



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Las extensiones amino y carboxilo terminal de NaTrxh participan en su secreción mediante un péptido señal atípico y en la formación de complejos con la S-RNasa

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda

Dr. Felipe Cruz García

Facultad de Química, UNAM

Dra. Patricia Coello Coutiño
Facultad de Química, UNAM

Dra. Patricia León Mejía
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad de México. Octubre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

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

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

Dra. Patricia Coello Coutiño	Facultad de Química, UNAM
Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM
Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

Se reconoce el apoyo de la Maestra Teresa de Jesús Olivera Flores del departamento de Bioquímica de la Facultad de Química.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA-UNAM (IN205009, IN210312) y PAIP-UNAM (429015). Durante los estudios de doctorado gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

Se agradece al programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP) por el financiamiento otorgado para la asistencia a congresos de corte nacional e internacional.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día_____.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
Vocal	Dr. Luis Cárdenas Torres
Vocal	Dr. José Luis Reyes Taboada
Vocal	Dr. Roberto Coria Ortega
Secretario	Dr. Eleazar Martínez Barajas

Esta tesis la dedico

A mi padre...a mi madre

Quienes con su estar, su andar y su ausencia, me han mostrado un sin fin de posibilidades y tantos caminos....los amo

La utopía es como el horizonte, está allá lejos. Yo camino dos pasos, y el horizonte se aleja...Y yo camino diez pasos y ella se aleja diez pasos. ¿Para qué sirve?. Sirve para eso, **para caminar!!**

Mario Benedetti

Gracias a todos por caminar conmigo...

Índice

Introducción	4
Antecedentes	
<i>Sistemas de autoincompatibilidad (AI) gametofítica dependientes de S-RNasa</i>	6
<i>Modelos del rechazo del polen en sistemas de AI basados en S-RNasas</i>	7
<i>Modelo de la degradación de las S-RNasas</i>	7
<i>Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas</i>	8
<i>Factores estilares no ligados al locus S esenciales para el rechazo del polen</i>	8
HT-B	9
120K	10
NaStEP	10
<i>La Tiorredoxina h de <u>Nicotiana glauca</u> (NaTrxh)</i>	11
Tiorredoxinas	12
<i>Función de las tiorredoxinas en la célula</i>	12
<i>Reacción que catalizan las tiorredoxinas</i>	13
<i>Clasificación de las tiorredoxinas</i>	14
<i>Localización de las tiorredoxinas vegetales</i>	15
Planteamiento del problema	17
Hipótesis	18
Objetivos	19
Materiales y Métodos	20
Material biológico	20
Transformaciones estables de <u>N. tabacum</u>	20
Preparación y desinfección de explantes de <u>N. tabacum</u>	
Infección de explantes con las diferentes versiones de NaTrxh:GFP con <u>Agrobacterium tumefaciens</u>	
Evaluación de las plantas transformadas	21
Selección de las plantas (T1)	22
Ensayos de expresión transitoria (<u>Allium sp</u>)	22
Desinfección de cebollas	
Obtención de epidermis de cebolla	
Transformación por biobalística de epidermis de cebolla	
Evaluación de la ruta de secreción de NaTrxh por ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla	24
Evaluación del paso de NaTrxh por el Retículo Endoplásmico	
Evaluación del tránsito de NaTrxh a través del Aparato de Golgi	
Cuantificación de proteína total	26
Ensayo de actividad enzimática para tiorredoxinas	27

<i>Sobreexpresión de proteínas recombinantes de las diferentes versiones de NaTrxh</i>	27
<i>Purificación de proteínas recombinantes</i>	
<i>Elaboración de las diferentes construcciones de NaTrxh: secuencia de DNA</i>	30
<i>Elaboración de las construcciones para sobreexpresar en E. coli las diferentes versiones de NaTrxh</i>	32
<i>Elaboración de las construcciones para indentificar la región responsable de la secreción de NaTrxh</i>	33
<i>Elaboración de las construcciones para evaluar la ruta de secreción que sigue NaTrxh</i>	35
<i>Interacción proteína-proteína por cromatografía de afinidad</i>	36
<i>Obtención de la fracción microsomal de hojas de <u>N. tabacum</u></i>	36
<i>Obtención de las regiones desordenadas de NaTrxh</i>	38
<i>Estructura tridimensional de NaTrxh y dinámica molecular</i>	38
Resultados	39
<i>Secreción de NaTrxh</i>	40
<i>NaTrxh se secreta en raíces de <u>N. tabacum</u> y en células epiteliales de cebolla</i>	42
<i>Transformación transitoria de diferentes versiones de NaTrxh en células de cebolla</i>	47
<i>La proteína NaTrxh no posee la información clásica para secretarse por la vía ortodoxa</i>	48
<i>El dominio interno Nβ dirige la secreción de NaTrxh</i>	50
<i>La NaTrxh utiliza el sistema endomembranoso para su secreción</i>	52
<i>El motivo Nβ está presente en tiorredoxina de soya</i>	54
<i>Las extensiones de la NaTrxh son regiones de alta movilidad y pueden funcionar como dominios de interacción proteína-proteína</i>	55
<i>La extensión C-terminal de la NaTrxh es la región responsable de su interacción con la S-RNasa</i>	57
Discusión	60
Conclusiones	69
Perspectivas	70
Bibliografía	71
Artículo: A novel motif the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase in vitro	77

Abstract

Thioredoxins are ubiquitous, stable and small proteins (12-17kDa) involved in regulating the redox state of the cell. There are 8 types of plant thioredoxins (f, m, x, y, z, h, o and s), which are localized in different cellular compartments. Thioredoxins *h* are the largest group. They are largely localized in the cytoplasm. According to their primary structure, they are divided in three subgroups I, II and III.

Thioredoxin *h* of *Nicotiana glauca* (NaTrxh) belongs to the subgroup II, where thioredoxins possess extensions towards their N- and C-terminal regions. So far, there is no clarity at all about the functionality of these extensions. However, a few reports describe the function of the N-terminal region. For example, in *Oriza sativa* thioredoxin *h* (OsTrxh1), *Populus tremula* (PtTrxh2) and *Arabidopsis thaliana* (AtTrxh9), this extension is directly associated with their subcellular localization.

Despite of NaTrxh does not possess a typical secretion signal, it is localized in the style extracellular matrix of *N. glauca*. This thioredoxin is reduced and interacts specifically with the S-RNase, the female determinant in the gametophytic self-incompatibility system (GSI) of *N. glauca*. To understand the implication of both extensions in secretion and protein-protein interaction, we generated different versions of NaTrxh by deleting both the N-terminal and the C-terminal extensions.

The function of NaTrxh extensions in secretion was evaluated by using constructs NaTrxh-GFP constructs and transiently expressing them in onion epidermal cells. Results indicated that the motif responsible for NaTrxh secretion is localized at the N-terminal and is defined by the amino acids A17EAESGSSSEP27. Likewise, we provide evidence that NaTrxh reaches the apoplast using the endoplasmic reticulum (ER) and the Golgi apparatus, which are elements of the orthodox secretion pathway.

On the other hand, we demonstrated that the NaTrxh C-terminal extension is essential for interaction with S-RNase.

Our results revealed that NaTrxh extensions are important to confer specificity to its final destination (subcellular localization) or to lead to direct association with their target proteins. This is the first work in which the presence of a signal peptide is identified with atypical features because the secretion signal is present in the inner region of the polypeptide chain with a low hydrophobicity, contrary to a classical signal peptide, thus evoking new protein secretion pathways in plants.

Resumen

Las tiorredoxinas son proteínas ubicuas, estables y pequeñas (12-17kDa) que participan principalmente regulando el estado redox de la célula. En plantas se conocen 8 tipos de tiorredoxinas (*f*, *m*, *x*, *y*, *z*, *h*, *o* y *s*) que se ubican en diferentes compartimentos celulares. Las tiorredoxinas *h* forman el grupo más grande; predominantemente se localizan en el citoplasma. De acuerdo a su estructura primaria se subdividen en tres subgrupos I, II y III. La tiorredoxina *h* de *Nicotiana glauca* (NaTrxh) está en el subgrupo II, cuyas tiorredoxinas poseen extensiones hacia la región N- y C-terminales. Hasta el momento, no hay claridad sobre la funcionalidad de estas extensiones, los pocos reportes que existen se enfocan en el estudio de la región N-terminal, la cual se asocia directamente con la localización subcelular de las tiorredoxinas *h* de arroz (OsTrxh1), de *Populus tremula* (PtTrxh2) y de *Arabidopsis thaliana* (AtTrxhg).

NaTrxh, a pesar de no contar con las señales de secreción típicas, se localiza en la matriz extracelular del estilo de *N. glauca*. Esta tiorredoxina interacciona y reduce específicamente a la S-RNasa que participa directamente en el sistema de autoincompatibilidad gametofítico (SAG) de *N. glauca*. Con el objetivo de conocer la implicación de las extensiones en la localización de la proteína e identificar si participan como dominios de interacción con la S-RNasa de *N. glauca*, se diseñaron distintas versiones de la NaTrxh, en donde se eliminaron diferentes regiones tanto de la extensión N-terminal como de la C-terminal.

La función de las extensiones en la localización de la NaTrxh fue evaluada fusionándola a la proteína GFP y expresándola transitoriamente en células de epidermis de cebolla. Los resultados indicaron que la región responsable de la secreción de la NaTrxh se encuentra en la extensión N-terminal, particularmente el motivo $\Delta\beta$ descrito por la secuencia

A₁₇EAESGSSSEP₂₇. Asimismo, se encontró que la NaTrxh utiliza el sistema endomembranoso para alcanzar la superficie celular utilizando elementos de la vía típica de secreción, tales como el retículo endoplásmico (RE) y el aparato de Golgi.

En contra parte, se identificó que la extensión C-terminal de la NaTrxh es determinante en la interacción con la glicoproteína estilar S-RNasa.

El trabajo deja ver que las extensiones de las tiorredoxina *h* son importantes para conferir especificidad a la NaTrxh, ya sea para situarla en su destino final (localización subcelular) o para ejercer su asociación directa con sus proteínas blancas. Este es el primer trabajo en el que se identifica la presencia de un péptido señal con características atípicas: la señal de secreción se encuentra presente en la región interna de la cadena polipeptídica (motivo Nβ) y posee características poco hidrofóbicas; con ello se abre un campo que explorar sobre las señales que dirigen el transporte proteico en plantas.

Introducción

Las tiorredoxinas son proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se encuentran presentes desde procariontes hasta eucariontes y pertenecen a la superfamilia de enzimas tiol-disulfuro oxido-reductasas (Wollman *et al.*, 1988). Los miembros de esta familia oxidan, reducen e isomerizan los puentes disulfuro presentes en sus proteínas blanco. La reacción es catalizada a través de su sitio activo conformado por la secuencia WCXXC (Laloi *et al.*, 2001). En general, las tiorredoxinas participan en la regulación del estado redox celular. En plantas han sido relacionadas con procesos de reproducción y en la respuesta del rechazo del polen (Cabrillac *et al.*, 2001; Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Traverso *et al.*, 2013) en la germinación, crecimiento celular y desarrollo (Montrichard *et al.*, 2009), entre otras funciones (Viera y Rey, 2006; Park *et al.*, 2009).

El sistema de las tiorredoxinas de plantas es complejo. En *Arabidopsis thaliana* por ejemplo, se predicen al menos 20 genes que codifican tiorredoxinas en comparación con los dos encontrados en levaduras y uno en mamíferos (Meyer *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, 2004; Gelhaye *et al.*, 2004a). Las tiorredoxinas de plantas se han dividido en 8 tipos: *f*, *m*, *x*, *y* y *z* se localizan en cloroplastos; las del tipo *o* en mitocondria y las *s* se asocian a retículo endoplasmático (RE) (Buchanan, 1991; Mestres-Ortega y Meyer, 1999; Laloi *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2003; Alkhalifioui *et al.*, 2008; Arsova *et al.*, 2010;). Por su parte, la mayoría de las tiorredoxinas del tipo *h* se localizan en el citoplasma celular, aunque recientemente se han localizado en mitocondria, asociadas a membrana plasmática e incluso secretadas al apoplasto (Ishiwatari *et al.*, 1995; Gelhaye *et al.*, 2004a; Gelhaye *et al.*, 2004b; Juárez-Díaz *et al.*, 2006; Alkhalifioui *et al.*, 2008).

La estructura primaria de las tiorredoxinas *h* fue tomada como criterio por Gelhaye *et al.*, (2004) para clasificarlas en tres subgrupos (I, II y III). Particularmente, las tiorredoxinas del subgrupo II cuentan con una región adicional hacia su extremo amino, pero su función no ha sido determinada; sin embargo, en *Oriza sativa* (OsTrxh) y en *Populus tremula* (PtTrxh2) su eliminación afecta su localización subcelular (Ishiwatari *et al.*, 1995; Gelhaye *et al.*, 2002).

En nuestro grupo aislamos una tiorredoxina que llamamos NaTrxh, la cual se expresa preferencialmente en estilos de especies autoincompatibles de *Nicotiana* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Asimismo, encontramos que NaTrxh interactúa físicamente con la S-RNasa, la cual es la determinante femenina de especificidad en la respuesta del rechazo del polen en las solanáceas. La interacción entre NaTrxh y la S-RNasa es independiente del estado redox de NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Juárez-Díaz *et al.* (2006) dio evidencias de que la NaTrxh pertenece al subgrupo II y posee la extensión típica hacia el extremo N-terminal de las tiorredoxinas de este grupo. Experimentos de expresión transitoria en hojas de *Nicotiana benthamiana* indican que la región N-terminal de NaTrxh está involucrada en la localización extracelular de esta proteína, ya que cuando la extensión es eliminada, NaTrxh permanece dentro de la célula (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). La mayoría de las proteínas que son secretadas utilizan la vía de secreción clásica: retículo endoplasmático y aparato de Golgi (RE/Golgi). Las proteínas que son secretadas por esta vía, requieren la presencia de un péptido señal hidrofóbico en el N-terminal, el cual es removido en el RE. Notablemente, la extensión N-terminal de NaTrxh no posee un péptido hidrofóbico, ya que el algoritmo de Hidden Markov (Bendtsen *et al.*, 2004a) predice el corte entre Ala₁₆-Ala₁₇, pero con una baja probabilidad (56%), lo que no da certeza de la presencia de un péptido señal ortodoxo. Por otro lado, el programa *Secretome 1.0 predictor* (Bendtsen *et al.*, 2004b) indica con un 95% de confiabilidad que la NaTrxh es una proteína que se secreta en ausencia de un péptido señal hidrofóbico (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). Además, NaTrxh presenta una extensión hacia el extremo carboxilo, que parece no estar involucrada en la secreción, ya que experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* donde la proteína GFP está fusionada a la región carboxilo terminal de NaTrxh, demuestran que aún bajo esta condición, NaTrxh se sigue secretando al apoplasto (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

A pesar de los hallazgos anteriores, aún no se ha determinado la secuencia en las extensiones hacia los extremos amino y carboxilo de NaTrxh que promueven su secreción y su interacción con la S-RNasa. Finalmente, no estaba claro si en la ruta al apoplasto NaTrxh utiliza la vía RE-aparato de Golgi. Estas incógnitas fueron abordadas en la presente investigación.

Antecedentes

Para evitar la endogamia, un gran número de especies poseen un mecanismo genético-bioquímico de reconocimiento y rechazo del polen, conocido como sistema de autoincompatibilidad (AI) (de Nettancourt, 1977; 2001). En varias familias, la AI está controlada genéticamente por un solo locus multialélico conocido como locus *S* (*Sterility*), el cual incluye dos genes fuertemente ligados. Uno de ellos codifica la determinante masculina (*SLF*, *S-Locus-F-box protein*) y tiene expresión específica en el polen y el otro gen codifica a la femenina (*S-RNasa*, *Ribonucleasa S*) con expresión exclusiva en el pistilo. El rechazo del polen ocurre si hay coincidencia alélica entre el haplotipo *S* del polen con alguno de los haplotipos *S* de un pistilo heterocigoto. Los sistemas de AI están ampliamente distribuidos en las angiospermas. A la fecha se sabe que están presentes en 91 de 271 familias, aunque a medida que se siga profundizando en su estudio esta cifra con seguridad crecerá. El número de alelos *S* presentes en una población puede ser grande y variar de especie a especie. Por ejemplo, en algunas especies de *Brassica* existen más de 60 alelos, en *Papaver* 80, y de 150 a 250 en *Trifolium* (Dickinson et al., 1992).

Sistemas gametofíticos de autoincompatibilidad dependientes de *S-RNasa*

El sistema de AI gametofítico es de los más representados en las angiospermas y se ha estudiado fundamentalmente en las familias Solanaceae (*Nicotiana*, *Solanum*, *Petunia*), Plantaginaceae (*Antirrhinum*) y Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus* y *Malus*) (de Nettancourt, 2001; Yamame y Tao, 2009). En estas familias, el producto génico de la determinante femenina es una proteína con actividad de ribonucleasa conocida como *S-RNasa* (McClure et al., 1989; Kao y McCubbin, 1996). Las *S-RNasas* se localizan en la matriz extracelular (ME) del tejido de transmisión (TT) del estigma, del estilo y del ovario (Anderson et al. 1986; Cornish et al., 1988; McClure et al., 1989; Sassa et al., 1996; Xue et al., 1996).

Se propone que las *S-RNasas* actúan como agentes citotóxicos *S*-específicos (McClure et al., 1989). Estas ribonucleasas se incorporan a los tubos polínicos (TPs) durante su crecimiento por la ME del TT del estilo, independientemente de si éstos provienen de una cruce compatible o incompatible. Una vez en el TP, las *S-RNasas* son almacenadas en

vacuolas y liberadas al citoplasma si la cruce es incompatible, ejerciendo su efecto citotóxico e inhibiendo el crecimiento del TP (Goldraij *et al.*, 2006).

Al producto del alelo S del polen se le conoce en solanáceas como *SLF* (**S**-locus **F**-box gene). Este gen tiene homología con la familia de proteínas que contienen una caja F hacia su extremo amino. La expresión de *SLF* es haplotipo S específica y se restringe al polen (Sijacic *et al.*, 2004). Debido a que los miembros de la familia de proteínas con caja F se asocian con la vía de degradación de proteínas por el proteosoma 26S (Sullivan *et al.*, 2003), se propone que *SLF* podría funcionar como una enzima ligasa tipo E3 durante el proceso de rechazo del polen (Sijacic *et al.*, 2004).

Modelos para el rechazo del polen en sistemas de AI basados en S-RNasa

Existen dos modelos que tratan de explicar cómo las S-RNasas pueden inhibir el crecimiento del TP en cruces incompatibles. Uno de ellos involucra la degradación de las ribonucleasas S a través de *SLF* (Hua *et al.*, 2008 a, b) y el segundo su compartimentalización en vacuolas del TP (Goldraij *et al.*, 2006; McClure, 2006).

Modelo de la degradación de las S-RNasas.

Este modelo (Hua y Kao, 2008) se basa en el potencial que tiene *SLF* de participar en la vía de degradación de proteínas vía el proteosoma 26S. En este modelo se supone que un estilo S_1S_2 es polinizado con polen S_1 . En este caso, tanto la S_1 - como la S_2 -RNasas producidas por el estilo son transportadas al interior del TP S_1 , cuya determinante masculina SLF_1 mediará específicamente la ubiquitinación y la degradación de la S_2 -RNasa por el proteosoma 26S, pero no la de la S_1 -RNasa, permitiendo que esta ribonucleasa degrade el RNA e inhiba el crecimiento del TP S_1 . En este modelo, se sugiere que la interacción haplotipo S específica entre *SLF* y la S-RNasa es más fuerte que la interacción *SLF* y la S-RNasa no específica. Lo anterior se cumple muy bien en una cruce compatible. Por ejemplo, si la polinización ocurre entre el polen S_3 y un estilo S_1S_2 , se formarán en el interior del TP complejos estables S_1 -RNasa- SLF_3 y S_2 -RNasa- SLF_3 , lo que provocará la degradación de ambas S-RNasas y la síntesis de las proteínas del TP no se verá afectada, permitiéndole alcanzar el ovario.

Modelo de la compartimentalización de las S-RNasas.

Este modelo fue propuesto por Goldraij *et al.* (2006). Los autores sugieren que las S-RNasas ingresan a los TP no importando su haplotipo S y se almacenan en una vacuola. Este modelo además de la S-RNasa y SLF, incluye a los factores estilares 120K, HT-B y NaStEP (se describen más adelante), como componentes de un sistema selectivo del rechazo del polen secretado a la matriz extracelular del estilo (Figura 1).

Bajo esta situación, en una cruce compatible en donde un TP S_3 crece en un pistilo heterocigoto S_1S_2 , el TP evita el rechazo debido a que tanto las S_1 -RNasa como la S_2 -RNasa permanecerán secuestradas dentro de vacuolas, como consecuencia de la degradación de la proteína HT-B en el TP (Figura 1).

Por otro lado, en el caso de un polen S_1 o S_2 , cuyos TPs se desarrollan en un estilo S_1S_2 , las vacuolas del TP que contienen a las S-RNasas se romperán como respuesta a la interacción haplotipo S-específica entre SLF y la S-RNasa. La proteína HT-B que hasta este momento podría ser protegida de su degradación por NaStEP en el TP, se estabilizará y la vacuola será degradada liberando a las ribonucleasas al citoplasma del TP, en donde ejercerán su efecto citotóxico inhibiendo su crecimiento (Figura 1).

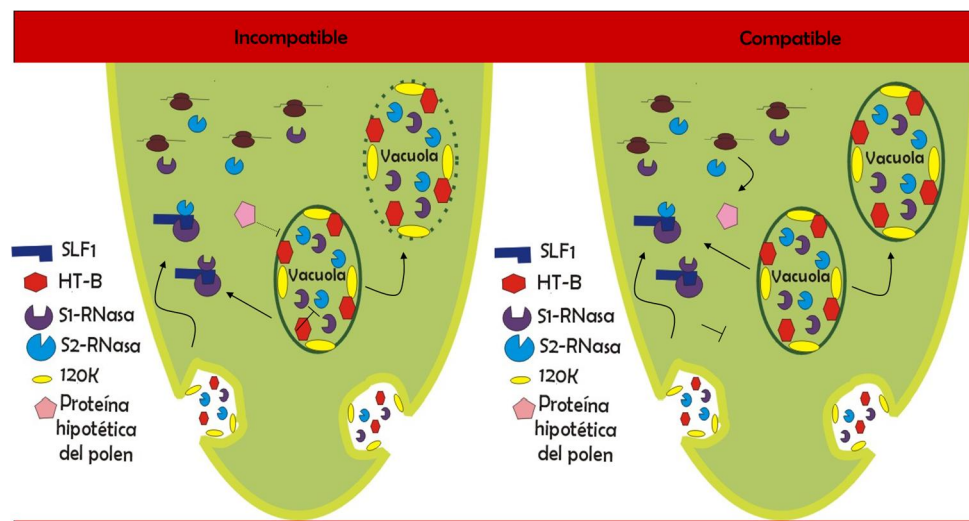


Figura 1. Modelo de compartimentalización. Izquierda cruce incompatible: Las S-RNasas junto con los factores estilares se integran al TP y se compartimentalizan en una vacuola, la interacción S-específica desencadena de alguna manera la inestabilidad de HT-B y la ruptura de la vacuola que culmina en la degradación del RNA y la inhibición del crecimiento del TP. Derecha cruce compatible: Las S-RNasas y los factores estilares también se integran al TP y permanecen en una vacuola, no existe interacción S-específica, los factores estilares junto con las S-RNasas se mantienen aisladas y con ello su efecto citotóxico, el TP puede llegar a la base del ovario.

Factores estilares no ligados al locus S, esenciales para el rechazo del polen

A pesar de que las S-RNasas y SLF determinan la especificidad de la AI, un cúmulo importante de evidencias genéticas indican que los productos de genes modificadores (GM), no ligados al locus S, son también esenciales en la vía bioquímica del rechazo del polen (Ai et al., 1991; Murfett et al., 1996; Tsukamoto et al., 1999; McClure et al., 2000).

A la fecha, solo se han identificado y clonado dos GMs estilares (*HT-B* y *120K*; McClure et al., 1999; Hancock et al., 2005) y uno estigmático (*NaStEP*; Jiménez-Durán et al., 2013). Sin embargo, no son todos los GMs estilares que son necesarios para el rechazo del polen, ya que contamos con una población de *N. alata* (11613) que segrega con plantas AI y autocompatibles (AC), y estas últimas no tienen algún defecto en los genes *HT-B*, *120K*, *NaStEP* y *S-RNasa*. A este factor se le llamó 4936, se sabe que actúa en el TP una vez que han ingresado las S-RNasas (Goldraij et al., 2006). La segregación del factor 4936 indica que está compuesto por dos genes, lamentablemente a la fecha no se han clonado.

HT-B (High Top Band).

HT-B codifica una proteína de 8.6 kD, con un dominio conformado por 20 residuos de asparagina y ácido aspártico (dominio ND) hacia el extremo carboxilo. En *N. alata*, el dominio ND está flanqueado por dos motivos ricos de cisteínas, CAACKC y CQTVCC (Kondo y McClure, 2008). *HT-B* se expresa sólo en estilos maduros de plantas AI (McClure et al., 1999). El gen *HT-B* está presente en tres géneros de la familia Solanaceae: *Nicotiana*, *Petunia* y *Solanum* (McClure et al., 1999; Kondo et al., 2002a, b; Sassa y Hirano, 2006). Su papel en la AI se confirmó mediante experimentos de pérdida de función en plantas transgénicas, en las cuales al ser suprimida *HT-B* perdieron la capacidad de rechazar su propio polen (McClure et al., 1999; Hancock et al., 2005; Puerta et al., 2009). Notablemente, en ausencia de *HT-B* en plantas transgénicas, las vacuolas de los TPs que contienen a las S-RNasas se mantienen intactas conteniendo su actividad citotóxica y permitiendo el crecimiento de los TPs al ovario (Goldraij et al., 2006). Estos datos son consistentes con el modelo de AI donde se requiere de la compartimentalización de la S-RNasa.

120K.

Este gen codifica una proteína de 120 kD, la cual es una arabinogalactoproteína con un motivo de extensina. Se localiza en las células del tejido de transmisión (TT) del estilo y es secretada a la ME de este tejido tanto en especies de *Nicotiana* AC como en AI. El silenciamiento de 120K por RNA interferente (RNAi) en híbridos de *N. plumbaginifolia* X *N. alata*, abate la capacidad de reconocimiento del polen con el mismo haplotipo S que el pistilo en *N. alata* (Hancock *et al.*, 2005). En esta especie, 120K forma complejos con las S-RNasas (Cruz-García *et al.*, 2001, 2005) e ingresa a los TPs independientemente de su haplotipo S (Lind *et al.*, 1996; Goldraij *et al.*, 2006). En cruzas compatibles y en etapas tempranas de la polinización de cruzas incompatibles, la proteína 120K delimita el interior de las vacuolas del TP en donde se encuentran contenidas las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006), siendo estos datos congruentes con el modelo de compartimentalización de las S-RNasas (Goldraij *et al.*, 2006).

***NaStEP* (*N. alata* Stigma Expressed Protein).**

Este gen codifica una proteína de 24.4 kD con actividad de inhibidor de proteasa (Jiménez-Durán *et al.*, 2013) y con homología a los inhibidores de proteasas de tipo Kunitz. Algunos miembros de esta familia además de presentar actividad de inhibidor bloquean canales dependientes de voltaje (Gilquin *et al.*, 1999; Yuan *et al.*, 2008). *NaStEP* se expresa únicamente en los estigmas maduros de las especies AI de *Nicotiana*. La proteína *NaStEP* se almacena en las vacuolas de las células estigmáticas, pero la polinización estimula su liberación al espacio extracelular (Busot *et al.*, 2008). Una vez ahí, *NaStEP* ingresa a los TPs en donde una fracción se asocia a sus vacuolas y en otra se observa en su citoplasma (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Los estudios de pérdida de función en híbridos transgénicos de *Nicotiana* con *NaStEP* suprimida, indican que en su ausencia se pierde la capacidad de rechazar el polen de manera haplotipo S-específica, demostrando que *NaStEP* es un gen esencial para la AI en *Nicotiana*. Notablemente, en ausencia de *NaStEP*, la proteína HT-B se degrada en TP incompatibles, una situación que no ocurre en plantas tipo silvestre AI de *N. alata* (Jiménez-Durán *et al.*, 2013), sugiriendo que *NaStEP* es un regulador positivo de la estabilidad de HT-B en los TPs.

La Tiorredoxina h de Nicotiana alata (NaTrxh)

El cDNA de la NaTrxh fue identificado a partir de un estudio de expresión diferencial entre estilos de la especie autocompatible (AC) *N. plumbaginifolia* y de la autoincompatible (AI) *N. alata* (Juárez-Díaz et al., 2006; McClure et al., 2013). NaTrxh tiene el sitio catalítico conformado por el motivo WCGPC, típico de las tiorredoxinas. La proteína NaTrxh es abundante en tejidos florales: pétalos, ovarios y estilos, con menor expresión en anteras, sépalos y en hojas (Juárez-Díaz et al., 2006).

La proteína NaTrxh interactúa directamente con la S-RNasa *in vitro*; asimismo, el análisis de reducción de sulfidrilos por 2D-SDS-PAGE señaló que NaTrxh también reduce específicamente a la S-RNasa (Juárez-Díaz et al., 2006). Dado que la S-RNasa juega un papel determinante en el sistema de reconocimiento del polen propio en *N. alata*, su interacción con la NaTrxh podría ser crucial a través de la modulación de su actividad de ribonucleasa.

Estudios de fraccionamiento bioquímico, de expresión transitoria en *N. benthamiana* y *A. thaliana* y de inmunolocalización en estilos de *N. alata*, indican que NaTrxh se localiza en el exterior de la célula (Juárez-Díaz et al., 2006). El análisis de la secuencia de aminoácidos señala que NaTrxh no posee una señal de secreción canónica (vía RE/Golgi). Algoritmos tales como el de Hidden Markov predicen que la probabilidad de poseer una señal de secreción es del 56%, mientras que el Secretome 1.0 Predictor indica que es una proteína que se secreta por una vía no clásica con un 95% de probabilidad. Experimentos de expresión transitoria demostraron que NaTrxh contiene la información suficiente para su secreción, dado que cuando la proteína reportera GFP se fusiona al extremo carboxilo de la NaTrxh, la proteína NaTrxh:GFP se acumula en la pared celular tanto en hojas de *N. benthamiana* como de *A. thaliana*, (Juárez-Díaz et al., 2006).

La capacidad de la NaTrxh para secretarse, así como de interactuar y reducir específicamente a la S-RNasa sugiere una función en la respuesta de rechazo del polen en *N. alata*, por ello es importante conocer la función de la tiorredoxina profundizando en su caracterización.

Tiorredoxinas

Las cisteínas son aminoácidos con alto poder reductor, alrededor del 1.9% de los aminoácidos de las proteínas son cisteínas (Lehninger, 2012). En un ambiente extracelular, estos residuos tienen la capacidad de unirse entre sí por puentes disulfuro. Sin embargo, en el interior de la célula los grupos tiol de la mayoría de las cisteínas se mantienen en un estado reducido (-SH) para evitar la asociación o el mal plegamiento de las proteínas que contienen este aminoácido. La célula ofrece una serie de alternativas para evitar esta asociación, una de las más utilizadas involucra la participación de proteínas capaces de reducir puentes disulfuro, como las tiorredoxinas.

Función de las tiorredoxinas en la célula

Algunos procesos vitales de la célula, tales como la proliferación, diferenciación y apoptosis, son regulados por sistemas redox. Se ha prestado particular atención a las proteínas que regulan interacciones tiol-disulfuro como las tiorredoxinas (Trx) y las glutaredoxinas (Grx). Estas proteínas son importantes en el mantenimiento del equilibrio redox de la célula.

Las tiorredoxinas cuentan con una larga historia evolutiva, están presentes en organismos con diferente grado de complejidad que van desde archeas hasta eucariontes superiores. Participan en diferentes procesos celulares: se utilizan como reductasas y permiten regular el estado redox de la célula cuando ésta se encuentra bajo estrés ambiental (Gilbert, 1990), funcionan como proteínas protectoras para evitar la aglutinación e inactivación de otras proteínas (Holmgren, 1985); además, estas proteínas regulan la muerte celular programada (Ravi *et al.*, 2005). Algunas tiorredoxinas también actúan como factores de crecimiento, modulan la respuesta inflamatoria y promueven el plegamiento de proteínas (Nakamura *et al.*, 2005). Las tiorredoxinas de plantas son particularmente importantes, participan en procesos como la fotorespiración, metabolismo de lípidos, transporte membranal, metabolismo hormonal y síntesis de ATP (Balmer *et al.*, 2004). También son fundamentales en el crecimiento de plántulas y en la germinación de semillas de cereales (Balmer *et al.*, 2004).

Las tiorredoxinas son proteínas pequeñas (12-17 kDa) y pertenecen a la superfamilia de proteínas oxidoreductasas, particularmente en las tiorredoxinas (Wollman *et al.*, 1988). La secuencia de aminoácidos fue revelada en 1968, cuando se identificó que la secuencia típica del sitio activo de estas proteínas es WCxxC. La reacción que catalizan es una sustitución nucleofílica bimolecular. En términos sencillos se puede ver cómo es la transferencia del enlace disulfuro de la proteína blanco a la tiorredoxina (Figura 2) (Collet y Messens, 2010).

Reacción que catalizan las tiorredoxinas

Las tiorredoxinas se mantienen inactivas cuando el grupo sulfhidrilo de su sitio catalítico se encuentra en estado oxidado, una vez que se reduce, se favorece termodinámicamente la reacción y son capaces de reducir los puentes disulfuro de sus proteínas blanco (Collet y Messens, 2010). La reacción comienza con un ataque nucleofílico del tiorredoxina reducido hacia el N-terminal del motivo WCGPC sobre el disulfuro de la proteína blanco. Bajo condiciones fisiológicas, una fracción considerable del sulfuro de la cisteína ubicada hacia el N-terminal está presente como tiorredoxina, lo que potencializa a este residuo para actuar como nucleófilo y atacar disulfuros de las proteínas blanco.

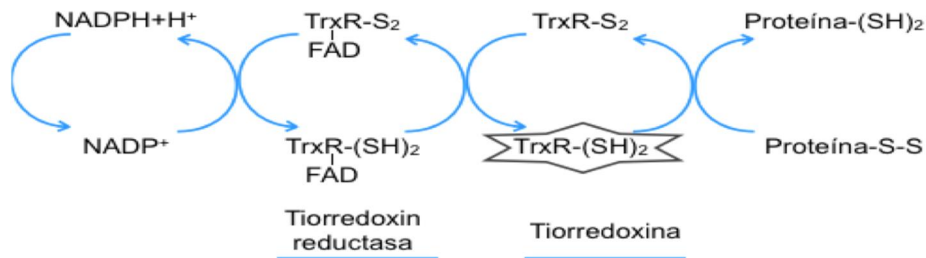


Figura 2. Sistema de NADPH/TrxReductasa/Tiorredoxina para reducir puentes disulfuro de proteínas blanco. Ciclo de reacciones de óxido-reducción para activar a la tiorredoxina (Trx-(SH)₂), la cual es capaz de reducir los puentes disulfuro de sus proteínas blanco. Modificado de Collet y Messens (2010).

Clasificación de las tiorredoxinas

Las tiorredoxinas como los organismos en general, han sufrido la presión de selección a lo largo del tiempo. En eucariontes, las tiorredoxinas se han seleccionado a la par de las NADPH-tiorredoxin reductasas y juntas forman el sistema Trx/NADPH-TrxR. En cloroplasto, se presenta un segundo sistema Trx/FADH-TrxR (Dai *et al.*, 2004). En mamíferos solo se han identificado dos genes y tres en levaduras que codifican para tiorredoxinas (Holmgren, 1989). Las plantas poseen el número más alto de tiorredoxinas presente en organismos. Al menos 20 genes se han reportado en el genoma de *Arabidopsis* (Meyer *et al.*, 2002; Marchand *et al.*, Gelhaye *et al.*, 2004).

A pesar de que las tiorredoxinas de plantas conservan la estructura terciaria compuesta por un “core” central (conformado por 5 hojas beta, tres paralelas y dos antiparalelas, rodeadas por 4 alfa hélices) característico de las tiorredoxinas, presentan ciertas peculiaridades que le proporciona la diversidad y especificidad de su función. Por ejemplo, la Trx de *Populus*, PtTrxh4, tiene una cisteína adicional (Cys4) que le permite ser reducida por las glutaredoxinas (Grx) resultando en un mecanismo catalítico atípico (Gelhaye *et al.*, 2003).

Basándose en la estructura primaria de las tiorredoxinas de plantas, estas se pueden dividir en 8 tipos de trxs (*f*, *m*, *x*, *h*, *y*, *z*, *o* y *s*) (Alkhalfioui *et al.*, 2008). Adicionalmente su distribución celular es diferencial, las trxs *f*, *m*, *x*, *s*, *y* y *z* se localizan en cloroplastos, las *o* en mitocondria y las tiorredoxinas *h*, mayoritariamente en el citoplasma.

Las tiorredoxinas *h* se subdividen en tres grupos (Gelhaye *et al.*, 2004). Las tiorredoxinas del subgrupo I son reducidas por la NADPH-tiorredoxin reductasa. El sitio catalítico de algunas de ellas se caracteriza por la secuencia WCPPC y todas conservan un triptófano, localizado 22 aminoácidos antes de la secuencia canónica en el sitio catalítico. El subgrupo III presenta la extensión en la región N-terminal que conserva una glicina en la posición 2 (Gly2) y una cisteína en la posición 4 (Cys4), todas presentan la secuencia clásica

WCGPC como sitio catalítico. Las tioredoxinas del subgrupo II presentan la secuencia WCGPC como sitio catalítico y cuentan también con una extensión hacia el N-terminal. La información hasta el momento sugiere que la extensión N-terminal de las tioredoxinas pueden funcionar como un dominio de unión a la membrana del tipo de una miristoilación (Shi y Bhattacharyya, 1996) o de señal de tránsito como se muestra en PtTrxh2 de *P. tremula*, en la que donde la remoción de la región N-terminal genera que la proteína ya no se localice en la mitocondria (Gelhay et al., 2002).

Localización de tioredoxinas vegetales

Las tioredoxinas de plantas están involucradas en numerosos procesos celulares. Estudios bioquímicos en trigo indican que regulan la germinación, el crecimiento celular y su desarrollo (Montrichard et al., 2009). Se sabe que son componentes en la comunicación intercelular, como es el caso de la tioredoxina de *O. sativa* (OsTrxh1) (Ishiwatari et al., 1995; 1998) y AtTrxh9 de *A. thaliana* (Meng et al., 2009). También se les ha asociado como factores que participan en la reproducción en *Brassica* (Cabrillac et al., 2001) y de *N. alata* (Juárez-Díaz et al., 2006), particularmente en la respuesta de rechazo del polen.

Las Trx se localizan en diferentes compartimentos celulares. La mayoría de las Trxs se encuentran presentes en el citosol (Arner y Holmgren, 2000). Sin embargo, algunas son translocadas al núcleo o a la mitocondria y otras se asocian a la membrana celular o al espacio extracelular (Martin y Dean, 1991; Xu et al., 1998; Hirota et al., 1999 y Juárez-Díaz et al., 2006). Las tioredoxinas de plantas son versátiles y específicas, lo que conlleva a que su localización se relacione directamente con sus blancos. Existen diferentes tipos de tioredoxinas de plantas. Las *f*, *m*, *x*, *y* y *z* se localizan en los cloroplastos, las *s* en retículo endoplásmico, las *o* en mitocondria y las tioredoxinas *h*, mayoritariamente en el citoplasma (Alkhalfioui et al., 2008). Análisis recientes revelaron que no todas las tioredoxinas *h* son citoplasmáticas. Las tioredoxinas *h* del subgrupo II poseen una extensión hacia la región N-terminal, la función bioquímica de esta extensión queda indefinida. Sin embargo, su presencia se asocia directamente con su localización celular. Por ejemplo, la tioredoxina *h* de *P. tremula*, PtTrxh2, requiere de su extensión en el extremo N-terminal para ubicarse en mitocondria. En este mismo sentido, la tioredoxina de *O. sativa*, RPR13-1, puede transportarse de célula a célula vía plasmodesmos sólo cuando está presente su extensión N-terminal (Ishiwatari et al., 1995 1998). La tioredoxina de *A. thaliana* (AtTrxh9) se asocia a la

membrana plasmática gracias a la capacidad de miristoilarse en la Gly2 presente en la extensión N-terminal (Meng *et al.*, 2009). La NaTrxh es una tiorredoxina *h* del subgrupo II de *N. alata*, esta proteína tiene extensiones en las regiones N- y C-terminal, pero su función no se ha determinado.

Planteamiento del Problema

La proteína NaTrxh tiene actividad de tiorredoxina. La NaTrxh se clasifica en el subgrupo II de las tiorredoxinas *h*, cuya característica general es que poseen una extensión en su extremo amino (Gelhay et al., 2004). Particularmente, la NaTrxh tiene adicionalmente otra extensión hacia su C-terminal. Los trabajos realizados para determinar la funcionalidad de estas extensiones en las tiorredoxinas *h*, han revelado su posible participación en su localización, aunque hasta el momento sigue siendo una incógnita su función.

El trabajo de Juárez-Díaz et al. (2006) estableció que la NaTrxh se secretaba al apoplasto estilar de *N. alata*. Sin embargo, el análisis de la estructura primaria no muestra la presencia de un péptido señal ortodoxo que indique que esta proteína sea secretada por retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. El algoritmo de Hidden Markov, que evalúa el procesamiento de los péptidos señales, señala con un 56% de confiabilidad que la extensión N-terminal de la NaTrxh se procesa entre los aminoácidos Ala₁₆ y Ala₁₇. Asimismo, el programa Secretome 1.0 Predictor indica que la proteína NaTrxh se secreta por una vía diferente a la del RE/Golgi. En mamíferos y en levaduras se sabe que existen muchas proteínas que son secretadas por vías no ortodoxas, es decir, diferentes a la del RE/Golgi (Nickel y Rabouille, 2009). Actualmente, no se han descrito proteínas de plantas que sean secretadas sin contener en su secuencia un péptido señal. Los datos anteriores sugieren que la NaTrxh sigue una ruta de secreción diferente a la canónica (RE/Golgi).

La NaTrxh se expresa preferencialmente en entornos genéticos de incompatibilidad, a pesar de que se desconoce la función de la NaTrxh en el mecanismo bioquímico de la incompatibilidad en *N. alata*, se sabe que la NaTrxh interacciona específicamente con la S-RNasa (Juárez-Díaz et al., 2006), sugiriendo que la participación de la NaTrxh podría ser esencial en este mecanismo genético de reconocimiento.

La intención de este trabajo fue establecer una relación directa entre la funcionalidad de las extensiones de la NaTrxh sobre su secreción, así como identificar el dominio de interacción con la S-RNasa.

Hipótesis

La NaTrxh es una tiorredoxina h con extremos amino y carboxilo con un papel diferencial, estas regiones están directamente relacionadas con su secreción y con su interacción con la S-RNasa.

Objetivos

Objetivo General

Explorar la función de las extensiones amino y carboxilo de la NaTrxh en su localización en el apoplasto y en la interacción con sus proteínas blanco.

Objetivos Particulares

- ❖ Evaluar la secreción de la NaTrxh en un sistema heterólogo.
- ❖ Identificar la región responsable de la secreción de la NaTrxh.
- ❖ Definir si el transporte de la NaTrxh hacia el apoplasto es a través del sistema endomembranoso de la célula.
- ❖ Identificar el dominio de interacción de la NaTrxh con la S-RNasa.

Materiales y Métodos

❖ Material biológico

Vegetal

Este trabajo se realizó en plantas de *Nicotiana alata*, *N. tabacum* y en células de epidermis de *Allium cepa* (cebolla).

Las plantas de *N. alata* y *N. tabacum* se mantuvieron en un invernadero en condiciones de 30°C y con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. Las cebollas se adquirieron en una tienda de autoservicio; el criterio para seleccionarlas fue el siguiente: cebollas de tamaño mediano (10-15 cm de diámetro), de color blanco brillante (evitar la presencia de hongos en su última capa) y sin signos de deshidratación.

Bacteriano

Las transformaciones estables de *N. tabacum* se realizaron por medio de la cepa pGV2260 de *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa fue previamente transformada con las diferentes versiones de NaTrxh:GFP (ver obtención de las clonas).

La sobreexpresión de las proteínas GST-NaTrxh se realizó en la cepa de *Escherichia coli* BL21 pLys (DE3).

❖ Transformaciones estables de *N. tabacum*

Las transformaciones estables se realizaron en explantes de *N. tabacum* infectadas con *A. tumefaciens*.

Preparación y desinfección de explantes de *N. tabacum*

Los explantes se obtuvieron a partir de hojas jóvenes y sanas de plantas de *N. tabacum* WT. Las hojas se incuban en agitación constante durante 15 min en 300 ml una solución de desinfección que contiene: cloro al 20% v/v y 1 ml de Tween-20. Se realizaron lavados con H₂O estéril por 10 min cada uno en agitación constante hasta eliminar el Tween-20 (ausencia de espuma).

Las hojas se cortaron en secciones de 1 cm x 1 cm evitando el tejido vascular.

NOTA: Se tuvo el cuidado de mantener las soluciones, el material y el área de trabajo bajo condiciones de esterilidad.

Infección de explantes con las diferentes versiones de NaTrxh:GFP con Agrobacterium tumefaciens

1.-Se creció un precultivo de la clona de *A. tumefaciens* con la construcción de interés para transformar en 5 ml de medio líquido LB + kanamicina 100 µg/ml.

2.- Se inoculó 50 ml de medio LB más antibióticos de selección (Rifampicina/Kanamicina) con 500 µl del precultivo. Al llegar a la $DO_{600} = 0.4-0.6$, se centrifugaron a 6,000 rpm por 10 min para recolectar las bacterias.

3.-El paquete celular se disolvió en medio MS + sacarosa al 1%. Los explantes, previamente desinfectados, se incubaron con el inóculo bacteriano durante 15 min en agitación suave.

4.-Se eliminó de los explantes el exceso de bacterias con papel filtro (estéril) y se colocaron en un medio NAP6 con acetosiringona por dos días en oscuridad.

5.-Posteriormente se colocaron en medio NAP6 con los antibióticos cefotaxima [75 mg/ml] y vancomicina [75 mg/ml] para la eliminación de las bacterias y la promoción de formación de brotes.

6.-Las plántulas se aislaron y se colocaron en medio Mourashige y Skoog (MS) Sigma para enraizar.

❖ Evaluación de las plantas transformadas (T0)

Una vez que las plantas se transfirieron a tierra, se purificó DNA genómico por el kit (ChargeSwitch gDNA Plant Kit) de Invitrogen. Las plantas se evaluaron por reacciones de PCR para identificar el transgen.

Reacción de PCR:	
Buffer Taq [10X]	2.5 µl
MgCl ₂ [50mM]	2.5 µl
Betaína [5M]	2.5 µl
Oligonucleótido [10µM] (Forward)	1 µl
Oligonucleótido [10µM] (Reverse)	1 µl
dNTPs [10µM]	0.3 µl
Tag polimerasa	0.2 µl
DNAg	0.5 µl
H ₂ O	9.5 µl

Programa: [1 ciclo (94°C/1 min); 30 ciclos (94°C/30 seg,
60°C/1 min, 72°C/1 min); 1 ciclo (72°C/7 min)]

❖ Selección de las plantas (T1)

Se desinfectaron semillas de *N. tabacum* transgénicas de la siguiente manera:

- 1.- Se colocaron las semillas en un microtubo de 1.5 ml estéril y se agregó 1 ml de NaClO al 20% y 1 µl de Tween-20 (C.f. 0.1%). Se agitaron por 20 min.
- 2.- Se centrifugaron las semillas por 10 seg y se eliminó la solución por decantación.
- 3.- Se agregó 1 ml de NaClO al 20% estéril y se agitó durante 10 min.
- 4.- Se enjuagó al menos 5 veces con 1 ml de agua estéril en cada ocasión hasta eliminar completamente el NaClO y el Tween-20. Al término de cada lavado se centrifugó y se eliminó el sobrenadante.
- 5.- Se sembraron las semillas en una caja petri con medio Gamborg's B-5 3.2 g/L con agar al 1%, sacarosa al 1% y con BASTA 5 mg/L (Sigma)

Las semillas se dejaron alrededor de mes y medio en una cámara de incubación con un foto periodo de 8 h luz/16 h oscuridad a 22°C o hasta obtener plántulas.

La expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) en las plántulas fue evaluada por fluorescencia a longitudes de onda de excitación/emisión 485/545 nm en un microscopio confocal FV-1000.

❖ **Ensayos de expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla**

El método de transformación utilizado para expresar transitoriamente las diferentes versiones de la NaTrxh fusionada a GFP en epidermis de cebolla fue por biobalística.

Las epidermis de cebolla fueron transformadas de acuerdo al protocolo propuesto por (Scott *et al.*, 1999).

Las diferentes versiones de NaTrxh se obtuvieron por construcciones respectivas en las que se eliminaron distintos dominios de la extensión hacia la región N-terminal y toda la región C-terminal. Cada una de estas versiones fueron recombinadas en el vector pEarley 103 de la serie Gateway, el cual conduce a la expresión constitutiva de las versiones de NaTrxh por el promotor 35S y fusiona el extremo C-terminal a la proteína reportera GFP (Figura 6B).

Para evaluar la región responsable de la secreción de NaTrxh, se diseñaron las siguientes versiones de NaTrxh: 35S:NaTrxh:GFP, 35S: $\Delta\alpha$ NaTrxh:GFP, 35S: $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP, 35S: $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP, 35S:N β :GFP y 35S:GFP (Figura 6B).

Desinfección de cebollas

- Se quitó la capa externa de la cebolla y se colocó en 2 L de una solución para desinfección: Cloro al 30%, 1 ml de Tween-20 y 2 ml de Mycrodin. Se incubó por 20 min en agitación suave.
- Se eliminó la solución anterior y se lavó con agua estéril por 10 min en agitación suave.
- Se repitió 2 veces el paso anterior.

Obtención de epidermis de cebolla

- 1.- Para el bombardeo, sólo se utilizaron las 4 capas internas de las cebollas.
 - 2.- La capa de cebolla se cortó en cuadros de 1.5 x 1.5 cm.
 - 3.- De cada cuadro, se levantó suavemente la epidermis y se colocó en medio MS + sacarosa al 3%.
- Las epidermis quedaron listas para ser bombardeadas.

NOTA!: No debe pasar más de 1 h desde el momento en que se obtienen las epidermis hasta el tiempo de la transformación (bombardeo).

Transformación por biobalística

El bombardeo se realizó con partículas de tungsteno de 5 μm y una presión de 7 Bar o 110 psi.

Las epidermis de cebolla bombardeadas se incubaron por 24 h a luz constante y a 25°C. Después del tiempo de incubación, se estimó la fluorescencia en un microscopio confocal Olympus FV-1000 utilizando longitudes de excitación/emisión 485/545 nm para GFP. Las células fueron colocadas por 15 min en una solución de sacarosa [1 M], con la finalidad de condensar el citoplasma y facilitar la observación de la localización extracelular de NaTrxh:GFP.

❖ Evaluación de la ruta de secreción de NaTrxh por ensayos de expresión transitoria en epidermis de cebolla

Evaluación del tránsito de NaTrxh por el Retículo Endoplasmático (RE).

Las construcciones que se diseñaron para evaluar si la NaTrxh pasa por el RE en su camino hacia el espacio extracelular son: NaTrxh:GFP(KDEL), N β :GFP(KDEL) y como control se utilizó la proteína de fusión Nap11:GFP(KDEL). La proteína Nap11 es una quimiocianina que es secretada vía RE/Golgi a la matriz extracelular del estilo (Cruz-García *et al.*, 2005). Los oligonucleótidos utilizados para la elaboración de estas construcciones se muestran en la sección que corresponde a la elaboración de las diferentes construcciones de NaTrxh.

- Las epidermis de cebolla fueron bombardeadas con las construcciones NaTrxh:GFP(KDEL), N β :GFP(KDEL) y p11:GFP(KDEL), se dejaron incubando a luz constante durante 24 h y temperatura de 25°C.
- Las epidermis, previamente transformadas, se montaron en un portaobjetos con 70 μ l ioduro de propidio (Sigma) con la finalidad de teñir el núcleo de las células.
- Se evaluó la localización de NaTrxh siguiendo la fluorescencia de GFP a longitudes de 485/545 nm. La tinción de los núcleos se observaron a longitudes de excitación/emisión de 570/670 nm.

Para conocer el patrón de fluorescencia del RE en las células de epidermis de cebolla, se utilizó un conjugado de concavalina A Alexa Fluor 594 (Invitrogen Cat.C11253), el cual se excita y emite fluorescencia a las longitudes de onda de 590/617 nm Figura 15 A (Gunther et al., 1973; Mandal and Brewel 1993).

- Se preparó una solución “stock” 5 mg/ml a partir del conjugado. Para disolver la concavalina A liofilizada, se utilizó una solución amortiguadora de bicarbonato de sodio 0.1 M, pH 8.3.
- Se diluyó el conjugado a una concentración de 50 μ g/ml con una solución amortiguadora HBSS (CaCl₂ 1.26 mM, KCl 5.33 mM, KH₂PO₄ 0.44 mM, MgCl₂·6H₂O 0.55 mM, MgSO₄·7H₂O 0.41 mM, NaCl 138 mM, NaHCO₃ 4 mM, Na₂HPO₄ 0.3 mM)
- Se centrifugó la concavalina A para eliminar y evitar que los cúmulos interfieran en el ensayo. Se tomó solo la parte de arriba de la solución del conjugado.
- Se agregó la cantidad suficiente para cubrir el tejido aprox. 100 μ l y se incubaron los tejidos por 10 min a 37°C.
- Se lavaron los tejidos con PBS 1X y se observaron en el microscopio confocal.
- Para conseguir una mejor penetración del colorante, las epidermis se incubaron con una solución 0.2% de Triton X-100 durante 15 min y posteriormente se incubaron con 20 μ g/ml de proteinasa K (Gibco BRL) preparada en 10 mM Tris pH 7.5 y 5 mM de EDTA. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad para evitar la degradación de la concavalina A.

Evaluación del tránsito de NaTrxh a través del Aparato de Golgi.

La evaluación del tránsito de cada una de las versiones de NaTrxh:GFP por el aparato de Golgi fue utilizando la toxina fúngica brefeldina A (BFA) (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Se utilizó como control positivo la proteína de fusión Nap11:GFP.

- Se transformaron las epidermis de cebolla con las construcciones: NaTrxh:GFP, N β :GFP y p11:GFP.
- Las epidermis transformadas, se incubaron en medio líquido MS con BFA a una concentración final de 50 μ g/ml durante 10 min en oscuridad.
- Posteriormente, se trataron con NaCl 1M por 10 min para plasmolizar las células y evaluar la secreción de las versiones de NaTrxh.
- Finalmente los tejidos se observaron en un microscopio confocal.

NOTA: Todas las imágenes en el microscopio confocal fueron obtenidas en la USAI (Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación) de la Facultad de Química de la UNAM.

❖ Cuantificación de proteína total

Para los experimentos de actividad de tioredoxina, así como de la elaboración de las columnas de afinidad, la cuantificación de la proteína fue determinada por el método de Bradford (1976). Se utilizó una curva patrón con albúmina de suero bovino (BSA) a 1 mg/ml.

Para la cuantificación de proteína de las fracciones microsomales de estilos de *N. alata*, se utilizó el método de Lowry (Peterson, 1977).

❖ **Ensayo de actividad enzimática para tiorredoxinas**

La actividad enzimática de tiorredoxina de las diferentes versiones de NaTrxh: $\Delta\alpha$ NaTrxh, $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh y NaTrxh Δ COO se comprobó utilizando el método espectrofotométrico según Holmgren (1979 y 1984). El ensayo se basa en la reducción de los puentes disulfuro que unen a las cadenas A y B de la insulina. En el ensayo se mide la turbidez generada por la liberación de la cadena B. La reducción es catalizada por la tiorredoxina utilizando como donador de electrones al ditioneitol (DTT).

El método consistió en preparar una solución de insulina a una concentración de 10 mg/ml. Se resuspendieron 46 mg de insulina (SIGMA) en 3.68 ml de Tris-Cl 50 mM, pH 8. Se ajustó la acidez de la solución a pH 2 con HCl 1 M y se tituló rápidamente a pH 8 con NaOH 1 M. Se aforó a un volumen de 4.6 ml con agua.

Para el ensayo de actividad, se colocaron en una celda 500 μ l de insulina a una concentración 1 mg/ml disuelta en fosfato de potasio 0.1 M, pH 7 y EDTA 2 mM, pH 8

A cada muestra se le agregó 100 μ l de tiorredoxina a una concentración de 75 ng/ μ l. La reacción comenzó agregando 10 μ l de DTT 100 mM, excepto al blanco, cuyo volumen final es de 610 μ l. Las lecturas se realizaron a una DO de 650 nm por 40 min a intervalos de un minuto.

❖ **Sobreexpresión de las diferentes versiones de NaTrxh**

La sobreexpresión de las diferentes versiones de NaTrxh se realizaron en la cepa BL21 de *E. coli*. Las versiones de NaTrxh se fusionaron a la proteína soluble glutatión S transferasa (GST) clonada en el vector pGEX (Figura. 2).

- 6.- Se centrifugó a 10,000 rpm (1300 x g) para eliminar los restos celulares. Se conservó el sobrenadante y se cuantificó por Bradford para su posterior purificación.

Purificación de las proteínas recombinantes

Las proteínas sobreexpresadas fueron cuantificadas (ver cuantificación de proteína total) para elaborar las columnas de afinidad (protocolo SIGMA).

- 1.- Se hidrató la resina glutatión-agarosa (Sigma) con agua utilizando 200 ml por gramo de resina. Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min ó 4°C toda la noche.
- 2.- Se lavó la resina con PBS 1 X para eliminar la manosa que se encuentra agregada a la glutatión agarosa con 5 vol. cama.
- 3.- Se equilibró la resina con 10 vol. cama de PBS 1 X y se dejó la columna al 50% de hidratación.
- 4.- Se agregó la proteína recombinante a la columna e incubó durante 45 min-1 h en agitación constante a 4°C.
- 5.- Se lavó la proteína recombinante pegada a la columna con 10 vol. cama de amortiguador PBS 1 X.
- 6.- Se eluyó la proteína recombinante con una solución de glutatión reducido 10 mM disuelto en Tris.HCl 50 mM pH 9.5.
- 7.- Finalmente se evaluó la purificación de la proteína recombinante mediante electroforesis SDS-PAGE.

❖ Elaboración de las diferentes construcciones de NaTrxh: Secuencias de DNA

Las secuencias que se muestran abajo, se utilizaron para el diseño de los oligonucleótidos utilizados en la elaboración de las proteínas de fusión como las proteínas recombinante:

Proteína completa de NaTrxh

NaTrxh (459 pb)

```
ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAATCAGGA
TCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAAT
TCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC GGCTACATGGTGTGGGCCCTGCAAA
ATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAATCGAC
GTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTTGCTGCTG
AAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTC
AAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA
```

Proteína $\Delta\alpha$ NaTrxh con eliminación de la región Met₁-Ala₁₆ (esta región se le conoce como región N α)

NaTrxh Δ N α (414 pb)

Eliminado: **ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCG**

```
ATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCCTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAAT
CGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTGC GGCT
ACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGAC
GTTGACTTCGTCAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTTGGAGTACAAGAT
ATGCCAACATTTTTGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGAT
GAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGCTAGTAATTATCGAACT
AAATTTTCATGTCCAATAA
```

Proteína $\Delta\beta$ NaTrxh con eliminación de la región Ala₁₇-Pro₂₇ (esta región se denominó región N β)

NaTrxh Δ N β (426 pb)

Eliminado: **GCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCG**

```
ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGGCGGAAGCGTCGCGTGTGATTGCTTTT
CATTTTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTG
GATTTTGC GGCTACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGTCTGCC
AAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAATCGACGTCGATGAGCTCTCAGATGTAGCACAAGAGTTT
GGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTTGCTGCTGAAGCAAGGAAAGGAAGTAGAGAGAGCGGTTGGG
GCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAAGCTCCTAAATTTGCTGCTAGT
AATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA
```

Proteína $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh con eliminación de toda la región que corresponde a la extensión N-terminal Met₁-Pro₂₇

NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ (381 pb)

Eliminado:ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAA
TCAGGATCGTCGTCAGAACCG

ATGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAATTCCTCCAAGCAA
TTAAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTTCGGCTACATGGTGTGGGCCCTGCAAAATGATGGAGCCG
GTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAATCGACGTCGATGAGCTC
TCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTCTGCTGAAGCAAGGAAAG
GAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAGCTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAA
GCTCCTAAATTTGCTGCTAGTAATTATCGAACTAAATTTTCATGTCCAATAA

Proteína NaTrxh Δ COO con eliminación de toda la extensión C-terminal (esta región está conformada desde el E₁₃₆)

NaTrxh Δ C (426 pb)

ATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGGCGGAAGCGGCAGAGGCAGAAATCAGGA
TCGTCGTCAGAACCGTCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAATCGGTGGCAACTTCACTTCAAT
TCCTCCAAGCAATTAATAAACTGATAGTTGTGGATTTTTCGGCTACATGGTGTGGGCCCTGCAAA
ATGATGGAGCCGGTTATTAACGCCATGTCTGCCAAGTATACCGACGTTGACTTCGTCAAAATCGAC
GTCGATGAGCTTCAGATGTAGCACAAAGAGTTTGGAGTACAAGCTATGCCAACATTTTGTCTGCTG
AAGCAAGGAAAGTAGAGAGAGTGGTTGGGGCTAAGAAAGATGAG

Eliminado:CTCGAGAAAAAGATTCTCAAGCACAGGGAGCTCCTAAATTTGCTGCTAGTAATTATC
GAAC TAAATTTTCATGTCCAATAA

Proteína completa de Nap11. Proteína control de secreción por la vía clásica

Nap11 (372 pb)

ATGTCAGGAAACAAGGGTCTGCAATTTTATGGGTGCATATTTATGGTGTGTTTACTATTCAAATA
ACTAATGCTGCTATTTACAATGTTGGAGATGGTAATGGCTGGACTTTTGGTGTAGCAACTGGCCT
AATGGCAAGAAATTTCAAAGCTGGCGATGTGCTTGTATTTAAATATCCTAAAGGTGTTTCAATATG
GTGATAGTGAACAAGGCTAATTACGGTACTTGCAATGCTTCAGGGAGAACACTTAGTTCTGGAAAT
GACAGAGTAACCTTTGGCAAGGGCACATACTATTTTATTTGCGGCATTCCTGGTCAATTGTAATGGT
GGCAAAAAGATTTTCAAGTACTGCTAAGTTAACAAACAAATAA

Proteína completa de GFP

GFP (702pb)

ATGGTAGATCTGACTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGTAATTA
GATGGTGTATGTTAATGGGCACAAATTTTCTGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGA
AACTTACCTTAAATTTATTTGCACTACTGGAAAACCTACCTGTTCCGTGGCCAACACTTGTCACT
ACTTCTCTTATGGTGTTCATGCTTTTCAAGATACCCAGATCATATGAAGCGGCACGACTTCTTC
AAGAGCGCCATGCCTGAGGGATACGTGCAGGAGAGGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGGAACTAC
AAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGGAGGAGACACCCCTCGTCAACAGGATCGAGCTTAAGGGAATC
GATTTCAAGGAGGACGGAAACATCCTCGGCCACAAGTTGGAATACAAC TACAAC TCCACACGTA
TACATCATGGCCGACAAGCAAAAGAACGGCATCAAAGCCAAC TCAAGACCCGCCACAACATCGAA
GACGGCGGCGTGCAACTCGCTGATCATATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCCTT
TTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGAC
CACATGGTCTTCTTGTAGTTTGTAAACAGCTGCTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATACAAA
GCTAGCCACCACCACCACCACCGTGTGA

Elaboración de las construcciones para sobreexpresar en *E. coli* las diferentes versiones de NaTrxh

Se diseñaron oligonucleótidos para clonar los cDNAs de las versiones de NaTrxh en el vector pGEX 4T-2 (Amersham Biosciences) con los sitios de restricción *Bam*HI y *Eco*RI.

GST-NaTrxh

Forward 5'-CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA-3'

Reverse 5'-GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3'

GST- $\Delta\alpha$ NaTrxh

Forward 5'-GCGCGGATCCATGGCAGAGGCAGAATCAG-3'

Reverse 5'-GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3'

GST- $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh

Forward 5'-GCGGATCCATGTCGCGTGTGATTG-3'

Reverse 5'-GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3'

La versión **GST- $\Delta\beta$ NaTrxh** se obtuvo mediante dos reacciones de PCR la primera reacción se realizó con los oligonucleótidos

Forward 5'-TCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTCCAAT-3'

Reverse 5'-GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3'

Esta reacción nos proporciona el fragmento $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh.

El producto de PCR de la primera reacción se utilizó como templado para la segunda reacción de PCR en la cual se utilizaron los oligonucleótidos:

Forward 5'-GGATCCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGCGCGGAAG
CGTCCGTGTGAT-3'

Reverse 5'-GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA-3'

Para la versión **GST-NaTrxh Δ COO**

Forward 5'-CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA-3'

Reverse 5'-CCGGAATTCCTGTGCTTGAGAATCTTTTCTCGAG-3'

Elaboración de las construcciones para identificar la región responsable de la secreción de NaTrxh

Para elaborar las versiones de **NaTrxh-GFP** y **$\Delta\beta$ NaTrxh-GFP**, se clonaron los cDNAs con los sitios attB1 y attB2 en el vector pDONR/Zeo (Invitrogen).

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Forward 5'-GGGGAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTG-3'

Reverse 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGGACATGAAATTTAGTTCGATA-3'

Se utilizaron las construcciones pGEX-NaTrxh y pGEX- $\Delta\beta$ NaTrxh como templado para las reacciones de PCR. Los cDNAs amplificados fueron clonados en pDONR/Zeo mediante recombinación con la clonasa BP.

Las versiones de **$\Delta\alpha$ NaTrxh-GFP**, **$\Delta\alpha\beta$ NaTrxh-GFP**, **NaTrxh Δ COO-GFP** y **Nap11-GFP** se clonaron en el sistema pENTR Directional TOPO Cloning Kits (Invitrogen). Este kit evita la clonación por restricción, purificación y ligación. El sistema permite clonar el producto de PCR dentro del vector de entrada pENTR (Figura 4). Una vez que es clonado el gen de interés en el vector pENTR, se puede transferir por recombinación a diferentes vectores destino de la línea Gateway. Las instrucciones para elaborar las clonas se siguieron al pie de la letra según el protocolo del proveedor (Invitrogen)

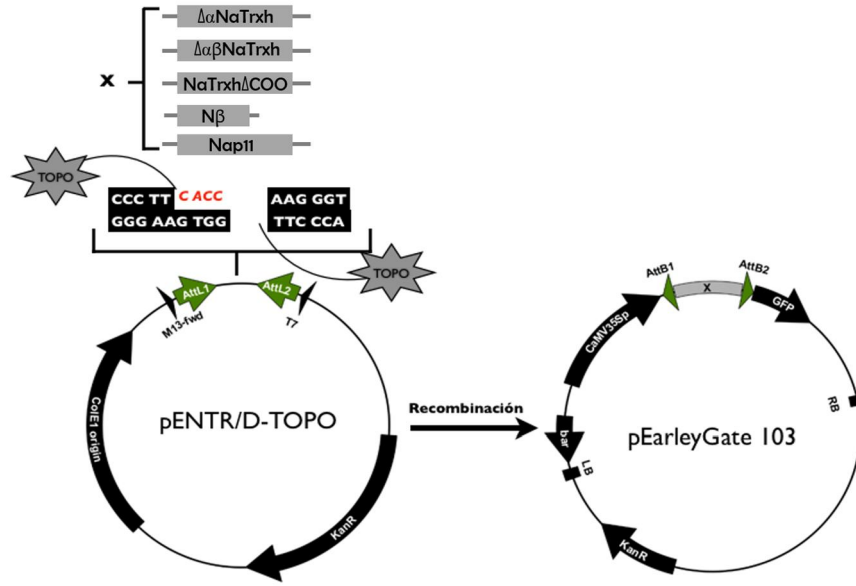


Figura 4. Clonación de las diferentes versiones de NaTrxh en el vector pEarleyGate 103. X corresponde a los cDNA's de las versiones de NaTrxh que se clonaron en el vector pENTR/D-TOPO. NaTrxh y ΔβNaTrxh se clonaron con las secuencias attB1 y attB2 en el vector pDONR/Zeo para poderlos recombinar en el vector pEarleyGate 103.

Oligonucleótidos para generar las construcciones de:

ΔαNaTrxh

Forward 5'-**CACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGA**-3'

Reverse 5'-TTATTGGACATGAAATTTAGTTCGATAATTACTAGCAGC-3'

ΔαβNaTrxh

Forward 5'-**CACCATGTGCGGTGTGATTGCTTTT**-3'

Reverse 5'-TTATTGGACATGAAATTTAGTTCGATAATTACTAGCAGC-3'

NaTrxh (Nβ)

5'-**CACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCG**-3'

El primer de Nβ fue alineado con el oligonucleótido complemento. Ambos oligonucleótidos fueron mezclados incubándolos a 94°C por 15 min y posteriormente se incubaron 30 min a temperatura ambiente.

Nap11

Forward 5'-**CACCATGTCAGGAAAACAAGGTCTGCAATTTTATG**-3'

Reverse 5'-TTTGTGGTAACTTAGCAGTAACTGAAATCTTTTGCC-3'

NaTrxhΔCOO

Forward 5'-**CACCTGGGATCGTATCTTTCAAGT**-3'

Reverse 5'-TCATTCCCTGTGCTTGAGAATCTT-3'

Elaboración de las construcciones para evaluar la ruta de secreción que sigue NaTrxh

Para elaborar las construcciones que contuvieran la señal de retención a retículo endoplásmico (KDEL) se utilizó un único oligonucleótido (reverse) que reconociera la región C-terminal de la proteína GFP, este oligonucleótido se le insertó a la secuencia que corresponde a la señal de retención a RE, KDEL. El DNA molde para la amplificación del cDNA fueron las construcciones previamente descritas.

Quedará el extremo carboxilo:

A S H H H H H H K D E L *
5101 gctagccaccaccaccaccaccac**aaagatgagctt**tga

Por lo tanto la especificidad de la clona la dará el oligo forward, es decir para la clona:

NaTrxh:GFP (KDEL)

FTHIPEX2

5' CGCGGGATCCATGGGATCGTATCTTTCAA 3'

GFP-KDEL

5' TCAAAGCTCATCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGC 3'

NβNaTrxh:GFP(KDEL)

Nbeta1a

5' CGCGGATCCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAGAACCGCCATGGCATG 3'

GFP-KDEL

5' TCAAAGCTCATCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGC 3'

p11:GFP (KDEL)

p11 fwd

5' ATGTCAGGAAAACAAGGGTCTGCAATTTTATG 3'

GFP-KDEL

5' TCAAAGCTCATCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGC 3'

Todas las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las siguientes condiciones:

Reacción de PCR:

Buffer PFU [10 X] 2.5 µl

Oligonucleótido [10 mM]
(Forward) 1 µl

Oligonucleótido [10 mM]
(Reverse) 1 µl

dNTPs [10 mM] 0.3 µl

Polimerasa PFU 0.2 µl

*DNAg 0.5 µl

H₂O 19.5 µl

Programa: [1 ciclo (94°C/1 min); 30 ciclos (94°C/30 s, 60°C**/1 min, 72°C/1 min); 1 ciclo (72°C/7 min)]

*El DNA molde utilizado fue a partir de construcciones previamente obtenidas por Juárez-Díaz *et al.* (2006).

**La temperatura de alineamiento depende del juego de oligonucleótidos que se utilizaron, en general la temperatura de trabajo fue de 60°C.

❖ Interacción proteína-proteína por cromatografía de afinidad

Para evaluar las interacciones entre diferentes versiones de NaTrxh y proteínas estilares, se requirió de la elaboración de columnas de afinidad para cada una de las proteínas sobreexpresadas en *E. coli* y fusionadas con la proteína GST (ver elaboración de columnas de afinidad).

Se agregaron 2 ml (12 mg/ml) de un extracto de proteínas totales de estilos de *N. alata* para evaluar la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh.

Se utilizaron extractos de proteínas de estilos de *N. alata* 110-18.

- Los extractos estilares se incubaron con la columna de afinidad por 1 h a TA y rotación continua.
- Se obtuvo la fracción de proteínas que no interaccionan con NaTrxh.
- La columna se lavó dos veces con 1 vol. cama de solución amortiguadora Tris 50 mM.
- Posteriormente se lavó con 3 ml de Tris [50 mM] +Tween 20 al 0.1 y 0.2%. Y luego se realizaron lavados con un gradiente de NaCl de 1, 5 y 10 mM con 3 ml de cada una de las concentraciones.
- La fracción unida se obtuvo con 1 ml de una solución de glicina 50 mM a pH 2.6, se recibió en 100 µl de una solución de Tris 1 M. Se repitió este paso una vez más.

❖ Obtención de la fracción microsomal de hojas de *N. tabacum*

- 1.- Se obtuvieron los pistilos de flores de plantas de *Nicotiana tabacum* y se congelaron inmediatamente hasta su uso.
- 2.- Se pesaron los pistilos y se agregó el amortiguador de homogenización en una relación 1/3 (p/v).
- 3.- Se homogenizó la mezcla por espacio de 15 s.
- 4.- Se filtró el homogenado por 4 capas de gasa y se obtuvo el filtrado en hielo.
- 5.- Se centrifugó a 9,000 x g en microfuga, a 4°C durante 15 min.
- 6.- Se tomó el sobrenadante y se distribuyó en tubos para ultracentrífuga.
- 7.- Se centrifugaron a 40,000 rpm en rotor 60 Ti Beckman a 4°C durante 80 min.

8.- Se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió con un pincel fino en amortiguador de ajuste de peso.

9.- Se determinó la cantidad de proteína por el método de Lowry modificado (Peterson 1977)

Amortiguador de homogenización

Sorbitol 620 mM,
HEPES/BTP 50 mM, pH 7.8
 β -mercaptoetanol 15 mM
ácido ascórbico 5 mM
EDTA 3 mM
DTT 1 mM
KCl 1 mM
PVP 0.6%
BSA 0.2%
Inhibidores de proteasas 1.6 μ g/ml

Amortiguador de ajuste de peso y resuspensión

Sorbitol 620 mM
 KH_2PO_4 5 mM pH 7.8
KCl 3.5 mM
DTT 1 mM
EDTA 0.1 mM
Inhibidores de proteasas 1.6 μ g/ml

Amortiguador de lavado

Sorbitol 350 mM
HEPES/MES 2 mM pH 7.6
DTT 1 mM
KCl 1 mM
Inhibidores de proteasas 1.6 μ g/ml

Tratamiento de los microsomas

Se realizaron dos tratamientos:

- 1) Los microsomas se incubaron con NaCl 400 mM por 20 min.
- 2) Los microsomas se incubaron con NaCl 400 mM + Triton 1%.

Se centrifugaron a 40,000 rpm por 3 h. Se obtuvo la fracción soluble con las proteínas que se liberaron con el NaCl, aquellas que se liberaron con Tritón y también se obtuvo la fracción microsomal en donde se encuentran las proteínas fuertemente asociadas a la

membrana. La fracción soluble de cada tratamiento fue liofilizada y resuspendida en el amortiguador de resuspensión.

❖ **Predicción de las regiones desordenadas de NaTrxh**

La exploración de las regiones desordenadas se llevó a cabo gracias al invaluable trabajo de la QFB Alejandra Zavala. Para ello se utilizó el programa DisEMBL (Linding *et al.*, 2003), el cual predice regiones de las proteínas con estructura muy flexible; estas regiones se les conoce como IDR's (regiones intrínsecamente desordenadas). El programa muestra tres criterios para establecer las IDR's: 1) Loops/coils: abarca residuos encontrados en las estructuras tallo-asa. 2) hot loops: indica todos los "loops" de alta movilidad y 3) Remark 465: son todas las regiones de proteínas previamente cristalizadas, de la base de datos del PDB que no muestran estructura definida. La secuencia de aminoácidos de NaTrxh fue evaluada con este programa (DisEMBL server: <http://www.lindinglab.org/Publications/embl/protein-disorder-prediction-implications-for-structural-proteomics>).

❖ **Estructura tridimensional de NaTrxh y dinámica molecular**

Se realizó un BLAST de la secuencia de la NaTrxh mostrando que la tiorredoxina de *H. vulgare* (PDB 2IWT) es la proteína con mayor homología. Posteriormente se generaron diferentes modelos utilizando el programa Modeller 9v4 y se evaluaron por ANOLEA. El mejor modelo fue simulado por dinámica molecular usando el programa GROMACS v4.5 (Berendsen *et al.*, 1995; Lindahl *et al.*, 2001) y GROMOS G53a6 (Oostenbrink *et al.*, 2005) las condiciones de la dinámica fue colocar la proteína en una caja de agua por 35 ns con 0.15 M NaCl, temperatura de 303K y una presión estándar. Después de los 30ns de simulación, NaTrxh presentó la conformación típica de las tiorredoxinas a excepción de los primeros 30 aminoácidos y los últimos 20. En los últimos 5ns de la simulación se estimaron las fluctuaciones (rmsf) como un criterio para evaluar las regiones de la proteína poco estructuradas.

El modelo final fue minimizado usando el protocolo ROSETTA relax-fast (Dantas *et al.*, 2003; Eswar *et al.*, 2006) y evaluado. La adecuación biológica del modelo final se evaluó mediante el protocolo Rd.HMM (Martínez y Sotres, 2010).

Resultados

Se realizó un alineamiento entre Trxh's del subgrupo II según la clasificación de Gelhaye *et al.* (2004) y la NaTrxh (Figura 5). Estas tiorredoxinas presentan la secuencia WCGPC dentro del sitio catalítico y cuentan también con una extensión hacia el N-terminal. En la Figura 5 se observan las regiones extendidas de las tiorredoxinas h y en particular, para NaTrxh, una región más larga hacia el C-terminal (Figura 5, negrillas). Las extensiones que posee NaTrxh sus extremos amino y carboxilo podrían ser las responsables de la especificidad hacia sus proteínas blanco, así como para su secreción al apoplasto. La proteína NaTrxh se secreta al espacio extracelular del tejido de transmisión del estilo, en donde se localiza también una de sus proteínas blanco, la S-RNasa (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). El presente trabajo se ha enfocado en relacionar la presencia de estas regiones “adicionales” de la NaTrxh con su localización y su interacción con la S-RNasa.

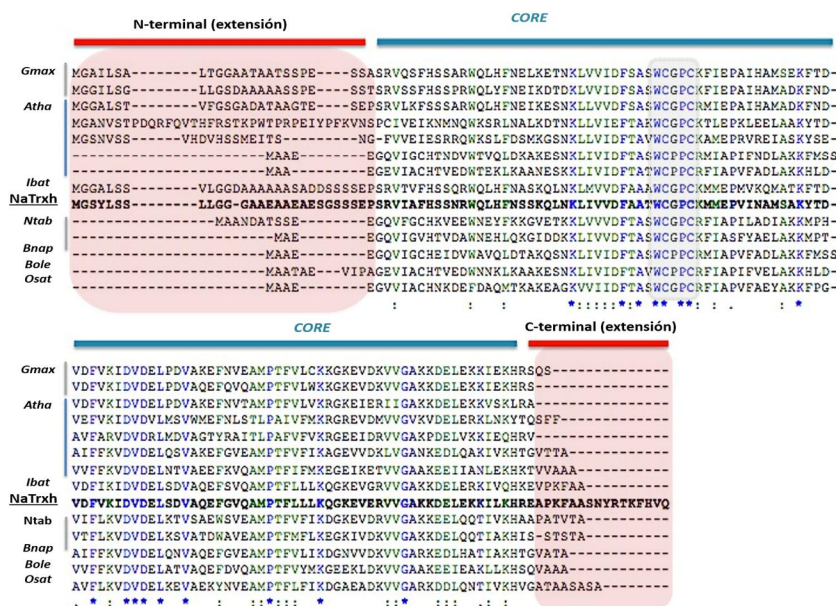


Figura 5. Alineamiento de diferentes tiorredoxinas h. Las Tiorredoxinas h pertenecen al subgrupo II según la clasificación (Gelhaye *et al.*, 2006). Las letras corresponden a la especie, seguido del código de acuerdo al NCBI. Gmax (*Glycine max*; TRX1 y TRX2); Atha, (*Arabidopsis thaliana*; Q38879, AAG52561, AAD39316, Q39239, Q42403); Nala, (*Nicotiana alata*; DQ021448); Ibat, (*Ipomea batata*; AY344228); Ntab (*Nicotiana tabacum*; P29449, Q07090; Bnap, (*Brassica napus*; Q39362); Osat, (*Oriza sativa*; D26547); Bole, (*Brassica oleracea*; P68176). Las extensiones de las tiorredoxinas se señalan con las barras rojas, NaTrxh se identifica con negrillas. La barra azul corresponde a la región “core” de las Trx’s, esta región está altamente conservada a nivel de estructura tridimensional. El recuadro gris claro abarca el sitio catalítico de las tiorredoxinas (WCXXC), de color verde se observan los aminoácidos con características químicas similares y en azul se muestran los aminoácidos conservados.

Secreción de NaTrxh

El trabajo de Juárez-Díaz *et al.* (2006) dejó en claro que la proteína NaTrxh es una proteína de secreción. Para definir cuál era la región responsable de su secreción, se planearon experimentos de expresión estable en *N. tabacum* y de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla (*Allium sp.*). Se utilizaron diferentes versiones de la proteína NaTrxh fusionadas al gen reportero GFP. Los criterios para definir las diferentes versiones de NaTrxh fueron los siguientes:

- 1.- El alineamiento de NaTrxh con otras tiorredoxinas *h* muestra claramente extensiones hacia los extremos N-terminal (Met₁-Pro₂₇) y C-terminal (Lys₁₃₃-Gln₁₅₂) (Figura 5)
- 2.- De acuerdo con la predicción del algoritmo Hidden Markov, la extensión N-terminal fue separada en dos regiones; la región alfa (N α) delimitada entre los aminoácidos Met₁ y Ala₁₆ y la región beta (N β) entre los aminoácidos Ala₁₇ y Pro₂₇ (Figura 6).
- 3.- Experimentos preliminares de expresión transitoria de la construcción CAM35S-NaTrxh-GFP en hojas de *A. thaliana* sugerían que NaTrxh contenía la información suficiente para su secreción.

Las versiones de NaTrxh resultantes se muestran en la Figura 6.

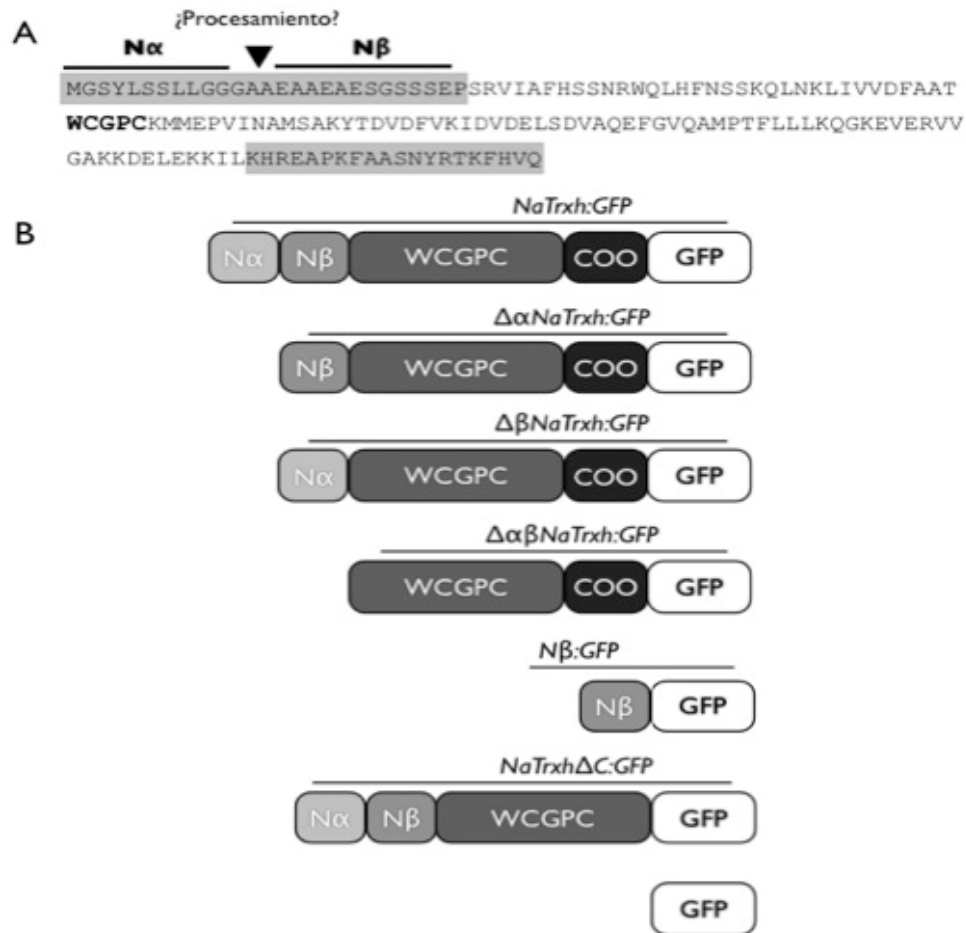


Figura 6. Diferentes versiones de la proteína NaTrxh. A) Secuencia de aminoácidos de NaTrxh. Los aminoácidos sombreados representan las extensiones presentes en los extremos amino y carboxilo de la proteína. Los aminoácidos WCGPC corresponden a la secuencia conservada en el sitio catalítico típico de las tiorredoxinas. De acuerdo a la predicción del procesamiento de NaTrxh por el algoritmo de Hidden Markov, la extensión N-terminal se divide en el fragmento **N α** conformado por los aminoácidos Met-1 a la Ala-16 y el fragmento **N β** que abarca los aminoácidos A-17 a la Pro-27. B) Esquemas de las diferentes versiones de NaTrxh fusionadas a la proteína reportera GFP. NaTrxh:GFP es la versión completa de la proteína fusionada a GFP. $\Delta\alpha$ NaTrxh:GFP, no tiene el fragmento **N α** . La versión $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP, no tiene el fragmento **N β** pero si está presente el **N α** . En $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP se eliminó toda la extensión amino terminal. **N β :GFP** corresponde a la región Ala-17 hasta Pro-27 fusionada a GFP. En NaTrxh Δ COO:GFP se eliminó la extensión carboxilo terminal de NaTrxh. Se utilizó como control negativo la proteína GFP únicamente.

***NaTrxh* se secreta en raíces de *N. tabacum* y en células epiteliales de cebolla**

Se transformaron por agroinfiltración explantes de hoja de *N. tabacum* con las distintas versiones de *NaTrxh:GFP*. Los explantes desarrollaron callos que se mantuvieron en medio nutritivo (NAP6) con el herbicida glufosinato de amonio (BASTA) como agente selectivo. A partir de los callos resistentes a BASTA se regeneraron plántulas, las cuales después de desarrollar raíces se transfirieron a suelo para evaluar la presencia del transgén correspondiente.

La transformación de las fue evaluada mediante reacciones de PCR utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos para demostrar la presencia del transgén de interés (Figura 7).

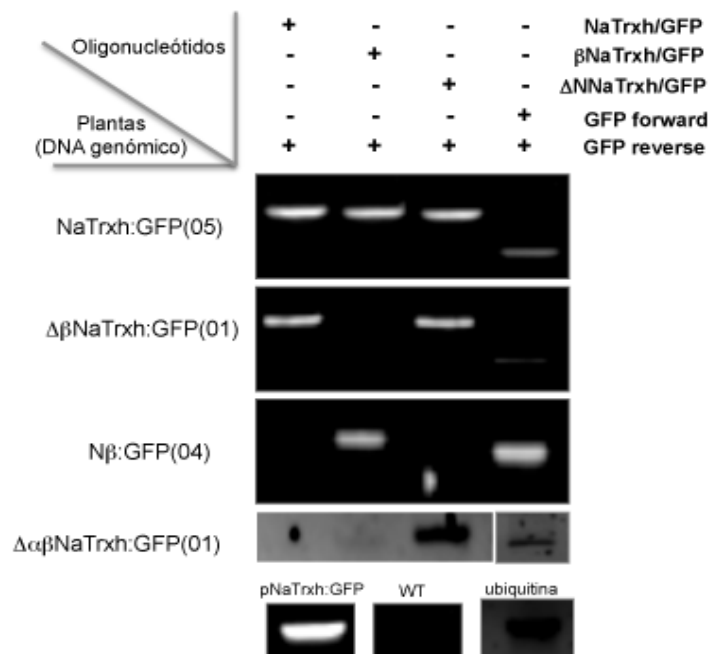


Figura 7. Análisis de las plantas transformadas To con las diferentes versiones de *NaTrxh:GFP*. Las plantas fueron analizadas mediante reacciones de PCR utilizando DNA genómico. Se usaron combinaciones de oligonucleótidos (arriba) que se unen a diferentes regiones del DNA que corresponde al cDNA de *NaTrxh:GFP*. (+) indica el oligonucleótido usado, (-) ausencia del oligonucleótido. Los paneles de abajo corresponden a los controles: p*NaTrxh:GFP* es la amplificación de la construcción con la que se transformaron las plantas, WT es el DNA genómico de plantas de *N. tabacum* sin transformar y Ubiquitina es la amplificación del gen de la ubiquitina como control de integridad del DNA.

Como se observa en la Figura 7, las plantas que portan el cDNA *NaTrxh:GFP* amplifican abundantemente utilizando cualquier combinación de oligonucleótidos. En cambio, las plantas transformadas con $\Delta\beta$ *NaTrxh:GFP* y $\Delta\alpha\beta$ *NaTrxh:GFP* carecen de la región de la Ala₁₇ a la Pro₂₇ y Met₁ a la Pro₂₇, respectivamente. La falta de estos segmentos no permite que los oligonucleótidos diseñados contra estas regiones puedan unirse y con ello se evita la amplificación de las mismas (Figura 7). En las plantas que fueron transformadas con *Nβ:GFP* solo se mostró amplificación cuando fue utilizado el oligonucleótido que correspondió a la región Nβ. Esta serie de resultados mostró que las plantas transformadas To portaban el transgén deseado.

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas de las diferentes versiones de *NaTrxh*, observando la fluorescencia de la proteína reportera GFP en las plantas To.

Se realizaron cortes histológicos finos (1 μm) de raíces de las plantas transformadas (To). De las diferentes líneas sólo se detectó fluorescencia en las plantas con la construcción *NaTrxh:GFP* (Figura 8). Con la finalidad de determinar la localización de las versiones de la *NaTrxh*, se tiñó la pared celular con el colorante *calcofluor white*. La fluorescencia de GFP se observó en verde en el espacio extracelular y la pared celular de la raíz en rojo. Debido a que la proteína GFP es de localización citoplásmica, la presencia de GFP en el exterior de la célula confirmó por lo tanto, que la proteína *NaTrxh* posee la información suficiente para su secreción. Asimismo, los datos obtenidos indican que la secreción de *NaTrxh* en raíces de *N. tabacum* al apoplasto, es independiente del tejido y especie donde se exprese.

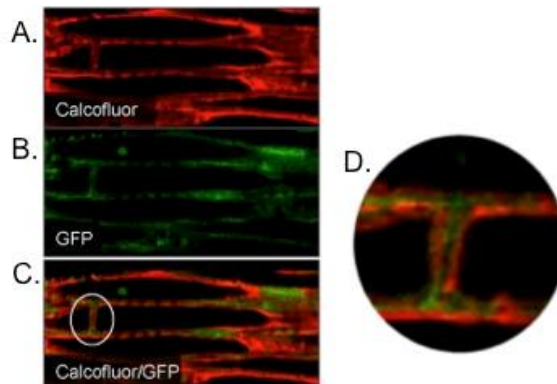


Figura 8. Análisis de expresión de la proteína quimérica NaTrxh:GFP en raíces de *N. tabacum*. Corte histológico de (1 μ m) de la raíz de la planta NaTo5 y su observación en el microscopio confocal. A) Tinción de la pared celular con calcofluor white (rojo); B) Fluorescencia de la GFP a 480nm (verde); C) empalme de la imágenes; D) acercamiento que muestra la localización extracelular de GFP.

Los resultados en la Figura 8 fueron confirmados por inmunoensayos tipo Western-blot, en donde se utilizaron anticuerpos contra GFP y extractos proteicos totales de las plantas transgénicas To. Aquí se corrobora la expresión de GFP fusionada a varias versiones de NaTrxh (Figura 9). Por otra parte, dado que la fluorescencia de GFP en los cortes histológicos fue baja para algunas de las de construcciones ensayadas, se procedió a seleccionar a las plantas transgénicas que expresaran GFP mediante microscopía de fluorescencia, pero en cortes frescos (Figura 9-B).

Para esto, se seleccionaron 5 plantas para la versión NaTrxh:GFP, 11 para $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP, 5 para la $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP y 14 para la N β :GFP de la generación To.

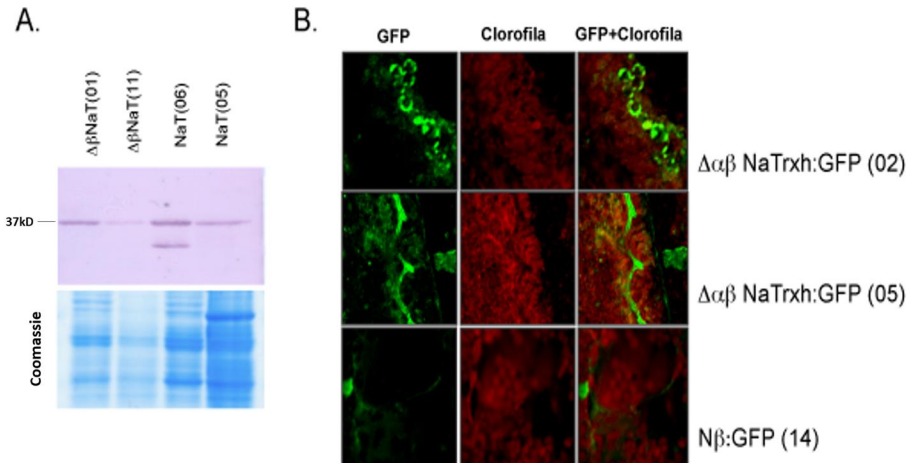


Figura 9. Evaluación de las plantas To. A. Ensayos de réplica tipo Western de extractos proteicos totales de dos líneas transgénicas: NaTrxh:GFP (NaT(06) y NaT(05)) y $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP ($\Delta\beta$ NaT(01) y $\Delta\beta$ NaT(11)); en el panel de superior se observa la inmunodetección con el anticuerpo anti-GFP (1:2,000); el panel inferior muestra los extractos de proteínas teñidos con azul de Coomassie. B. Imágenes de microscopía confocal de cortes frescos de hojas de las líneas $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP, $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP y N β :GFP; Panel izquierdo, fluorescencia GFP a 480nm; panel medio autofluorescencia de la clorofila (rojo); panel derecho, empalme de las imágenes.

De las plantas To seleccionadas se obtuvieron semillas, las cuales fueron sembradas en medio Gamborgs + sacarosa 1% y BASTA con la finalidad de obtener la generación T1 (Figura 10); asimismo, se sembraron semillas de *N. tabacum* WT como control. La mayoría de las semillas WT no germinaron en presencia de BASTA y las que lo lograron, detuvieron su crecimiento a las dos semanas. Sus raíces fueron muy cortas y sus hojas presentaron clorosis (Figura 10). En cambio las plantas que provienen de las semillas transgénicas To crecieron abundantemente y con gran vigor en presencia del herbicida (Figura 10).

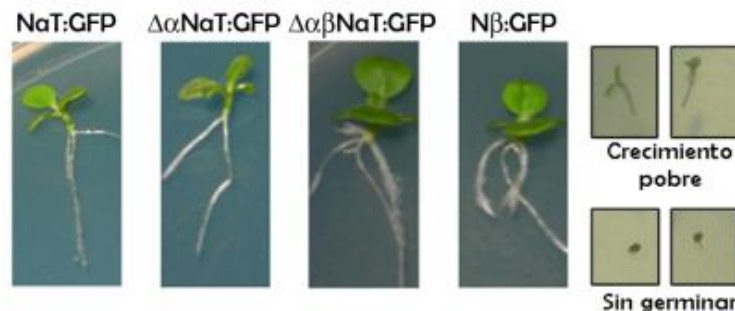


Figura 10. Plantas transgénicas T1 que expresan diferentes versiones de NaTrxh.

Plantas T1 de *N. tabacum* crecidas en medio de selección de Gamborgs + BASTA. En la derecha se notan aquellas plantas que no se desarrollaron en presencia del herbicida.

La evaluación de la plantas transgénicas T1 se realizó en raíces con el fin de evitar la autofluorescencia a 480 nm emitida por la clorofila de las hojas de *N. tabacum*.

Las raíces de las plantas transgénicas T1 seleccionadas por el herbicida BASTA, fueron evaluadas buscando la localización de la fluorescencia emitida por GFP. Los datos obtenidos se resumen en la figura 11. Las plantas T1 que expresaron la versión completa de la proteína de fusión NaTrxh:GFP y el motivo N β :GFP la fluorescencia se localizó en la periferia de las células de la raíz (Figura 11-a y d); en cambio en las versiones $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP y $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP, la fluorescencia se observó dentro de la célula (Figura 11-b y c). Estos resultados muestran de manera contundente que la expresión transitoria reportada previamente en hojas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana* de la construcción NaTrxh:GFP (Juárez-Díaz *et al.*, 2006) quien no afecta tampoco en *N. tabacum* la localización subcelular de NaTrxh. Asimismo, se encontró que la región amino terminal de Natrxh se encuentra la información responsable de la secreción de esta tiorredoxina. Sin embargo, las imágenes obtenidas no fueron del todo claras, por lo que se realizaron los experimentos en células de epidermis de cebolla.

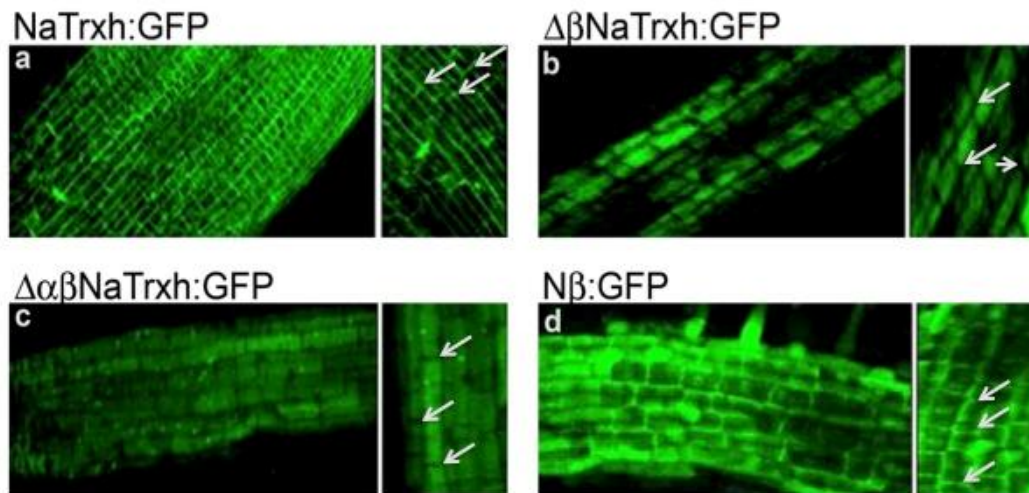


Figura 11. Raíces de líneas estables T1 de *N. tabacum* que expresan diferentes versiones de NaTrxh-GFP. a) Fluorescencia de NaTrxh:GFP, se encuentra presente en la periferia de las células. b) y c) Se observa la fluorescencia de $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP y de $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP respectivamente, en el citoplasma de la células d) La fluorescencia emitida por N β :GFP se observa también alrededor de las células como en (a). Las flechas señalan la región extracelular.

Transformación transitoria de diferentes versiones de NaTrxh:GFP en células de cebolla

La expresión transitoria en células de epidermis de cebolla proporciona las siguientes ventajas sobre el sistema de hojas de *N. benthamiana*: 1) Es una monocapa celular, lo que permite enfocar y ubicar mejor la fluorescencia en el tejido; 2) No tiene cloroplastos que puedan interferir con la emisión de la GFP; y 3) La plasmólisis de estas células deja ver claramente el espacio intercelular.

Las epidermis de cebolla fueron transformadas por biobalística según el protocolo de Scott *et al.* (1999); las construcciones que se utilizaron para transformar las epidermis de cebolla son las diferentes versiones de NaTrxh:GFP mostradas en la Figura 8. El control negativo consistió en bombardear las células sólo con partículas de tungsteno (Figura 12-A). Como control positivo, se utilizó la proteína estilar p11 de *N. alata*, la cual se secreta a la matriz extracelular del tejido de transmisión junto con otras proteínas estilares como la S-RNasa, NaTTs y 120K (Cruz-García *et al.*, 2005). En estos ensayos, la proteína p11 se expresó como una proteína de fusión con GFP. Como era de esperarse, la fluorescencia de Nap11:GFP se localizó en la periferia de las células previamente plasmolizadas (Figura 12-C). Cuando las células fueron transformadas con la proteína NaTrxh:GFP el patrón de fluorescencia fue igual al presentado por Nap11:GFP (Figura 12-D). En cambio, cuando se expresó únicamente la proteína GFP, la fluorescencia se observó en el citoplasma (Figura 12-B).

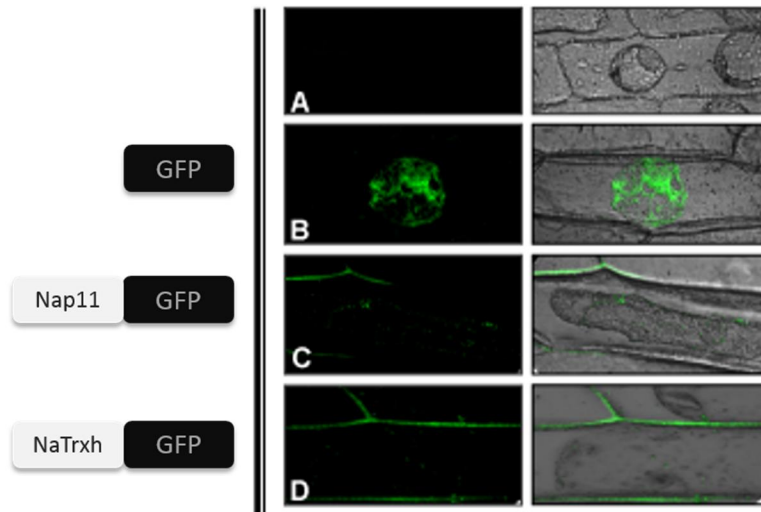


Figura 12. Expresión transitoria de NaTrxh-GFP en células de epidermis de cebolla. Células plasmolizadas con NaCl 1 M. Del lado izquierdo se representan las construcciones con las que se transformaron las células de cebolla. A: son células sin transformar plasmolizadas. B, C, y D, se observa la fluorescencia de GFP y su localización. La proteína Nap11:GFP es una proteína secretada a la matriz extracelular del tejido de transmisión de *N. alata*.

Los ensayos de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla han sido útiles para demostrar que la Trxh9 de *A. thaliana* y la proteína MpRCI inducida por frío en *Musa paradisiaca* se encuentran asociadas a la membrana plasmática (Feng *et al.*, 2009; Meng *et al.*, 2009). Los datos de este trabajo corroboran que la NaTrxh también se secreta en células de cebolla, un sistema diferente al tejido de transmisión del estilo de *N. alata* y de la epidermis de hojas de *N. benthamiana* y de *A. thaliana* (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). De esta manera, los resultados corroboran que la secreción de NaTrxh no es tejido ni especie dependiente, además validan la técnica de expresión transitoria de cebolla como un buen sistema para la evaluación de la secreción de proteínas.

La proteína NaTrxh no posee la información clásica para secretarse por la vía ortodoxa

La mayoría de las proteínas que son secretadas de la célula, se transportan a través del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. Esta ruta se le conoce como la ruta clásica de secreción (Schatz y Dobberstein, 1996; Lee *et al.*, 2004). Para ingresar en ella, es necesario que las proteínas contengan una señal peptídica altamente hidrofóbica en su extremo N-terminal, la cual será eliminada una vez que la proteína se integre al lumen del RE durante su traducción (Lee *et al.*, 2004).

El perfil de hidrofobicidad de la extensión N-terminal de la NaTrxh no es el común para clasificarla como péptido señal, ya que el resultado del análisis con el programa CLC Main (Workbench 6 <http://www.softpedia.es/programa-CLC-Combined-Workbench-36411.html>), indicó que los primeros 20 aminoácidos de NaTrxh no tienen un perfil hidrofóbico claro, lo cual sí se observó para la proteína Nap11 que se localiza extracelularmente en *N. alata* (Figura 13).

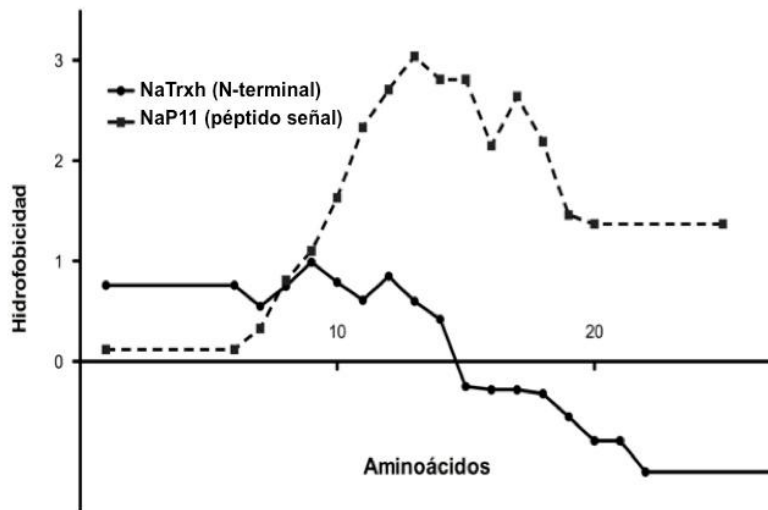


Figura 13. Comparación del perfil de hidrofobicidad entre el péptido señal de una proteína que se secreta vía RE/Golgi (Nap11) y la extensión N-terminal de NaTrxh. La línea discontinua representa el péptido señal de Nap11 conformado por 25 aminoácidos y la línea continua es la extensión N-terminal de NaTrxh. Claramente se observa que el péptido señal de p11 es más hidrofóbico que el extremo N-terminal de NaTrxh.

El programa de predicción de péptido señal, Signal P (Bendtsen *et al.*, 2004) se utilizó para establecer la probabilidad que tiene la extensión N-terminal de NaTrxh de funcionar como péptido señal. El programa utiliza dos parámetros para la predicción del péptido señal: 1) el perfil de hidrofobicidad y 2) la probabilidad que tiene la región N-terminal de las proteínas para ser eliminadas, es decir, el procesamiento del péptido señal.

El programa indica que Nap11 se procesa en la posición 22/23 con una probabilidad de 0.956, mientras que para la proteína NaTrxh predice un procesamiento entre los aminoácidos 16 y 17 con una probabilidad de 0.593, la cual es baja si nos referimos a la eliminación del péptido señal de cualquier proteína que se secrete por la vía RE/Golgi.

El análisis anterior deja ver que a pesar de que la proteína NaTrxh posee la información suficiente para su secreción, no contiene las características típicas para secretarse por la vía RE/Golgi.

El dominio interno N β dirige la secreción de NaTrxh

Para determinar la región responsable de la secreción de la NaTrxh, se realizaron ensayos de expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla con diferentes versiones de la NaTrxh fusionadas a GFP (Figura 6-B). Se utilizó como control positivo a la proteína de fusión Nap11:GFP y como control negativo a la proteína GFP. Los resultados de los ensayos dieron evidencia de que la extensión C-terminal no es la responsable de la secreción de la NaTrxh, ya que la fluorescencia emitida por la construcción NaTrxh Δ COO:GFP con la región del carboxilo terminal eliminada, se localizó en el apoplasto de las células previamente plasmolizadas, la cual es comparable con la localización de la señal de GFP conducida por la proteína extracelular Nap11 (Figura 12-C). Los datos de la Figura 14-B indicaron que la región N α no conduce a la secreción de la NaTrxh, dado que la fluorescencia de la proteína $\Delta\alpha$ NaTrxh:GFP se observó en la periferia de las células (Figura 14-B3). En cambio, la fluorescencia de las proteínas $\Delta\beta$ NaTrxh:GFP y $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh:GFP permaneció en el citoplasma (Figura 14-B5 y 14-B7), siendo este patrón de fluorescencia igual al control de localización en citoplasma de la GFP (Figura 12-B). Estos datos indicaron que la región responsable de la secreción de NaTrxh se encuentra en el extremo amino, particularmente en la región N β (Figura 14-B9). El resultado fue confirmado fusionando sólo el dominio N β al N-terminal de la proteína GFP y observando la fluorescencia en la periferia de las células epidérmicas de cebolla (Figura 14-B9). Por lo tanto, en conjunto, los resultados señalan claramente que el motivo AEAESGSSSEP o una secuencia dentro de este fue el responsable de que NaTrxh secrete de la célula.

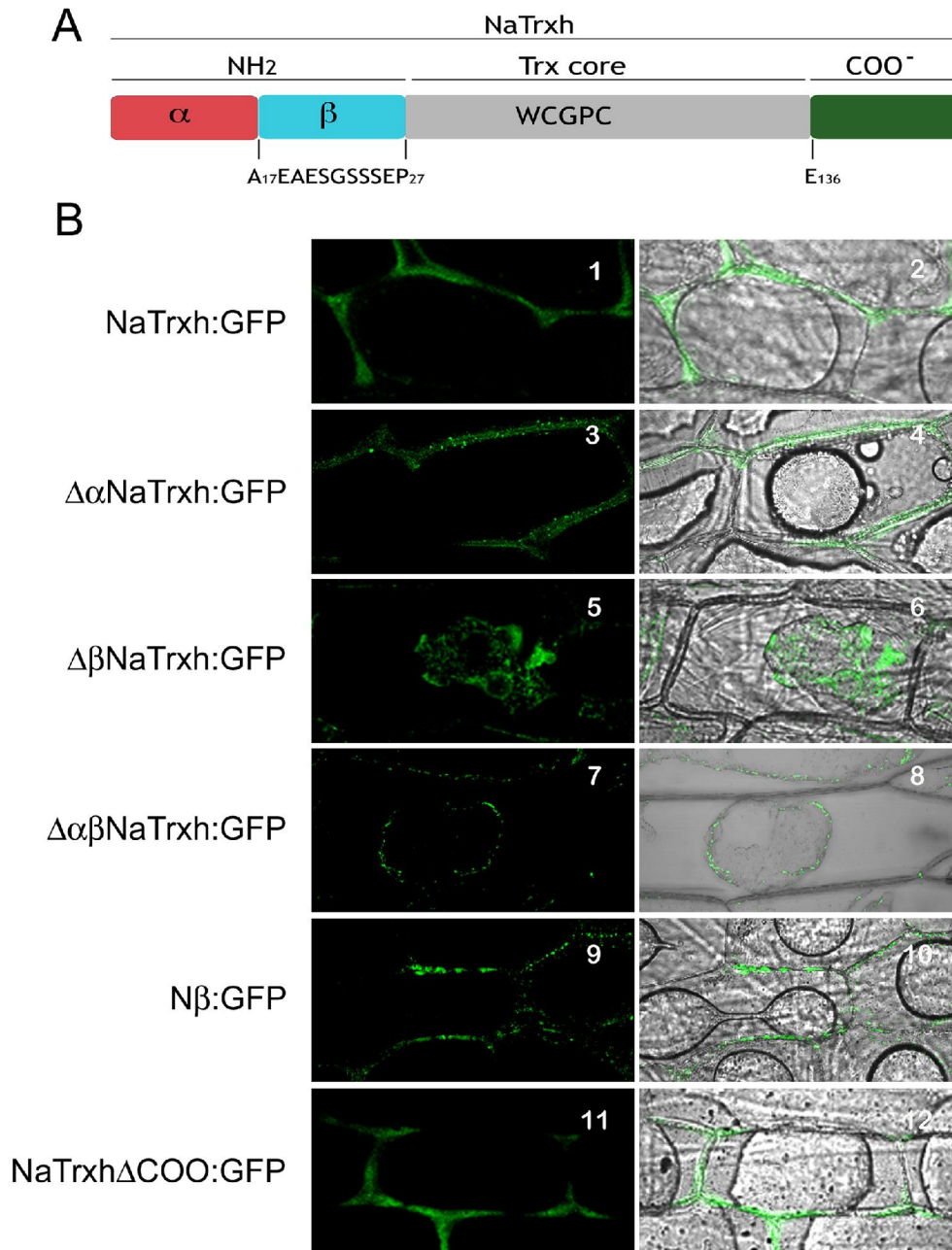


Figura 14. La señal de secreción de NaTrxh es AEAESGSSSEP y se encuentra en su región amino terminal. A) Esquema de NaTrxh; se marcan las dos regiones de la extensión N-terminal: en rojo N α (Met-1 a Ala-16) y en azul N β (Ala-17 a Pro-27). Se indica en gris el “core” de tiorredoxina con el sitio catalítico WCGPC y en verde se señala la extensión C-terminal. B) Expresión transitoria de las versiones de NaTrxh en células de epidermis de cebolla y plasmolizadas con NaCl 1 M; 1, 3, 5, 7, 9 y 11 fluorescencia de GFP a 480 nm, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 empalme de la fluorescencia de GFP y campo claro.

La NaTrxh utiliza el sistema endomembranoso para su secreción

Como se describió previamente, la ruta de secreción convencional que siguen tanto proteínas solubles como proteínas membranales para alcanzar el espacio extracelular es transitar a través del retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Sin embargo, existen proteínas que son secretadas, como la interleucina-1 β de monocitos humanos (Rubartelli *et al.*, 1991), galectinas 1 y 3 de eritrocitos (Lutomski *et al.*, 1997; Menon y Hughes, 1999), proteína que une acil-coenzima A (Acb1) de *S. cerevisiae* (Durán *et al.*, 2010) entre otras, que carecen de un péptido señal hidrofóbico en la región amino terminal que las dirija al RE.

El análisis realizado por Juárez-Díaz *et al.* (2006) utilizando el programa Secretome 1.0 Predictor indica que la NaTrxh es una proteína que se secreta por una vía no ortodoxa, es decir, que no transita por el RE/Golgi. Dado que el motivo AEAESGSSSEP (**N β**) es responsable de la localización extracelular de la NaTrxh y no posee las características fisicoquímicas típicas para alcanzar el RE, surgió la hipótesis de que NaTrxh podría ser secretada por una ruta no convencional. Para evaluar esta posibilidad, se diseñaron experimentos de expresión transitoria en células de epidermis de cebolla con proteínas de fusión con el motivo KDEL en el extremo carboxilo, la cual funciona como señal de retención en el RE (Capitani y Sallece, 2009). Las proteínas que se evaluaron fueron: La proteína completa NaTrxh:GFP(KDEL), sólo el dominio N β :GFP(KDEL) y Nap11:GFP(KDEL) como control, ya que es una proteína con péptido señal típico y cuya síntesis se completa en el RE (Figura 15-A).

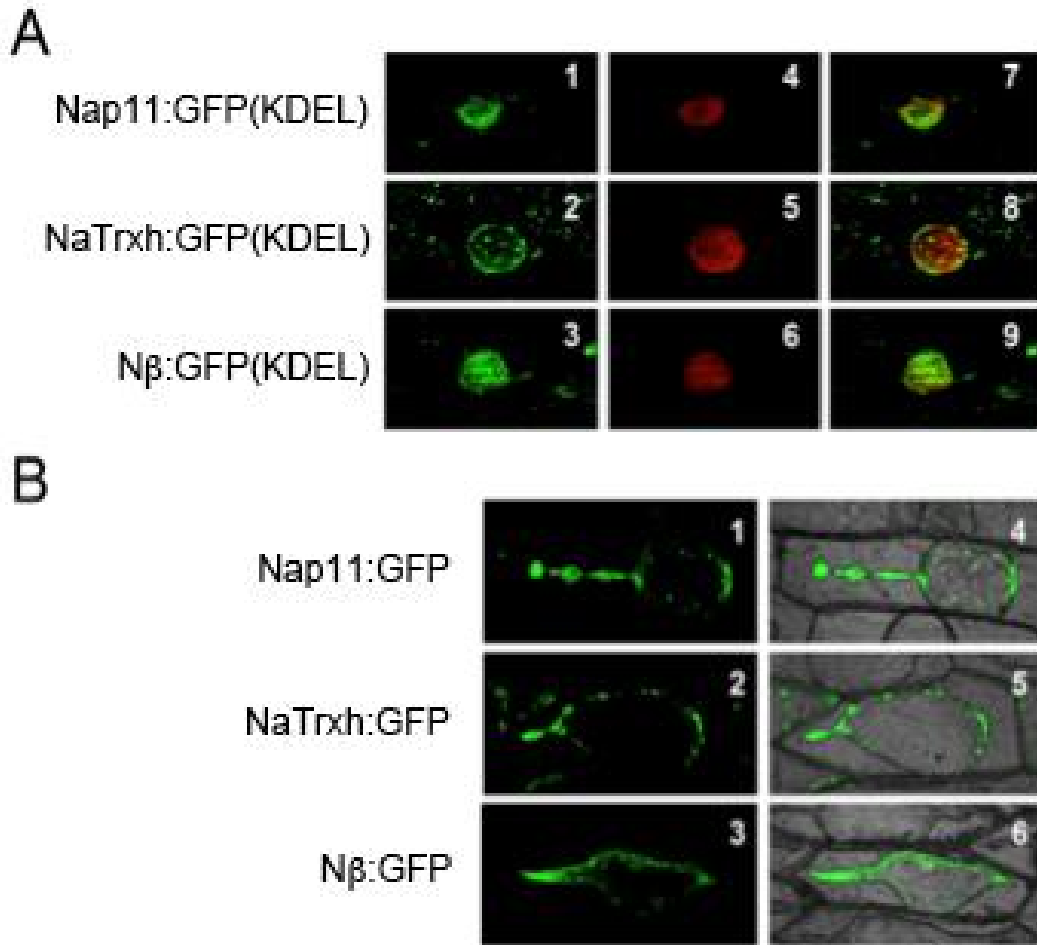


Figura 15. NaTrxh sigue la ruta del retículo endoplasmático y el aparato de Golgi para su secreción.
 A) Microscopía confocal de expresión transitoria en células de cebolla de Nap11:GFP (KDEL), NaTrxh:GFP(KDEL) y N β :GFP(KDEL); 1, 2 y 3 fluorescencia de GFP a 485/545nm (verde); 4, 5 y 6 tinción de núcleos con yoduro de propidio 570/670 nm (rojo); 7, 8 y 9 acoplamiento de las imágenes.
 B) Tratamiento con Brefeldina A previo la transformación con las construcciones p11:GFP, NaTrxh:GFP y N β :GFP expresadas en células epidérmicas de cebolla y plasmolizadas con NaCl. 1, 2 y 3 fluorescencia de GFP (verde) y 4, 5 y 6 acoplamiento de las imágenes en fluorescencia con campo claro.

Los resultados mostrados en la Figura 15, podrían sugerir que el motivo AEAESGSSSEP es una señal que dirige a las proteínas a RE. La fluorescencia emitida por la proteína Nap11:GFP(KDEL) se localizó alrededor del núcleo (Figura 15-A7). Este mismo patrón fue observado utilizando a las proteínas NaTrxh:GFP(KDEL) y N β :GFP(KDEL). Sin embargo, el resultado no es determinante para establecer que NaTrxh termina su traducción en el RE y que de ahí se dirige al aparato de Golgi en vesículas, ya que existen reportes de proteínas de secreción que se traslocan directamente del RE a la membrana plasmática evadiendo el Golgi, tales como la proteína de levadura Ist2 (Jüschke et al., 2005; Franz et al., 2007).

Para conocer si NaTrxh también se asocia al sistema endomembranal, se realizaron ensayos tipo Western-blot con extractos proteicos totales y una fracción microsomal de estilos de *N. alata*. Los resultados mostraron que la proteína NaTrxh se detecta en ambas fracciones, aunque enriquecida en la fracción microsomal (Figura 17), coincidiendo y reforzando los resultados de expresión transitoria en células epidérmicas de cebolla que indican que la NaTrxh, en su camino hacia el exterior de la célula, se integra al sistema endomembranoso.

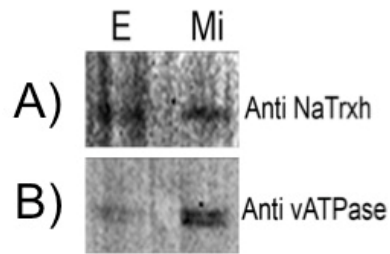


Figura 17. Inmunodetección de NaTrxh en la fracción microsomal. Fraccionamiento celular de estilos de *N. alata*. E. Proteínas totales, Mi. Fracción microsomal. Panel (A) NaTrxh se identifica en ambas fracciones. Panel (B) predominantemente se identifica a la vATPase en la fracción microsomal.

Las extensiones de la NaTrxh son regiones de alta movilidad y pueden funcionar como dominios de interacción proteína-proteína

Se ha establecido que las extensiones de las tiorredoxinas *h* tienen un carácter funcional y específico. En el trabajo de esta tesis se determinó que la extensión N-terminal de la NaTrxh funciona como una señal para su secreción. Sin embargo, otra hipótesis sobre las funciones de las extensiones N- y C-terminales de la NaTrxh, es la de servir como dominios de interacción con otras proteínas. En el trabajo de Zavala-Castillo (2006), se obtuvo la estructura tridimensional de NaTrxh utilizando el método de homología comparativa utilizando el programa Rosetta-HMMer (Martínez-Castilla y Rodríguez-Sotres, 2010) encontrándose que NaTrxh tiene homología con la tiorredoxina *h* HvTrxh2 de *Hordeum*. El modelo que se obtuvo de NaTrxh además de mostrar la conservación del “core” con la tiorredoxina de *E. coli* y con HvTrxh2, mostró que las regiones N-terminal y C-terminal mantienen una estructura ordenada y se pliegan sobre la superficie del “core”, indicando que las extensiones de NaTrxh tienen contacto con el solvente y/o se presentan expuestas y listas para la interacción con otras proteínas (Figura 18).

Para establecer el potencial que tienen las extensiones de la NaTrxh como dominios de interacción, se realizó un análisis de regiones desordenadas. El análisis se hizo con el programa DiSEMBL (Bendtsen *et al.*, 2004b) el cual, predice las regiones desordenadas utilizando tres algoritmos: *Hot loops*, *Remark-465* y *Loops/coils*. Asimismo, el análisis fue cotejado con la dinámica molecular, en donde se muestran las regiones que tardaron mayor tiempo en establecer su estructura tridimensional y por ello, son regiones con mayor vibración (Figura 18-D y E). Los métodos anteriores de análisis indicaron que las extensiones de la NaTrxh son zonas de alto desorden (Figura 18). Para la región N-terminal se observaron dos regiones de mayor movilidad, una que abarca los primeros 10 aminoácidos y una segunda que abarca desde el aminoácido 15 hasta el 28. En esta zona se encuentra la secuencia AESGSSSEP que es el motivo responsable de la secreción de NaTrxh.

Por otro lado, otra de las regiones altamente móviles identificada correspondió a la extensión C-terminal que abarca los aminoácidos 133 hasta el 152 (Figura 18 -A, B, C y D zona punteada). Estos análisis sugieren que las extensiones N- y C-terminales de la NaTrxh son zonas con alto potencial de interacción con otras proteínas.

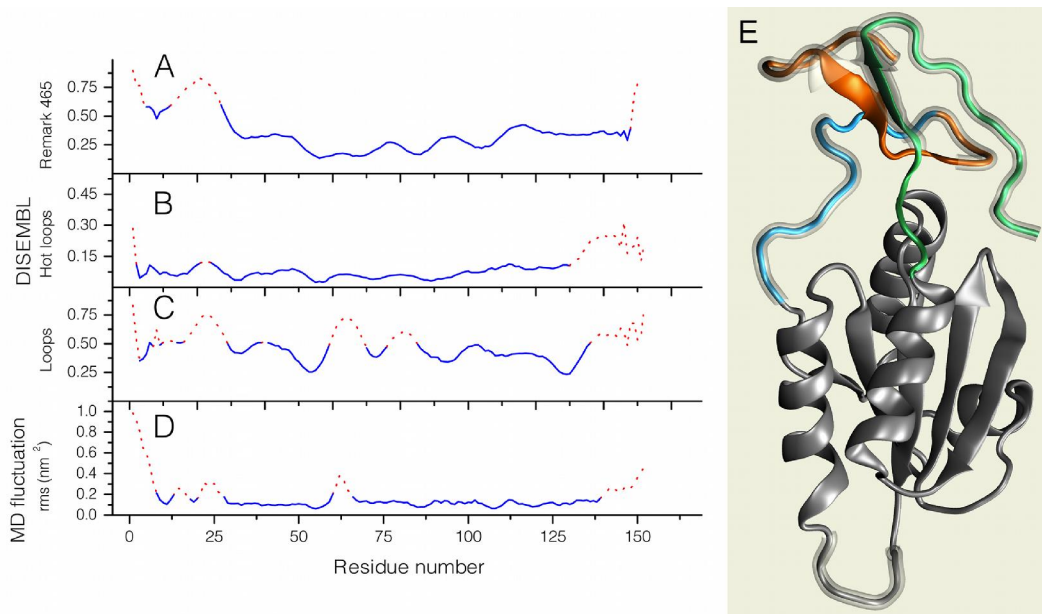


Figura 18. Evaluación de las regiones desordenadas de NaTrxh. Con el programa DiSEMBL y dinámica molecular se predijeron las regiones desordenadas (líneas punteada). El programa DiSEMBL utiliza tres diferentes redes neuronales: A. Remark 465; B. Hot-loops y C. Loops/coils; D. Corresponde a las regiones con mayor fluctuación de acuerdo a la dinámica molecular. E. Modelo tridimensional de NaTrxh. En gris se aprecia el “core” de la proteína, en azul-anaranjado se presenta la extensión N-terminal de NaTrxh, en verde corresponde a la extensión C-terminal. Las regiones sombreadas señalan la movilidad según los análisis anteriores.

La extensión C-terminal es la región responsable de la interacción con la S-RNasa

Una vez obtenidas las evidencias en favor de que las extensiones amino y carboxilo terminal de NaTrxh estaban expuestas al solvente y de que tenían el potencial de participar en la interacción con otras proteínas, se evaluó si la S-RNasa, una proteína que previamente reportamos que interacciona con NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), lo hacía a través de algunas de estas extensiones. Para explorar esto, se realizaron ensayos de reconocimiento proteína-proteína basados en cromatografía de afinidad usando diferentes versiones de NaTrxh fusionadas a GST. Las proteínas recombinantes GST: $\Delta\alpha$ NaTrxh, GST: $\Delta\beta$ NaTrxh, GST: $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh y GST:NaTrxh Δ COO fueron sobreexpresadas en *E. coli*.

En primera instancia se evaluó si la fusión a GST afectaba la actividad reductora de NaTrxh sobre la insulina. En la Figura 19-A se observa que las proteínas de fusión GST: $\Delta\alpha$ NaTrxh, GST: $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh y GST:NaTrxh Δ COO se acumularon en la fase soluble, lo que indicó que estas proteínas mantuvieron su estructura tridimensional y actividad, ya que fueron capaces de reducir los dos puentes disulfuro de la insulina (actividad de tiorredoxina, Figura 19-B) (Holmgren, 1979). Sin embargo, la proteína GST: $\Delta\beta$ NaTrxh, sin el motivo N β , se acumuló en la fase insoluble, razón por la cual no se midió su actividad de tiorredoxina, indicando con ello que este motivo es importante para el correcto plegamiento de NaTrxh (Figura 19-A).

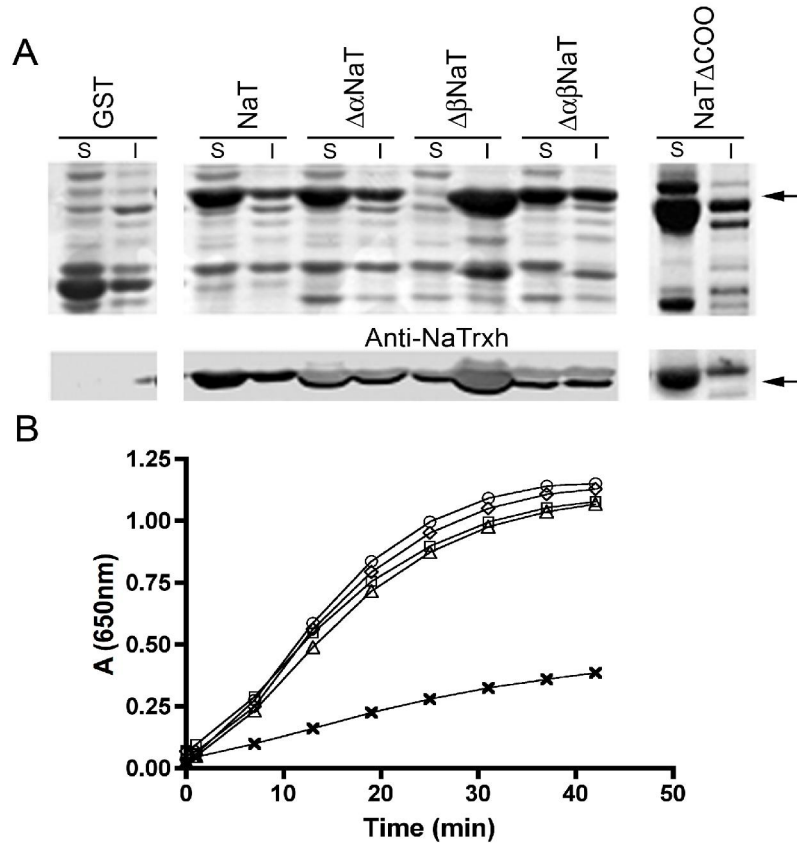


Figura 19. Actividad reductora de diferentes versiones de NaTrxh fusionadas a GST. A. Panel superior, análisis por SDS-PAGE de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes fusionadas a GST en *E. coli*, S-fracción soluble, I-fracción insoluble, GST- glutatión S-transferasa, NaT-NaTrxh, $\Delta\alpha$ NaT-NaTrxh sin el dominio N α , $\Delta\beta$ NaT-NaTrxh sin el dominio N β , $\Delta\alpha\beta$ NaT-NaTrxh sin la extensión N-terminal y NaT Δ COO-NaTrxh sin la extensión C-terminal. Panel inferior, ensayo de réplica tipo Western en donde se identifican las proteínas NaTrxh con el anticuerpo anti-NaTrxh. B. Ensayo de actividad de tiorredoxina utilizando como donador de electrones al DTT según Holmgren (1979); estrellas-actividad de DTT (control); triángulos-NaTrxh Δ COO; círculos NaTrxh; rombos $\Delta\alpha$ NaTrxh; cuadros $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh.

Para evaluar si las extensiones N- y/o C-terminal jugaban un papel importante en la interacción entre la S-RNasa y NaTrxh, se realizaron cromatografías de afinidad utilizando las proteínas previamente sobreexpresadas (GST:NaTrxh, GST: $\Delta\alpha$ NaTrxh, GST: $\Delta\beta$ NaTrxh, GST: $\Delta\alpha\beta$ NaTrxh y GST:NaTrxh Δ COO) como ligando. Las proteínas recombinantes fueron unidas covalentemente a una matriz de glutatión sepharosa, y fueron puestas en contacto con extractos de proteínas totales de estilos de *N. alata*. En la Figura 20 se observa que la S-RNasa es retenida con alta afinidad cuando la proteína NaTrxh se encuentra completa, es decir con ambas extensiones, ya que eluyó de la columna después de aplicar una solución con 200 mM de NaCl (Figura 20A). Notablemente, cuando se eliminaron las regiones α y β de NaTrxh, la S-RNasa siguió interaccionando con NaTrxh, aunque en menor medida, ya que la

cantidad de S-RNasa que se retuvo en la columna de afinidad fue menor, sobretodo para la versión de NaTrxh que carece de ambas regiones (α y β) (Figuras 20 B y C). No obstante, cuando se eliminó la región carboxilo terminal, la unión de la S-RNasa con la NaTrxh fue totalmente abatida, lo que sugiere fuertemente que la extensión carboxilo terminal de NaTrxh es esencial para la interacción con la ribonucleasa S (Figura 20 D).

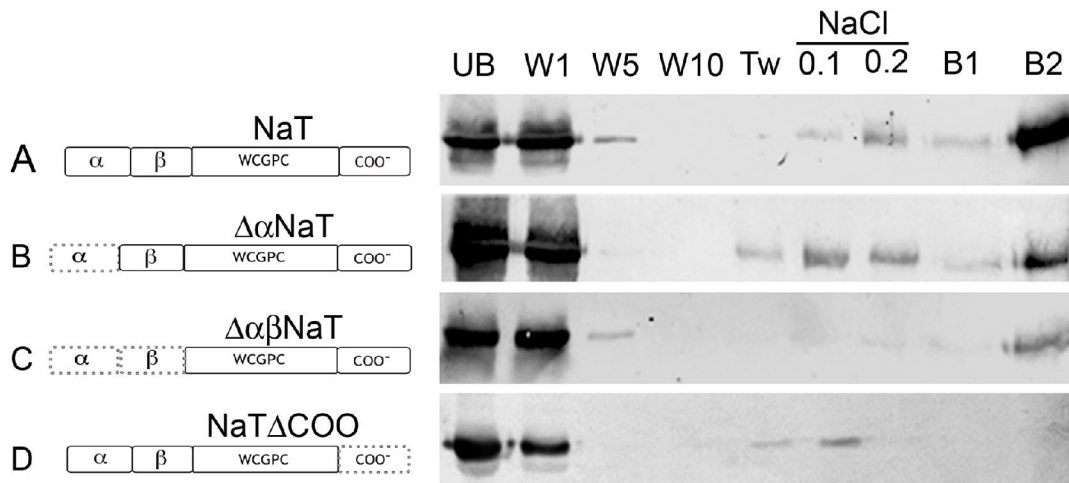


Figura 20. Las extensiones de NaTrxh contribuyen a la interacción NaTrxh:S-RNasa. Ensayos de pull down utilizando columnas con diferentes versiones de NaTrxh unidas a la matriz. Las líneas punteadas indican las regiones eliminadas. Extractos crudos estilares de *N. alata* fueron pasados a través de cada columna. UB: fracción no unida, W1, W5 y W10: número de lavados 1, 5 y 10, respectivamente, con amortiguador (50 mM Tris, pH 7.9 + 50 mM NaCl); Tw: solución amortiguadora (Tris pH 7.9 + 0.1% de Tween-20); NaCl 0.1 y 0.2: lavado con 50 mM Tris, pH7.9 + 100mM y 200mM de NaCl respectivamente; B1 y B2: fracciones unidas eluidas con solución amortiguadora (50 mM glicina + 50 mM de NaCl pH 2.6)

Discusión

La NaTrxh es una tiorredoxina *h* que pertenece al subgrupo II de la clasificación propuesta por Gelhaye *et al.* (2004). Las tiorredoxinas del subgrupo I y del subgrupo II poseen extensiones hacia los extremos tanto amino como carboxilo (Figura 5). El análisis de la estructura primaria de estas tiorredoxinas no ha revelado dominios característicos que permitan determinar una funcionalidad generalizada de estas extensiones. De manera contraria, la variabilidad de secuencias y la diferencia de tamaño (Figura 5), sugieren que estas zonas contribuyen de manera específica a su función (Gelhaye *et al.*, 2004). De esta manera, el objetivo de esta investigación estuvo enfocado a determinar la función de las extensiones presentes en la proteína estilar NaTrxh en su secreción y en la interacción física con otras proteínas.

Extensión N-terminal de NaTrxh

Los ensayos realizados en este trabajo describieron que la región extendida, N-terminal de NaTrxh es necesaria para su localización subcelular, en particular, se encontró un motivo denominado N β que es necesario y suficiente para dirigir la localización de la tiorredoxina al apoplasto. Anteriormente, Juárez-Díaz *et al.* (2006) reportaron que NaTrxh era una tiorredoxina *h* con la información suficiente para su secreción, a pesar de no contar con un péptido señal ortodoxo. Los ensayos de la expresión de las diferentes versiones de la tiorredoxina tanto en líneas estables de *N. tabacum* (Figuras 7 y 10), como de expresión transitoria en células epidermis de cebolla plasmolizadas (Figuras 11 y 13-B), confirmaron la capacidad que posee NaTrxh para secretarse. Resultados similares con la tiorredoxinas *h* de *A. thaliana* (AtTrxh9), la de arroz (OsTrxh) y la de *P. tremula* (PtTrxh2) confirmaron que la extensión N-terminal juega un papel esencial en la localización subcelular de estas tiorredoxinas (Ishiwatari *et al.*, 1995 y 1998; Meng *et al.*, 2009), ya que la eliminación de la extensión N-terminal en OsTrxh interrumpe su transporte vía plasmodesmos (Ishiwatari *et al.*, 1995 y 1998). En cuanto a PtTrxh2, su localización cambia de mitocondria a citoplasma si se elimina su región N-terminal (Gelhaye *et al.*, 2002). En especial, la tiorredoxina AtTrxh9 parece contener señales para su modificación postraduccional de tipo miristoilación (adición

de un grupo lipídico miristoil 14:0), la mutación de la Glicina 2 por Alanina elimina la asociación de la AtTrxh9 a la membrana plasmática (Meng *et al.*, 2009). NaTrxh posee una Glicina en la posición dos, el programa (<http://ca.expasy.org/tools/myristoylator>), indica con un “score” de 0.990 que esta glicina podría sufrir modificaciones postraduccionales de tipo miristoilación, al igual que en la proteína AtTrxh9. Si NaTrxh es capaz de miristoilarse y con ello asociarse al sistema endomembranoso, no es extraño que NaTrxh se inmunodetecte en la fracción microsomal de proteínas estilares como se observa en la Figura 17. De igual manera, la microscopia electrónica de transmisión identifica a la NaTrxh en estructuras membranales (ver artículo). Sin embargo, es difícil definir cual podría ser la función específica de esta miristoilación, dado que es una modificación que se realiza durante la síntesis de proteínas, lo que indicaría que puede estar relacionada con la asociación a la membrana del retículo endoplásmico. No obstante, los ensayos de expresión transitoria con la versión $\Delta\alpha$ NaTrxh:GFP dejan ver que esta modificación no afecta la localización en la membrana plasmática de NaTrxh (Figura 14B-3), por lo tanto, esta señal postraducciona no participa directamente en la secreción de NaTrxh. Con todo lo anterior, se torna de manera muy importante definir si NaTrxh es capaz de miristoilarse y las implicaciones funcionales de esta modificación, cómo afecta su localización, su secreción o bien, cómo afecta la función en el sistema de autoincompatibilidad.

El motivo N β es una señal atípica de secreción que conduce el transporte de NaTrxh por la vía RE-Golgi

Las proteínas citoplasmáticas que serán secretadas de la célula y aquellas con localización en la membrana plasmática, generalmente completan su traducción en el retículo endoplasmático. Posteriormente, son modificadas en el Golgi-TGN (Transgolgi network) hasta llegar a su destino. Esta sucesión de eventos se le conoce como “vía de secreción clásica o convencional” (CPS en inglés ó VSC). Desde hace 25 años se dieron a conocer las vías de secreción no convencionales (UPS por sus siglas en inglés). Sin embargo, en los últimos años se ha revelado el secretoma de plantas, el cual indica que mas del 70% de las proteínas que serán secretadas utilizan vías alternas a la vía de secreción convencional (Ding *et al.*, 2014) dejando en entre dicho el grado de universalidad de esta vía. Estas proteínas son de importancia fundamental, se encuentran involucradas en la supervivencia inmune y celular,

así como en el desarrollo y diferenciación celular. Actualmente, se ha reportado sobre diferentes vías de secreción no convencionales, que incluyen a las plantas. Estas se clasifican en cuatro mecanismos (Nickel y Seedorf, 1992; Nickel y Rabouille, 2009; Ding *et al.*, 2014):

- Tipo I.- Son aquellas proteínas que NO poseen un péptido señal ortodoxo y que son insensibles a la toxina fúngica BFA. Por ejemplo, la secreción inducida por el ataque de patógenos es independiente del Golgi de la manitol deshidrogenasa, la cual es una enzima simplástica (Cheng *et al.*, 2009).
- Tipo II. Aquellas vías que implican la compartimentalización de las proteínas en algún punto del camino hacia la membrana plasmática. Estas proteínas poseen un péptido señal típico, el cual es procesado una vez que se alcanza el RE; sin embargo, llegan a la superficie celular de manera independiente a vesículas COPI y al aparato de Golgi. En plantas, este mecanismo se ha descrito en la fusión vacuolar a la membrana plasmática como respuesta de defensa contra patógenos. En levaduras, se ha descrito en la proteína Ist2, la cual alcanza la membrana plasmática a través de un mecanismo de traslocación entre las regiones corticales del RE y la membrana plasmática (Jüschke *et al.*, 2005). Otro ejemplo lo conforman las α -integrinas que se secretan por una vía independiente del Golgi en células epiteliales de *Drosophila* (Schotman *et al.*, 2008).
- Tipo III.- Es un mecanismo descrito en plantas que consiste en la secreción a través de cuerpos multivesiculares (MVS) y los conformados por organelos de doble membrana EXPO (exocyst-positive organelle) (Ding *et al.*, 2014).
- Tipo IV.- Es una vía no vesicular, la siguen proteínas que carecen de péptido señal y son secretadas independientemente al RE y Golgi (Nickel y Rabouille, 2009). Entre ellas se encuentra el mitógeno FGF-2, que participa en la angiogénesis, no posee péptido señal y tampoco se integra a ningún tipo de vesícula. Notablemente, los sitios de unión de FGF-2 a la membrana son determinados por proteoglicanos *heparan sulfato* (HSPG's), los cuales se requieren para la exportación de FGF-2 de las células (Zehe *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que FGF-2 cruza la membrana por un mecanismo de difusión controlado que puede ser mediado por un transportador proteico o por la capacidad de FGF-2 de cruzar independientemente la membrana plasmática (Zehe *et al.*, 2006). Otros ejemplos son enzimas que degradan insulina, las

interleucinas IL-1b y IL-18 y algunas proteínas de levadura que no tienen péptido señal.

La inquietud de conocer la señal que conduce a la secreción de NaTrxh y el mecanismo que lleva a la tiorredoxina al apoplasto fue creciente. La información hasta ese momento sólo se centraba en el reporte de Juárez-Díaz *et al.* (2006) que sugería que la secreción de NaTrxh se llevaba a cabo por mecanismos no convencionales de secreción. Sin embargo, Los datos generados en células de epidermis de cebolla indican que NaTrxh se conduce por el RE (Figura 15). Esto se corroboró con las construcciones de NaTrxh:GFP (KDEL) que contienen la señal de retención a RE (KDEL) y presentaron un patrón de fluorescencia idéntica a la proteína control Nap11:GFP(KDEL), la cual posee péptido señal y sigue la vía de secreción clásica RE/Golgi (Figura 15-A). La fluorescencia de NaTrxh:GFP:KDEL se detecta rodeando al núcleo marcado con yoduro de propidio. Esta señal es la misma para Nap11:GFP:KDEL, con ello se descartó de inmediato la posibilidad de que la NaTrxh se condujera por mecanismos UPS del tipo IV. De igual manera, los ensayos de expresión transitoria con las construcciones NaTrxh:GFP, N β :GFP y de Nap11:GFP y el tratamiento de las células epidérmicas de cebolla tratados la toxina fúngica BFA (inhibe el reclutamiento de la proteína ARF1, la cual es indispensable en la formación y el transporte de vesículas tipo COPI que siguen la ruta Golgi-membrana plasmática. Helms y Rothman, (1992) revelaron que la secreción de NaTrxh es inhibida por BFA indicando que NaTrxh se transporta a través del Golgi y en vesículas tipo COPI (Figura 15-B), con esto se descarta cualquier otro tipo de mecanismo UPS.

Los resultados indicaron que la NaTrxh utiliza elementos de la vía clásica de secreción (VSC). Para integrarse a esta vía, las proteínas requieren la presencia de un péptido señal en el N-terminal altamente hidrofóbico (Lee *et al.*, 2004). Los programas de predicción de péptido señal no indican que la extensión N-terminal de NaTrxh tenga las características hidrofóbicas de un péptido señal (Juárez-Díaz *et al.*, 2006). En este trabajo se encontró que el motivo responsable de la localización de NaTrxh al apoplasto, se asocia a la secuencia A₁₇EAESGSSSEP₂₇ y, se le denominó N β (Figura 14). La comparación de las características entre el motivo N β y el péptido señal de Nap11, muestran claramente que N β no corresponde a una señal de secreción típica, ya que por un lado, es un motivo interno en la secuencia polipeptídica de NaTrxh (Figura 14-A) y por el otro, los residuos de aminoácidos

que lo componen, no son hidrofóbicos (Figura 13). Este dato es revelador dado que es el primer reporte que indica de la presencia de un péptido señal con estas características irregulares.

El motivo N β promueve la secreción de la proteína GFP (N β :GFP) indicando que es necesario y suficiente para localizar a la proteína citoplásmica GFP al exterior celular (Figura 14B-9). Asimismo, la proteína N β :GFP:KDEL es capaz de retenerse en el RE. Es claro entonces, que el motivo N β es suficiente para la secreción de NaTrxh y además es capaz de conducir a la NaTrxh al RE. La pregunta que surge entonces es: ¿Cómo lo hace? Esta reportado (Schatz y Dobberstein, 1996; Lee *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2014) que para integrarse a la vía VSC, las proteínas requieren la presencia de un péptido señal hidrofóbico en el N-terminal (Lee *et al.*, 2004), lo cual es una característica importante para ser reconocida por la proteína SRP (*Signal-Receptor Particle*), que circula entre el citoplasma y el RE (Keenan *et al.*, 2001). La SRP junto con el péptido señal se une al receptor de SRP-translocón, los cuales se encuentran en la membrana del RE. De esta manera, la proteína reconocida por SRP se integra al RE, donde además se elimina el péptido señal de ella (Keenan *et al.*, 2001). Este mecanismo es conocido como vía SRP (Cross *et al.*, 2009). Por lo que se abren interrogantes sobre la incorporación de NaTrxh al RE cómo si es posible que la región N β sea una señal reconocida por la proteína SRP o existe un mecanismo no descrito que transloque a la proteína completa NaTrxh al RE.

La vía SRP fue descrita por primera vez en células de mamíferos alrededor de los años 80's, posteriormente, se identificó que esta vía esta altamente conservada, ya que es posible identificar homólogos tanto de la SRP como de su receptor en todas los niveles taxonómicos analizados. La vía esta descrita por dos eventos principales: 1) reconocimiento del péptido señal por la SRP y 2) la translocación de la proteína al lumen del RE o bien a la membrana plasmática de bacterias. Se han descrito dos mecanismos SRP, uno puede llevarse acabo cotraduccionalmente (generalmente con proteínas integrales de membrana) y el otro, postraduccionalmente (proteínas citoplasmática que serán secretadas) (Cross *et al.*, 2009). En plantas superiores y en microalgas, se encontró que la vía SRP en cloroplastos (cpSRP) opera para optimizar la conversión de luz natural en energía (*Truncated Light-harvesting chlorophyll antenna* o TLA). Este sistema pertenece al ensamblaje de los complejos en la

membrana tilacoidal (Kist y Melis, 2014), mostrando que la vía SRP se conserva con ciertas modificaciones en plantas.

Típicamente, el péptido señal es extremadamente degenerado. En general consiste en una región amino terminal básica (región N), un core de 7-12 aminoácidos (región H) y una región polar (región C); La diferencia en el grado de hidrofobicidad le permite indicar la naturaleza de la proteína, ya sea una proteína integral de membrana o una proteína citoplásmica que será secretada. En bacterias, los péptidos señal pueden ser hasta de 50 aminoácidos (Peterson *et al.*, 2003). Estos péptidos señal poseen regiones N extendidas como el caso de las proteínas autotransportadoras (Peterson *et al.*, 2006). El motivo N β no tiene ninguna de estas características y la presencia de un motivo interno con característica poco hidrofóbicas y que le confiere a las proteínas la capacidad de transportarse al RE, sugiere la presencia de un mecanismo de reconocimiento de tipo SRP novedoso o bien, un mecanismo con elementos independientes que no se han identificado aún. Sin embargo, la presencia de un motivo N β en las bases de datos de proteínas de levaduras y mamíferos no fue encontrada, sugiriendo que el motivo N β , como señal de secreción, es un evento que apareció una vez que las plantas divergieron de otros eucariontes como las levaduras y los mamíferos. A pesar de ello, la búsqueda del motivo N β en las plantas no dio resultados alentadores, aunque sí esta presente en dos tiorredoxinas de soya (Figura 16). El alineamiento de las dos tiorredoxinas de soya con la NaTrxh indica que las tiorredoxinas de soya tienen una región muy similar a la encontrada con N β (Figura 16). Las tiorredoxinas de soya que cuentan con el motivo N β , también tienen una extensión N-terminal, y su localización está fuertemente asociada a la membrana plasmática (Shi y Bhattacharyya, 1996)(Figura 16). Otra de las características de los péptidos señales convencionales que son identificados por una proteína SRP, es que son señales que se procesan, los estudios que relacionan las extensiones N-terminal con la localización de las tiorredoxinas h de *O. sativa* (RPR13) y *P. tremula* PtTrxh2 no indican que estas regiones sean eliminadas; sin embargo, el programa secretome 1.0 predictor indica con un score 0.874 que NaTrxh se procesa entre la A₁₆ y la A₁₇ (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), ¿Es probable entonces que las extensiones N-terminal de las tiorredoxinas h tipo II sean péptidos señales atípicos? Y ¿la región N-terminal de NaTrxh se procesa? La respuesta a estas preguntas darían información sobre las vía que conducen a NaTrxh al RE-Golgi.

Con la finalidad de conocer si el motivo N β tenía la capacidad de interactuar con proteínas que coadyuvaran a la translocación de NaTrxh al RE, se realizó el análisis de las regiones desordenadas (RMV) de NaTrxh. Este análisis indicó que las zonas de mayor desorden correspondieron a los extremos N- y C-terminales de la NaTrxh, en especial el asa conformada por los amino ácidos 12 al 27, de acuerdo a la base de datos DiSEMBI y a la dinámica molecular. Este “loop” lo forma el dominio N β y dado que los RMV se definen como probables regiones de interacción proteína-proteína, se sugiere que el motivo N β puede ser una región con potencial para interactuar con algunas proteínas como SRP o bien una proteína diferente tipo chaperona como el *Trigger factor* (TF) de bacterias (Ullers *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2006). Si N β interactúa con una chaperona tipo TF puede dirigir el tránsito de NaTrxh a través del RE por un mecanismo no descrito en eucariontes.

Extensión C-terminal de NaTrxh

La región C-terminal es un dominio de interacción con proteínas estilares

De manera contraria a la extensión N-terminal, la región C-terminal de NaTrxh no contribuye en la localización extracelular de la proteína. En los ensayos de expresión transitoria, la mutante NaTrxh Δ COO:GFP no se observa en el apoplasto, es decir la ausencia del extremo carboxilo no afecta la secreción de la NaTrxh (Figura 14B-11 y 13B-12). Por lo tanto, es claro señalar que la presencia de solo una región adicional en el extremo amino al “core” de las tiorredoxinas *h*, permite dirigir su localización subcelular y con ello su función en la célula.

La participación de la NaTrxh en el sistema de auto-incompatibilidad de *N. alata*, fue propuesta por Juárez-Díaz *et al.* (2006), al reportar que la NaTrxh interactúa y reduce específicamente a la S-RNasa. Los experimentos de *pull down* que se realizaron en este trabajo, mostraron que la región responsable de la interacción entre estas dos proteínas es la extensión C-terminal de la NaTrxh, la cual se conforma por los aminoácidos E-136 al Q-152 (Figura 20-D). De acuerdo a los ensayos de localización, la región C-terminal de la NaTrxh no

es importante para su secreción (Figura 14-B11), aunque no se descarta la posibilidad de que la S-RNasa, la cual es una proteína que se secreta en el tejido de transmisión estilar, sea elemento que conduzca y ayude en la secreción de NaTrxh. Por otro lado, la región C-terminal tampoco es importante en la actividad de tiorredoxina como en el caso de la AtTrxh9 (Meng *et al.*, 2009) (Figura 19-B) donde el extremo C-terminal de AtTrxh9 forma una especie de bisagra que cubre el sitio activo; La proteína recombinante NaTrxh Δ COO parece plegarse correctamente (Figura 19-A) y además es capaz de reducir los puentes disulfuro de la insulina (Figura 19-B). Sin embargo, en la tiorredoxina AtTrxh3 se ha detectado una región entre los aminoácidos A₁₀₀-A₁₀₆ (AKEEIIA) importante en la termoestabilidad de la proteína, así como en la capacidad para funcionar como chaperona (Jung *et al.*, 2013), indicando que la región C-terminal de las tiorredoxinas confiere otras propiedades. Los datos generados en este trabajo nos llevan a proponer que el complejo S-RNasa-NaTrxh esta relacionado directamente con la respuesta de auto-incompatibilidad de *N. alata*.

¿Es NaTrxh esencial en el sistema de incompatibilidad de *N. alata*?

La expresión espacio-temporal de las tiorredoxinas ha asociado a estas proteínas con estructuras reproductivas. Por ejemplo, las tiorredoxinas AtTrxh1, AtTrxh4 y AtTrxh5 se expresan en el polen y/o en el tubo polínico (Traverso *et al.*, 2013). Asimismo, en *Brassica* y en *N. alata* las tiorredoxinas *h* se han asociado a la respuesta del rechazo del polen (Cabrillac *et al.*, 2001; Ivanov y Gaude., 2009).

La S-RNasa es la determinante femenina en el sistema de auto-incompatibilidad de *N. alata* (McClure *et al.*, 1989); forma complejos con otras proteínas estilares como: 120K, Nap11, NaTTs (Cruz-García *et al.*, 2003), siendo 120k indispensable para que funcione el sistema de auto-incompatibilidad (Hancock *et al.*, 2005). La localización extracelular de NaTrxh y la interacción con la S-RNasa permite proponer varios escenarios: 1) que NaTrxh se una al complejo a través de la S-RNasa en el tejido de transmisión del estilo y lo conduzca hacia su encuentro con el tubo polínico, 2) dentro del tubo polínico, conduzca, probablemente por la reducción de la S-RNasa, la liberación del complejo y 3) el control del estado redox de la S-RNasa se encuentre directamente relacionado con su estabilidad o afecte su actividad de ribonucleasa.

La proteína NaTrxh tiene gran similitud a nivel de secuencia y estructura con la tiorredoxina de *H. vulgare*. Dado que la tiorredoxina de cebada ya está cristalizada se utilizó como andamio para la predicción de la estructura tridimensional de NaTrxh. Lo más interesante es que una de las proteínas blanco de la tiorredoxina de cebada es un inhibidor de subtilisina (Bernal-Lugo y Cruz-García, no publicado). Uno de los genes modificadores del sistema de incompatibilidad (SI) de *N. alata* es la proteína NaStEP, la cual es un gen modificador de la autoincompatibilidad en *Nicotiana* y además es un inhibidor de subtilisina. Tanto NaStEP como inhibidores de subtilisina de cebada comparten similitudes estructurales como blancos de las tiorredoxinas (Jiménez-Durán *et al.*, 2013). Si NaTrxh interacciona y/o reduce a NaStEP colocaría a la tiorredoxina como una proteína doblemente importante regulando el sistema de auto-incompatibilidad de *Nicotiana*.

Dado que NaTrxh se expresa mayoritariamente en un entorno genético incompatible (Juárez-Díaz *et al.*, 2006), la interacción con la S-RNasa y la posible regulación de NaStEP, mostraría un elemento regulatorio más del sistema de auto-incompatibilidad, por esa razón sería muy interesante conocer el fenotipo de auto-incompatibilidad cuando se suprime la expresión de NaTrxh.

Conclusiones

La proteína NaTrxh es una tiorredoxina h del subgrupo II que posee extensiones hacia la región N-terminal y C-terminal del "core" típico de las tiorredoxinas. El modelo tridimensional de la NaTrxh predice que las extensiones N-terminal y C-terminal se pliegan sobre el "core" de la proteína, indicando su potencial como dominios de reconocimiento para sus proteínas blanco y para darle especificidad a su función.

La región N-terminal de la NaTrxh está directamente involucrada en su localización extracelular. Particularmente, se identificó una señal de secreción novedosa, la cual es un motivo interno con características hidrofílicas (N β) definido por los aminoácidos A17EAESGSSSEP27. La señal conduce de alguna manera no descrita a la NaTrxh a través de retículo endoplasmático y el aparato de Golgi al apoplasto, aunque no es todavía claro si el motivo N β promueve la traducción de NaTrxh en el RE o si la transporta a él.

Este trabajo confirma que las extensiones ubicados en los extremos N-terminal y C-terminal de las tiorredoxinas h del subgrupo II son indispensables para su función, ya sea localizando correctamente a la proteína y/o interaccionando con sus proteínas blanco. Asimismo, el trabajo reporta por primera vez la presencia de una señal con características atípicas que determina la secreción de una proteína que utiliza el sistema endomembranoso.

La extensión C-terminal de NaTrxh participa en la interacción con la S-RNasa, indicando el potencial de NaTrxh como un gen modificador de la vía genética del rechazo del polen en *Nicotiana*.

Perspectivas

Los resultados que se presentaron a lo largo de la tesis dan soporte a la predicción realizada por el algoritmo de Hidden Markov, el cual indica que la NaTrxh se procesa entre la A16-A17. Sin embargo, no se desarrollaron experimentos que nos confirmaran la eliminación de la región N α de la NaTrxh nativa. Así como tampoco se identificaron a las proteínas con capacidad de interactuar con el motivo N β ; esta información podrá mostrar un nuevo sistema de reconocimiento y/o traducción que integre a las proteínas que tengan un péptido señal atípico hacia el RE.

Los datos generados alrededor de la proteína NaTrxh sugieren que ésta podría jugar un papel importante en el sistema de auto-incompatibilidad de *Nicotiana*; sin embargo, serán necesarios experimentos de pérdida de función con líneas de plantas transgénicas con NaTrxh suprimida para evaluar este aspecto. Finalmente, las plantas transgénicas también permitirán evaluar su relación con NaStEP. Esta información proporcionará elementos que permitan describir con mayor profundidad el mecanismo de reconocimiento y rechazo del polen alelo S-específico en *Nicotiana*.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Ai YJ, Kron E, Kao TH. (1991) **S-alleles are retained and expressed in a self-compatible cultivar of *Petunia hybrida***. *Mol Gen Genet*. 230: 353-358.
- ❖ Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F. (2008) **A novel type of thioredoxins dedicated to symbiosis in legumes**. *Plant Physiol*. 148: 424-435.
- ❖ Anderson M, Cornish AE, Mau SL, Williams EG, Hoggart R, Atkinson A, Bönig I, B Grego, Simpson R, Roche PJ, Haley JD, Penschow JD, Niall HD, Tregear GW, Coughlan JP, Crawford RJ, Clarke AE. (1986) **Cloning of cDNA for a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca***. *Nature*. 321: 38-44.
- ❖ Arner ES, Holmgren A. (2000) **Physiological functions of thioredoxin and a thioredoxin reductase**. *Eur J Biochem*. 267: 6102-6109.
- ❖ 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.
- ❖ Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schurmann P, Buchanan BB. (2003) **Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 370-375.
- ❖ Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schurmann P, Droux M, Buchanan BB. (2004) **Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria**. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 2642-2647.
- ❖ Berendsen HJ, van der Spoel D, van Drunen R. (1995) **GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation**. *Comput Phys Commun*. 91: 43-56.
- ❖ Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. (2004) **Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0**. *J Mol Biol* 340: 783-790.
- ❖ Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, von Heijne G, y Brunak S. (2004) **Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion**. *Protein Eng Des Sel*. 17: 349-356.
- ❖ [Bradford MM](#). (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal Biochem*. 72: 248-254.
- ❖ Buchanan BB. (1991) **Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development**. *Arch Biochem Biophys*. 288: 1-9.
- ❖ Busot G, B McClure, C Ibarra-Sánchez, K Jiménez-Durán, S Vázquez-Santana, F Cruz-García (2008) **Pollination in *Nicotiana glauca* stimulates synthesis and transfer to the stigmatic surface of NaStEP, a vacuolar Kunitz proteinase inhibitor homologue**. *J Exp Bot*. 59: 3187-3201.
- ❖ Cabrillac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T. (2001) **The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins**. *Nature* 410: 220-223.
- ❖ [Capitani M](#), [Sallese M](#). (2009) **The KDEL receptor: new functions for an old protein**. *FEBS Lett*. 583: 3863-3871.

- ❖ Collet JF, Messens J. (2010) **Structure, function and mechanism of thioredoxin proteins.** *Antioxid Redox Signal.* 8: 1205-1216.
- ❖ Cornish EC, Anderson MA, Clarke AE. (1988) **Molecular aspects of fertilization in flowering plants.** *Annu Rev Cell Biol.* 4: 209-228.
- ❖ Cruz-García F, Hancock CN, McClure B. (2003) **S-RNase complexes and pollen rejection.** *J Exp Bot.* 54: 123-130.
- ❖ Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B. (2005) **Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro.** *Plant J.* 42: 295-304.
- ❖ Cross BC, Sinning I, Luirink J, High S. (2009) **Delivering proteins for export from the cytosol.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 255-264.
- ❖ Dai S, Johansson K, Miginiac-Maslow M, Schürmann P, Eklund H. (2004) **Structural basis of redox signaling in photosynthesis: structure and function of ferredoxin:thioredoxin reductase and target enzymes.** *Photosynth Res.* 79: 233-248.
- ❖ Dantas G, [Kuhlman B](#), [Callender D](#), [Wong M](#), [Baker D](#). (2003) **A large scale test of computational protein design: folding and stability of nine completely redesigned globular proteins.** *J Mol Biol.* 332: 449-460.
- ❖ De Nettancourt D. (1977) **Incompatibility in angiosperms.** *Sex Plant Reprod.* 10: 185-199.
- ❖ De Nettancourt D. (2001) **Incompatibility in Angiosperms: Monographs on theoretical and applied genetics 3.** Springer-Verlag. New York.
- ❖ Dickson HG, Crabbe MJ, Gaude T. (1992) **Sporophytic self-incompatibility systems: S gene products.** *Int Rev Cytol.* 140: 525-561.
- ❖ Ding Y, Robinson DG, Jiang L. (2014) **Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants.** *Curr Opin Cell Biol* 29: 107-115.
- ❖ [Duran JM](#), [Anjard C](#), [Stefan C](#), [Loomis WF](#), Malhotra V. (2010) **Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes.** *J Cell Biol.* 188: 527-536.
- ❖ DisEMBL server: <http://www.lindinglab.org/Publications/embl/protein-disorder-prediction-implications-for-structural-proteomics>.
- ❖ Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A. (2006) **Comparative protein structure modelling using Modeller.** *Curr Protoc Bioinformatics.* 15: 5.6.1-5.6.30.
- ❖ Feng DR, Liu B, Li WY, He YM, Qi KB, Wang HB, Wang JF. (2009) **Over-expression of a cold-induced plasma membrane protein gene (MpRCI) from plantain enhances low temperature-resistance in transgenic tobacco.** *Environ Exp Bot.* 65: 395-402.
- ❖ [Franz A](#), [Maass K](#), [Seedorf M](#). (2007) **A complex peptide-sorting signal, but no mRNA signal, is required for the Sec-independent transport of Ist2 from the yeast ER to the plasma membrane.** *FEBS Lett.* 581: 401-405.
- ❖ Gelhaye E, Rouhier N, Laurent P, Sautiere PE, Martin F, Jacquot JP. (2002) **Isolation and characterization of an extended thioredoxin h from poplar** *Physiol Plant.* 114: 165-171.
- ❖ Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP. (2003) **Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction.** *FEBS Lett.* 555: 443-448.
- ❖ Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP. (2004) **The thioredoxin h system of higher plants.** *Plant Physiol Biochem.* 42: 265-271.
- ❖ Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jacquot, JP. (2004) **A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 14545-14550.
- ❖ Gilbert HF. (1990) **Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange.** *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 63: 69-172.

- ❖ Gilquin B, Lecoq A, Desné F, Guenneugues M, Zinn-Justin S, Ménez A. (1999) **Conformational and functional variability supported by the BPTI fold: solution structure of the Ca²⁺ channel blocker calcicludine.** *Proteins*. 34: 520–532.
- ❖ Goldraij A, Kondo K, Lee CB, Hancock CN, Sivaguru M, Vazquez-Santana S, Kim S, Phillips TE, Cruz-García F, McClure B. (2006) **Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*.** *Nature*. 439: 805-810.
- ❖ Gunther GR, Wang JL, Yahara I, Cunningham BA, Edelman GM. (1973) **Concanavalin A derivatives with altered biological activities.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70: 1012-1016
- ❖ Hancock CN, Kent L, McClure BA. (2005) **The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Plant J*. 43: 716-723.
- ❖ Helms JB, Rothman JE. (1992) **Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF.** *Nature*. 360: 352–354.
- ❖ Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J. (1999) **Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus, A two steps mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB.** *J Biol Chem*. 274: 27891-27897.
- ❖ Holmgren A. **Thioredoxin** (1985) *Annu Rev Biochem*. 54: 237–271.
- ❖ Holmgren A. (1989) **Thioredoxin and glutaredoxin systems.** *J Biol Chem*. 264: 13963–13966.
- ❖ Holmgren A. (1979) **Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide.** *J Biol Chem*. 254: 9627–9632.
- ❖ Holmgren A. (1984) **Enzymatic reduction-oxidation of proteins disulfides by thioredoxin.** *Methods Enzymol*. 107: 295–300.
- ❖ Hua ZH, Fields A, Kao TH. (2008a) **Biochemical models for S-RNase based self-incompatibility.** *Mol Plant*. 1: 575-585.
- ❖ Hua Z, Kao TH. (2008b) **Identification of major lysine residues of S₃-RNase of *Petunia inflata* involved in ubiquitin-26S proteasome-mediated degradation *in vitro*.** *Plant J*. 54: 1094-1104.
- ❖ Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M. (1995) **Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap.** *Planta*. 195: 1295-300.
- ❖ Ishiwatari Y, Fujiwara T, McFarland KC, Nemoto K, Hayashi H, Chino M, Lucas WJ. (1998). **Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell- to –cell transport through plasmodesmata.** *Planta*. 205: 12-22.
- ❖ Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, 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.
- ❖ Juárez-Díaz JA, McClure B, Vázquez-Santana S, Guevara-García A, León-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.
- ❖ Jung JY, Chi YH, Chae HB, Shin MR, Lee ES, Cha JY, Paeng SK, Lee Y, Park JH, Kim WY, Kang CH, Lee KO, Lee KW, Yun DJ, Lee SY. (2013) **Analysis of arabidopsis thioredoxin-h isotypes identifies discrete domains that confer specific structural and functional properties.** *Biochem J*. 456: 13-24.
- ❖ [Jüschke C, Wächter A, Schwappach B, Seedorf M.](#) (2005) SEC18/NSF-independent, protein-sorting pathway from the yeast cortical ER to the plasma membrane. [J Cell Biol](#). 169: 613-622.

- ❖ Kao TH, McCubbin AG. (1996) **How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 12059-12065.
- ❖ Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P. (2001) **The signal recognition particle.** *Annu Rev Biochem* 70: 755-775.
- ❖ Kirst H, Melis A. (2014) **The chloroplast signal recognition particle (CpSRP) pathway as a tool to minimize chlorophyll antenna size and maximize photosynthetic productivity** *Biotechnol Adv.* 32: 66-72.
- ❖ Kondo K, McClure B. (2008) **New microsomal-associated HT-family proteins from *Nicotiana* respond to pollination and define an HT/NOD-24 protein family.** *Mol Plant.* 1: 634-644.
- ❖ Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y. (2001) **Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants.** *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 14144-14149.
- ❖ Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. (2004) **Bi-directional protein transport between the ER and golgi.** *Ann Rev Cell Dev Biol.* 20: 87-123.
- ❖ Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M. (2003) **Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*.** *FEBS Lett.* 54: 87-92.
- ❖ Lehninger M, Nelson D. (2012) **Principles of Biochemistry.** Sexta edición. Editorial W. H. Freeman.
- ❖ Lind JL, Bönig I, Clarke AE, Anderson MA. (1996) **A style-specific 120 kDa glycoprotein enters pollen tubes of *Nicotiana glauca* in vivo.** *Plant Reprod.* 9: 75-86.
- ❖ Lindahl E, Hess B van der Spoel D. (2001) **GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis.** *J Mol Model.* 7: 306-317.
- ❖ Linding R, Juhl JL, Diella F, Bork P, Gibson TJ, Russell RB. (2003) **Protein Disorder Prediction: Implications for structural proteomics.** *Structure* 11: 1453-1459.
- ❖ Lutomski D, Fouillit M, Bourin P, Mellottee D, Denize N, Pontet M, Bladier D, Caron M, Joubert-Caro R. (1997) **Externalization and binding of galectin-1 on cell surface of K562 cells upon erythroid differentiation.** *Glycobiology* 7: 1193-1199.
- ❖ Mandal DK, Brewer CF. (1993) **Differences in the binding affinities of dimeric concanavalin A (including acetyl and succinyl derivatives) and tetrameric concanavalin A with large oligomannose-type glycopeptides.** *Biochemistry.* 32: 5116-5120.
- ❖ Marchand C, Maréchal PL, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P. (2004) **New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomics analysis.** *Proteomics* 4: 2696-2706.
- ❖ Martin H, Dean M. (1991) **Identification of a thioredoxin-related protein associated with plasma membranes.** *Biochem Biophys Res Commun.* 175: 123-128.
- ❖ Martínez-Castilla LP, Rodríguez-Sotres R. (2010) **A score of the ability of a three-dimensional protein model to retrieve its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness.** *PLoS One.* 5: e12483.
- ❖ McClure B, Mou B, Canevascini S, 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.
- ❖ McClure B, Cruz-García F, Beecher B, Sulaman W. (2000) **Factors affecting inter and intra specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Ann Bot.* 85 A: 113-123.
- ❖ McClure B, Frankling-Tong V. (2006) **Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in self pollen tube inhibition.** *Planta.* 224: 233-245.

- ❖ McClure B, Haring V, Ebert PR, Anderson MA, Simpson RJ, Sakiyama F, Clarke AE. (1989) **Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases.** *Nature*. 342: 955-957.
- ❖ Meng L, Wong JH, Feldman LF, Lemaux PG, Buchanan BB. (2009) **A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107: 3900-3905.
- ❖ Menon RP, Hughes RC. (1999) **Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex.** *Eur J Biochem*. 264: 569-576.
- ❖ Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP. (2002) **Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position.** *Methods Enzymol*. 347: 394-402.
- ❖ Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB. (2009) **Thioredoxin targets in plants: The first 30 years.** *J Proteomics* 72: 452-474.
- ❖ Murffet J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure B. (1996) **S-RNase and inter-specific 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.
- ❖ Nakamura T, Nakamura H, Hoshino T, Ueda S, Wada H, Yodoi J. (2005) **Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin.** *Antioxid Redox Signal* 7: 60-71.
- ❖ Nickel W, Rabouille C. (2009) **Mechanisms of regulated unconventional protein secretion.** *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10: 148-155.
- ❖ Nickel W, Seedorf M. (1992) **Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells.** *Annu Rev Cell Dev Biol*. 24: 287-308.
- ❖ Oostenbrink C, Soares TA, van der Vegt NF, van Gunsteren WF. (2005) **Validation of the 53A6 GROMOS force field.** *Eur Biophys J*. 34: 273-284.
- ❖ Park SK, Jung YJ, Lee JR, Lee YM, Jang HH, Lee SS, Park JH, Kim SY, Moon JC, Lee SY. (2009) **Heat-shock and redox-dependent functional switching of an h-type Arabidopsis thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone.** *Plant Physiol*. 150: 552-561.
- ❖ Peterson GL. (1977) **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable.** *Anal Biochem*. 83: 346-56.
- ❖ Peterson JH, Szabady LR, Bernstein HD. (2006) **An unusual signal peptide extension inhibits the binding of bacterial presecretory proteins to the signal recognition particle, trigger factor, and the SecYEG complex.** *J Biol Chem*. 281: 9038-9048.
- ❖ Peterson JH, Woolhead CA, Bernstein HD. (2003) **Basic amino acids in a distinct subset of signal peptides promote interaction with the signal recognition particle.** *J Biol Chem*. 278: 46155-46162.
- ❖ Ravi D, Muniyappa H, Das KC. (2005) **Endogenous thioredoxin is required for redox cycling of anthracyclines and p53-dependent apoptosis in cancer cells.** *J Biol Chem*. 280: 40084-40096.
- ❖ Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpl P, Staehelin LA, Robinson DG. (2002) **Reevaluation of the effects of Brefeldin A on Plant Cells Using tobacco bright Bellow 2 cells expressing golgi-targeted green fluorescent protein COPI antisera.** *Plant Cell*. 14: 237-261.
- ❖ Rubartelli A, Sitia R. (1991) **Interleukin 1b and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion.** *Biochem Soc Trans*. 19: 255-259.

- ❖ Sassa H, Nishio T, Kowiyama Y, Hirano H, Koba T, Ikehashi H. (1996) **Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease super family.** *Mol Genet Genomics.* 27: 222.
- ❖ Sijacic P, X Wang X, Skirpa AL, Wang Y, Dowd PE, McCubbin AG, Huang S, Kao TH. (2004) **Identification of the pollen determinant of S-RNase-mediated self-incompatibility.** *Nature.* 429: 302-305.
- ❖ Sullivan JA, Shirasu K, Deng XW. (2003) **The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants.** *Nat Rev Genet.* 4: 948-958.
- ❖ Schotman H, Karhinen L, Rabouille C. (2008) **dGRASP- mediated noncanonical integrin secretion is required for Drosophila epithelial remodeling.** *Dev Cell.* 14: 171-182.
- ❖ Scott A, Wyatt S, Tsou PL, Robertson D, Allen NS. (1999) **Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells.** *Biotechniques* 26: 1128-1132.
- ❖ Shi J, Bhattacharyya MK. (1996) **A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean.** *Plant Mol Biol.* 32: 653-562.
- ❖ Schatz G, Dobberstein B. (1996) **Common principles of protein translocation across membranes.** *Science* 271: 1519-1526.
- ❖ Traverso JA, Pulido A, Rodríguez-García MI, Alché JD. (2013) **Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives.** *Front. Plant Sci.* 465: 1-14
- ❖ Tsukamoto T, Ando T, Kokubun H, Watanabe H, Masada M, Zhu X, Marchesi E, Kao TH. (1999) **Breakdown of self-incompatibility in a natural population of *Petunia axillaris* (Solanaceae) in Uruguay containing both self-incompatible and self-compatible plants.** *Plant Reprod.* 12: 1432-2145.
- ❖ Ullers RS, Houben EN, Raine A, ten Hagen-Jongman CM, Ehrenberg M, Brunner J, Oudega B, Harms N, Luirink J. (2003). **Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the Escherichia coli ribosome.** *J Cell Biol.* 161: 679-684.
- ❖ Vieira Dos Santos C, Rey P. (2006) **Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response.** *Trends Plant Sci.* 11: 329-334.
- ❖ Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J, Fradelizi D. (1988) **Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin.** *J Biol Chem.* 263: 15506-15512.
- ❖ Xu D, Tsai CJ, Nussinov R. (1998) **Mechanism and evolution of protein dimerization.** *Protein Sci.* 7: 533-544.
- ❖ Xue Y, Carpenter R, Dickinson HG, Coen ES. (1996) **Origin of allelic diversity in *Antirrhinum* S locus RNase.** *Plant Cell.* 8: 805-814.
- ❖ Yamame H, Tao R. (2009) **Molecular basis of self-(in) compatibility and current status of S-genotyping in Rosaceous fruit trees.** *J Jap Soc H Sci.* 78: 137-157.
- ❖ Yuan CH, He QY, Peng K, Diao JB, Jiang LP, Tang X, Liang SP. (2008) **Discovery of a Distinct Superfamily of Kunitz-Type Toxin (KTT) from Tarantulas.** *PloS One,* 3: e3414.
- ❖ Zehe C, Engling A, Wegehangel S, Schäfer T, Nickel W. (2006) **Cell-surface heparan sulfate proteoglycans are essential components of the unconventional export machinery of FGF-2.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 103: 15479-15484.

ARTICULO:

***A novel motif NaTrxh N-terminus promotes its secretion,
whereas the C-terminus participates in its interaction
with S-RNase in vitro***

RESEARCH ARTICLE

Open Access

A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase *in vitro*

Alejandra Ávila-Castañeda^{1†}, Javier Andrés Juárez-Díaz^{2†}, Rogelio Rodríguez-Sotres¹, Carlos E Bravo-Alberto¹, Claudia Patricia Ibarra-Sánchez¹, Alejandra Zavala-Castillo¹, Yuridia Cruz-Zamora¹, León P Martínez-Castilla¹, Judith Márquez-Guzmán² and Felipe Cruz-García^{1*}

Abstract

Background: NaTrxh, a thioredoxin type *h*, shows differential expression between self-incompatible and self-compatible *Nicotiana* species. NaTrxh interacts *in vitro* with S-RNase and co-localizes with it in the extracellular matrix of the stylar transmitting tissue. NaTrxh contains N- and C-terminal extensions, a feature shared by thioredoxin *h* proteins of subgroup 2. To ascertain the function of these extensions in NaTrxh secretion and protein-protein interaction, we performed a deletion analysis on NaTrxh and fused the resulting variants to GFP.

Results: We found an internal domain in the N-terminal extension, called N β , that is essential for NaTrxh secretion but is not hydrophobic, a canonical feature of a signal peptide. The lack of hydrophobicity as well as the location of the secretion signal within the NaTrxh primary structure, suggest an unorthodox secretion route for NaTrxh. Notably, we found that the fusion protein NaTrxh-GFP(KDEL) is retained in the endoplasmic reticulum and that treatment of NaTrxh-GFP-expressing cells with Brefeldin A leads to its retention in the Golgi, which indicates that NaTrxh uses, to some extent, the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus for secretion. Furthermore, we found that N β contributes to NaTrxh tertiary structure stabilization and that the C-terminus functions in the protein-protein interaction with S-RNase.

Conclusions: The extensions contained in NaTrxh sequence have specific functions on the protein. While the C-terminus directly participates in protein-protein interaction, particularly on its interaction with S-RNase *in vitro*; the N-terminal extension contains two structurally different motifs: Na and N β . N β , the inner domain (Ala-17 to Pro-27), is essential and enough to target NaTrxh towards the apoplast. Interestingly, when it was fused to GFP, this protein was also found in the cell wall of the onion cells. Although the biochemical features of the N-terminus suggested a non-classical secretion pathway, our results provided evidence that NaTrxh at least uses the endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and also vesicles for secretion. Therefore, the N β domain sequence is suggested to be a novel signal peptide.

Keywords: Thioredoxin, Secretion, Self-incompatibility, *Nicotiana alata*, Gametophytic, S-RNase

* Correspondence: fcg@unam.mx

†Equal contributors

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México 04510, Distrito Federal, México

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Thioredoxins (Trxs) are widely distributed in nature from prokaryotes to eukaryotes. These proteins, which belong to the oxidoreductase thiol:disulfide superfamily [1], are characterized by the active site signature sequence WCXXC. This sequence motif constitutes the redox center mediating the isomerization of specific disulfide bridges on Trx target proteins [2]. In yeasts and mammals, the cytoplasmic Trx redox system is complemented by a second Trx system within mitochondria. In plants, the system is more intricate due to the presence of chloroplastic Trxs that are strongly associated with the regulation of chloroplast metabolism and function [3]. In mammals and yeast, only two and three Trx-encoding genes, respectively, have been identified so far. In contrast, about 19 genes encoding Trxs are contained in *Arabidopsis thaliana* genome, recently reviewed in [4,5].

Trxs were initially described as reductants of ribonucleotide reductase during DNA synthesis [6,7]. Later, these proteins were shown to take part in a variety of important physiological processes, for example as electron donors for several biosynthetic oxidoreductases [8-10] or as protectants against oxidative damage by reduction of the disulfide bridges within many proteins. Interestingly, Trxs and Trx-related proteins are being found to be involved in several sexual plant reproduction processes as well, as reviewed in [11]. The functional diversity of Trxs correlates with their wide distribution in nature and with the large variability in their primary structures (from 27% – 69% of identity among the amino acid sequences) [12]. Their features and functions have been recently reviewed [13,14].

Plant Trxs can be divided into eight types based on their sequence [15]. Types *f*, *m*, *x*, *y*, and *z* are localized in chloroplasts, type *o* is found in mitochondria, and type *s* is associated with the endoplasmic reticulum (ER) [2,15-19]. Information about the subcellular localization of type *h* (Trxs h), the largest group of this protein family, is limited since this group includes proteins located in the cytosol as well as in mitochondria and even secreted to the apoplast [20-22].

Plant Trxs are also involved in highly specialized biological processes, including self-incompatibility (SI) in *Brassica* [23]. Two Trxs h proteins, THL1 and THL2, interact with the C-terminal domain of the S-locus receptor kinase (SRK), which is the female determinant in the sporophytic SI system in *Brassica* [24]. The formation of the SRK-THL complex occurs during self-compatible pollinations and it has been proposed that it prevents the SRK dimerization and self-phosphorylation; the last event is essential to the activation of the pollen rejection response [23]. Moreover, suppression of THL1 and THL2 in transgenic plants has shown that both Trxs are required for full pollen acceptance [25]. Trxs h also may

play a role in the gametophytic S-RNase-based SI system in *Nicotiana glauca* since NaTrxh reduces *in vitro* to the S-RNase, the female S-determinant [22]. Moreover, the NaTrxh transcript is more abundant in SI species than in self-compatible ones from *Nicotiana* spp. [26]. In general, evidence indicating the involvement of Trxs and, in general, thiol/disulfide containing proteins within plant sexual reproduction processes is increasing, meaning that redox regulation plays a pivotal role in regulating these signalling mechanisms [11].

Trx h group is subdivided into three subgroups [27]. Subgroup 2 includes Trxs with an N-terminal extension. Some evidence suggests a role for this extension in Trx intracellular trafficking. In *Populus tremula*, the N-terminus of PtTrxh2 functions as a mitochondrial targeting signal [21]. As with other subgroup 2 members, *N. glauca* NaTrxh contains extensions toward its C- and N-termini, but their functions have not been investigated. Notably, NaTrxh does not possess a canonical signal peptide at its N-terminus but is secreted onto the extracellular matrix of the style [22]. Therefore, either or both the N- or C-terminus could be involved in NaTrxh secretion and/or mediate the protein-protein interaction of NaTrxh with its target proteins.

Here, we show that NaTrxh secretion depends on an inner segment within its N-terminal extension. This segment, N β , guides secretion of NaTrxh through the ER and Golgi. In addition, pull-down assays indicate that the C-terminal extension participates in the interaction with S-RNase. Likewise, *in silico* structure modeling predicts both the N- and C-terminal extensions to be solvent exposed and to fold into stable secondary structure elements. The model is consistent with an active role of both extensions in tertiary structure stabilization, with little or no effect on NaTrxh reductase activity.

Results

NaTrxh localizes to the extracellular matrix of the transmitting tissue in *N. glauca* styles or associates with secretory pathway elements

Previously, we demonstrated that NaTrxh co-localizes to the extracellular matrix (ECM) of the stylar transmitting tissue in *N. glauca* along with the S-RNase [22]. Although it lacks a canonical signal peptide, NaTrxh contains sufficient information to guide its secretion, raising the possibility that this protein could follow a non-classical secretion pathway, as suggested by the Secretome 1.0 algorithm [22]. Immuno-gold labelling and electron microscopy data were consistent with an NaTrxh localization at the ECM of the same *N. glauca* stylar tissue (Figure 1). Notably, a semi-quantitative analysis, counting all observed particles from five different micrographs at a 12 K resolution, revealed gold particles to be associated with structures related to the secretory system (Figure 1A).

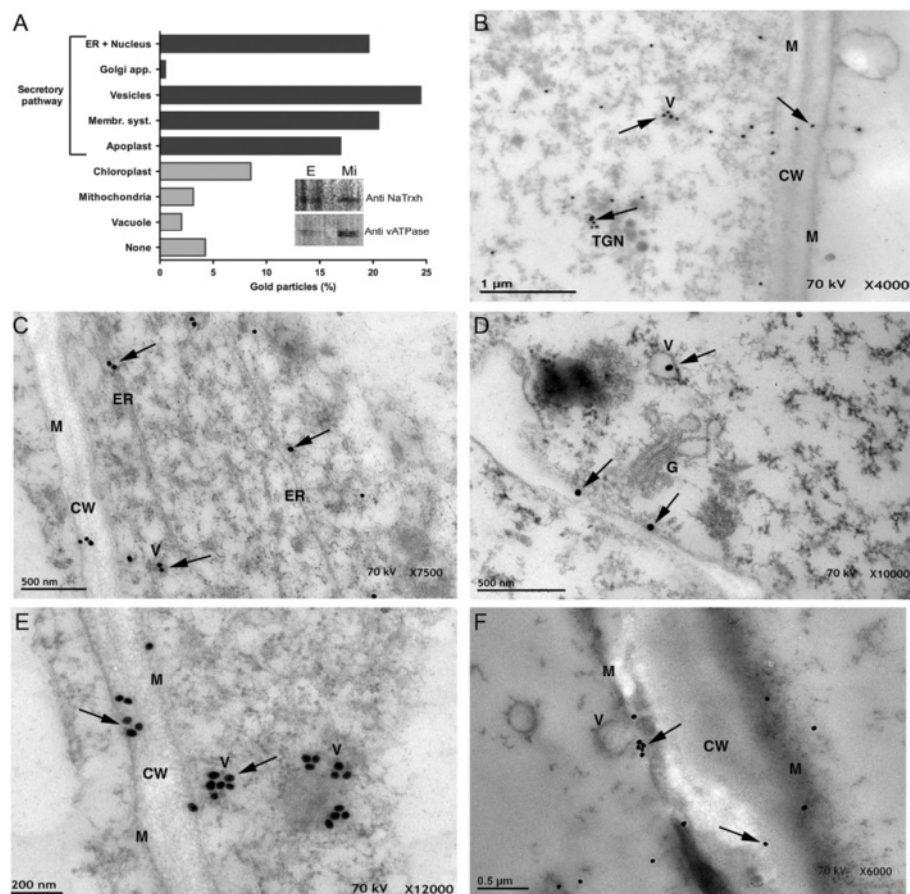


Figure 1 NaTrxh localized to the cell wall or associates to secretory elements in *N. alata* styles. (A) Semi-quantitative analysis of the localization of the gold particles (i.e., NaTrxh) by the electron microscopic immune-gold assays. Sub-panel shows NaTrxh was immunodetected in a styler microsomal fraction (Mi) along with vATPase. E: crude protein extract. (B) NaTrxh was associated with vesicles (V), the trans-Golgi network (TGN), or in the cell wall (CW). (C – D) NaTrxh was mainly found associated to membranous systems, such as the endoplasmic reticulum (ER), the Golgi apparatus (G), or within vesicles. (E – F) Vesicles containing gold particles. In (f), a vesicle is observed fused to the plasma membrane (M). NaTrxh localization (arrows). Scale bars are shown in each micrograph. (B – F) Ultra thin sections of *N. alata* styles were treated with anti-NaTrxh and then with anti-rabbit coupled to gold particles.

This association is consistent with the immune detection of both NaTrxh and the vATPase (marker) in the microsomal fraction of a protein crude extract from *N. alata* styles (Figure 1A, sub-panel). In Figure 1B, D, E, and F, gold particles (i.e., NaTrxh) are observed in association with vesicles, some of which reach the plasma membrane. These images are suggestive of membrane fusion leading to the extracellular release of the vesicle content, including NaTrxh (Figure 1F), which also was found at the ECM, labelled as cell wall (CW; Figure 1B, C, E, F). Figure 1C and D are representative micrographs where NaTrxh was found in association either with the ER or the Golgi. In contrast to the Secretome 1.0 algorithm prediction [22], our data show at least a fraction of NaTrxh travelling through the ER and Golgi secretory pathway en route to its final apoplastic localization in the styles of *N. alata*. However, as previously mentioned, NaTrxh

lacks a canonical signal peptide, and the localization found through immuno-gold and electron microscopy provides cellular confirmation of secretion.

NaTrxh N- and C-terminal extensions

As previously reported [22] and shown in Figure 1, NaTrxh is secreted in *N. alata* styles. Contrary to the Secretome 1.0 algorithm, which predicts a non-classical secretion signal for NaTrxh, the hidden Markov algorithm [28] predicts a cleavage site between residues Ala-16 and Ala-17, albeit with a low probability ($p = 0.593$) [22]. Multiple alignment of several Trxs *h* from subgroup 2 showed that the NaTrxh N-terminal extension sequence is at least 27 residues long (Additional file 1: Figure S1) and its C-terminal extension comprises residues E-136 to Q-152 (Additional file 1: Figure S1).

Based on the above predictions, we divided the N-terminus of NaTrxh in two motifs: N α (from Met-1 to Ala-16) and N β (Ala-17 to Pro-27). The C-terminal extension was defined starting at E-136 (Figure 2A).

The N β region is crucial for NaTrxh secretion

To test if either extension is responsible for NaTrxh secretion, we generated NaTrxh deletion mutants lacking different sequence segments, fused to green fluorescent

protein (GFP), and then transiently expressed them in onion epidermal cells.

First, we showed that the full-length NaTrxh fused to GFP is observable in the extracellular space of onion epidermal cells (Figure 3A and B), as reported in *N. benthamiana* and *A. thaliana* [22]. The same was observed for the stylar ECM protein p11 [29] fused to GFP (Figure 3C and D). We observed the same pattern when the N α motif is deleted from the N-terminus of

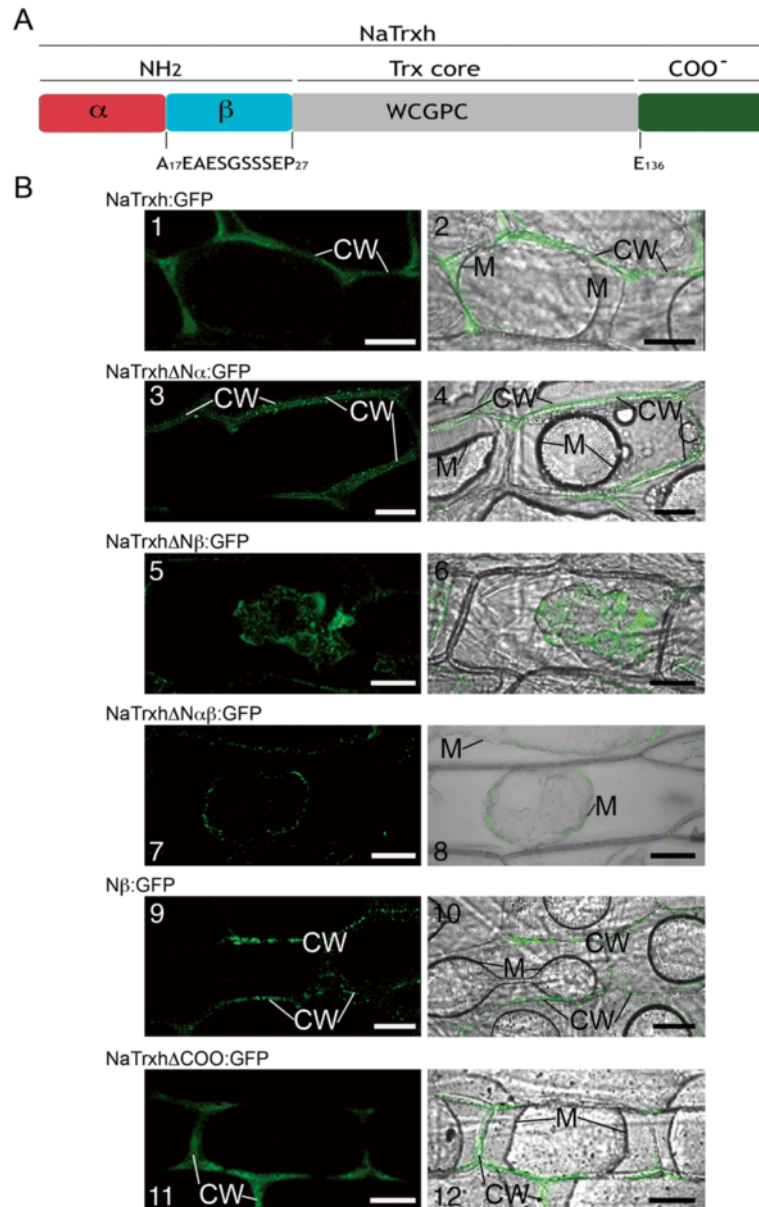


Figure 2 The N β motif is responsible for NaTrxh secretion. (A) An NaTrxh scheme indicating its N- and C-terminal extensions. The N-terminus was subdivided into two regions: N α (red) and N β (cyan). The C-terminus (green). (B) Transient expression of the different NaTrxh mutants fused to GFP in onion epidermal cells. (B-1) (B-2) Full-length NaTrxh. (B-3) (B-4) NaTrxh Δ N α . (B-5) (B-6) NaTrxh Δ N β . (B-7) (B-8) NaTrxh Δ N $\alpha\beta$. (B-9) (B-10) N β motif (Ala-17 to Pro-27) directly fused to GFP. (B-11) (B-12) NaTrxh Δ COO. (B-1) (B-3) (B-5) (B-7) (B-9) (B-11) GFP fluorescence. (B-2) (B-4) (B-6) (B-8) (B-10) (B-12). Bright fields merged with fluorescence images. The cells were plasmolyzed with 1 M NaCl before confocal observation. CW: cell wall; M: plasma membrane. Scale bars = 50 μ m.

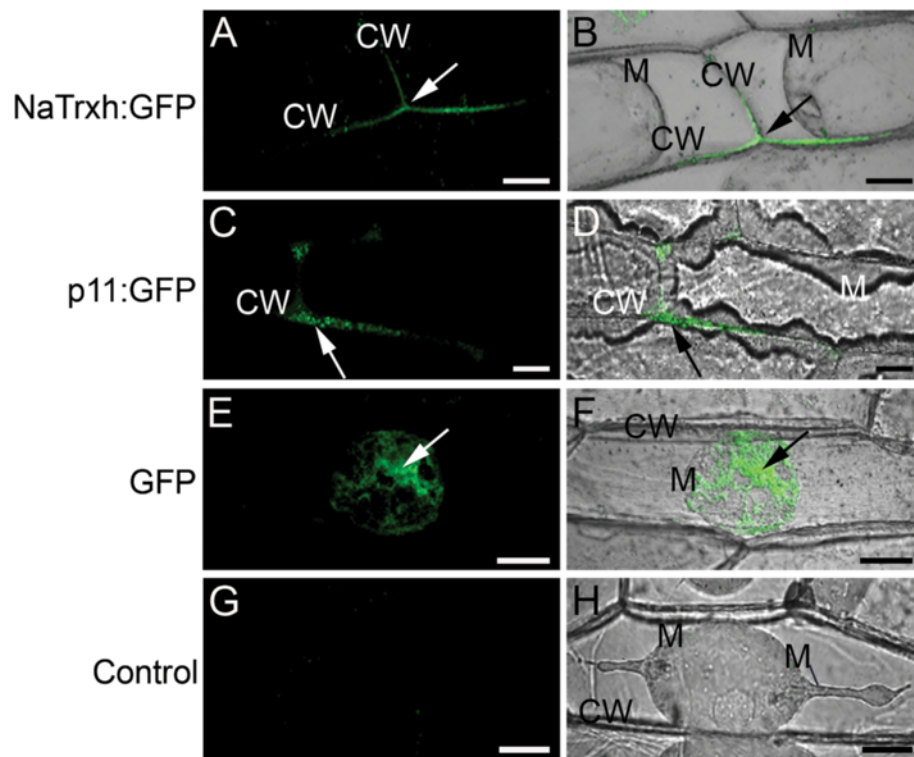


Figure 3 NaTrxh: GFP is secreted in onion epidermal cells. (A – B) GFP fluorescence from the NaTrxh: GFP fusion protein, was localized on the cell wall (CW). **(C – D)** p11 is a known secreted protein in *N. alata* styles that was also secreted. **(E – F)** GFP alone was not secreted when transiently expressed. **(G – H)** Non-transformed cells. **(A, C, E, G)** GFP fluorescence. **(B, D, F, H)** Bright fields merged with fluorescence images. M: plasma membrane; CW: cell wall; GFP fluorescent signal (arrows). The cells were plasmolized with 1.0 M NaCl before confocal observation. Scale bars = 30 μ m.

NaTrxh (NaTrxh Δ N α : GFP; Figure 2B-3 and 2B-4) and, therefore, concluded the N α domain is not required for targeting NaTrxh to the apoplast. However, when NaTrxh Δ N α β , which lacks both the N α and N β motifs, was expressed as a GFP fusion protein, fluorescence was localized inside the cells, indicating that secretion was abolished (Figure 2B-7 and B-8). When the C-terminus was deleted from NaTrxh (NaTrxh Δ COO: GFP), GFP fluorescence was localized to the apoplast (Figures 2B-11 and B-12). These data show that the N-terminal extension carries all the information for NaTrxh secretion. However, in contrast to an orthodox N-terminal signal peptide, the first 17 amino acids are not required, as the inner N β domain promotes secretion in the absence of the N α segment. To test this hypothesis, we generated an NaTrxh protein mutant with the N α domain adjacent to the Trx core, deleting the N β domain (NaTrxh Δ N β), and then expressed it as a GFP fusion protein. Transient expression of NaTrxh Δ N β : GFP is shown in Figures 2B-5 and B-6. GFP fluorescence can be observed within the cytosol. Furthermore, fusion to GFP of the N β domain alone leads to extracellular localization of the GFP signal, which resembles the distribution found for full-length NaTrxh (Figure 2B-9 and B-10). Together, these outcomes

provide strong evidence that the N β domain is both essential and sufficient for NaTrxh secretion.

NaTrxh uses the endomembrane system to reach the apoplast

While clearly sufficient to function as a secretion signal, the N β domain may guide NaTrxh secretion through an unorthodox secretion pathway. This possibility is suggested by the N β domain's unusual position within the primary structure (17 residues from the N-terminus) and the absence of a long hydrophobic amino acid region (Additional file 2: Figure S2). To evaluate if N β -led secretion proceeds via the ER, we looked for the presence of NaTrxh in the ER using two NaTrxh fusion proteins, NaTrxh:GFP(KDEL) and N β : GFP(KDEL), both of which exhibit the ER retention signal KDEL [30,31]. As a control, we also fused p11 to GFP(KDEL). p11 is a known secreted protein from *N. alata* [29] with a typical signal peptide that is expected to follow the classical ER/Golgi pathway. The GFP signal from all GFP(KDEL) fusion proteins exhibits a typical ER distribution pattern surrounding the nucleus. The reticulate fluorescent pattern observed with both fusion proteins (Figure 4A-1 and A-4) and, interestingly, with the N β : GFP(KDEL) as well (Figure 4A-7),

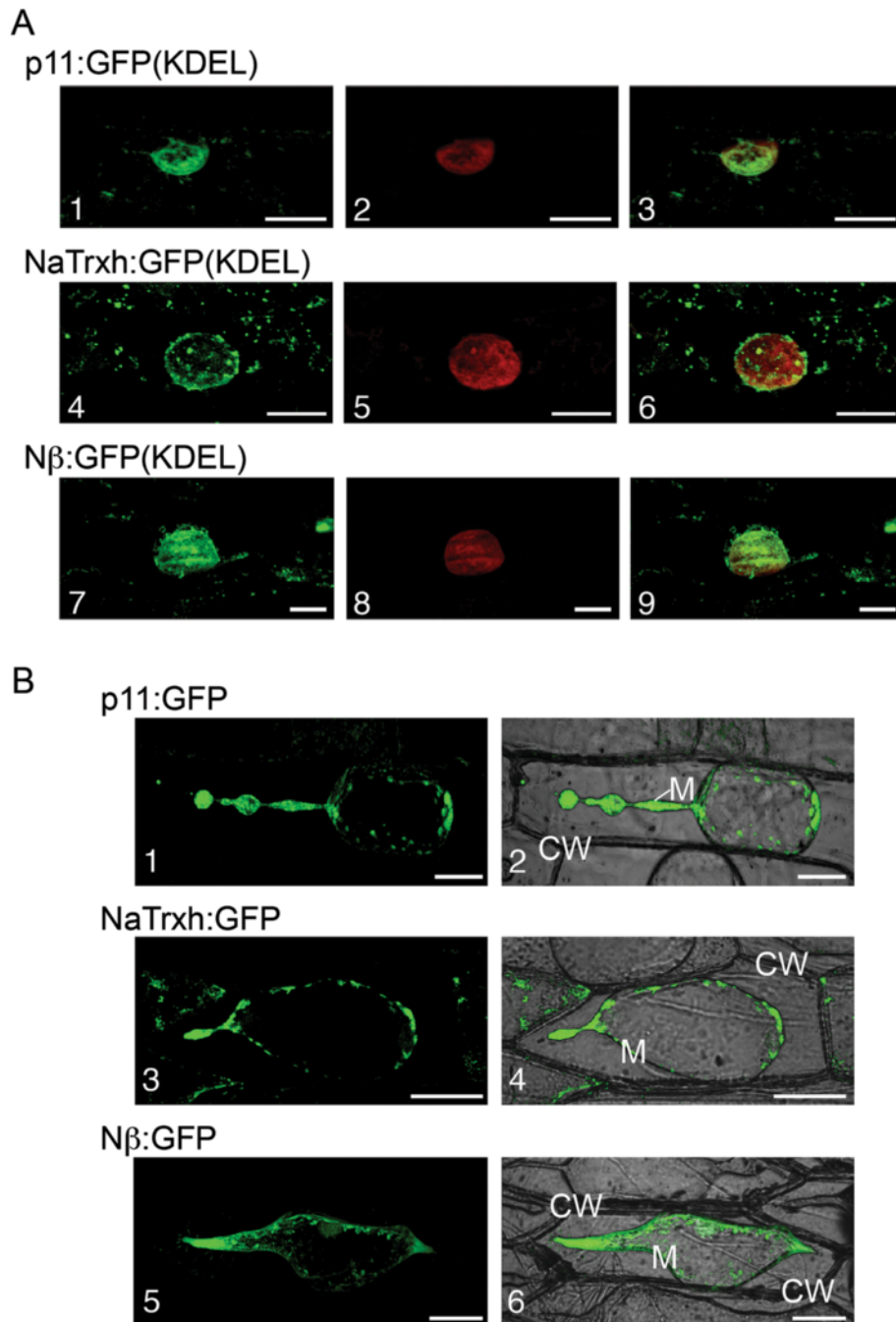


Figure 4 NaTrxh uses the ER/Golgi secretion elements to reach the apoplast. (A) Transient expression in onion cells of different proteins with the ER retention signal (KDEL) toward the C-termini. **(A-1) (A-4) (A-7)** GFP fluorescence. **(A-2) (A-5) (A-8)** Nucleus staining with propidium iodide. **(A-3) (A-6) (A-9)** Merged images. Scale bars = 20 μm. **(B)** Transient expression of p11:GFP, NaTrxh:GFP and Nβ:GFP in onion cells treated with BFA (50 μg/ml). **(B-1) (B-3) (B-5)** GFP fluorescence. **(B-2) (B-4) (B-6)** Bright fields merged with fluorescence images. The observations were made after plasmolysis with 1 M NaCl. CW: cell wall; M: plasma membrane. Scale bars = 50 μm.

contrasts with the blurred pattern of the nucleus (Figures 4A-2, A-5 and A-8). These data are consistent with the passage of NaTrxh through the ER on its way out of the cell (Figure 4A).

Evidence for participation of the Golgi network in NaTrxh secretion was obtained from treatment of onion epidermal cells with the fungal toxin Brefeldin A (BFA). BFA blocks vesicle formation at the Golgi network, which

prevents secretion of Nap11:GFP, NaTrxh:GFP, and N β :GFP (Figure 4B). Additional evidence that NaTrxh is secreted through vesicles is NaTrxh association with a membrane fraction (Figure 1A). Taken together, these results show that the N β domain is a hydrophilic novel internal signal able to promote NaTrxh secretion via the ER/Golgi.

The N-terminal region of NaTrxh accounts for structural stability but not for its reductase activity

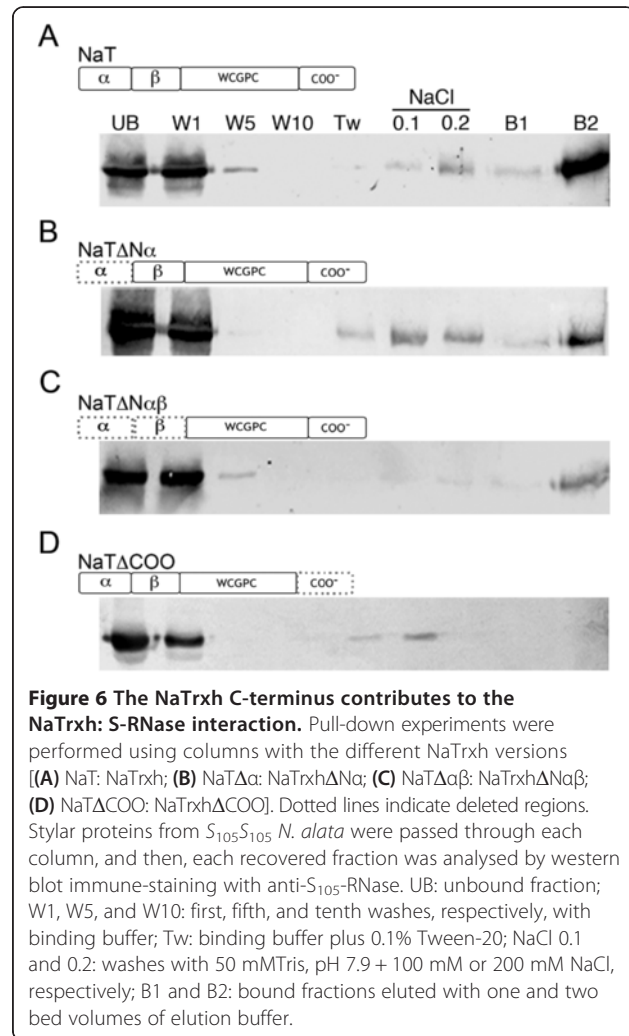
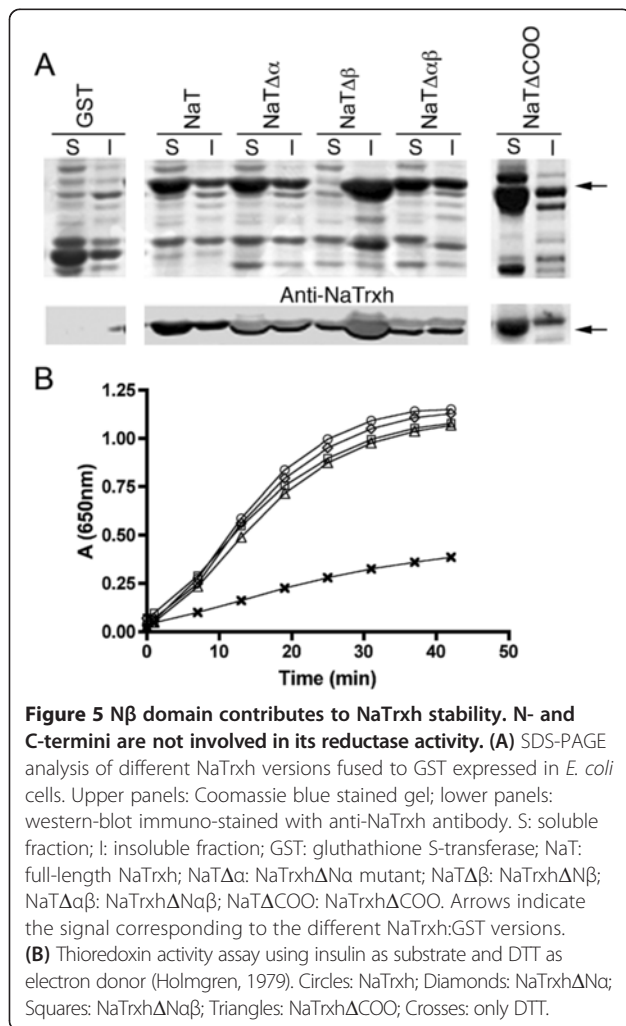
To evaluate whether the N-terminal extension, the C-terminal extension, or both extensions participate in NaTrxh reductase activity, we overexpressed four NaTrxh mutants as GST fusion proteins in *Escherichia coli*. The NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, and NaTrxh Δ COO proteins were recovered from the soluble phase from bacterial sonicates (Figure 5A), as reported for the full NaTrxh [22]. Notably, NaTrxh Δ N β is only detected at the insoluble phase (Figure 5A), suggesting that the protein does not fold correctly; therefore, its activity as a disulphide reductase could not be tested. When compared to full-

length NaTrxh, the NaTrxh variants show no differences in their ability to reduce insulin disulfide bonds using dithiothreitol (DTT) as an electron donor (Figure 5B) [7]. This result demonstrates that the N-terminal extension functions in NaTrxh trafficking and, like the C-terminus, does not participate in NaTrxh's ability to reduce target proteins.

N. alata S-RNase interacts *in vitro* with NaTrxh by its C-terminal region

We previously reported the *in vitro* interaction of NaTrxh with the pistil S-determinant S-RNase from *N. alata*. The interaction takes place regardless of the NaTrxh redox state [22]. To test whether the N-terminal or C-terminal region accounts for this specific protein-protein interaction, we prepared GST:NaTrxh-, GST:NaTrxh Δ N α -, GST:NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ -, and GST:NaTrxh Δ COO-Affi-Gel affinity columns and passed through them extracellular stylar protein extracts from *N. alata* S₁₀₅S₁₀₅.

Figure 6A shows that the S₁₀₅-RNase was retained in the NaTrxh-GST-Affi-gel matrix, as reported by Juárez-Díaz



et al. [22]. Notably, we observed a similar binding behaviour when crude style extracts from *N. alata* $S_{105}S_{105}$ were passed through the NaTrxh $\Delta N\alpha$ and NaTrxh $\Delta N\alpha\beta$ matrices (Figure 6B and C). Noteworthy, when the protein extracts are passed through the affinity column with NaTrxh ΔCOO , the S_{105} -RNase is not retained (Figure 6D). These data show that the NaTrxh C-terminus contributes to the interaction with the S_{105} -RNase.

The N β domain plays a structural role in NaTrxh

NaTrxh is predicted to interact with other trafficking-related proteins to be secreted. Thus, the N β domain is likely to be exposed at the molecular surface to facilitate such interactions. To support this hypothesis, we constructed a model of NaTrxh using a combination of homology modeling and molecular dynamic (MD) simulations. We used Modeller 9v4 [32] for the homology modelling and GROMACS 3.3.1 [33,34] for the MD simulations.

While the closest homologue of NaTrxh with a known 3D-structure is the *Hordeum vulgare* H2 Trx (2IWT), the *N. alata* protein possesses extensions toward its N- and C-termini, which has no homologues in the Protein Data Bank (PDB) [35]. We obtained a predicted conformation for these extensions by performing two rounds of MD simulations. The structure shown in Figure 7E is a representative conformation, drawn with visual molecular dynamics (VMD) molecular viewer [36]; mobile regions are shown in orange, blue and green. At the end of the second run, the N- and C-termini folded to form a “beta sheet hat” separated from the Trx core and opposite the putative reactive

site loop (with the motif xCxPCx). The beta sheet was fully formed after 20 ns and remained stable thereafter. Only four segments in the protein showed significant fluctuation in the final model: the first 5 and the last 5 residues, the loop where the reactive cysteine residues reside (60 to 66), and a loop connecting the core to the N-side of the “beta sheet hat” (residues 23 to 26).

The model was rated from *very good* to *fairly good* by Atomic Non-Local Environment Assessment (ANOLEA) [37] (Figure 7B) and ProQ [38]. With the Rd.HMM protocol [39], we used the coordinates of the backbone atoms of the model (after replacement of sequence information with random amino acid sequences) to retrieve the *N. alata* NaTrxh amino acid sequence from the NCBI nr protein database [40] with a statistical significance substantially higher than the one for the *H. vulgare* sequence (homology modeling template protein). In contrast, the 2IWT crystal as well as some of the initial models from Modeller, when subjected to the Rd.HMM protocol, scored the sequence of the barley protein and several other Trx h proteins with high probability, while the *N. alata* amino acid sequence was recovered with an E value above 1 (lacking statistical significance). According to its quality and appropriateness scores (see Methods), the model appears to be reasonably close to the reduced form of the *N. alata* NaTrxh 3D structure. The appropriateness score is worth noting because the Rd.HMM is known to be very sensitive, which may result in false negatives (i.e., the model is rejected even when it may be an approximate description of the native-like 3D structure). However, no false positives have been found yet.

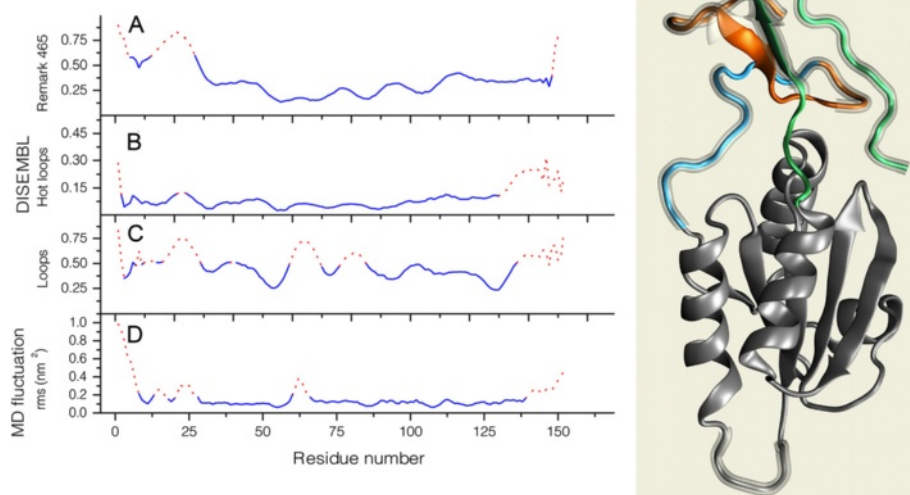


Figure 7 N- and C-terminal extensions are predicted to be disordered and solvent exposed. (A – C) Plots of DisEMBL Remark 465, hot loops, and loop index values. Red dashed lines indicate amino acid positions over the default threshold. (D) RMSD fluctuation average per amino acid for the backbone atoms of the NaTrxh model during the last 2.5 ns of MD simulation. (E) Cartoon of the NaTrxh final model relaxed with ROSETTA fast-relax. Segments were colored according to Figure 2A. The glassy shades indicate areas predicted as highly mobile, according to the plot in D; image prepared with VMD [36].

Interestingly, in all models produced, the N-terminus remains accessible to the solvent, especially the region corresponding to residues 20 to 28, which coincides with the N β domain. In addition, the final conformations of the N- and C-termini anchors and the N-terminal extension to the hat (Figure 7E) forces the poorly ordered loop of amino acids from residues 23 to 26 to remain on the protein surface. Since this region seems to be sufficient for NaTrxh secretion, its anchorage may facilitate the recognition of this sequence by some unidentified component of the secretion pathway. To assess the potential of the NaTrxh extensions to interact with other proteins, we compared them to intrinsically disordered regions (IDRs). The amino acid sequences known as intrinsically disordered proteins (IDPs) or IDRs, among other names, are proteins or partial regions of proteins that lack stable and well-defined 3D structures under physiological conditions *in vitro* [41-43]. We identified the IDRs using DisEMBL [28]; server at [44], which relies on three criteria to assign an amino acid sequence as disordered: loops/coils, hot loops, and remark465. The loops/coils definition identified residues 1 to 47, 59 to 70, 75 to 86, and 135 to 152 as IDRs (Figure 7C); hot loops reported segments 19 to 26 and 118 to 152 as IDRs (Figure 7B); and remark465 defined the first 28 N-terminal residues as the only IDR in NaTrxh (Figure 7A). According to DisEMBL, the NaTrxh extensions are IDRs, and all three criteria agree with MD simulations in the prediction of the N β region (Figure 7D) as a poorly structured protein segment.

Discussion

Here, we demonstrated that the N β domain (A₁₇EAESGSS-SEP₂₇) is required for NaTrxh secretion. Additionally, we provided evidence on NaTrxh targeting to the apoplast via the ER/Golgi regardless of the absence of a distinguishable hydrophobic signal peptide. Finally, we also present data that suggest that the C-terminal region of NaTrxh is an important mediator of the NaTrxh:S-RNase interaction.

NaTrxh is transported through vesicles toward the apoplast

The immune assays we performed clearly show that NaTrxh is mainly localized to membranous bodies, primarily vesicles, which correlate with the finding of NaTrxh in the microsomal fraction. These data strongly indicate that NaTrxh is carried to the extracellular space by means of a vesicle-dependent secretion pathway. The electron microscopy data clearly place NaTrxh inside vesicles (Figure 1), although some gold particles were observed to be associated with ER and other unidentified membranous systems, we cannot affirm that these vesicles come from the ER, the Golgi, or both.

Although NaTrxh lacks a canonical signal peptide, its association with vesicles correlates well with its extracellular localization. A possible secretion mechanism for proteins of this kind relies on their direct interaction with secretion vesicles without previous association to the ER/Golgi [45]. In mammalian cells and yeast, some proteins are secreted through an ER/Golgi-independent pathway. Such is the case of insulin degrading enzymes [46], interleukins IL-1 β and IL-18 [47], and some yeast proteins lacking a signal peptide [45].

NaTrxh has an internal and hydrophilic secretion signal and is secreted via the ER/Golgi

The symplastic localization of the NaTrxh Δ N α mutant (Figure 2B-3, B-4) shows that the first 17 N-terminal residues are not essential for NaTrxh secretion. Instead, the internal amino acid sequence A₁₇EAESGSSSEP₂₇ (N β), despite lacking the characteristic hydrophobicity (Additional file 2: Figure S2) shown on classical signal peptides [48], is essential and sufficient for NaTrxh secretion, as observed by the cytoplasmic localization of the NaTrxh Δ N β mutant (Figures 2B-5, B-6). This motif is also sufficient to direct the N β GFP-tagged to the extracellular space (Figures 2B-9, B-10). Most proteins secreted through the ER/Golgi pathway are translated in ribosomes attached to the ER membrane and possess a signal peptide localized at the N-terminus [48]. One important property of such signal peptides is their hydrophobicity [48]. This feature is essential for recognition of the nascent peptide by the signal receptor particle (SRP) [49]. Although our data indicate that NaTrxh passes through the ER and Golgi en route to the apoplast—as shown with the KDEL constructs (Figure 4A), the blocking of NaTrxh secretion by BFA (Figure 4B), and the presence of NaTrxh in the microsomal fraction (Figure 1A)—we do not know how NaTrxh is transported into the ER and how the Golgi participates in its secretion. Although several possible scenarios are feasible, we currently have no evidence to favor any of them. Two examples that support secretion of proteins without a conventional signal peptide and using the endomembrane system are the proteins IL-1 β and AcbA (acyl-coenzyme A-binding protein) [50]. IL-1 β joins secretory lysosomes and is released when those lysosomes fuse with the plasma membrane [51,52]. IL-1 β also can be captured directly into multivesicular bodies or be sequestered by autophagosomes and fuse with multivesicular bodies [52,53].

Non-classical secretion of cytoplasmic plant proteins has also been documented, as reviewed in [54,55]. It has been demonstrated that proteins without signal peptide, such as celery mannitol dehydrogenase in *A. thaliana*, traffic to the apoplast while bypassing the classical ER/Golgi secretion pathway [56]. Another example is the

hygromycin phosphotransferase in *A. thaliana*, which is secreted through a Golgi-independent route mediated by the Golgi-localized synaptotagmin 2 [57]. However, this is unlikely to be the case for NaTrxh since our data clearly showed that it goes through both ER and Golgi for its secretion (Figure 4).

Another possible route that NaTrxh could follow to the apoplast is through specialized vesicles, such as the exosome-like nanovesicles described in *Olea europea* pollen tubes, called pollensomes [58]. Some of the pollensomes are proposed to be ER- and Golgi-derived vesicles based on the fact that Ole e 1 from *O. europea* was found to be within these pollensomes [58]. Regarding NaTrxh, we observed that some of it was contained in cytoplasmic vesicles and some of them were observed fused to the plasma membrane (Figure 1E and F). In the apoplast, NaTrxh was never found associated to any exosome-like structure, as described for pollensomes [58] (Figure 1).

An additional possibility is that NaTrxh could associate to endomembrane systems through lipidic modifications. Actually, Traverso et al. [59] found that NaTrxh is *in vitro* myristoylated at Gly-2, suggesting that NaTrxh may be a membrane-associated protein *in planta*. Based on this, it was speculated that it could be the manner about how NaTrxh is transported to the apoplast [59,11]. However, this scenario appears to be unlikely to occur because our deletion analysis outcomes indicated that the first 16 amino acids (the N α motif) are not essential for NaTrxh secretion, instead it was the inner domain, the N β motif, the one that directly led its secretion (Figure 2).

The N β motif is apparently exclusive to plant Trxs. Besides NaTrxh, a similar motif has been found in only two soybean thioredoxins (Trxh2 and Trxh1) that, notably, are associated with the plasma membrane. Both soybean Trxs have an N-terminal extension [60] that includes a region with a high similarity index to the N β sequence (Additional file 3: Figure S3).

Our cell biology data along with our molecular assays by transient expression of different versions of NaTrxh fused to GFP indicate that NaTrxh secretion is due to its N β motif and that the protein follows a secretion pathway that requires the ER, the Golgi apparatus, and secretion vesicles. How NaTrxh interacts with these secretory elements is not known since the NaTrxh N-terminus does not have any of the typical signal peptide biochemical properties. However, the absence of an orthodox signal peptide in NaTrxh reveals the existence of an alternative secretion mechanism that uses, to some extent, the ER/Golgi secretory pathway. The accurate mechanism that leads NaTrxh secretion needs to be clarified and future research will be of great interest in order to unravel possible novel plant trafficking routes.

NaTrxh:S-RNase interaction

Protein and mRNA levels of NaTrxh are higher in the styles of SI plants than in self-compatible plants, and S-RNase interacts with NaTrxh *in vitro*. These facts have been used to classify *NaTrxh* as a pistil modifier gene that accounts for pollen rejection in *N. alata* [22,26].

This work contributes to our understanding of the molecular mechanism mediating the NaTrxh: S-RNase interaction. The pull-down experiments show that the NaTrxh C-terminal extension (E-136 to Q-152) is essential for its interaction with S-RNase (Figure 6D). However, this region does not affect NaTrxh secretion (Figure 2B-11, B-12) or Trx activity (Figure 5B). Therefore, it appears that NaTrxh is able to fold correctly in the absence of the C-terminal domain or at least fold well enough to sustain its native-like reductase activity.

In *N. alata*, several proteins are directly involved in pollen rejection. In this species, S-RNase degrades the pollen tube RNA and determines sexual incompatibility on the female side. The NaTrxh:S-RNase interaction could be relevant to the SI response. NaTrxh likely stabilizes S-RNase or inhibits its ribonuclease activity in the pollen tube. Indeed, Oxley and Bacic [61] showed that S-RNase ribonuclease activity is affected by redox state *in vitro*. However, the redox state of NaTrxh does not impair its interaction with S-RNase [22].

S-RNase forms complexes with other stelar proteins (i.e., 120 K, p11, NaTTs) [62]. While 120 K is known to be essential for SI in *N. alata* [63], the precise function of these protein complexes in SI is still unclear. It is possible that NaTrxh participates as an associating factor to transport such as S-RNase, 120 K, NaTTs or p11 to the pollen tube or, alternatively, to release these proteins from S-RNase complexes once inside the pollen tube. Both scenarios may be possible since a redox change by NaTrxh could play an important role for modifying S-RNase and stelar protein complexes. It has been determined that one of the targets of NaTrxh is actually S-RNase [22]. Therefore, further research is needed to determine if NaTrxh is a modifier factor in *N. alata* SI by altering the S-RNase redox state *in planta*. Although the data presented here are consistent with a role of NaTrxh in pollen rejection in SI *Nicotiana* species, loss of function assays would provide direct evidence of this role.

Finally, homology modeling to predict the 3D structure of Trx h revealed high sequence similarity between the *H. vulgare* and *N. alata* Trxh proteins, including conservation of the reactive site loop. The quality of the predicted model indicates similarity at the structural level too. The barley Trx h protein plays an important regulatory role during seed germination [64], and one of its targets is the barley α -amylase/subtilisin inhibitor, a homologue of the SI modifier *N. alata* NaStEP protein

recently described by our group [65]. Both NaStEP and *H. vulgare* inhibitor proteins share extensive structural similarity; the loop equivalent to the one mediating the interaction of the barley proteins is present in NaStEP but is longer and has four cysteine residues instead of two [65]. An interaction of NaTrxh and NaStEP at some point along the physiological events regulating pollen rejection in *Nicotiana* is a possibility worth future consideration.

Conclusions

Thioredoxins type *h* clustered within the subgroup 2 contain non-conserved extensions towards the N- and/or the C-termini, which function is still unclear. In this work, we showed that the N-terminal extension of NaTrxh, a subgroup 2 Trx h from *N. alata*, contained the sufficient information to lead its secretion towards the apoplast. Interestingly, this extension contains two distinguishable motifs, called N α and N β , divided by the hidden Markov algorithm [28] prediction of a cleavage site on the Ala-16 position. While the N α domain appeared unlikely to have any function on NaTrxh secretion, the N β was the responsible for its particular subcellular localization.

The N β domain is the only sequence necessary for NaTrxh secretion. Transient expression experiments in epidermal onion cells of the N β -GFP fusion protein revealed its localization in the apoplast, as occurred with the full NaTrxh protein fused to GFP and with the NaTrxh Δ N α and NaTrxh Δ COO mutants as well. These data corroborated the N β function as a novel signal peptide since its primary structure position and hydrophilic profile do not follow the typical biochemical features of the classical transport sequences.

The N β biochemical features suggested an ER/Golgi independent secretion pathway. However, NaTrxh was detected in a microsomal fraction and, furthermore, was immune-detected mainly associated to classical secretory elements when observed within the cells in *N. alata* styles, providing evidences that the NaTrxh could be secreted through the classical ER/Golgi pathway or at least, it uses the elements of this route. This hypothesis was also tested by fusing the ER retention signal KDEL to NaTrxh-GFP and treating the cells, when expressing the fusion protein NaTrxh-GFP, with BFA, separately. In the first case, the NaTrxh-GFP(KDEL) was found associated to the ER and in the latter, the NaTrxh-GFP secretion was abolished, confirming that the NaTrxh actually goes through these organelles in order to be secreted. Furthermore, it was also found that the N β domain played an important structural role on the NaTrxh tertiary structure stability since the NaTrxh Δ N β , which only lacks the N β domain, was detected in inclusion bodies when overexpressed in *E. coli* cells and not in the soluble one as the wild type and the other NaTrxh versions did (i.e., NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N α β and NaTrxh Δ COO).

Regarding the C-terminus, it was found to be essential for the NaTrxh-S-RNase *in vitro* interaction, since the S-RNase was unable to bind to a NaTrxh Δ COO-containing column.

Finally, the *in silico* analysis showed that the NaTrxh N- and C-termini are solvent exposed, suggesting a protein-protein interaction role. While this function appears to be essential for the S-RNase interaction, it also provided evidences on the N β domain, which should interact either with a non-identified secretory element or interact in a different manner as the classical secreted proteins do with SRP. Interestingly, the N-terminal extension clearly showed two structural motifs, which coincide with the N α and N β domains tested in this work.

Methods

Plant materials

Self-incompatible (SI) *Nicotiana alata* S₁₀₅S₁₀₅ has been described previously [22,66-68].

GST fusion proteins, overexpression and purification from *E. coli*

The NaTrxh Δ N α and the NaTrxh Δ N α β cDNAs were generated with *Bam*-HI and *Eco*-RI flanking sites using 5'-GCGCGGATCCATGGCAGAGGCAGAATCAG-3' and 5'-GCGGATCCATGTCGCGTGTGATTG-3' as sense primers, respectively, and 5'-GCGCGCGGGAATTC AATTTATTTGGACATGAAA-3' as the antisense primer for both mutants. For the NaTrxh Δ COO mutant, we used 5'-CGCGCGGATCCATGGGATCGTATCTT TCAA-3' as the forward primer and 5'-CCG GAATTC CCTGTGCTTGAGAATCTTTTTCTCGAG-3' as the reverse primer with *Bam*-HI and *Eco*-RI sites, respectively. The NaTrxh Δ N β cDNA with *Bam*-HI and *Eco*-RI sites was generated by two sequential PCRs. For the first PCR, the forward primer was 5'-TCGCGTGTGATTGCTTTTCATTCTTCCAAT-3'. The PCR product from the first amplification was used as template for the second PCR, with 5'-GGATCCATGGGATCGT ATCTTTCAAGTTTGCTCGGTGGAGGCGGCGG AAGCGTCGCGTGTGAT-3' used as the sense primer. The reverse primer in both amplification steps was the same as that used for the other N-mutants.

For overexpression of the mutant forms of NaTrxh, each cDNA was cloned into pGEX 4 T-2 (pGEX) (Amersham Biosciences) in *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells (Stratagene), as was previously described for the wild type NaTrxh [22].

The GST:NaTrxh, GST:NaTrxh Δ N α , GST:NaTrxh Δ N β , GST:NaTrxh Δ N α β , and GST:NaTrxh Δ COO fusion proteins were overexpressed in *E. coli* cultures at an OD₆₀₀ of 0.5 – 0.7 by adding 0.1 mM IPTG and incubating for 3 – 5 h at 37°C. The proteins were separated by batch affinity chromatography using glutathione agarose (Sigma).

Constructs for NaTrxh versions, N β and p11 fused to GFP
NaTrxh and NaTrxh Δ N β cDNA with *attB1* and *attB2* sites were generated by using the following primers: forward, 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC TTCATGGGATCGTATCTTTCAAGTTTG-3'; reverse, 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTGG ACATGAAATTTAGTTCGATA-3'. The pGEX::NaTrxh and pGEX::NaTrxh Δ N β constructs were used as templates, respectively. The PCR products were cloned into pDONR/Zeo (Invitrogen) by recombination with a BP Clonase (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

The NaTrxh Δ N α , NaTrxh Δ N $\alpha\beta$, and p11 cDNAs were generated by PCR using the forward primers 5'-CACC ATGGCAGAGGCAGAATCAGGA-3', 5'-CACCATGTC GCGTGTGATTGCTTTT-3' and 5'-CACCATGTCAGG AAAACAAGGGTCTGCAATTTTATG-3', respectively. For the NaTrxh Δ N α and NaTrxh Δ N $\alpha\beta$ clones, the reverse primer was 5'-TTATTGGACATGAAATTTAG TTCGATAATTACTAGCAGC-3'. For p11, the reverse primer was 5' TTTGTTTGTAACTTAGCAGTAAC TGAAATCTTTTGGCC 3'. All cDNAs were cloned into pENTR/D-TOPO (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

NaTrxh Δ COO cDNA was cloned into pENTR/D-TOPO by using 5'-CACCTGGGATCGTATCTTTCAAGT-3' and 5'-TCATCCCTGTGCTTGAGAATCTT-3' as sense and antisense primers, respectively.

To generate the N β sequence, the DNA fragment 5'-C ACCATGGCAGAGGCAGAATCAGGATCGTCGTCAG AACCG-3' was aligned with its complement by mixing both primers and incubating at 94°C for 15 min and then for 30 min at room temperature before proceeding with cloning into pENTR/D-TOPO (Invitrogen), following the manufacturer's instructions.

All *NaTrxh* sequences (including N β) were transferred by recombination by LR recombinase enzymatic mixture (Invitrogen) to pEarleyGateway103 (C-GFP-HIS) (pEG103) [69], following the manufacturer's instructions. In the plasmid, the gene of interest is translated with GFP fused to its C-terminus under the control of the 35S cauliflower mosaic virus (35S) promoter.

The *NaTrxh:GFP(KDEL)*, *N β :GFP(KDEL)*, and *p11:GFP(KDEL)* constructs were generated by PCR using the corresponding pEG103 construct as a template. The forward primers were the same as described above for each construct and the reverse was 5' TCAAAGCTC ATCTTTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGCTAGC 3', which encodes the amino acids KDEL fused to the C-terminus of GFP from pEG103.

Transient expression assays in onion epidermal cells

Each fusion construct *35S:NaTrxh-GFP* was individually bombarded into onion epidermal cells [70]. After 24 h

of particle bombardment, onion epidermal cells were plasmolyzed by incubation in 1 M NaCl for 10 min. Fluorescence was visualized using an Olympus FV 1000 confocal microscope with 485/545 nm excitation/emission light for GFP and 570/670 nm for propidium iodine (Sigma), which was used to stain the nucleus.

Brefeldin A (BFA) treatment

Bombarded onion epidermal cells were incubated in 50 μ g/ml Brefeldin A (BFA; Sigma) for 30 min at room temperature before observation under a confocal microscope [71].

Protein assay

Protein concentrations were determined as described elsewhere [72] and using bovine serum albumin as standard.

Reductase activity assay

The ability of the soluble NaTrxh mutants to reduce insulin disulphide bonds was evaluated as previously described [7] and compared with the reductase activity of the wild-type recombinant NaTrxh [22]. In these assays, 2.5 μ g of purified Trx protein were used.

Protein gel blot analysis and immunostaining

Proteins were fractionated by 12.5 % SDS-PAGE, blotted onto nitrocellulose, and then immunostained with polyclonal anti-GST (1:10,000 dilution), anti-NaTrxh (1:1,000) [22], or anti *S*₁₀₅-RNase (1:10,000 dilution) [29].

Affi-gel affinity columns and pull-down assays

Purified recombinant GST fusion proteins (30 mg) were immobilized on Affi-gel-10 (Bio-Rad), following the manufacturer's instructions. The NaTrxh_{rec}-Affi-gel affinity column used was the same as previously reported [22].

Protein crude extracts (1 mg) from *N. alata* *S*₁₀₅*S*₁₀₅ were obtained in a binding buffer (BB: 50 mM Tris-HCl, pH 7.9) and passed over each GST-NaTrxhAffi-gel column. After recovering the unbound fraction, ten bed volume washes were done with the BB. The column was sequentially washed as follows: (a) BB plus 1 % Tween-20, (b) BB plus 0.1 M NaCl, and (c) BB plus 0.2 M NaCl where indicated. Tightly bound proteins were eluted with a 50 mM glycine plus 50 mM NaCl, pH 2.6 buffer. The samples were neutralized by the immediate addition of 1 M Tris. Fractions were concentrated by cold acetone precipitation and analyzed by SDS-PAGE and western blot, as described above.

Multiple alignment analysis

Amino acid sequences of plant Trxs were aligned by ClustalW [73]. The GenBank accession numbers used are as follows: from Trx h subgroup 1, *A. thaliana*

(S58118 and S58119), *Brassica napus* (Q39362), *B. oleracea* (P68176), *N. tabacum* (Q07090 and P29449), and *Oryza sativa* (D26547); and from Trx h subgroup 2, *A. thaliana* (AAD39316, AAG52561 and S58123), *Ipomoea batatas* (AY344228), and *N. alata* (DQ021448).

Modeling of the *N. alata* h2 thioredoxin

BLAST sequence analysis revealed h2 thioredoxin from barley (*H. vulgare*; PDB id 2IWT) as the closest homologue to the *N. alata* thioredoxin NaTrxh. With Modeller 9v4 [74,75], several possible alignments were then used to produce up to 100 initial homology models of NaTrxh. After evaluation using ANOLEA, the best models were recombined in Modeller, and the selection repeated. The best model was then used for a Molecular Dynamics (MD) simulation run at 35 ns in an octahedral water box (1.2 nm distance from the walls to the protein) with 0.15 M NaCl, at 303 K (Berendsen thermostat, with velocity rescaling) and standard pressure (Berendsenbarostat), using GRO-MACS v4.5 [33] and the GROMOS G53a6 force field [76]. After a 30 ns simulation, the radius of gyration and root mean squared deviation (rmsd) changes of the protein reached a plateau, and only the first 30 and the last 20 amino acids appeared partially unfolded. The most representative conformer was recovered with clustering from 30 to 35 ns, minimized, and the MD simulation repeated. Again, after clustering from 30 to 35 ns and minimization, a final model was produced. The last 5 ns of MD simulation were used to estimate the local pre-residue fluctuations (rmsf) as a tool to identify poorly structured regions in the protein. For this particular case, the repeated MD simulations converged better to a stable model than the classic simulated annealing MD. The reason behind this was not pursued further.

The final model was minimized again using the ROSETTA relax-fast protocol [77] and its quality evaluated. The ANOLEA total energy [37] is $-1184.276 E/\kappa T$ units, with positive energies (sum $41.691 E/\kappa T$ units) in 12 of 52 residues (Figure 7). The ProQ scores [38,78,79] are LG 2.910 (very good) and MaxSub 0.301 (fairly good). MaxSub has been compared to other scores and was found to be a reliable quality score for homology-based models [79]. The biological appropriateness of the final model was rated using the Rd.HMM protocol [39]. The search of amino acid sequences compatible with the final model on the NCBI sequence databases retrieved 62 sequences. The top score corresponded to the NaTrxh amino acid sequence (GenBank accession AAY42864.1, HMM score 124, E-value 6.6×10^{-31}). The original X-ray template is at position 29 with an HMM score of 20. In the remaining sequences, 45 were Trxh sequences, 15 lacked functional annotation, and none were annotated

with an alternative function. The ratio of the HMM score to the NaTrxh sequence length is 0.84, which is indicative of a very good model [39]. The HMM alignment is consistent with an optimal threading of the amino acid sequence to the NaTrxh 3D model. From these data, the 3D coordinates of the NaTrxh predicted model could be rated as highly appropriate to host the NaTrxh amino acid sequence. In contrast to other quality assessment methods for protein structural models, the Rd.HMM protocol does not give false positives; therefore, the model may be regarded as a highly reliable prediction.

Disordered regions of NaTrxh

We used DisEMBL [44,80] to predict, *in silico*, intrinsically disordered regions (IDRs) in the NaTrxh amino acid sequence. DisEMBL reports three different index values for assignment of IDRs: loops/coils, hot loops, and remark 465. Loops/coils indicate residues found within loops that are not necessarily disordered; hot loops indicate highly dynamic loop regions that should be regarded as disordered; and remark465 labels the Protein Data Base (PDB) records with missing coordinates in the X-ray structure, accordingly. The DisEMBL index was trained with PDB data to predict highly mobile regions likely to produce a poorly defined electron density in the would-be X-ray data [80].

Immuno-gold and transmission electron microscopy

N. alata flowers were emasculated 48 h before anthesis and then collected as they reached maturity. Tissue was cut 2 mm below the stigma and fixed in 3% paraformaldehyde and 0.5% glutaraldehyde in 0.1 M PBS for a minimum of 4 h at 4°C. Tissue was rinsed in 0.1 M PBS three times for 10 min. The fixed tissue was dehydrated in a series of ethanol concentrations (30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 100%) and infiltrated with LR-white resin by dipping it into solutions of increasing concentration (25%, 50%, 75%, 100%). The selected regions were then cut into ultra thin sections and placed in nickel grids. For immunolocalization, sections were blocked with TBST buffer (20 mM Tris pH 7.6, 150 mM NaCl, 20 mM sodium azide, 1% Tween 20, 5% BSA) for 1 h at room temperature and then incubated with a rabbit anti-NaTrxh antibody (1:10) at 4°C overnight. The sections were washed three times with TBST for 5 min and then incubated with 25 nm gold-labeled anti-rabbit IgG (1:10) for 2 h at room temperature. Grids were washed three times in TBST and then two times in deionized water. The sections were stained with uranyl acetate followed by lead citrate. Grids were observed and photographed with a JEOL 1200EXII electron microscope.

Additional files

Additional file 1: Figure S1. The N- and C-terminal extensions in NaTrxh. Protein alignment of various plant Trxs h. NaTrxh N- and C-terminal extensions are bolded. The N-terminal extension was split into two subregions based on the Hidden-Markov-predicted cleavage site: Na covers from the Met-1 to the Ala-16 residues; the N β expands from Ala-17 to Pro-27.

Additional file 2: Figure S2. Hydrophobicity profiles of the N-termini of Nap11 and NaTrxh proteins. Dotted line: Nap11; solid line: NaTrxh.

Additional file 3: Figure S3. A similar N β motif from *N. alata* (Nala [DQ021448]) is found in *Glycine max* Trxh1 and Trxh2 (Gmax [TRX1] and Gmax [TRX2], respectively), which are associated with the plasma membrane. The N β motif (underlined), essential to lead NaTrxh secretion, is conserved in Trxh1 and Trxh2 (both associated to the plasma membrane) from soybean [60].

Abbreviations

Trx: Thioredoxin; Trx h: Thioredoxin type *h*; ER: Endoplasmic reticulum; ECM: Extracellular matrix; CW: Cell wall; BFA: Brefeldin A; DTT: Dithiothreitol; MD: Molecular dynamic; PDB: Protein data bank; IDRs: Intrinsically disordered regions; IDPs: Intrinsically disordered proteins; SI: Self-incompatibility/self-incompatible; GFP: Green fluorescent protein; SRK: S-locus receptor kinase; ORFs: Open reading frames; rmsd: Root mean squared deviation; SRP: Signal receptor particle; VMD: Visual molecular dynamics.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

AAC and JAJD generated the molecular constructs and performed the molecular and transient expression assays. RRS, AZC and LPMC performed the structural *in silico* analysis. CEBA worked on onion epidermal cells transfection. CPIS performed the electron microscopy immune-localization experiments. YCZ generated and provided Nap11 constructs. JMG supervised the experiments. FCG supervised the research, designed the experiments and was involved in data analysis. FCG and JAJD wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by CONACYT-México (81968), DGAPA-UNAM (IN205009, IN210312). J.A.J.-D. was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico-UNAM. We thank Melody Kroll for manuscript edition, Andrew Beacham (University of Birmingham, UK) for critical reading of the manuscript and Laurel Fábila, Karina Jiménez-Durán and Ma. Teresa Olivera (Facultad de Química, UNAM, Mexico) for technical assistance.

Author details

¹Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México 04510, Distrito Federal, México. ²Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, México 04510, Distrito Federal, México.

Received: 24 January 2014 Accepted: 12 May 2014

Published: 28 May 2014

References

- Wollman EE, d'Auriol L, Rimsky L, Shaw A, Jacquot JP, Wingfield P, Graber P, Dessarps F, Robin P, Galibert F, Bertoglio J, Fradelizi D: **Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin.** *J Biol Chem* 1988, **263**:15506–15512.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienberger JM, Bonnard G, Meyer Y: **Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**:14144–14149.
- Meyer Y, Buchanan BB, Vignols F, Reichheld JP: **Thioredoxins and glutaredoxins: unifying elements in redox biology.** *Annu Rev Genet* 2009, **43**:335–367.
- Buchanan BB, Balmer Y: **Redox regulation: a broadening horizon.** *Annu Rev Plant Biol* 2005, **56**:187–220.
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld JP, Riondet C: **Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance.** *Antioxid Redox Signal* 2012, **17**:1124–1160.
- Laurent TC, Moore EC, Reichard P: **Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides VI. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor of *Escherichia coli*.** *J Biol Chem* 1964, **239**:3436–3444.
- Holmgren A: **Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide.** *J Biol Chem* 1979, **254**:9627–9632.
- Holmgren A: **Enzymatic reduction-oxidation of proteins disulfides by thioredoxin.** *Methods Enzymol* 1984, **107**:295–300.
- Stewart EJ, Aslund F, Beckwith J: **Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins.** *EMBO J* 1998, **17**:5543–5550.
- Arné ESJ, Holmgren A: **Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase.** *Eur J Biochem* 2000, **267**:6102–6109.
- Traverso JA, Pulido A, Rodríguez-García M, Alché JD: **Thiol-based redox regulation in sexual plant reproduction: new insights and perspectives.** *Front Plant Sci* 2013, **4**:1–14.
- Eklund H, Gleason FK, Holmgren A: **Structural and functional relations among thioredoxins of different species.** *Proteins* 1991, **11**:13–28.
- Buchanan BB, Holmgren A, Jacquot JP, Scheibe R: **Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest.** *Biochim Biophys Acta* 1820, **2012**:1822–1829.
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH: **Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins-molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling.** *Antioxid Redox Signal* 2013, **19**:1539–1605.
- Alkhalifiou F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F: **A novel type of thioredoxins dedicated to symbiosis in legumes.** *Plant Phys* 2008, **148**:424–435.
- Buchanan BB: **Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development.** *Arch Biochem Biophys* 1991, **288**:1–9.
- Mestres-Ortega D, Meyer Y: **The *Arabidopsis thaliana* encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin.** *Gene* 1999, **240**:307–316.
- Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M: **Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*.** *FEBS Lett* 2003, **543**:87–92.
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustün S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Börnke F: **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* 2010, **22**:1498–1515.
- Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H, Chino M: **Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap.** *Planta* 1995, **109**:1295–1300.
- Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jacquot JP: **A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**:14545–14550.
- Juárez-Díaz JA, McClure B, Vázquez-Santanta S, Guevara-García A, León-Mejía P, Márquez-Guzmán J, Cruz-García F: **A novel thioredoxin h is secreted in *Nicotiana glauca* and reduces S-RNase in vitro.** *J Biol Chem* 2006, **281**:3418–3424.
- Cabrilac D, Cock JM, Dumas C, Gaude T: **The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins.** *Nature* 2001, **410**:220–223.
- Bower MS, Matias DD, Fernandes-Carvalho E, Mazzurco M, Gu T, Rothstein SJ, Goring DR: **Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase.** *Plant Cell* 1996, **8**:1641–1650.
- Haffani Y Z, Gaude T, Cock JM, Goring DR: **Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response.** *Plant Mol Biol* 2004, **55**:619–630.
- McClure B, Cruz-García F, Romero C: **Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems.** *Ann Bot* 2011, **108**:647–658.

27. Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP: **The thioredoxin h system of higher plants.** *Plant Physiol Biochem* 2004, **42**:265–271.
28. Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S: **Improved prediction of signal peptides: signalP 3.0.** *J Mol Biol* 2004, **340**:783–790.
29. Cruz-García F, Hancock CN, Kim D, McClure B: **Stylar glycoproteins bind to S-RNase in vitro.** *Plant J* 2005, **42**:295–304.
30. Andres DA, Dickerson IM, Dixon JE: **Variants of the carboxyl-terminal KDEL sequence direct intracellular retention.** *J Biol Chem* 1990, **265**:5952–5955.
31. Andres DA, Rhodes JD, Meisel RL, Dixon JE: **Characterization of the carboxyl-terminal sequences responsible for protein retention in the endoplasmic reticulum.** *J Biol Chem* 1991, **266**:14277–14282.
32. Eswar N, Webb B, Marti-Renom MA, Madhusudhan MS, Eramian D, Shen MY, Pieper U, Sali A: **Comparative protein structure modelling using Modeller.** *Curr Protoc Bioinformatics* 2006, **15**:5.6.1–5.6.30.
33. Berendsen HJC, van der Spoel D, van Drunen R: **GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation.** *Comput Phys Commun* 1995, **91**:43–56.
34. Lindahl E, Hess B, van der Spoel D: **GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis.** *J Mol Model* 2001, **7**:306–317.
35. Protein Data Bank (PDB): <http://www.rcsb.org/pdb>.
36. Humphrey W, Dalke A, Schulten K: **VMD: visual molecular dynamics.** *J Mol Graph* 1996, **14**:33–38.
37. Melo F, Feytmans E: **Assessing protein structures with a non-local atomic interaction energy.** *J Mol Biol* 1998, **277**:1141–1152.
38. Stockholm Bioinformatics Center (SBC): <http://www.sbc.su.se/~bjornw/ProQ/ProQ.html>.
39. Martínez-Castilla LP, Rodríguez-Sotres R: **A score of the ability of a three-dimensional protein model to retrieve its own sequence as a quantitative measure of its quality and appropriateness.** *PLoS One* 2010, **5**:e12483.
40. National Center of Biotechnology Information (NCBI): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein>.
41. Dunker AK, Obradovic Z, Romero P, Garner EC, Brown CJ: **Intrinsic protein disorder in complete genomes.** *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* 2000, **11**:161–171.
42. Dunker AK, Lawson JD, Brown CJ, Williams RM, Romero P, Oh JS, Oldfield CJ, Campen AM, Ratliff CM, Hippes KW, Ausio J, Nissen MS, Reeves R, Kang C, Kissinger CR, Bailey RW, Griswold MD, Chiu W, Garner EC, Obradovic Z: **Intrinsically disordered protein.** *J Mol Graph Model* 2001, **19**:26–59.
43. Xue B, Dunbrack RL, Williams RW, Dunker AK, Uversky VN: **PONDR-FIT: a meta-predictor of intrinsically disordered amino acids.** *Biochim Biophys Acta* 1804, **2010**:996–1010.
44. DisEMBL server: <http://www.lindinglab.org/Publications/embl/protein-disorder-prediction-implications-for-structural-proteomics>.
45. Nombela C, Gil C, Chaffin WL: **Non-conventional protein secretion in yeast.** *Trends Microbiol* 2006, **14**:15–21.
46. Zhao WQ, Lacor PN, Chen H, Lambert MP, Quon MJ, Krafft GA, Klein WL: **Insulin receptor dysfunction impairs cellular clearance of neurotoxic oligomeric β .** *J Biol Chem* 2009, **284**:18742–18753.
47. MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A: **Rapid secretion of interleukin-1 β by microvesicle shedding.** *Immunity* 2001, **15**:825–835.
48. Walter P, Ibrahim I, Blobel G: **Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum. I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein.** *J Cell Biol* 1981, **91**:545–550.
49. Keenan RJ, Freymann DM, Stroud RM, Walter P: **The signal recognition particle.** *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001, **70**:755–775.
50. Kinseth MA, Anjard C, Fuller D, Guizzunti G, Loomis WF, Malhotra V: **The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development.** *Cell* 2007, **130**:524–534.
51. Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A: **The secretory route of the leaderless protein interleukin 1 β involves exocytosis of endolysosome-related vesicles.** *Mol Biol Cell* 1999, **10**:1463–1475.
52. Nickel W, Rabouille C: **Mechanisms of regulated unconventional protein secretion.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**:148–155.
53. Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A: **Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease.** *J Cell Biol* 2007, **179**:485–500.
54. Ding Y, Wang J, Wang J, Stierhof Y-D, Robinson DG, Jiang L: **Unconventional protein secretion.** *Trends Plant Sci* 2012, **17**:606–615.
55. Drakaki G, Dandekar A: **Protein secretion: how many secretory routes does a plant cell have?** *Plant Sci* 2013, **203–204**:74–78.
56. Cheng E, Zamski E, Guo WW, Pharr DM, Williamson JD: **Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: a possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens.** *Planta* 2009, **230**:1093–1103.
57. Zhang H, Zhang L, Gao B, Fan H, Jin J, Botella MA, Jiang L, Lin J: **Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in *Arabidopsis*.** *PLoS One* 2011, **6**:e26477.
58. Prado N, Alché Jd D, Casado-Vela J, Mas S, Villanba M, Rodriguez R, Bantano E: **Nanovesicles are secreted during pollen germination and pollen tube growth: a possible role in fertilization.** *Mol Plant* 2014, **7**:573–577.
59. Traverso JA, Micallega C, Martinez A, Brown SC, Satiat-Jeunemaitre B: **Roles of N-terminal fatty acid acylations in membrane compartment partitioning: *Arabidopsis* h-type thioredoxins as a case study.** *Plant Cell* 2013, **25**:1056–1077.
60. Shi J, Bhattacharyya MK: **A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean.** *Plant Mol Biol* 1996, **32**:653–662.
61. Oxley D, Bacic A: **Disulphide bonding in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana glauca*.** *Eur J Biochem* 1996, **242**:75–78.
62. Cruz-García F, Hancock CN, McClure B: **S-RNase complexes and pollen rejection.** *J Exp Bot* 2003, **54**:123–130.
63. Hancock CN, Kent L, McClure BA: **The stylar 120 kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*.** *Plant J* 2005, **43**:716–723.
64. Jiao J, Yee BC, Wong J, Kobrehel K, Buchanan BB: **Thioredoxin-linked changes in regulatory properties of barley α -amylase/subtilisin inhibitor protein.** *Plant Physiol Biochem* 1993, **31**:799–804.
65. Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F: **NaSTEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes.** *Plant Phys* 2013, **161**:97–107.
66. Murfett J, Bourque JE, McClure B: **Antisense suppression of S-RNase expression in *Nicotiana* using RNA polymerase II- and III-transcribed gene constructs.** *Plant Mol Biol* 1995, **2**:201–212.
67. Murfett J, Strabala TJ, Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure B: **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* 1996, **8**:943–958.
68. Zurek DM, Mou B, Beecher B, McClure B: **Exchanging sequence domains between S-RNases from *Nicotiana glauca* disrupts pollen recognition.** *Plant J* 1997, **11**:797–808.
69. Earley KW, Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS: **Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics.** *Plant J* 2006, **45**:616–629.
70. Scott A, Wyatt S, Tsou PL, Robertson D, Allen NS: **Model system for plant cell biology: GFP imaging in living onion epidermal cells.** *Biotechniques* 1999, **26**:1128–1132.
71. Ritzenthaler C, Nebenführ A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, Pimpel P, Staehelin LA, Robinson DG: **Reevaluation of the effects of Brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera.** *Plant Cell* 2002, **14**:237–261.
72. Bradford MM: **A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem* 1976, **72**:248–254.
73. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG: **The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools.** *Nucleic Acids Res* 1997, **25**:4876–4882.
74. Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen M, Sali A: **Protein structure modeling with MODELLER.** *Methods Mol Biol* 2008, **426**:145–159.
75. **Program for comparative protein structure modelling by satisfaction of spatial restraints (Modeller).** Server at <http://www.sailab.org/modeller>.
76. Oostenbrink C, Soares TA, van der Vegt NFA, van Gunsteren WF: **Validation of the 53A6 GROMOS force field.** *Eur Biophys J* 2005, **34**:273–284.
77. Raman S, Vernon R, Thompson J, Tyka M, Sadreyev R, Pei J, Kim D, Kellogg E, DiMaio F, Lange O, Kinch L, Sheffler W, Kim BH, Das R, Grishin NV, Baker D:

Structure prediction for CAPS8 with all-atom refinement using Rosetta. *Proteins* 2009, **77**:89–99.

78. Wallner B, Elofsson A: Can correct protein models be identified? *Protein Sci* 2003, **12**:1073–1086.
79. Wallner B, Elofsson A: All are not equal: a benchmark of different homology modeling programs. *Protein Sci* 2003, **14**:1315–1327.
80. Linding R, Jensen LJ, Diella D, Bork P, Gibson TJ, Russell RB: Protein disorder prediction. *Structure* 2003, **11**:1453–1459.

doi:10.1186/1471-2229-14-147

Cite this article as: Ávila-Castañeda et al.: A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase *in vitro*. *BMC Plant Biology* 2014 **14**:147.

Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

