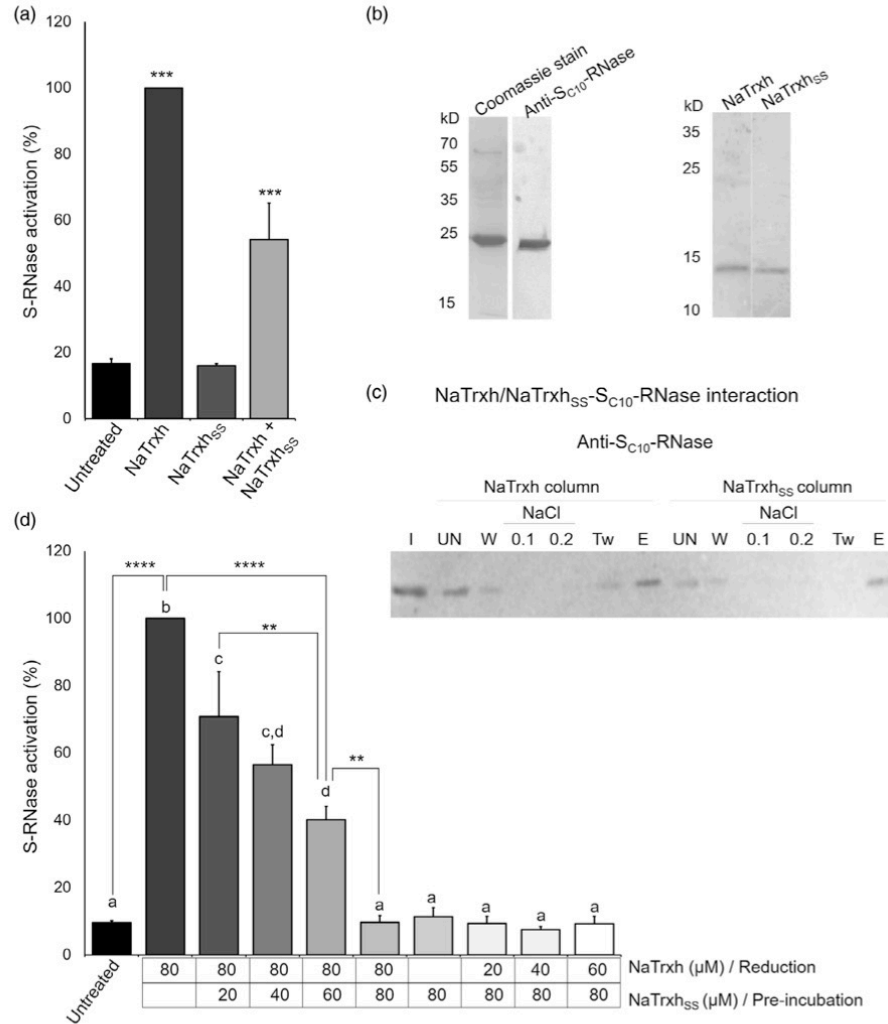


Figure 4. NaTrxh_{SS} is a competitive inhibitor for S-RNase enhancement activity by NaTrxh. (a) Purified S_{C10}-RNase was treated with equimolar amounts of both NaTrxh and NaTrxh_{SS}, shown in (b), or with each version of NaTrxh. Reduction was performed with NADPH and NTR. S_{C10}-RNase activity was measured after 30 min and the activation percentage was calculated. (c) The interaction between S-RNase and wild-type (wt) and mutant versions of NaTrxh was observed by pull-down assays, where S_{C10}-RNase was passed through columns with NaTrxh or NaTrxh_{SS}, as indicated. Elutions were made with binding buffer containing 0.1 and 0.2 M NaCl, 0.1% Tween-20 (Tw), and, finally, with 50 mM glycine plus 50 mM, pH 2.6 buffer (E) to elute strongly bound proteins, as reported previously (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). All recovered fractions were analysed with S_{C10}-RNase specific antibodies. I, Input; UN, Unbinding; W, Wash. (d) Purified S_{C10}-RNase was pre-incubated with different amounts of NaTrxh_{SS} (20, 40, 60 and 80 μM) 1 h before NaTrxh reduction (performed using 20, 40, 60 or 80 μM of NaTrxh). Then, ribonuclease activity was determined and the activation percentage was calculated. S_{C10}-RNase activity significantly increased after being reduced by NaTrxh; however, the addition of NaTrxh_{SS} negatively affected S-RNase activation in a dose-dependent manner. Equimolar amounts of NaTrxh_{SS} and NaTrxh caused no S-RNase activation. The full lack of activation observed with 80 μM NaTrxh_{SS} was not reversible by adding increasing amounts of NaTrxh. Data are shown as the mean ± SE (n = 3). The results differ at **P > 0.01, and ****P > 0.00001, respectively.

between NaTrxh_{SS} and S-RNase is strong, we tested whether wt NaTrxh can displace this mutant protein when it is interacting with S-RNase by pre-incubating S-RNase

with a constant amount of NaTrxh_{SS} and adding increasing amounts of wt NaTrxh. All treatments resulted in ribonuclease activity similar to that observed with untreated

S-RNase (ANOVA, $P > 0.9999$) (Figure 4d), which confirms that the interaction between NaTrx_{SS} and S-RNase is strong and stable and is not affected by NaTrxh.

NaTrxh reduces a unique disulphide bond in the S_{C10}-RNase

Sequence analysis and 3D studies provide structural information about S-RNases from solanaceous species. Alignments reveal five conserved regions, C1 to C5, including active site regions in C2 and C3, and two variable regions (HVa and HVb) (Anderson *et al.*, 1989). The crystal structure of *N. alata* S_{F11}-RNase (Ida *et al.*, 2001) shows four disulphide bonds (Cys₁₆-Cys₂₁, Cys₄₆-Cys₉₄, Cys₁₅₃-Cys₁₈₆, and Cys₁₆₉-Cys₁₈₀) that are conserved in solanaceous S-RNases (Anderson *et al.*, 1989). Some S-RNases, such as *N. alata* S₃- and S₆-RNases, have a ninth Cys that remains free (Anderson *et al.*, 1989). *Nicotiana glauca* S_{C10}-RNase contains 10 Cys residues and alignment with S_{F11}-RNase suggests that, although Cys₁₆-Cys₂₁, Cys₄₆-Cys₉₄, Cys₁₅₅-Cys₁₈₅, and Cys₁₆₈-Cys₁₇₉ are disulphide bonded, Cys₇₇ and Cys₉₅ remain free (Figure S6).

The loss of activity of the S_{C10}-RNase after DTT reduction, in contrast to the positive effect on ribonuclease activity after NaTrxh treatment (Figure 3c), suggests that NaTrxh reduction does not occur on the four S-RNase disulphide bonds. Therefore, reduction, *N*-ethylmaleimide (NEM) modification and mass spectrometry were used to identify the disulphide bonds in S_{C10}-RNase that are specifically targeted by NaTrxh. Purified S_{C10}-RNase was treated with NaTrxh and the pattern of NEM modification was compared with that for untreated and Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) reduced controls. Table 1 shows that modified peptides containing Cys₇₇ and Cys₉₅ were observed in both control and NaTrxh treated samples, confirming that these residues do not participate in disulphide bonds. However, peptides containing modified Cys₁₅₅ and Cys₁₈₅ were only detected after reduction by TCEP and NaTrxh, indicating that these residues participate in a disulphide that is reduced by NaTrxh (Table S1 and Figure S6). The 3D model of S_{C10}-RNase was made based on the S_{F11}-RNase structure (Ida *et al.*, 2001) and it shows that the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond is located far from the active site and on the opposite side of the hypervariable regions of S-RNase (Figure 5).

DISCUSSION

Thioredoxins have been implicated in several physiological roles, including *Brassica* (Cabrillac *et al.*, 2001; Haffani *et al.*, 2004) and *Prunus* SI (Muñoz-Sanz *et al.*, 2017). Trxs inhibit the *Brassica* S-locus receptor kinase (SRK; the pistil S-specificity determinant), although this may not occur in all situations (Cabrillac *et al.*, 2001; Haffani *et al.*, 2004). *Prunus armeniaca* (apricot) M-locus mutants behave as true MG mutations and cause breakdown of SI

independently of S-RNase or SFB (S-locus F-box protein, pollen-side S-specificity determinant in *Prunus*; Vilanova *et al.*, 2006). The M-locus gene is a disulphide bond oxidoreductase expressed in pollen, ParMDO (*P. armeniaca* DsbA-like oxidoreductase, a Trx-superfamily member; Muñoz-Sanz *et al.*, 2017). This is significant because the oxidoreductase activity is clearly required for SI pollen rejection. Here, we show direct *in vivo* evidence involving NaTrxh reductase activity as being essential in *Nicotiana* SI and in *N. plumbaginifolia* pollen rejection through the expression of the redox-inactive NaTrx_{SS}.

It is rare to have direct biochemical insight into the roles of MGs for several reasons. HT-B, for example, is a protein for which the function is unknown, making it difficult to propose a specific biochemical role within SI pathway. NaStEP, another SI essential protein, has been identified as a Kunitz-type proteinase inhibitor (Jiménez-Durán *et al.*, 2013); however, its target remains uncovered. Contrastingly, NaTrxh is a well-established Trx that clearly reduces and interacts with S-RNase *in vitro* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Here, we show that NaTrxh enhances S_{C10}-RNase seven-fold *in vitro* (Figure 3) and that this is caused by a highly specific reduction of the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond (Table 1, Figures 5 and S6).

The Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond of S_{C10}-RNase is conserved in all S-RNases (Anderson *et al.*, 1989) and its location far from the active site might indicate that it does not participate in the maintenance of the conformation of the catalytic residues (Figure 5); this could explain why S-RNase has activity independent of NaTrxh reduction. Although further investigation is required regarding how the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond reduction on S-RNase affects its conformation, we may hypothesize that this specific reduction could favour interaction with the RNA or promote its release after the catalysis; both possibilities would increase the efficiency of the enzyme.

NaTrxh contains at its N-terminal an extension with two motifs (N α and N β) and also an extension towards its C-terminal (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Its role with respect to enhancing/reducing S-RNase is associated with one of these three domains described in NaTrxh, as well as the redox-active WCGPC motif. Previous results from binding assays through affinity chromatography by generating an NaTrxh-Affi-gel column showed that S-RNase is strongly retained, indicating a stable protein-protein interaction (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), which is weakened when the N- or the C-terminal deleted NaTrxh forms are used as baits, showing that both N- and C-terminal extensions participate in the interaction of NaTrxh with S-RNase (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Ávila-Castañeda *et al.* (2014) reported that deleting N α partially reduces the affinity for S-RNase and the results shown in Figure 3 suggest that this manifests as the diminished ability to enhance S_{C10}-RNase activity. The NaTrxh N-terminal

Table 1 S-RNase disulphide bond reduction by NaTrxh

Peptide	Protein position	Cys with NEM modification		
		Untreated	TCEP	NaTrxh
AFEYMLVLQWPTAFCHTTPCK	Cys-16	–	+	–
	Cys-21	–	+	–
PDNVSTTLNYCAAKENFKNIE	Cys-45	–	+	–
	WPDLTAAETCYCKQHQNFWRHE	Cys-77 ^a	+	+
WRHEYNKHGKCCSESYNREQY	Cys-94	–	+	–
	Cys-95	–	+	–
KITQGYPNLSCTKGIMELVEI	Cys-155*	–	+	+
	GIMELVEIGICFDSMKVKNVIN	–	+	–
FDSMKVKNVINCPhPKTKCKPTG	Cys-179	–	+	–
	NVINCPHKTCKPTGSNEIKF	Cys-185*	–	–

The results are based on the percentage of NEM-modified cysteines in untreated, TCEP reduced or NADPH/NTR/NaTrxh (NaTrxh) reduced SC10-RNase samples. Cys77 is NEM modified regardless of SC10-RNase reduction by NaTrxh or TCEP. Cys155 and Cys185 (asterisk, black box) are specifically NEM-modified after reduction by NaTrxh.

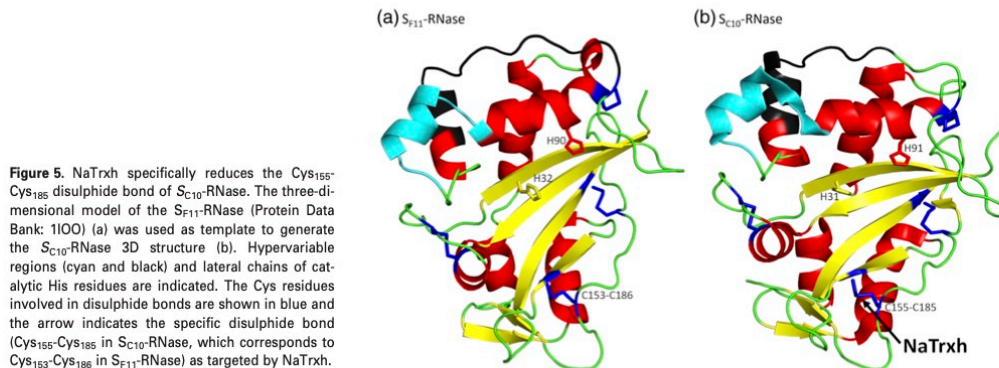


Figure 5. NaTrxh specifically reduces the Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ disulphide bond of S_{C10}-RNase. The three-dimensional model of the S_{F11}-RNase (Protein Data Bank: 1I00) (a) was used as template to generate the S_{C10}-RNase 3D structure (b). Hypervariable regions (cyan and black) and lateral chains of catalytic His residues are indicated. The Cys residues involved in disulphide bonds are shown in blue and the arrow indicates the specific disulphide bond (Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ in S_{C10}-RNase, which corresponds to Cys₁₅₃-Cys₁₈₆ in S_{F11}-RNase) as targeted by NaTrxh.

N β motif appears to be particularly important because the NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ construct completely failed to increase the ribonuclease activity of S_{C10}-RNase. The NaTrxh C-terminal domain is more enigmatic. Binding studies showed that the NaTrxh Δ COO mutant is unable to form a stable complex with S-RNase (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), although the results in Figure 3 show that it is able to enhance S_{C10}-RNase activity *in vitro* as the wt NaTrxh does. This suggests that the binding activities of N $\alpha\beta$ and the C-terminal extension function differently, at least in relation to the increase of the S-RNase activity.

The measurement of specific ribonuclease activities is crucial for understanding their functionality. In several studies, the activity values range from 170 to 2200 U for S₁, S₃, S₄, S₆ and S₇-RNase haplotypes from *N. alata* (McClure *et al.*, 1989), 30 U for S₁-RNase from *Petunia hybrida* (Clark *et al.*, 1990) and 106 to 164 U for the S₁, S₂ and S₃-RNases from *P. Petunia inflata* (Singh *et al.*, 1991). The differences in the activity levels among distinct

haplotypes are evident and it has been demonstrated that several factors, such as salt concentration and temperature, modify the ribonuclease activity (Singh *et al.*, 1991). Under the conditions used for the present study, the results were similar to those reported by Clark *et al.* (1990) for S₁-RNase from *P. hybrida*. Despite these differences, all S-RNases function for pollen rejection. Regardless, our most remarkable finding is that S_{C10}-RNase activity is positively affected by NaTrxh reduction and this could apply to other S-RNase haplotypes because the disulphide bond that is reduced is conserved among all S-RNases.

Although S-RNase exhibits activity when purified (i.e. before being reduced by NaTrxh), we propose that it would not be sufficient to prevent PT growth as observed from the *in vivo* data from pollinations of NaTrxh_{SS}-expressing hybrids as discussed later. One possibility is that the primary function of non-reduced S-RNase is the S-specific interaction with SLF to determine the compatibility of the cross and that the low activity exhibited without reduction

is not sufficient to degrade RNA in incompatible pollen tubes. This idea is supported by the fact that both self and non-self-S-RNases enter pollen tubes (Luu *et al.*, 2000; Goldraij *et al.*, 2006) and might have certain levels of activity but do not cause pollen tube growth inhibition immediately.

An example that supports the above hypothesis is that when S-RNases from *Pyrus pyrifolia* and *Pyrus bretschneideri* are overexpressed in *E. coli*, the resultant S-RNases were not sufficiently active to kill the cells because significant amounts of the ribonuclease were recovered after induction with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (Gamage *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2018).

Based on our results, we propose that transgenic hybrids expressing NaTrx_{SS} lost their ability to reject self-pollen because NaTrx_{SS} interacts with S-RNase, forming a stable complex that avoids reduction of the disulphide bond targeted by NaTrxh; thus, NaTrx_{SS} would act as an inhibitor for S-RNase activity enhancement. The incompatible phenotype of several PTs (Figure 2) can be explained by the action of wt NaTrxh, which is also present in NaTrx_{SS}-expressing hybrids. A similar phenotype was observed in *THL1/2*-antisense suppressed lines of *Brassica napus*. Those lines had a significant decrease in both *THL1* and *THL2* mRNA levels and showed a reduced pollen growth, indicating that *THL1* and *THL2* are essential for full pollen acceptance (Haffani *et al.*, 2004).

We propose that *in planta* when S-RNase interacts with wt NaTrxh within the PTs, reduction takes place releasing S-RNase in its more active/reduced form. Conformational changes in both Trx and target protein structures derived from reduction by Trx would promote the target release (Holmgren, 1995). By contrast, when the interaction occurs between S-RNase and NaTrx_{SS} in PTs of transformed hybrids, the lack of reduction would prevent the release of the target protein, resulting in a stable interaction that might avoid S-RNase interacting with the wt NaTrxh and therefore being reduced/activated. The results shown in Figure 4 support our hypothesis and also the loss of the SI phenotype observed in NaTrx_{SS}-expressing hybrids, indicating that full activation of S-RNase is necessary for full pollen rejection response.

We suggest that NaTrxh functions by increasing S-RNase ribonuclease activity for pollen rejection and hypothesize that this occurs in PT cytoplasm because NaTrxh itself must be reduced by the NTR, which in turn obtains the electrons from NADPH. Although our results do not exclude the fact that NaTrxh could act on proteins other than S-RNase, we note that NaTrxh is preferentially expressed in SI species (or recently derived SC accessions, Figure S1) and its ability to enhance the ribonuclease activity of S_{C10}-RNase *in vitro* is clear (Figure 3). Because the NaTrx_{SS} dominant-negative phenotype in pollen compatibility and species that do not express a NaTrxh-like protein

show normal PT growth, we conclude that NaTrxh is only required for pollen rejection (i.e. S-specific pollen rejection and rejection of pollen from SC *N. plumbaginifolia*; Figure 1c,d and S4).

The seven-fold increase of ribonuclease activity (Figure 3c) strongly suggests that NaTrxh promotes the cytotoxic activity of S-RNase. We propose that S-RNase reduction takes place only when there is an incompatible interaction between the S-RNase and SLF and degradation of RNA is necessary to prevent PT growth. Therefore, NaTrxh might act in pollen rejection after recognition between S-RNase and SLF occurred because this primary event determines the response. Figure 5 illustrates our hypothesis, which is compatible with either the collaborative non-self-recognition model or the compartmentalization one, because both are focused on upstream events that confer resistance to S-RNase in compatible PTs. In the former model, self-pollen rejection occurs when self-S-RNase evades degradation and, in the latter case, when S-RNase exits the luminal compartment. We suggest that NaTrxh activates S-RNase that escapes regardless of the resistance mechanism and thus facilitates pollen tube RNA degradation and pollen rejection (Figure 6). This also might apply to ParMDO, although its activity toward *Prunus* S-RNase has not been assessed. Of course, ParMDO is expressed in pollen and NaTrxh is expressed in the pistil, and the upstream mechanisms that provide resistance to non-self-S-RNase are considered to be very different in *Prunus* compared to Solanaceae SI (Vilanoba *et al.*, 2006). In both cases, however, the oxidoreductase activity is required only for S-RNase-dependent pollen rejection and its absence leads to compatibility. Thus, these MG functions may suggest late-stage similarities between pollen rejection mechanisms in Solanaceae and *Prunus*, which are otherwise curiously different even though both rely on S-RNase and pollen expressed F-box proteins to determine S-specificity.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material

SI *N. alata* (S_{A2}S_{A2}, S_{C10}S_{C10}, and S₁₀₅S₁₀₅), SC *Nicotiana glauca*, SC *N. tabacum* 'PraecoX' (inventory no. TI 1347), SC *N. plumbaginifolia* (inventory no. TW107, accession 43B), SC *Nicotiana longiflora* (inventory no. TW79, accession 30A), SI *Nicotiana rastroensis*, and SC *Nicotiana benthamiana* have been described previously (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). All plants were grown under greenhouse conditions.

Generation of transgenic *N. plumbaginifolia*:

NaTrx_{SS} × *N. alata* S_{C10}S₀ or S_{A2}S₀ hybrids

The redox-inactive oxidoreductase NaTrxh mutant, NaTrx_{SS}, was generated by substituting Ser residues for Cys₆₂ and Cys₆₅. Site-directed mutagenesis was performed by overlap extension (Ho *et al.*, 1989) using wt NaTrxh cDNA as the template (Juárez-Díaz

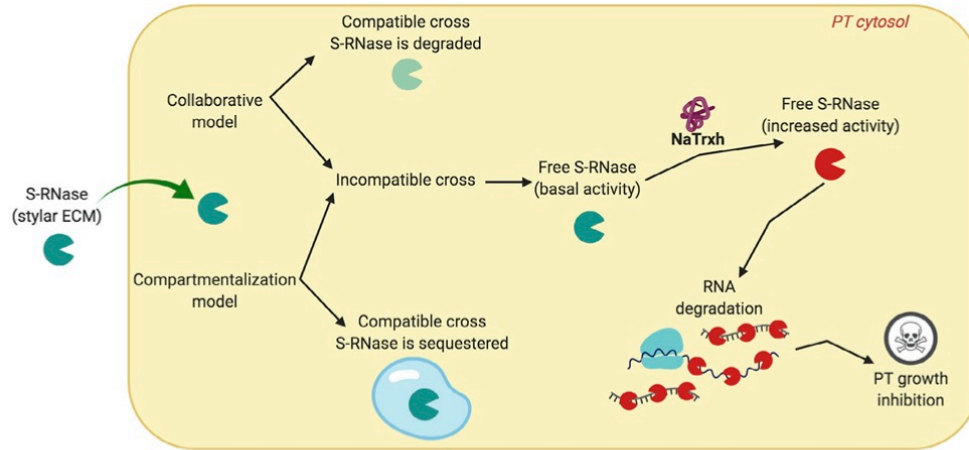


Figure 6. NaTrxh increases the ribonuclease activity of the S-RNase to act as a cytotoxin in the pollen rejection response. In the collaborative non-self-recognition model, compatibility is attributed to ubiquitination and degradation of non-self-S-RNase. In the compartmentalization model, compatibility is attributed to S-RNase sequestration in the endomembrane system. In either case, the free S-RNase is reduced by NaTrxh, provoking a remarkable increase in its ribonuclease activity, enabling it to degrade pollen tube RNA. ECM, extracellular matrix; PT, pollen tube.

et al., 2006). Two amplifications were performed using the primers FW1 with RV1 (5'-CATGCCATGGATGGGATCGTATCTTTCAAG-3' and 5'-CTCCATCATTTACTGGGCCCACTCCA-3', respectively) and FW2 with RV2 (5'-GCGGCTACATGGAGTGGGCCAGT-3' and 5'-GCGCGGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3', respectively) to generate two fragments with the desired mutations in the overlapping ends (primers RV1 and FW2 overlap and include the Cys/Ser substitutions). The two products were mixed and the complete NaTrxh_{SS} sequence was generated in a third amplification using FW1 and RV2. The complete product was cloned into pJET (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) and then re-amplified using the primers FW3 (5'-CACCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGT-3') and RV2 for transfer into pENTR (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The final pK2GW7:NaTrxh_{SS} construct was prepared using Gateway recombination into pK2GW7, placing the NaTrxh_{SS} coding sequence under control of the CaMV35S promoter and CaMV35S terminator, and used to transform *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. *Nicotiana plumbaginifolia* was transformed as described (Murfett *et al.*, 1996), screened for expression, and three lines were crossed with SI *N. alata* S_{A2}S_{A2} or S_{C10}S_{C10}. Fourteen *N. plumbaginifolia* × *N. alata* S_{A2}S₀ or *N. plumbaginifolia* × *N. alata* S_{C10}S₀ hybrid progeny (S_{A2}⁻ or S_{C10}⁻ hybrids, respectively) reached maturity and were evaluated for NaTrxh_{SS} expression and pollen rejection.

NaTrxh_{SS} expression in transformed hybrids and pollination phenotyping

Pistil RNA was extracted using Trizol reagent (Ambion, Austin, TX, USA) and treated with RNase-free DNase I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) to analyze NaTrxh_{SS} expression. M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma, St Louis, MO, USA) was used to synthesize cDNA from pistil RNA (2 µg). NaTrxh_{SS} cDNA was amplified with specific forward 5'-CTACATGGAGTGGGCCAGT-3' and reverse 5'-GGACATGAAATTTAGTTCGATAACTAGCAGC-3' primers, targeting the mutation-containing sequences (279 bp

PCR product expected) (Figure S2). The wt NaTrxh cDNA was similarly amplified using forward (5'-CTACATGGTGGGCCCTGC-3') and reverse (5'-CCAACCACTCTCTACTTCCTTCTTGC-3') primers (187 bp PCR product expected) (Figure S2).

Mature flowers from S_{A2}⁻ or S_{C10}⁻ hybrids were pollinated with *N. alata* S_{C10}⁻ or S_{A2}⁻ pollen. Pistils were prepared and stained with aniline blue (Jiménez-Durán *et al.*, 2006) after 72 h. Pollen tube growth to the base of the style was observed using an Olympus AX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan). For quantitative analysis, four or three (as indicated) pollinated pistils with fewer amounts of pollen grains were used to count the callose plugs in the bottom of the style and in one-third of the style, obtaining a percentage of those found near the ovary (expressed as percentage with the SD).

Expression and purification of recombinant NaTrxh and NaTrxh mutants

The NaTrxh, NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNβ, and NaTrxhΔCOO constructs were expressed as GST fusions in *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Stratagene, La Jolla, CA, USA) from pGEX 4T-2 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) as described previously (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014), and NaTrxh_{SS} was expressed similarly. GST fusion proteins were overexpressed in *E. coli* cultures at OD₆₀₀ of 0.5–0.7 by adding 0.1 mM IPTG and were harvested after 3 h at 37°C. Fusion proteins were recovered from the soluble fraction after sonication and glutathione-agarose (Sigma) chromatography. NaTrxh, NaTrxhΔNα, NaTrxhΔNβ, NaTrxhΔCOO, and NaTrxh_{SS} were released by digestion with thrombin (GE Healthcare) and tested for effects on ribonuclease activity.

S-RNase purification and ribonuclease activity assay

S_{C10}-RNase was purified from mature *N. alata* S_{C10}S_{C10} pistils by CM- and SP-Sepharose cation exchange chromatography as described previously (Cruz-García *et al.*, 2005). Further purification was carried out by gel filtration chromatography via HiLoad

Superdex (GE Healthcare) in phosphate-buffered saline (PBS). S_{C10} -RNase-containing fractions were identified by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and immunoblot analysis.

Purified S_{C10} -RNase (6 μ g) was incubated for 3 h in 50 mM Tris-HCl, pH 7.9, at 37°C with 10 mM DTT for full reduction or with NaTrxh, NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N α β , NaTrxh Δ COO, NaTrxh $_{SS}$, NaTrxh + NaTrxh $_{SS}$ or *E. coli* Trx (Sigma) using NADPH and recombinant *E. coli* NTR (Sigma) for electron transfer, as described previously (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) or without any reducing agent (untreated). Ribonuclease activity was then determined using purified *Torula* yeast RNA (Sigma) as a substrate (4 mg ml⁻¹). Assays were performed for 30 min at 37°C in 0.1 M potassium acetate (pH 7), 0.05 M KCl and 25% glycerol. The results are reported as 1 U = 1 A₂₆₀ min⁻¹ ml⁻¹ (McClure *et al.*, 1989).

For competition assays, S_{C10} -RNase was pre-incubated with different NaTrxh $_{SS}$ concentrations (20, 40, 60 or 80 μ M) for 1 h at room temperature before performing S-RNase reduction with NaTrxh. Ribonuclease activity assays were developed as indicated above.

Pull-down assays

GST-NaTrxh and GST-NaTrxh $_{SS}$ fusion proteins (100 μ g of each purified recombinant protein) were immobilized on glutathione-agarose resin. Purified S_{C10} -RNase (20 μ g) was passed through each column in PBS as binding buffer and incubated for 1 h at room temperature. The unbound fraction was recovered and 10 bed volumes washes were made with PBS. Sequential elutions were made with PBS containing 0.1 and 0.2 M NaCl and 1% Tween-20. To elute strongly bound proteins, a 50 mM glycine plus 50 mM NaCl (pH 2.6) buffer was used as reported previously (Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

Identification of S-RNase disulphide bonds targeted by NaTrxh

Sulphydryl groups were blocked on the purified S_{C10} -RNase (20 μ g) without reduction, reduced with the NADPH/NTR/NaTrxh system as described previously (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), or with 0.1 M TCEP (Sigma), by the addition of 20 μ g of NEM (Sigma) for 1 h at 37°C. Proteins were precipitated by acetone and analysed by LC-MS + MS/MS on an LTQ Orbitrap (Gehrke Proteomics Center, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO, USA).

S_{C10} -RNase from *N. alata* three-dimensional model

The S_{C10} -RNase three-dimensional model was constructed in SWISSMODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) based on the S_{F11} -RNase structure from *N. alata* (Protein Data Bank: 1I00), which has 47.4% of sequence identity. One thousand minimization steps were performed in CHIMERA (Pettersen *et al.*, 2004).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank W. Hansberg-Torres (IFC-UNAM) and A. Covarrubias-Robles (IBT-UNAM) for their valuable comments and ideas; C. Romero-Salvador (IBMCP, Valencia, Spain) and J. V. Muñoz-Sanz (MU) for helpful discussions; R. Lowery and L. Pei (MU) for helping with the proteomic analysis; and M. Kroll for editing work. M.D.T.-R. holds a PhD studentship from CONACyT-México (434975). The work was funded by grants from FQ-5000-9128, CONACyT (236602) and PAPIIT-UNAM (IN220919) to F.C.-G., PAPIIT-UNAM (IA204815) to J.A.J.-D., and US NSF grant MCB 1127059 to B.A.M.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FC-G designed the project. MDR-R performed the experiments. BM contributed to the proteomic analysis. MDT-R, FC-G and BAM analysed data. JAJ-D and YC-Z made the NaTrxh constructs for overexpression and protein purification. MDT-R, BAM and FC-G wrote the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All of the relevant data are available and can be found within the manuscript and its supplementary information.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. NaTrxh is primarily expressed in pistils from SI *Nicotiana* species. (A) Total pistil protein extracts were separated by SDS-PAGE, blotted, and probed with an NaTrxh antibody. NaTrxh (or NaTrxh-like protein) was only detected in species with SI background (SI and SC*) (top). Coomassie-blue stained gel as loading control (bottom). (B) The NaTrxh transcript levels were normalized to 18S rRNA and compared to levels in *Nicotiana plumbaginifolia*. NaTrxh transcripts were detected in all of the tested species. Analyses were performed in triplicate. SI, self-incompatible; SC, self-compatible; SC*, self-compatible that lacks one or more SI proteins.

Figure S2. NaTrxh and NaTrxh $_{SS}$ sequence alignment and specific amplification. (A) Alignment of NaTrxh and NaTrxh $_{SS}$ sequences showing the three point mutations (black) generated substituting serine for cysteine in the WCGPC motif. Light grey: specific primers used to amplify NaTrxh; cyan: primers employed to specifically amplify NaTrxh $_{SS}$. (B) Specific amplification of NaTrxh or NaTrxh $_{SS}$. Left: NaTrxh-specific primers amplify the expected 187 bp product from a wild-type (WT) template but not the mutant template (SS). Right: NaTrxh $_{SS}$ -specific primers amplify the expected 279-bp product from the mutant template (SS) but not from the wild-type (WT).

Figure S3. Expression of S-RNase and MGs is not affected by NaTrxh $_{SS}$ expression in S_{C10} - or S_{A2} -hybrids. (A) Protein-blot analysis of pistil protein extracts. Blots were probed with the antibodies shown at left. UT, untransformed S_{C10} -hybrids (1 and 2). Three S_{C10} -hybrids (3, 4, and 5) and three S_{A2} -hybrids (6, 7, and 8) expressing NaTrxh $_{SS}$ are shown. These hybrids express S_{C10} -RNase or S_{A2} -RNase, as expected. UT and NaTrxh $_{SS}$ -expressing hybrids show similar levels of three MGs: 120K, NaStEP, and HT-B (HT). (B) Coomassie-blue stained loading control.

Figure S4. S_{A2} -hybrids expressing NaTrxh $_{SS}$ show loss of S-specific pollen rejection. An S_{A2} -hybrid expressing NaTrxh $_{SS}$ was challenged with pollen from *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ (incompatible) or $S_{C10}S_{C10}$ (compatible). Pollen tubes (indicated by the arrows) were visualized at the base of the style. Numerous pollen tubes are visible regardless of pollen-S haplotype, indicating the loss of S-specific pollen rejection.

Figure S5. Self-pollen rejection in wt *N. plumbaginifolia* \times *N. alata* hybrids. Wt S_{C10} -hybrids were challenged with pollen from *N. alata* $S_{A2}S_{A2}$ (compatible) or $S_{C10}S_{C10}$ (incompatible). Pollen tubes (arrows; PT) were visualized at the stigma and along the

style only in the compatible cross (S_{A2} -pollen). In an incompatible cross (S_{C10} -pollen), pollen tube growth is inhibited at stigma level, indicating that self-pollen rejection occurs at the style close to the stigma.

Figure S6. S-RNase disulphide bonds. Alignment of S_{F11} - and S_{C10} -RNase sequences (Iida *et al.*, 2001). Arrows, free Cys residues. The Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ S_{C10} -RNase disulphide reduced by NaTrxh is indicated.

Table S1. S-RNase disulphide bond reduction by NaTrxh. The results are based on the percentage of NEM-modified cysteines in untreated, TCEP reduced or NADPH/NTR/NaTrxh (NaTrxh) reduced S_{C10} -RNase samples. Cys₇₇ (a, blue-bold) NEM-modified regardless of reduction, indicating that it is not disulphide bonded. Cys₁₅₅ and Cys₁₈₅ (asterisk, black box) are specifically NEM-modified after reduction by NaTrxh.

REFERENCES

- Anderson, M.A., McFadden, G.I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Fernley, R. and Clarke, A.E. (1989) Sequence variability of three alleles of the Self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell*, **1**, 483–491.
- Arner, E.S. and Holmgren, A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* **20**, 6102–6109.
- Ávila-Castañeda, A., Juárez-Díaz, J.A., Rodríguez-Sotres, R., Bravo-Alberto, C.E., Ibarra-Sánchez, C.P., Zavala-Castillo, A., Cruz-Zamora, Y., Martínez-Castilla, L.P., Márquez-Guzmán, J. and Cruz-García, F. (2014) A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro. *BMC Plant Biol.* **14**, 147.
- Bedinger, P.A., Broz, A.K., Tovar-Mendez, A. and McClure, B. (2017) Pollen-pistil interactions and their role in mate selection. *Plant Physiol.* **173**, 79–90.
- Beecher, B., Murfett, J. and McClure, B.A. (1998) RNase1 from *Escherichia coli* cannot substitute for S-RNase in rejection of *Nicotiana plumbaginifolia* pollen. *Plant Mol. Biol.* **36**, 553–563.
- Cabrillac, D., Cock, J.M., Dumas, C. and Gaude, T. (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature*, **410**, 220–223.
- Chen, J., Wang, P., de Graaf, B.H.J., Zhang, H., Jiao, H., Tang, C., Zhang, S. and Wu, J. (2018) Phosphatidic acid counteracts S-RNase signaling in pollen by stabilizing the actin cytoskeleton. *Plant Cell*, **30**, 1023–1039.
- Clark, K.R., Okuley, J.J., Collins, P.D. and Sims, T.L. (1990) Sequence variability and developmental expression of S-alleles in self-incompatible and pseudo-self-incompatible *Petunia*. *Plant Cell*, **2**, 815–826.
- Cruz-García, F., Hancock, C.N., Kim, D. and McClure, B. (2005) Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro. *Plant J.* **42**, 295–304.
- de Nettancourt, D. (2001) *"The genetic basis of self-incompatibility" in Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants.* (New York: Springer-Verlag, pp. 39–54.
- Gamage, N., Matsuura, T., Norioka, N., Yoshimura, Y., Takasaki, T., Nakanishi, T. and Norioka, S. (2000) Expression of a fusion protein of *Pyrus pyrifolia* S-RNase with glutathione-S-transferase in *E. coli*. *Biotech Lett.* **22**, 1413–1417.
- García-Valencia, L.E., Bravo-Alberto, C.E., Wu, H.M., Rodríguez-Sotres, R., Cheung, A.Y. and Cruz-García, F. (2017) SIPP, a novel mitochondrial phosphate carrier, mediates in self-incompatibility. *Plant Physiol.* **175**, 1105–1120.
- Gelhay, E., Rouhier, N. and Jacquot, J.P. (2004) The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol Biochem.* **42**, 265–271.
- Goldraj, A., Kondo, K., Lee, C.B., Hancock, C.N., Sivaguru, M., Vázquez-Santana, S., Kim, S., Phillips, T.E., Cruz-García, F. and McClure, B. (2006) Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*, **439**, 805–810.
- Haffani, Y.Z., Gaude, T., Cock, J.M. and Goring, D.R. (2004) Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol. Biol.* **55**, 619–630.
- Hancock, C.N., Kent, L. and McClure, B.A. (2005) The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**, 716–723.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51–59.
- Holmgren, A. (1979) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydroliipoamide. *J. Biol. Chem.* **254**, 9627–9632.
- Holmgren, A. (1985) Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 237–271.
- Holmgren, A. (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, **3**, 239–243.
- Hua, Z.H. and Kao, T.H. (2006) Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-Locus F-Box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Mol. Plant*, **1**, 575–585.
- Iida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbiggin, E., Clarke, A.E., Sakiyama, F. and Sato, M. (2001) The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{F11} -RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**, 103–112.
- Jiménez-Durán, K. (2013) Una proteína estigmática esencial en la autoincompatibilidad y regulador positivo de la estabilidad de HT-B en los tubos polínicos de *Nicotiana*. PhD Thesis. UNAM.
- Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, R., Cisneros, J., Busot, G. and Cruz-García, F. (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**, 97–107.
- Juárez-Díaz, J.A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., León-Mejía, P., Márquez-Guzmán, J. and Cruz-García, F. (2006) A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *J. Biol. Chem.* **281**, 3418–3424.
- Kondo, K., Yamamoto, M., Matton, D.P., Sato, T., Hirai, M., Norioka, S., Hattori, T. and Kowayama, Y. (2002) Cultivated tomato has defects in both S-RNase and HT-B genes required for stylar function of self-incompatibility. *Plant J.* **29**, 627–636.
- Kubo, K., Entani, T., Takara, A. *et al.* (2010) Collaborative non-self-recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science*, **5**, 796–799.
- Kumar, J.K., Tabor, S. and Richardson, C.C. (2004) Proteomic analysis of thioredoxin-targeted proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3759–3764.
- Lai, Z., Ma, W., Han, B., Liang, L., Zhang, Y., Hong, G. and Xue, Y. (2002) An F-box gene linked to the self-incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol. Biol.* **50**, 29–42.
- Li, W. and Chetelat, R.T. (2010) A pollen factor linking inter- and intraspecific pollen rejection in tomato. *Science*, **330**, 1827–1830.
- Luu, D.T., Qin, X., Morse, D. and Cappadocia, M. (2000) S-RNase uptake by compatible pollen tubes in gametophytic self-incompatibility. *Nature*, **407**, 649–651.
- Marchand, C., Le Maréchal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Decottignies, P. (2004) New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics*, **4**, 2696–2706.
- Marx, C., Wong, J.H. and Buchanan, B.B. (2003) Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta*, **216**, 454–460.
- Meyer, Y., Vignols, F. and Reichheld, J.P. (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**, 394–402.
- McClure, B.A., Cruz-García, F. and Romero, C. (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann. Bot.* **108**, 647–658.
- McClure, B.A. and Franklin-Tong, V. (2006) Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta*, **224**, 233–245.
- McClure, B.A., Gray, J.E., Anderson, M.A. and Clarke, A.E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana glauca* involves degradation of pollen rRNA. *Nature*, **347**, 757–760.
- McClure, B., Haring, V., Ebert, P.R., Anderson, M.A., Simpson, R.J., Sakiyama, F. and Clarke, A.E. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature*, **342**, 955–957.
- McClure, B.A., Mou, B., Canevascini, S. and Bernatzky, R. (1999) A small asparagine-rich protein required for S-allele-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13548–13553.
- Murfett, J., Cornish, E.C., Ebert, P.R., Bonig, I., McClure, B.A. and Clarke, A.E. (1992) Expression of a self-incompatibility glycoprotein (S_2 -ribonuclease) from *Nicotiana glauca* in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell*, **4**, 1063–1074.

- Murfett, J., Ebert, P.R., Haring, V. and Clarke, A.E. (1995) An S-RNase promoter from *Nicotiana glauca* functions in transgenic *N. glauca* plants but not *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* **28**, 957–963.
- Murfett, J., Strabala, T.J., Zurek, D.M., Mou, B., Beecher, B. and McClure, B.A. (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.
- Muñoz-Sanz, J.V., Zuriaga, E., Badenes, M.L. and Romero, C. (2017) A disulfide bond A-like oxidoreductase is a strong candidate gene for self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*) pollen. *J. Exp. Bot.* **68**, 5069–5078.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C. and Ferrin, T.E. (2004) UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **25**, 1605–1612.
- Puerta, A.R., Koichiro, U., Takato, K. and Hidenori, S. (2009) Identification and functional analysis of pistil self-incompatibility factor HT-B of *Petunia*. *J. Exp. Bot.* **60**, 1309–1318.
- Singh, A., Ai, Y., Kao, T.H. (1991) Characterization of ribonuclease activity of three S-allele-associated proteins of *Petunia inflata*. *Plant Physiol.* **96**, 61–68.
- Tovar-Méndez, A., Kumar, A., Kondo, K., Ashford, A., Baek, Y.S., Welch, L., Bedinger, P.A. and McClure, B.A. (2014) Restoring pistil-side self-incompatibility factors recapitulates an interspecific reproductive barrier between tomato species. *Plant J.* **77**, 727–736.
- Vilanova, S., Badenes, M.L., Burgos, L., Martínez-Calvo, J., Liácer, G. and Romero, C. (2006) Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiol.* **142**, 629–641.
- Williams, J.S., Der, J.P., dePamphilis, C.W. and Kao, T.-h. (2014) Transcriptome analysis reveals the same 17 S-locus F-box genes in two haplotypes of the self-incompatibility locus of *Petunia inflata*. *Plant Cell*, **26**, 2873–2888.
- Williamson, J.D., Hirsch-Wyncott, M.E., Larkins, B.A. and Gelvin, S.B. (1989) Differential accumulation of a transcript driven by the CaMV 35S promoter in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* **90**, 1570–1576.
- Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y. and Hisabori, T. (2004) Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **45**, 18–27.
- Zhang, N. and Portis, R. Jr (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 9438–9443.

Supplemental data

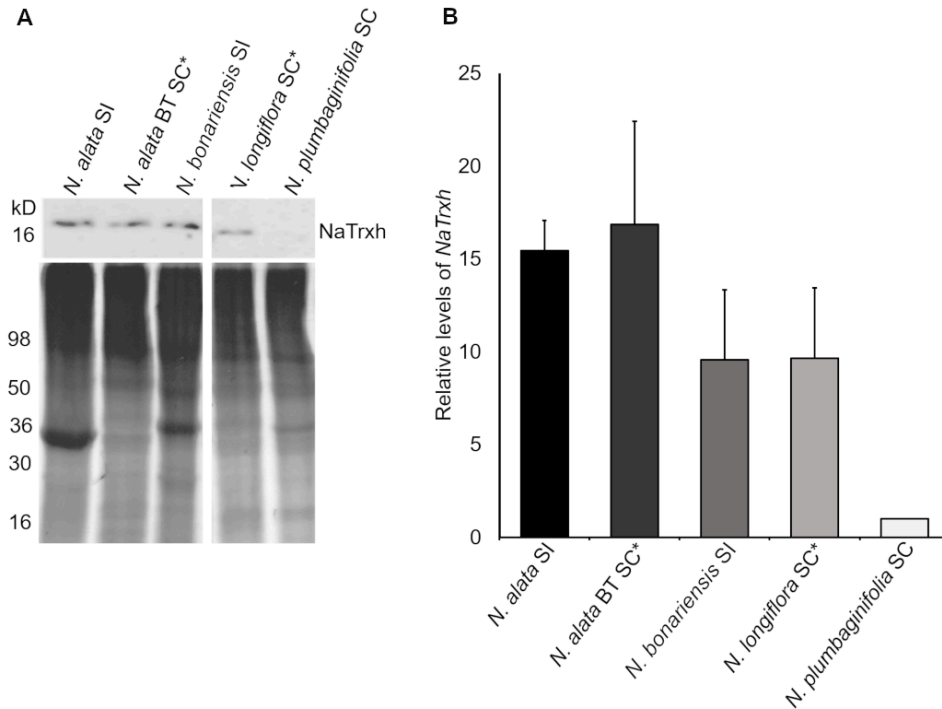


Fig. S1. NaTrxh is primarily expressed in pistils from SI *Nicotiana* species. (A) Total pistil protein extracts were separated by SDS-PAGE, blotted, and probed with an NaTrxh antibody. NaTrxh (or NaTrxh-like protein) was only detected in species with SI background (SI and SC*) (top). Coomassie-blue stained gel as loading control (bottom). (B) The NaTrxh transcript levels were normalized to 18S rRNA and compared to levels in *N. plumbaginifolia*. NaTrxh transcripts were detected in all the tested species. Analyses were performed in triplicate. SI: self-incompatible; SC: self-compatible; SC*: self-compatible that lacks one or more SI proteins.

A

```

NaTrxhss  ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAA
NaTrxWT   ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAA

NaTrxhss  TCAGGATCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAA
NaTrxWT   TCAGGATCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAA

NaTrxhss  CTTCACTTCAATTCCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC GGCTACA
NaTrxWT   CTTCACTTCAATTCCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC GGCTACA

                W  S  G  P  S
NaTrxhss  TGGAGTGGGCCCAGTAAAATGATGGAGCCGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACC
NaTrxWT   TGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACC
                W  C  G  P  C

NaTrxhss  GACGTTGACTTCGTCAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGA
NaTrxWT   GACGTTGACTTCGTCAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGA

NaTrxhss  GTACAAGCTATGCCAACATTTTGGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGTT
NaTrxWT   GTACAAGCTATGCCAACATTTTGGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGTT

NaTrxhss  GGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTT
NaTrxWT   GGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTT

NaTrxhss  GCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA
NaTrxWT   GCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA
  
```

B

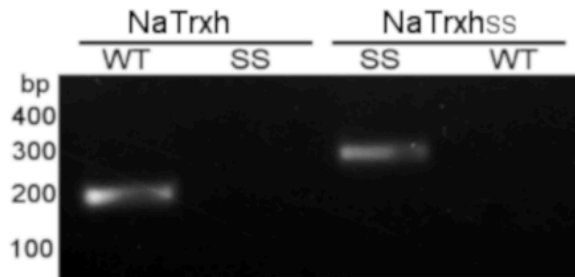


Fig. S2. NaTrxh and NaTrxh_{SS} sequence alignment and specific amplification. (A) Alignment of NaTrxh and NaTrxh_{SS} sequences showing the three point mutations (black) generated substituting serine for cysteine in the WCGPC motif. Light grey: specific primers used to amplify NaTrxh; cyan: primers employed to specifically amplify NaTrxh_{SS}. (B) Specific amplification of NaTrxh or NaTrxh_{SS}. Left, NaTrxh-specific primers amplify the expected 187 bp product from a wild-type (WT) template but not the mutant template (SS). Right, NaTrxh_{SS}-specific primers amplify the expected 279 bp product from the mutant template (SS) but not from the wild-type (WT).

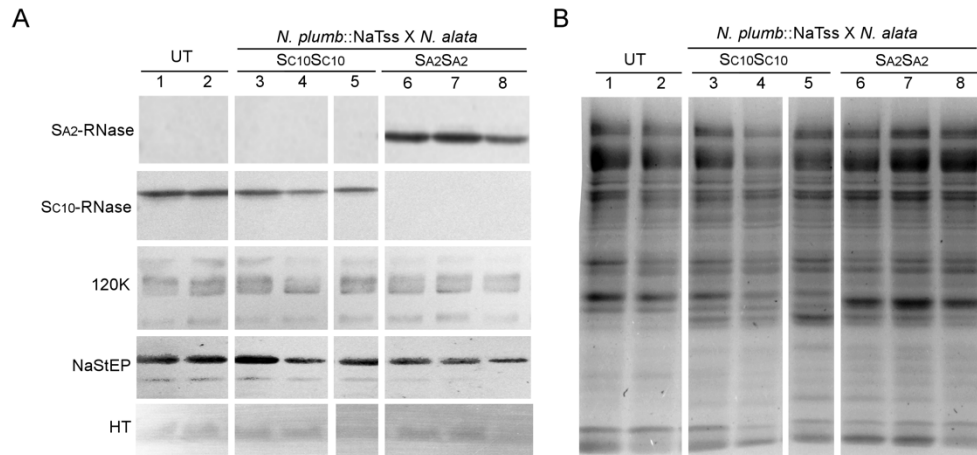


Fig. S3. Expression of S-RNase and MGs is not affected by NaTrxh_{SS} expression in S_{C10}- or S_{A2}-hybrids. (A) Protein-blot analysis of pistil protein extracts. Blots were probed with the antibodies shown at left. UT: untransformed S_{C10}-hybrids (1 and 2). Three S_{C10}-hybrids (3, 4, and 5) and three S_{A2}-hybrids (6, 7, and 8) expressing NaTrxh_{SS} are shown. These hybrids express S_{C10}-RNase or S_{A2}-RNase, as expected. UT and NaTrxh_{SS}-expressing hybrids show similar levels of three MGs: 120K, NaStEP, and HT-B (HT). (B) Coomassie-blue stained loading control.

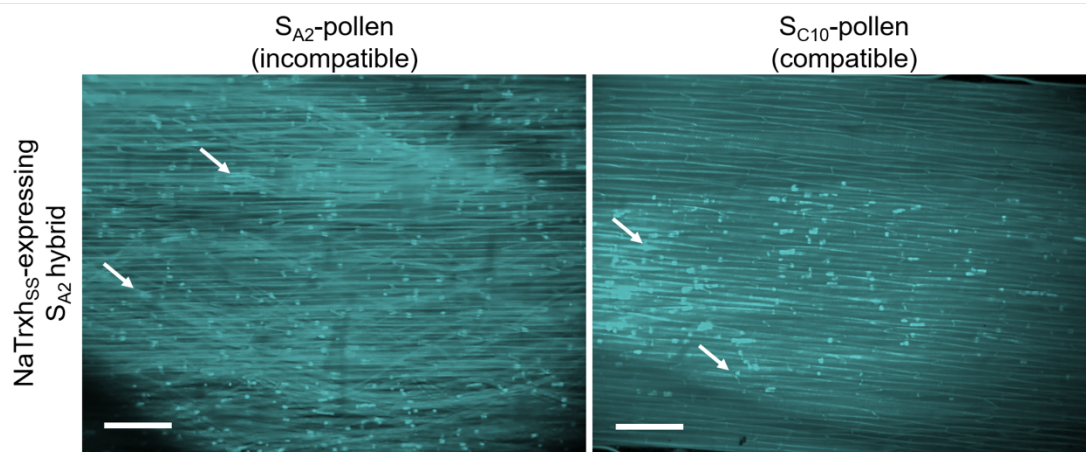


Fig. S4. S_{A2}-hybrids expressing NaTrxh_{SS} show loss of S-specific pollen rejection. An S_{A2}-hybrid expressing NaTrxh_{SS} was challenged with pollen from *N. alata* S_{A2}S_{A2} (incompatible) or S_{C10}S_{C10} (compatible). Pollen tubes (indicated by the arrows) were visualized at the base of the style. Numerous pollen tubes are visible regardless of pollen-S haplotype, indicating the loss of S-specific pollen rejection.

wt *N. plumbaginifolia* x *N. alata* S_{C10}

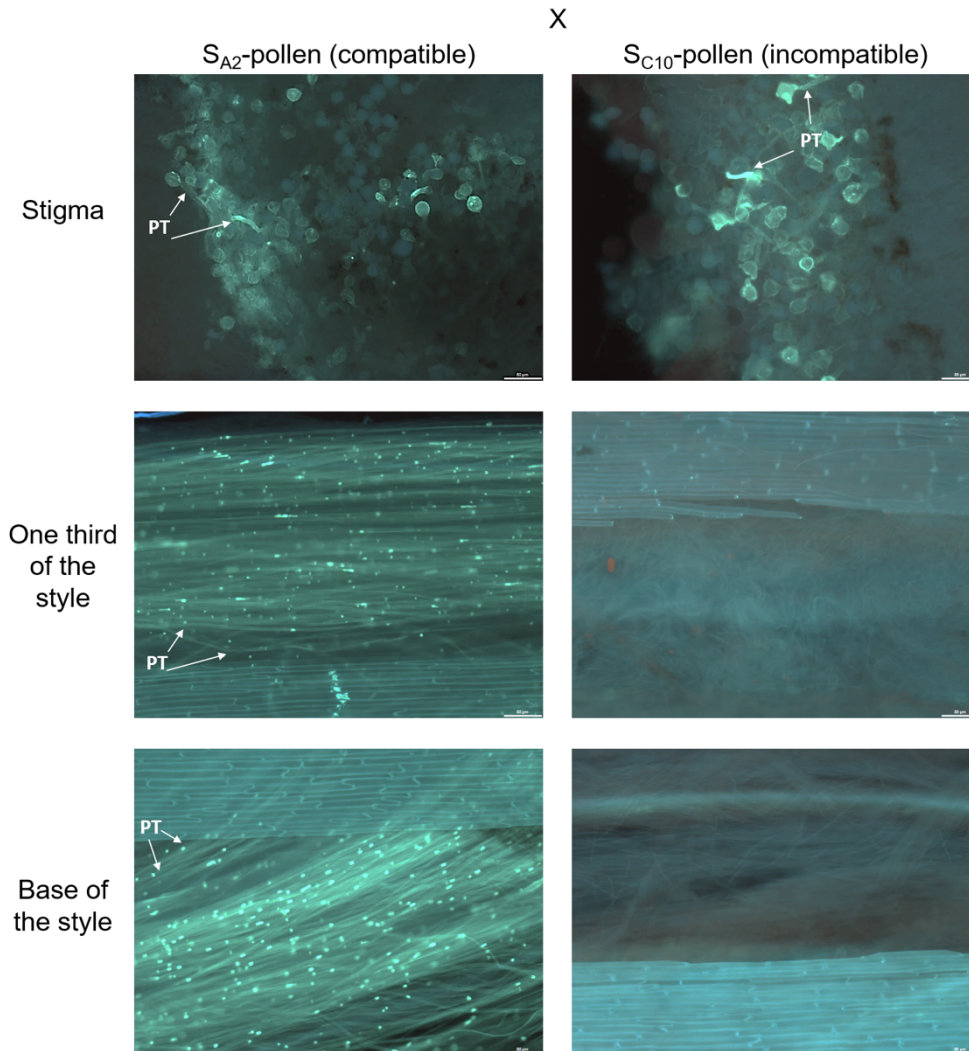


Fig. S5. Self-pollen rejection in wt *N. plumbaginifolia* x *N. alata* hybrids. Wt S_{C10}-hybrids were challenged with pollen from *N. alata* S_{A2}S_{A2} (compatible) or S_{C10}S_{C10} (incompatible). Pollen tubes (arrows; PT) were visualized at the stigma and along the style only in the compatible cross (S_{A2}-pollen). In an incompatible cross (S_{C10}-pollen), pollen tube growth is inhibited at stigma level, indicating that self-pollen rejection occurs at the style close to the stigma.

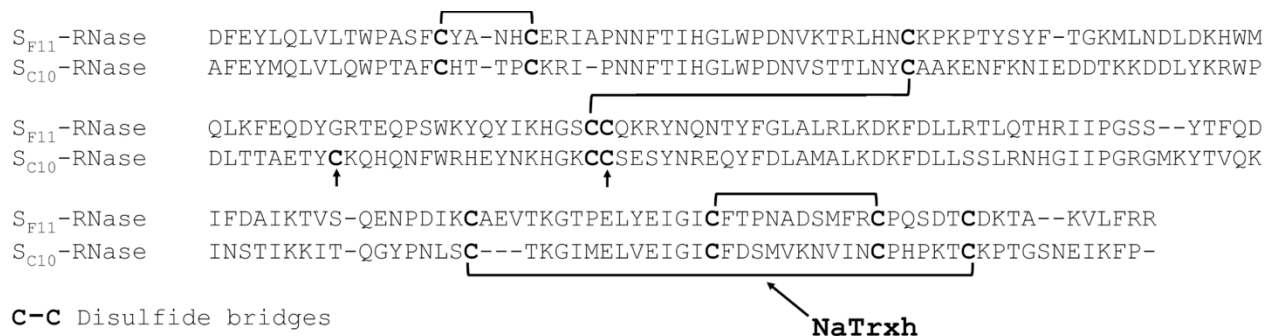


Fig. S6. S-RNase disulphide bonds. Alignment of S_{F11} - and S_{C10} -RNase sequences (29). Arrows, free Cys residues. The Cys₁₅₅-Cys₁₈₅ S_{C10} -RNase disulphide reduced by NaTrxh is indicated.

Supplemental data S7

Mass Spectrometry data

The excised gel bands were in-gel digested with trypsin without reduction or alkylation. After trypsin digestion, peptides were extracted and lyophilized. Peptides were resuspended with 1% formic acid and analyzed by LC-MS+MS/MS on a Thermo Scientific LTQ Orbitrap. MS data (peptide mass and sequence, MSMS) were searched against the entire NCBI green-plants (Viridiplantae) database using Sorcerer-Sequest (SageN Research, Saratoga, CA, USA). Raw data were copied to the Sorcerer2 IDA and peak lists prepared using ReAdW. All viridiplantae entries in the NCBI database (336,500 entries, last update February 2013) were searched with trypsin as enzyme, 2 missed cleavages allowed; oxidized methionine, N-Ethylmaleimide cysteine (monoisotopic mass +125.04768) and NEM+Water cysteine (monoisotopic mass +143.05824) were searched as variable modifications; 50ppm mass tolerance on precursor; 0.5 Da mass tolerance on fragments. Results were then examined using Scaffold (V4.8.2, Proteome Software). Data were first filtered for precursor mass tolerance of +/- 10ppm (parts per million mass error), then >95% confidence on peptide match, and >99% confidence on protein identification.

gi|533129 (100%), 25,178.9 Da
 S7-RNase [Nicotiana alata]
 11 exclusive unique peptides, 14 exclusive unique spectra, 33 total spectra, 97/218 amino acids (44% coverage)

```

  MLNSPLT SVL  FVLLFVL SPI  YGAF EY MQLV  LQWPTAF CHT  TPCKRIP NNF
  TIHGLW PDNV  STTLN YCAAK  ENFKN IEDDT  KKDDLYKRWP  DLTTAETY CK
  QHQNFWR HEY  NKHGK CCS ES  YNREQYFDLA  MALKDKFDLL  SSLRNHG IIP
  GRGMKYTVQK  INSTIKKITQ  GYPNLSCTKG  IMELVEIGIC  FDSMVKNVIN
  CPHPKTCKPT  GSNEIKFP
  
```

Figure S7.1. Sequence coverage for S-RNase. Peptides were matched with high confidence ($p < 0.05$) using the Sequest algorithm. Eleven peptides (from 33 MS/MS spectra) were matched to the S₇-RNase (exclusive unique indicates these peptides are not present in other sequences in the database). Yellow indicates peptides matched, green indicates modified amino acid (oxidized Met or NEM-Cys). The mature protein, as analyzed, starts at A₂₃ in the gene sequence.

NEM modified Cys sites confirmed by peptide sequence matching using Sequest

Data from parallel Sequest and MASCOT searches confirmed NEM modification of two cysteine residues. Data were filtered for $p < 0.05$ for peptide scores, XCorr in Sequest and MASCOT ion scores. The MSMS spectra for peptide containing the two cysteine modified residues are shown below. The Sequest matched data show good sequence coverage ($>80\%$) from b- and y-ions including data confirming the NEM-modified cysteine residues.

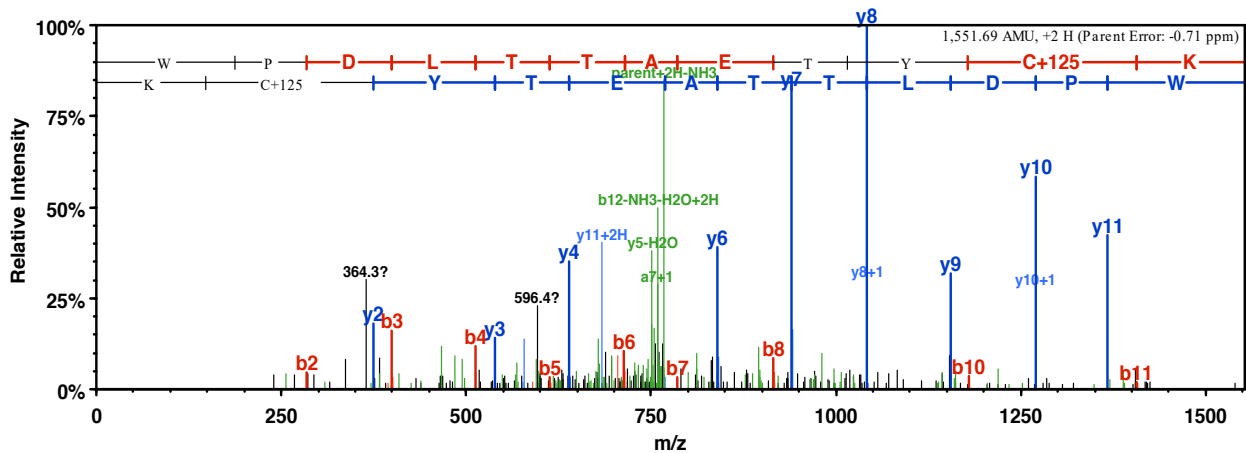


Figure S7.2. MSMS data for NEM modified site at Cysteine 99. A second MSMS spectrum for a doubly charged ion was matched to an authentic trypsin-derived peptide (W₈₈ to K₁₀₀). Both b-ions (red) and y-

ions (blue) were matched to the sequence (90% sequence coverage, <0.5 Da error) and the mass error on the precursor ion was very low (0.7pm).

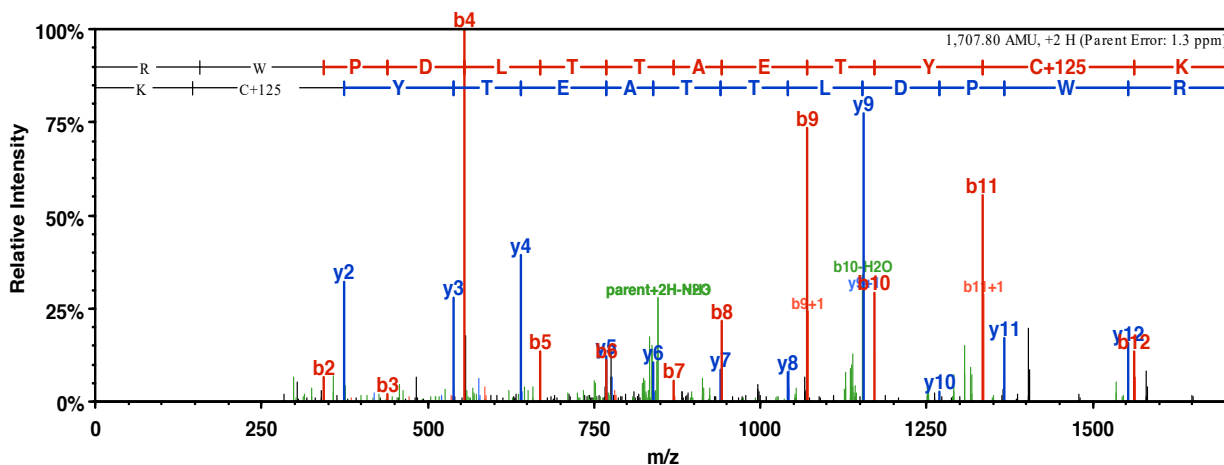


Figure S7.3. MSMS data for NEM modified site at Cysteine 99. The MSMS spectrum for a doubly charged ion was matched to a missed cleavage trypsin-derived peptide (R₈₇ to K₁₀₀). The Arg is preceded by a Lys residue in the sequence, adjacent trypsin sites such as these often result in a missed cleavage event. The b-ions (red) and y-ions (blue) matched to the sequence are shown (85% sequence coverage, <0.5 Da error) and the mass error on the precursor ion was very low (1.3ppm).

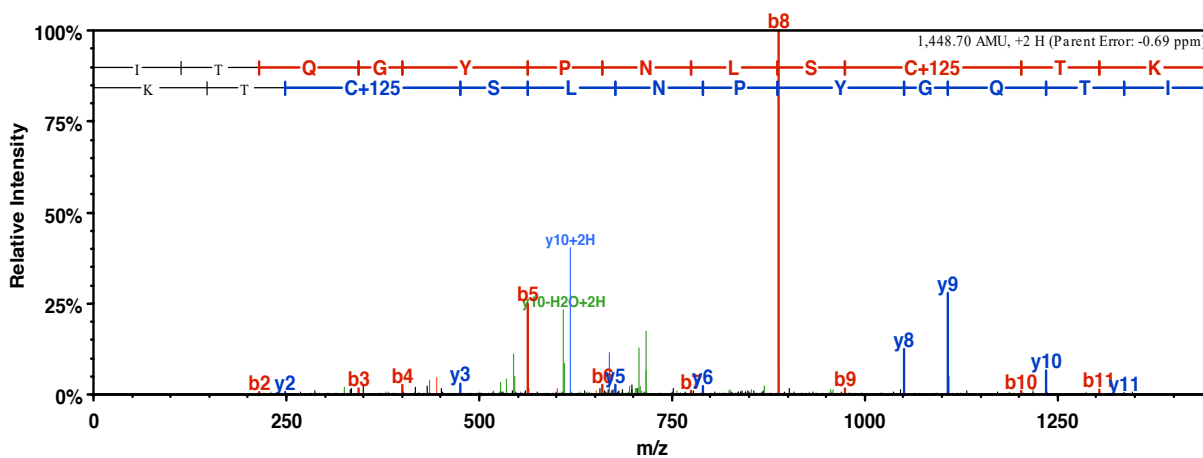


Figure S7.4. MSMS data for NEM modified site at Cysteine 177. The MSMS spectrum for a doubly charged ion was matched to a trypsin-derived peptide (I₁₆₆ to K₁₇₉). The b-ions (red) and y-ions (blue) matched to the sequence are shown (83% sequence coverage, <0.5 Da error) and the mass error on the precursor ion was very low (0.7ppm).

13. Artículo “High resolution crystal structure of NaTrxh from *Nicotiana alata* and its interaction with the S-RNase”.

Journal of Structural Biology 212 (2020) 107578



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Structural Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yjsbi



High resolution crystal structure of NaTrxh from *Nicotiana alata* and its interaction with the S-RNase



María Daniela Torres-Rodríguez^a, Lilian González-Segura^a, Rogelio Rodríguez-Sotres^a,
Javier Andrés Juárez-Díaz^b, Yuridia Cruz-Zamora^a, Felipe Cruz-García^{a,*}

^aDepartamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx 04510, Mexico

^bDepartamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Mx 04510, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

NaTrxh
Thioredoxin h
S-RNase
Self-incompatibility

ABSTRACT

Thioredoxins are regulatory proteins that reduce disulfide bonds on target proteins. NaTrxh, which belongs to the plant thioredoxin family *h* subgroup 2, interacts and reduces the S-RNase enhancing its ribonuclease activity seven-fold, resulting an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana*. Here, the crystal structure of NaTrxh at 1.7 Å by X-ray diffraction is reported. NaTrxh conserves the typical fold observed in other thioredoxins from prokaryotes and eukaryotes, but it contains extensions towards both N- and C-termini. The NaTrxh N-terminal extension participates in the reduction of S-RNase, and in the structure reported here, this is oriented towards the reactive site. The interaction between S_{P11}-RNase and the NaTrxh N-terminal was simulated and the short-lived complex observed lasted for a tenth of ns. Moreover, we identified certain amino acids as S_{P11}-RNase-E155 and NaTrxh-M104 as good candidates to contribute to the stability of the complex. Furthermore, we simulated the reduction of the C153-C186 S_{P11}-RNase disulfide bond and observed subtle changes that affect the entire core, which might explain the increase in the ribonuclease activity of S-RNase when it is reduced by NaTrxh.

1. Introduction

Thioredoxins (Trxs) are regulatory proteins widely distributed in living organisms that belong to the oxidoreductase thiol-disulfide superfamily. The reactive site of Trxs (WCXXC) has a conserved motif featuring two reactive Cys residues able to reduce disulfide bonds on specific protein targets to control some biological processes (Holmgren, 1985).

Dillet et al. (1998) described the catalytic mechanism of Trxs. Briefly, thanks to its low pKa, the first reactive site Cys can act as a nucleophile and attacks a sulfur atom on the target disulfide bond allowing the formation of a covalently linked mixed intermediate complex. Then, the second Cys of the catalytic motif breaks the intermolecular disulfide bond between the Trx and its target causing the dissociation of the oxidized Trx and the reduced target protein (Dillet et al., 1998; Kallis and Holmgren, 1980).

Whereas most organisms have a small number of Trxs, plant genomes encode a large number of these proteins. For example, in *Arabidopsis thaliana*, at least 20 Trxs encoded genes have been identified (Gelhay et al., 2005). So far, based on their sequence and cellular location, eight types of plant thioredoxins, have been described (Meyer

et al., 2002). The types *f*, *m*, *x*, *y*, and *z* are chloroplastic. Type *s* localizes in the endoplasmic reticulum, and type *o* is mitochondrial (Collin et al., 2003; Lemaire et al., 2003; Alkhalfioui et al., 2008). Members of type *h*, which is the largest and most heterogeneous group, localize in the cytosol, mitochondria, or the apoplast (Gelhay et al., 2004; Zhang et al., 2011). Besides, Trxs *h* cluster in three subgroups, and subgroup 2 includes Trxs with extended N-termini (Gelhay et al., 2004).

Recently, we provided evidence about the participation of a thioredoxin *h* from *Nicotiana alata* (NaTrxh) as an essential protein in the pollen rejection response in *Nicotiana* (Torres-Rodríguez et al., 2020). NaTrxh reduces one of the four conserved disulfide bonds of S-RNase, the self-incompatibility female determinant in *Nicotiana*, and causes an increase in its ribonuclease activity. The Cys155 and Cys185 form this disulfide bond in S_{C10}-RNase (Torres-Rodríguez et al., 2020). NaTrxh is expressed by the transmitting tissue cells of the style and is secreted to its extracellular matrix (Juárez-Díaz et al., 2006); however, its essential role in the pollen rejection response suggests a function inside the pollen tube (Torres-Rodríguez et al., 2020).

NaTrxh belongs to Trx *h* subgroup 2 (Juárez-Díaz et al., 2006). Its N-terminal end is 27 amino acid residues long and contains two motifs: the Nα (Met1 to Ala16) and the Nβ motif (Ala17 to Pro27) (Ávila-

* Corresponding author.

E-mail address: fcg@unam.mx (F. Cruz-García).

<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107578>

Received 29 May 2020; Received in revised form 11 July 2020; Accepted 14 July 2020

Available online 16 July 2020

1047-8477/ © 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

Castañeda et al., 2014). The N β domain targets NaTrxh towards the extracellular matrix of the style transmitting tract in *Nicotiana glauca* (Ávila-Castañeda et al., 2014). Moreover, both N α and N β domains are involved in the NaTrxh interaction with S-RNase allowing its reduction are involved in the NaTrxh interaction with S-RNase allowing its reduction (Torres-Rodríguez et al., 2020).

On the other hand, NaTrxh also exhibits a C-terminal extension comprising from Glu136 to Gln152. This domain is required for its interaction with S-RNase, but it does not participate in either NaTrxh secretion or in the reduction of S-RNase (Ávila-Castañeda et al., 2014; Torres-Rodríguez et al., 2020).

Here, we report the crystal structure of NaTrxh determined at 1.7 Å resolution. In the structure 116 residues were resolved, and 20 and 15 amino acids, respectively at the N- and C-terminal end, were not observed probably because they are highly disordered. The structure of these residues was simulated using Molecular Dynamics (MD), to determine the potential interactions between NaTrxh and S-RNase. The simulations were based on the NaTrxh X-ray structure reported here along with the previously reported S_{F11}-RNase structure (Ida et al., 2001). Finally, using semiempirical Quantum-Mechanics (QM) calculations we predicted the possible conformational change in S-RNase after the reduction of its C153-C186 disulfide bond, which is the identified target of NaTrxh (Torres-Rodríguez et al., 2020).

2. Materials and methods

2.1. Expression and purification of NaTrxh

NaTrxh was expressed as a GST fusion protein in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Stratagene) as previously described (Juárez-Díaz et al., 2006). The fusion protein was overexpressed in *E. coli* cultures at OD₆₀₀ 0.5–0.7 by adding 0.1 mM IPTG and harvested after 3 h at 37 °C. Fusion proteins were recovered from the soluble fraction after sonication and glutathione-agarose (Sigma) chromatography. NaTrxh was released by digestion with thrombin for 14 h at room temperature (GE Healthcare) and separated by molecular filtration chromatography in HiLoad Superdex 16/600, 200 µg (GE Healthcare). Fractions containing purified NaTrxh were dialyzed in 10 mM ammonium acetate, pH 6.0, to perform the crystallization screenings.

2.2. Protein crystallization

An initial screening was performed using JBScreen Wizard 3 (Jena Bioscience) with purified NaTrxh at 12 mg/ml in 10 mM ammonium acetate, pH 6.0, using the sitting-drop vapor-diffusion method by mixing 2 µl of protein and 2 µl of reservoir solution. NaTrxh crystals were obtained at 18 °C after 15 days in the condition containing 20% (w/v) polyethylene glycol 3350, 200 mM ammonium formate (solution 4) and 0.025% (v/v) dichloromethane as additive. Crystals were flash-cooled by immersion in liquid nitrogen using the mother liquor solution supplemented with 20% (v/v) glycerol as cryoprotectant.

2.3. Data collection and structure determination

X-ray diffraction data of the NaTrxh were collected at 100 K at the Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory (Illinois, USA) in the beamline 19ID. Diffraction data were indexed, integrated, and scaled using the HKL3000 (Minor et al., 2006). The determination of phases was carried out by molecular replacement in HKL3000 using as a template the coordinates of thioredoxin *h* isoform 2 from *Hordeum vulgare*, HvTrxh2 (PDB ID 2IWT) (Maeda et al., 2006), which has 40% of sequence identity with NaTrxh. The refinement cycles of the structure were carried out with standard protocols of Phenix (Adams et al., 2011) and monitoring R_{free} and R_{work} during the whole process. Electron density maps were analyzed using Coot (Emsley et al., 2010). Structural figures were made with VMD (Humphrey et al., 1996) and

Table 1
Data collection and refinement statistics for NaTrxh.

Data collection^a	
Wavelength (Å)	0.9795
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions	
a, b, c (Å)	45.99, 68.85, 70.80
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Monomers per asymmetric unit	2
Resolution range (Å)	49.36/1.7
Total reflections	215,966
Unique reflections	25,159 (1235)
Completeness (%)	99.3 (99.4)
R _{merge} (%)	10.6 (103.2)
Mean I/σ (I)	25.2 (2.6)
Multiplicity	8.6 (7.5)
CC _{1/2}	1.00 (0.86)
Refinement statistics	
Resolution range (Å)	49.36/1.7
R _{work} /R _{free} (%)	18.54/22.02
Number of atoms	
Protein	1910
Water	126
Ethylene glycol	8
Average B-factors (Å²)	
Protein	30.09
Water	44.67
Ethylene glycol	62.92
RMSD from ideal stereochemistry	
Bond lengths (Å)	0.006
Bond angles (°)	0.772
Ramachandran plot statistics	
Residues in most favored regions (%)	98.46
Residues in allowed regions (%)	1.54
Residues in non-allowed regions (%)	0
PDB code	6X0B

^a Values in parentheses show the statistics for the highest resolution shell.

PyMOL

2.4. Modeling of NaTrxh-S_{F11}-RNase interaction

NaTrxh structure obtained here (PDB ID 6X0B), was used for the simulation of its interaction with S-RNase. Those segments not observed in the protein crystal of NaTrxh were predicted using a previously published model of this protein (Ávila-Castañeda et al., 2014), and Molecular Dynamics (MD) simulations. MD simulations were run using GROMACS (Abraham et al., 2015) and AMBER99SB-ILDN (Lindorff-Larsen et al., 2010) force field in an explicit solvent with PME electrostatics and PME-like treatment of Van der Waals. MD simulations were done using constant pressure (~1 atm) and 298 K.

Several possible conformations for the starting complex between NaTrxh and S_{F11}-RNase (PDB ID 1J0O) (Ida et al., 2001), were obtained with the docking module of the ROSETTA suit (Kaufmann et al., 2010), with constraints to recover those conformations where the reactive NaTrxh Cys and the substrate disulfide were at less than 12 Å. Productive simulations were run unconstrained and repeated 3 to 5 times. For Simulated Annealing simulations (SA-MD), the temperature was increased to 373 K for 3 ns and gradually reduced back to 298 K in 15 ns cycles. Where indicated, a light pulling force was introduced in MD simulations to accelerate the formation of the complex. The standard analysis tools from GROMACS suit (Abraham et al., 2015) and VMD (Humphrey et al., 1996) were used to analyze the trajectories.

2.5. Modeling of S_{F11}-RNase-dinucleotide complex

A 5' OH-CC-3'OH dinucleotide was repeatedly docked into S_{F11}-RNase using AUTODOCK vina (Trott and Olson, 2010) to give over 250 poses. The box was restricted to ± 10 Å (in X, Y, and Z directions) from the putative active site His residues (His32, His91). Meaningful complexes were selected based on what is known for the catalytic

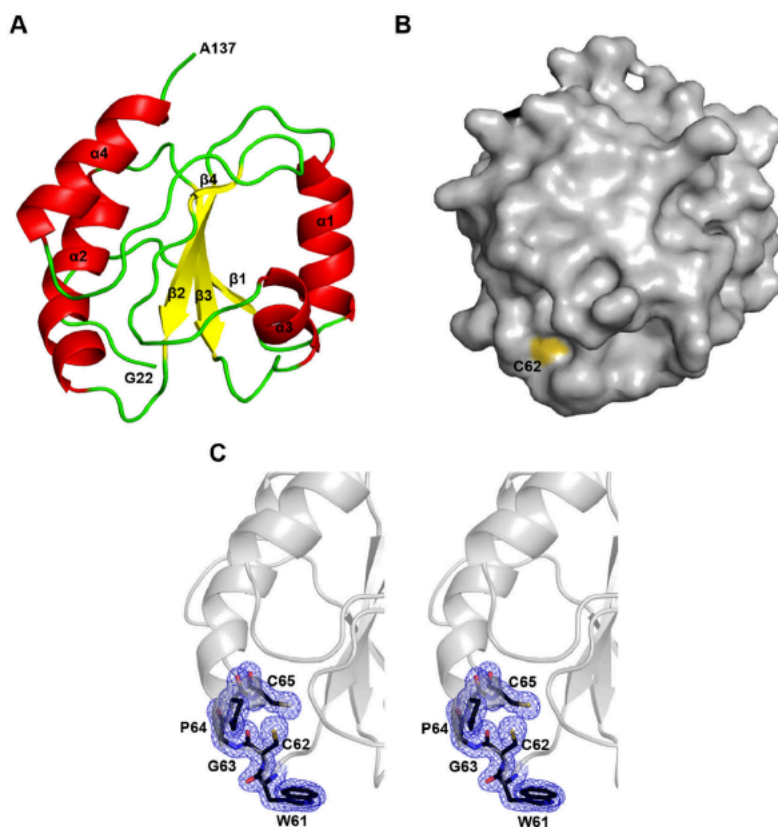


Fig. 1. Crystallographic structure of NaTrxh. (A) Cartoon representation of one monomer of NaTrxh. The sulfur atom of Cys62 is shown in yellow showing the exposed surface. (B) Surface representation of one monomer of NaTrxh. (C) Close-up stereoview of the reactive site; the sidechains of residues from W61 to C65 are depicted as sticks with carbon atoms in black, nitrogen in blue, oxygen in red and sulfur in yellow. The electron density map ($2F_o - F_c$) is contoured at 1σ (blue mesh). The figures were generated using PyMOL. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

mechanism of RNases and docking energy. These complexes were further refined using MD, and the complex having the expected features of the enzyme-substrate for this kind of enzymes was optimized using all-atom QM semiempirical calculations using the PM7 method and the localized molecular orbitals approach (LMO), as implemented in MOPAC 2016 (Stewart, 2013), before and after the C153-C186 disulfide bond was broken (*in silico*).

NaTrxh PDB ID 6X0B
S_{PT11}-RNase PDB ID 1100

3. Results

3.1. Overall structure

We determined the NaTrxh crystal structure at 1.7 Å resolution. The crystal belongs to the orthorhombic (P212121) space group and contains two monomers in the asymmetric unit. Table 1 summarizes data collection and refinement statistics, and Fig. 1 shows the crystal structure of NaTrxh. Trxs from all organisms conserve a structure consisting of five β -strands surrounded by four α -helices. These

secondary structure elements are organized from N- to C-terminal as follows: β 1, α 1, β 2, α 2, β 3, α 3, where the β -strands are parallel, followed by the β strands β 4, β 5, and α 4. These β strands are antiparallel (Holmgren et al., 1975). NaTrxh has this typical folding of the Trxs, and the secondary structure elements are conserved except the β 5-strand (Figs. 2 and 3).

The NaTrxh reactive site (WCGPC) is conserved as in all Trx *h* subgroup 2. It localizes on the surface of the protein (Fig. 1C). Amino acid residues Trp61 and Cys62 are in a loop formed between β 2 and α 2, and those Gly63, Pro64, and Cys65 are part of the α 2-helix. The side chain of the Cys62 residue in its reduced form is exposed to the solvent (Fig. 1B), which is the one that performs the first nucleophilic attack on the disulfide bond in the target protein (Kallis and Holmgren, 1980).

Besides the reactive site signature, several additional residues play essential structural and catalytic roles in most Trxs. These were identified in *Escherichia coli* Trx, and all are conserved in NaTrxh (Fig. 3A). For example, Pro70, which separates the catalytic motif from the rest of the α 2-helix and provides stability to the protein (de Lamotte-Guéry et al., 1997) and Pro105 that is located on the opposite side of the reactive site and helps to maintain its conformation (Fig. 3B) (Gleason,

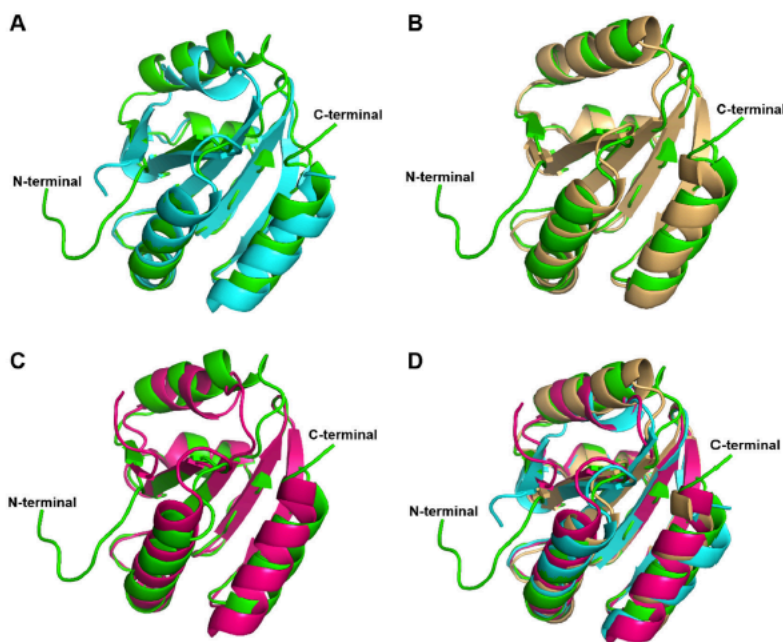


Fig. 2. Superimposition of NaTrxh structure (green, PDB ID 6X0B) with different trxs as (A) *E. coli* Trx (cyan, PDB ID 2TRX), (B) HvTrxh2 from *H. vulgare* (yellow-brown, PDB ID 2IWT), and (C) human mitochondrial trx 2 (magenta, PDB ID 1W89). (D) All the structures show the typical Trx folding. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

1992).

Two Gly residues are also conserved in all Trxs. These are located at the N- and C-terminal of the $\beta 5$ -strand and define its length (Collet and Messens, 2010). In NaTrxh, the $\beta 5$ -strand is not formed. However, both Gly residues are conserved (Gly113 and Gly121; Fig. 3B), suggesting for them a different essential role in NaTrxh, yet to be determined. Besides, two charged amino acids are essential for the activation of the C-terminal Cys of the reactive site as a nucleophile (Eklund et al., 1991). Based on their conserved position in NaTrxh, the best candidates are Asp56 y Lys86 in NaTrxh (Fig. 3B).

3.2. NaTrxh N- and C-terminal extensions

The *E. coli* Trx fold does not include the N- and C-terminal extensions present in NaTrxh. The residues from Met1 to Ser21 (N-terminal) and those from Pro138 to Gln152 (C-terminal), exhibit weak or non-existent ($2F_o - F_c$) electron density in the NaTrxh structure and are not present in the final model.

These residues comprise the full $N\alpha$ domain and five and fifteen amino acids from N β and C-terminal domains, respectively. Both N- and C-terminal NaTrxh extensions were predicted as disordered regions and solvent-exposed (Ávila-Castañeda et al., 2014). Thus, their high flexibility might be the reason why they could not be determined in the diffraction.

In the X-ray structure, only six residues of the NaTrxh N-terminal domain were observed (from Gly22 to Pro27). The model shows its orientation towards the reactive site (Fig. 1A), which agrees with the fact that this region is crucial for the reduction of S-RNase (Torres-Rodríguez et al., 2020).

3.3. Interaction between NaTrxh N-terminal and S-RNase that leads to its reduction

Since NaTrxh selectively reduces one disulfide bond of S_{C10} -RNase (equivalent to the C153-C186 in S_{F11} -RNase), we used the three-dimensional structure of both proteins to predict a possible complex. We generated several possible complexes with the ROSETTA protein-protein docking protocol, narrowing the search to those bringing NaTrxh-C62 to less than 10 Å away from S_{F11} -RNase-C153-C186 disulfide bond. In the complex, some favorable contacts between the NaTrxh N-terminal and S_{F11} -RNase were expected, since the absence of this region prevents the reduction of S_{C10} -RNase by NaTrxh (Torres-Rodríguez et al., 2020), so this was used as an additional criterium to select the best partner candidates (Fig. 4A). Then, free MD simulations were performed to analyze the stability of these starting complexes and do some accounting of persistent contacts.

None of the starting conformations led to the formation of a stable complex, which was no surprise because Trxs do not form a permanent dimer with its target. Thus, the interaction between S_{F11} -RNase and NaTrxh through its N-terminal should be enough to allow the formation of a transition state, which cannot be observed in MD under classical mechanics. Accordingly, the complex did stand for a few tenths of ns and broke up. However, it was enough information to identify essential residues participating in the stability of the complex (Fig. 4B). In order to improve the sampling of their conformation, we introduced a soft pulling force between NaTrxh-C62 and S_{F11} -RNase-C186 sulfur atoms equivalent in energy to one hydrogen bond to identify persistent contacts (those present in over 60% of the simulation frames). One significant interaction was the contact between S_{F11} -RNase-E155 with NaTrxh-C62 side chain and NaTrxh-M104 backbone (Fig. 4C). The

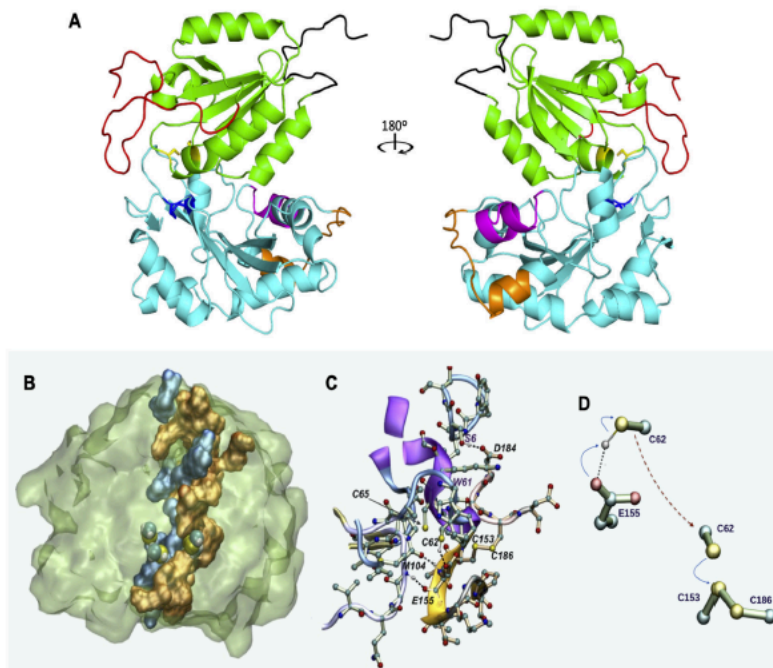


Fig. 4. (A) Cartoon representation of the NaTrxh-S_{F11}-RNase complex. NaTrxh is shown in green and its N- and C-terminal extensions are in red and black, respectively. NaTrxh reactive site (yellow) is close to the C153-C186 disulfide bond (blue) of S_{F11}-RNase (cyan). Hypervariable regions, K47-L63 (orange) and F72-P82 (magenta), of S-RNase do not interact with NaTrxh N-terminal. (Right) Image rotated 180° about the vertical axis. (B) The complex surface (green) is shown translucent, while in solid colors the residues of NaTrxh (steel blue surface) and S_{F11}-RNase (dark orange surface) making persistent contacts (in 60% or more of the simulation frames). (C) Atomic detail of selected contacts in the NaTrxh (purple cartoons and light green sticks) and S_{F11}-RNase (yellow-brown cartoons and light orange sticks) complex. Atoms of relevant residues are shown as balls in CPK colors. Hydrogens are not shown, except for those involved in protein-protein H-bonds (shown as black dashed lines). (D) Proposed catalytic mechanism of NaTrxh, including the abstraction of a proton of NaTrxh-C62 by S_{F11}-RNase-E155 and formation of the thiolate that attacks S_{F11}-RNase-C153-C186 disulfide bond. The images were prepared using VMD. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

and His91 is protonated at the Nδ. The putative enzyme-substrate complex was identified by the correct positioning of the catalytic residues close to the atoms that each one is expected to influence during catalysis. Simulations of the same complex after the reduction of the disulfide bond showed minor changes in geometry (not shown). However, due to the stochastic movement of atoms, the discrimination of changes with possible influence on catalysis from those due to Brownian motions was not possible. Then, we used semiempirical quantum mechanics (PM7-LMO) to calculate the electronic structure of the enzyme-CC putative complex with or without the C153-C186 disulfide bond, which binds the β4-strand to the loop formed between β5 and β6-strands of S_{F11}-RNase. Bound water molecules taken from the MD simulation were included in the PM7-LMO geometry optimization.

The results shown in Fig. 5 confirmed the subtle effect of breaking the disulfide. The wireframe structure of the reduced and oxidized enzyme-CC complex is superimposed to reveal how the structural change, though subtle, it propagates to the entire structure (Fig. 5A). Fig. 5B shows the structure of the CC dinucleotide and some residues possibly involved in the catalysis. The residue His32 is protonated and H-bonds to the bridge oxygen at the 3'phosphoester bond. This is the residue proposed to protonate the 3'OH of the leaving nucleotide. The residue His91 accepts an H-bond to the 2'OH of the nucleotide, and it is proposed that this promotes the activation of the 2'-alkoxide

nucleophile. This alkoxide is expected to attack the phosphorous atom making a classic S_N2 displacement of the phosphodiester bond. Lys90 H-bonds to both the phosphate and the 2'OH groups, providing charge compensation during the catalysis. In this enzyme, His32 is further activated by its H-bond to Glu165, which in turn, is H-bonded to Lys152. As shown in Fig. 5C, some of the H-bonds possibly related to catalysis changed after breaking the C153-C186 disulfide bond. The reduction in the H-bond distance His32-O3' and His91-HO2' may offer a possible explanation for the increased activity of the S-RNase when is reduced by NaTrxh (Fig. 5D). The proposed mechanism of action of S_{F11}-RNase is shown in Fig. 5E.

4. Discussion

The core of NaTrxh from *N. alata* has a tertiary structure similar to the reported for other Trxs from bacteria to plants (Figs. 2 and 3. Holmgren et al., 1975; Smeets et al., 2005; Maeda et al., 2006). However, NaTrxh, as other members of the type *h* plant Trxs, contains extended N- and C-terminal ends whose structure was not fully determined because of their high flexibility.

Previous work showed that both NaTrxh N- and C-terminal extensions interact with S-RNase (Ávila-Castañeda et al., 2014). However, only residues contained in the N-terminal are essential for S-RNase

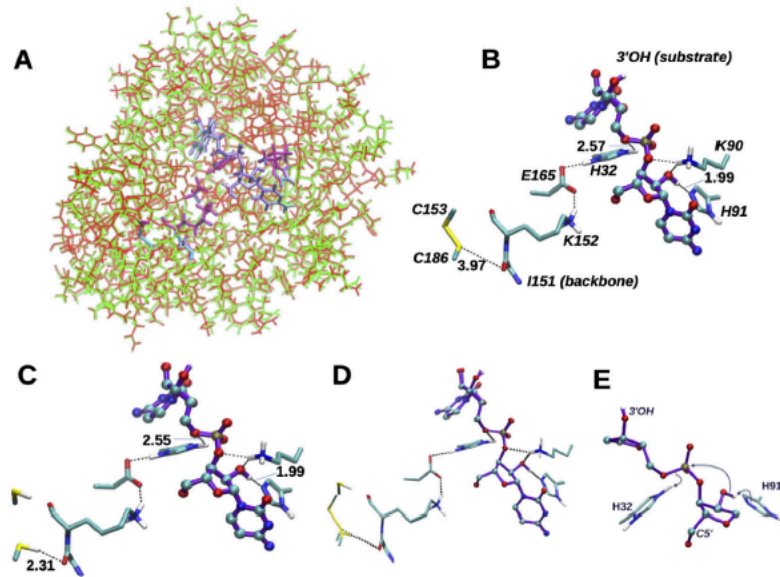


Fig. 5. Predicted changes in the structure of S_{F11} -RNase complexed with a CC dinucleotide. Superimposition of the complex (A) with (red) or without (green) the C153-C186 disulfide bond (both depicted as wireframes). The substrate and the relevant residues shown in (D) are as licorice. The CC ligand (ball and sticks) and relevant residues (sticks) are shown in CPK colors with (B) or without (C) the disulfide, and their superimposition (D). The numbers indicate H-bonding distances that may be important in catalysis. The numbers in roman typeface are H-bond distances (Å) and residues are labeled (B) by amino acid abbreviation and sequence number. (E) Suggested mechanism of action of S_{F11} -RNase showing the nucleophilic attack of H32 and H91 to the CC ligand. The images were prepared using VMD. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

reduction (Torres-Rodríguez et al., 2020). We hypothesize that the interaction between NaTrxh and S-RNase could stabilize the N-terminal extension of NaTrxh. Hence, the crystallization of both proteins in a complex will let us know the conformation state of this domain with this specific target. Other crystal structure Trx-substrate complexes have been determined such as HvTrx2, from *Hordeum vulgare*, which was covalently bound to its substrate BASI, by a disulfide bond (Maeda et al., 2006). The obtained structure allowed the identification of residues interacting during reduction, which are highly conserved among Trxs and localize in the core of HvTrx2. In contrast to NaTrxh, HvTrx2 has a smaller N-terminal extension, and it seems not to be involved in the interaction with this specific target. The HvTrx2 N-terminal extension was not determined in the final structure (Maeda et al., 2006).

During the reduction reaction, some residues at the NaTrxh core would contact S-RNase, as was observed for the HvTrx2-BASI complex; however, the interaction may lack the strength to retain S-RNase long enough for its reduction, and then, the contacts of S-RNase with residues at the NaTrxh N-terminus may provide the required additional binding energy. In agreement with this hypothesis, *E. coli* Trx, which lacks the N-terminal extension, is unable to reduce the S-RNase and, most importantly, when the N-terminal extension was removed from NaTrxh, the reduction of the S-RNase reduction did not occur (Torres-Rodríguez et al., 2020).

Parameters used in the simulation assays did not let us determine the interaction between the NaTrxh C-terminal extension and S-RNase. However, we previously gave evidence of this interaction by using affinity chromatography (Ávila-Castañeda et al., 2014). The NaTrxh C-terminal end exhibits high mobility, and the conformations observed for this were far from the reactive site of NaTrxh (Fig. 4A). In agreement, NaTrxh C-terminal does not participate in the S-RNase reduction

(Torres-Rodríguez et al., 2020). Currently, the NaTrxh C-terminal function is poorly understood and deserves future research.

To date, we have not identified other substrates of NaTrxh, and our interest is on S-RNase since the activity of this protein is enhanced by NaTrxh reduction (Torres-Rodríguez et al., 2020). S-RNases are highly polymorphic. Variability among different alleles is contained in two hypervariable regions (Anderson et al., 1989). At the same time, the core of the protein is conserved as well as the four disulfide bonds (Anderson et al., 1989; Oxley and Bacic, 1996), including the one reduced by NaTrxh (C155-C185 in the S_{C10} -RNase, C153-C186 in S_{F11} -RNase). Therefore, it would be expected that the reduction of S-RNase by NaTrxh would not be S-allele specific. Moreover, we propose that S-RNase-NaTrxh interaction would not interfere with allelic specific recognition of S-RNase by the male determinant, SLF, because such recognition is mediated by the hypervariable regions of S-RNase (Matton et al., 1997) and these do not interact with NaTrxh (Fig. 4A).

The interactions between S-RNase and SLF or NaTrxh and S-RNase have different roles in the pollen rejection response. It is unknown if they occur at the same time inside of pollen tube. However, we propose that the S-RNase-SLF interaction happens early and is the initial step that triggers the pollen rejection mechanism because it determines whether the pollen is accepted or rejected. On the other hand, the S-RNase-NaTrxh interaction would later occur when S-RNase activity levels are necessary to degrade pollen tube RNA.

On the other hand, the C16-C21 and C46-C94 disulfide bonds are located close to the active site of the S_{F11} -RNase. They seem to be the primary bonds that maintain the catalytic residues conformation and allow the S-RNase to have a basal ribonuclease activity (Ida et al., 2001). They might prevent a crucial structural change in the active site when the C153-C186 disulfide bond is broken. It would explain why S-

RNase exhibits a basal activity before being reduced by NaTrxh, but the specific reduction increases its ribonuclease activity (Torres-Rodríguez et al., 2020).

To explore possible structural changes caused by the reduction of the C153-C186 disulfide bond, we simulated its breaking off. Our data shown only subtle changes between S_{F11}-RNase with and without the C153-C186 disulfide bond, including a small change in the geometry of contacts between the catalytic residues His32 and His90 and the substrate (Fig. 5D). However, the increase in activity after reduction can hardly be ascribed only to these two residues, because all the core of S-RNase is altered. Differences in activity could relate to a faster dynamic of the active site, including those secondary residues involved in the recognition and orientation of the substrate (RNA), and may also allow a faster product release. In any case, according to QM theory, all atoms in a polyatomic molecule share their electrons to some extent with all other atoms and electronic perturbations should propagate to the whole system. It is interesting to observe how the reduction of a single disulfide in S-RNase does indeed bring a subtle rearrangement of the whole protein. Probably this is one of the reasons why the rational design of proteins has proven so challenging (Banda-Vázquez et al., 2018). However, we cannot rule out additional conformational changes taking place in vivo due to the protein's interaction with components of intracellular medium, including the solvent, ions, and other macromolecules.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Crystallographic results shown in this report are derived from work performed at Argonne National Laboratory, Structural Biology Center at the Advanced Photon Source. Argonne is operated by UChicago Argonne, LLC, for the U.S. Department of Energy, Office of Biological and Environmental Research under contract DE-AC02-06CH11357. We are grateful to the staff of the beamline 19-ID for their support during data collection and data processing particularly to Dr. Youngchang Kim. We thank A. Díaz-Vilchis (IBT-UNAM) for her help in the molecular replacement. M.D.T.-R. held a Ph.D. studentship from CONACyT-México (434975). The work was funded by grants from FQ-5000-9128, CONACyT (236602) and PAPIIT-UNAM (IN220919) to F.C.-G. and Supercomputing project LANCAD-UNAM-DGITC-215 to R.R.S.

Author contributions

The project was designed by F.C.-G. M.D.T.-R. performed the purification and crystallization of NaTrxh. L.G.-S. carried out diffraction data collection and crystal structure determination of NaTrxh. R.R.-S. performed MD analysis. J.A.J.-D. and Y.C.-G. made the NaTrxh constructs for overexpression. M.D.T.-R., and F.C.-G. wrote the MS.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107578>.

References

Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* 1–2, 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.

Adams, P.D., Pavel, V.A., Bunkóczi, G., Chen, V.B., Echols, N., Headd, J.J., Hung, L.-W.,

Jain, S., Kapral, G.J., Kunstleve, R.W.G., McCoy, A.J., Moriarty, N.W., Oeffner, R.D., Read, R.J., Richardson, D.C., Richardson, J.S., Terwilliger, T.C., Zwart, P.H., 2011. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods* 55, 94–106. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.07.005>.

Akhalfoui, F., Renard, M., Frendo, P., Keilinger, C., Meyer, Y., Gelhaye, E., Hirasawa, M., Knaff, D.B., Ritzenthaler, C., Montrichard, F., 2008. A novel type of thioredoxins dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* 148, 424–435. <https://doi.org/10.1104/pp.108.123778>.

Anderson, M.A., Comis, E.C., Goeffrey, I., Bernatzky, R., Atkinson, A., Orpin, T., Dedman, H., Tregear, G., Femley, R., Clarke, A.E., 1989. Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell.* 1, 483–491. <https://doi.org/10.1105/tpc.1.5.483>.

Ávila-Castañeda, A., Juárez-Díaz, J.A., Bravo-Alberto, C.E., Ibarra-Sánchez, C., Zavala-Castillo, A., Cruz-González, Y., Martínez-Castilla, L., Márquez-Guzmán, J., Cruz-García, F., 2014. A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro. *BMC Plant Biol.* 14, 147. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-147>.

Banda-Vázquez, J., Shanmuganarman, S., Rodríguez-Sotres, R., Torres-Larios, A., Höcker, B., Sosa-Peinado, A., 2018. Redesign of LAOBP to bind novel l-amino acid ligands. *Protein Sci.* 27, 957–968. <https://doi.org/10.1002/pro.3403>.

Collet, J.F., Messens, J., 2010. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 1205–1216. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3114>.

Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J.M., Knaff, D.B., 2003. The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J. Biol. Chem.* 278, 23747–23752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302077200>.

de Lamotte-Guéry, F., Pruvost, C., Minard, P., Delaue, M.A., Miginiac-Maslou, M., Schmitter, J.M., Stein, M., Decotignies, P., 1997. Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha2 helix of *Escherichia coli* thioredoxin. *Protein Eng.* 10, 1425–1432. <https://doi.org/10.1093/protein/10.12.1425>.

Dillet, V., Dyson, H.J., Bashford, D., 1998. Calculations of electrostatic interactions and pKas in the active site of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry* 37, 10298–10306. <https://doi.org/10.1021/bi980333x>.

Eklund, H., Gleason, F.K., Holmgren, A., 1991. Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins* 11, 13–28. <https://doi.org/10.1002/prot.340110103>.

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G., Cowtan, K., 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.P., 2004. The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 42, 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.002>.

Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., Jacquot, J.P., 2005. The plant thioredoxin system. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 24–35. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4296-4>.

Gleason, F.K., 1992. Mutation of conserved residues in *Escherichia coli* thioredoxin: effects on stability and function. *Protein Sci.* 1, 609–616. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010507>.

Holmgren, A., 1985. Thioredoxin. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 237–271. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.001321>.

Holmgren, A., Soderberg, B.O., Eklund, H., Branden, C.L., 1975. Three-dimensional structure of *Escherichia coli* thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 2305–2309. <https://doi.org/10.1073/pnas.72.6.2305>.

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

Ida, K., Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbiggin, E., Clarke, A.E., Sakiyama, F., Sato, M., 2001. The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{F11}-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* 314, 103–112. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5127>.

Juárez-Díaz, J.A., McClure, B., Vázquez-Santana, S., Guevara-García, A., Leon-Mejía, P., Márquez Guzmán, J., Cruz-García, F., 2006. A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro. *J. Biol. Chem.* 281, 3418–3424. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511687200>.

Kallis, B.B., Holmgren, A., 1980. Differential reactivity of the functional sulphydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 255, 10261–10265.

Kaufmann, K.W., Lemmon, G.H., Deluca, S.L., Sheehan, J.H., Meiler, J., 2010. Practically useful: what the Rosetta protein modeling suite can do for you. *Biochemistry* 49, 2987–2998. <https://doi.org/10.1021/bi902153g>.

Lemaire, S.D., Collin, V., Keryer, E., Quessada, A., Miginiac-Maslou, M., 2003. Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* 543, 87–92. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00416-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00416-2).

Lindorff-Jensen, K., Piana, S., Palmo, K., Mangakis, P., Klepeis, J.L., Dror, R.O., Shaw, D.E., 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins* 78, 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>.

Maeda, K., Hagglund, P., Finnie, C., Svensson, B., Henriksen, A., 2006. Structural basis for target protein recognition by the protein disulfide reductase thioredoxin. *Structure* 14, 1701. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.09.012>.

Matton, D.P., Maes, O., Laublin, G., Xike, Q., Bertrand, C., Morse, D., Cappadocia, M., 1997. Hypervariable domains of self-incompatibility RNases mediate allele-specific pollen recognition. *Plant Cell.* 9, 1757–1766. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1757>.

Meyer, Y., Vignols, F., Reichheld, J.P., 2002. Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* 347, 394–402. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)47039-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)47039-5).

- Minor, W., Cymborowski, M., Otwinowski, Z., Chruszcz, M., 2006. HKL-3000: the integration of data reduction and structure solution from diffraction images to an initial model in minutes. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 62 <https://doi.org/10.1107/S0907444906019949>. 8598–8566.
- Oxley, D., Bacic, A., 1996. Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana glauca*. *Eur. J. Biochem.* 242, 75–80. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0075r.x>.
- Smeets, A., Evrard, C., Landmeters, M., Marchand, C., Knoops, B., Declercq, J.-P., 2005. Crystal structures of oxidized and reduced forms of human mitochondrial thioredoxin 2. *Protein Sci.* 14, 2610–2621. <https://doi.org/10.1110/ps.051632905>.
- Stewart, J.J.P., 2013. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *J. Mol. Model.* 19, 1–32. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1667-x>.
- Torres-Rodríguez, M.D., Cruz-Zamora, Y., Juárez-Díaz, J.A., Mooney, B., McClure, B., Cruz-García, F., 2020. NaTrxh is an essential protein for pollen rejection in *Nicotiana* by increasing S-RNase activity. *Plant J.* <https://doi.org/10.1111/TPJ.14802>.
- Trott, O., Olson, A.J., 2010. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455–461. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>.
- Zhang, C.-J., Zhao, B.-C., Ge, W.-N., Zhang, Y.-F., Song, Y., Sun, D.-Y., Guo, Y., 2011. An apoplastic H-type thioredoxin is involved in the stress response through regulation of the apoplastic reactive oxygen species in rice. *Plant Physiol.* 157, 1884–1899. <https://doi.org/10.1104/pp.111.182808>.