



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**NaTrxh regula positivamente la actividad catalítica de la S-RNasa**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Biól. María Daniela Torres Rodríguez**

TUTOR PRINCIPAL

**Dr. Felipe Cruz García**

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**Dr. Wilhelm Hansberg Torres**

Instituto de Fisiología Celular

**Dra. Marina Gavilanes Ruíz**

Facultad de Química

Ciudad de México, enero, 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Reconocimientos**

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Felipe Cruz García en el laboratorio 104 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas.

A mi comité tutor integrado por el Dr. Wilhelm Hansberg Torres, la Dra. Marina Gavilanes Ruíz y el Dr. Felipe Cruz García.

A la Facultad de Química.

A la BioUSAI, en especial al Biól. Jorge Herrera Díaz por la asesoría en la realización de la técnica de qRT-PCR.

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

A mis compañeros del laboratorio: Yu, Javier, Andrea, Lili, Edgar, Ari, Mariana, Renata, Claudio, Oscar, Alex, Carlos y Luis.

Al programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por otorgar el financiamiento para presentar mi proyecto en el XXX Congreso Nacional de Bioquímica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría.

Este proyecto fue financiado por DGAPA IN210312 y PAIP-FQ-5000-9128.

## **Abreviaturas**

AC: Autocompatible

AI: Autoincompatible

Ala: Alanina

Cys: Cisteína

ECM: Matriz extracelular

FAD: Flavín Adenín Dinucleótido

GFP: Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

gDNA: DNA genómico

Glu: Ácido glutámico

GM: Genes Modificadores

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-Tiogalactopiranosido

kDa: Kilodalton

MCS: Sitio de clonación múltiple (Múltiple Cloning Site)

mg: Miligramos

mRNA: RNA mensajero

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

NTR: Tiorredoxina Redutasa Dependiente de NADPH

R: Purina

RE: Retículo endoplásmico

rRNA: RNA guía

SCF: Complejo Spk1-Cullin1-SLF (Skp1-Cullin-F-Box)

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SLF: Proteína con caja F del locus S (S-Locus F-box protein)

Trx: Tiorredoxina

TT: Tejido de transmisión

Y: Pirimidina

## ÍNDICE

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	7
2.1 Sistema de Autoincompatibilidad en Angiospermas.....	7
2.2 Sistema de Autoincompatibilidad Gametofítico.....	8
2.3 Características de las tiorredoxinas.....	10
2.4 Tiorredoxinas vegetales.....	12
2.5 Tiorredoxinas tipo <i>h</i> .....	13
3. Antecedentes.....	15
3.1 NaTrxh es una tiorredoxina tipo <i>h</i> con mayor expresión en plantas AI.....	15
3.2 NaTrxh colocaliza con la S-RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar.....	16
3.3 La NaTrxh interacciona con la S-RNasa y la reduce <i>in vitro</i> .....	18
4. Hipótesis.....	21
5. Objetivos.....	21
5.1 Objetivos generales.....	21
5.2 Objetivos particulares.....	21
6. Materiales y métodos.....	22
6.1 Extracción de RNA total.....	22
6.2 Cuantificación relativa del transcrito <i>NaTrxh</i> .....	24
6.3 Amplificación de <i>NaTrxh</i> de DNA genómico de plantas AC y AI.....	25
6.4 Amplificación del transcrito <i>NaTrxh</i> de plantas AC y AI.....	27
6.5 Clonación de los productos de amplificación de <i>NaTrxh</i> .....	28
6.6 Purificación de la proteína NaTrxh.....	31
6.7 SDS-PAGE.....	33
6.8 Reducción <i>in vitro</i> de la S-RNasa.....	34
6.9 Sistema de electroforesis en dos dimensiones para identificación de proteínas blanco de la NaTrxh.....	34
6.10 Cuantificación de la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.....	36
7. Resultados.....	38
7.1 Cantidad relativa del transcrito <i>NaTrxh</i> .....	38
7.1.1 Diseño de oligonucleótidos.....	38
7.1.2 Curvas de disociación de oligonucleótidos.....	39
7.1.3 Curvas de calibración.....	41
7.1.4 El transcrito de <i>NaTrxh</i> se acumula mayoritariamente en pistilos.....	43
7.1.5 El transcrito de <i>NaTrxh</i> se acumula mayoritariamente en especies AI.....	46
7.2 Existen al menos dos copias del gen <i>NaTrxh</i> .....	47
7.3 El transcrito de <i>NaTrxh</i> es producto de la transcripción del gen sin intrones...	53
7.4 Hay modificación del transcrito de <i>NaTrxh</i> en pistilo de <i>N. alata</i> .....	56
7.5 Las diferencias en la secuencia del transcrito reflejan diferencias a nivel de proteína.....	57
7.6 El efecto de la reducción de la S-RNasa por NaTrxh.....	61
7.6.1 La S-RNasa es una proteína blanco de la reducción de NaTrxh.....	61
7.6.2 La reducción por NaTrxh aumenta la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.....	63

8. Discusión.....	66
8.1 <i>NaTrxh</i> se expresa mayoritariamente en pistilos de especies AI.....	66
8.2 El transcrito de <i>NaTrxh</i> en <i>N. alata</i> es modificado en una citosina.....	67
8.3 <i>NaTrxh</i> regula la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.....	71
8.4 Posible participación de <i>NaTrxh</i> en el sistema de AI de <i>Nicotiana</i> .....	73
9. Conclusiones.....	77
10. Perspectivas.....	78
11. Bibliografía.....	79

## 1. Resumen

Las angiospermas han desarrollado diversas estrategias reproductivas para generar y mantener su diversidad genética promoviendo la polinización cruzada. Uno de estos mecanismos es la autoincompatibilidad (AI), que permite reconocer y rechazar el polen propio y aceptar aquel de plantas genéticamente distintas. Este mecanismo se ha estudiado intensamente en las familias Rosaceae, Solanaceae y Scrophulariaceae.

La AI está controlada genéticamente por el locus multialélico *S*, el cual codifica la determinante masculina, una proteína con caja F denominada SLF, y la determinante femenina, una ribonucleasa denominada S-RNasa. El reconocimiento entre la S-RNasa y SFL en el citoplasma del tubo polínico determina el rechazo del polen; sin embargo, otros genes fuera del locus *S* expresados en polen o pistilo, son necesarios para completar la vía y son conocidos como genes modificadores (GM).

En nuestro grupo se clonó el gen *NaTrxh* de *N. alata*, el cual codifica para una tiorredoxina tipo *h*. Esta proteína se acumula preferentemente en los pistilos de especies AI y es secretada al espacio extracelular del tejido de transmisión. Estudios bioquímicos revelaron que NaTrxh interactúa con la S-RNasa y la reduce *in vitro*. Lo anterior sugiere que NaTrxh contribuye al mecanismo del rechazo del polen.

En el presente estudio se compararon los niveles del transcrito de *NaTrxh* en distintos tejidos de dos especies AI y se encontró que hay mayor expresión de esta tiorredoxina en el pistilo, acorde a lo observado a nivel de proteína. En general, las especies con entorno genético de AI presentan niveles más altos del transcrito que las especies AC.

Por otro lado, se realizaron ensayos de actividad *in vitro* de la S-RNasa y se observó que sólo después de ser reducida con NaTrxh, su capacidad de degradar el RNA aumenta considerablemente. El efecto positivo de la reducción por NaTrxh sobre la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa podría contribuir de manera importante en la regulación de la actividad de la S-RNasa durante la respuesta del rechazo del polen en *Nicotiana*.

## **2. Introducción.**

### **2.1 Sistema de autoincompatibilidad en angiospermas.**

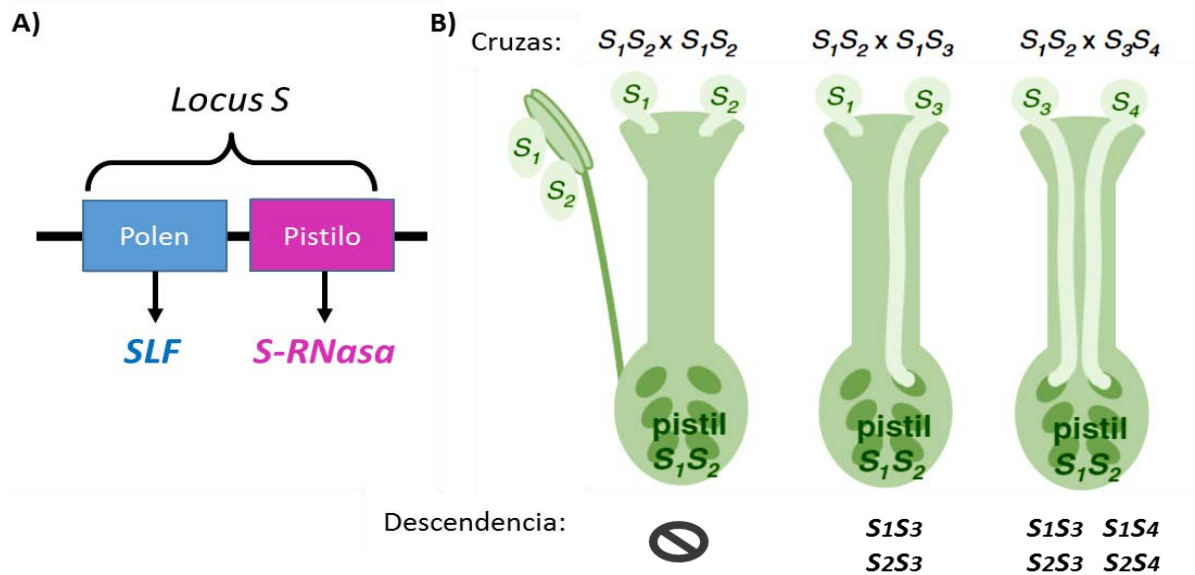
El éxito en la reproducción sexual de las angiospermas depende de una serie de eventos que van desde la llegada del grano de polen al estigma, la hidratación del polen, su germinación, crecimiento a través del estilo y finalmente, la fertilización (McClure y Franklin-Tong, 2006). El grano de polen se adhiere, hidrata y germina en la superficie estigmática permitiendo el crecimiento del tubo polínico, el cual interactúa con los componentes secretados por la matriz extracelular del estilo (McClure y Franklin-Tong, 2006). Esta interacción entre el polen y el pistilo involucra muchas proteínas que participan en una gran variedad de procesos.

Uno de los eventos de interacción polen-pistilo que han desarrollado muchas angiospermas es la autoincompatibilidad (AI), la cual se define como la incapacidad de una planta fértil hermafrodita para producir cigotos después de la autopolinización (de Nettancourt, 1977). Este proceso le permite a la planta reconocer y rechazar el polen propio y aceptar aquel de individuos genéticamente distintos (de Nettancourt, 1977; Rea y Nasrallah, 2008), con lo que se promueve la polinización cruzada y se favorece la diversidad genética en las generaciones futuras (Rea y Nasrallah, 2008).

La AI es controlada genéticamente por un único locus multialélico, denominado locus S y que incluye dos genes fuertemente ligados, uno de los cuales se expresa exclusivamente en el pistilo y el otro solo en el polen (Figura 1.A). El reconocimiento y rechazo del polen propio se basa en las interacciones alelo específicas de los productos del locus S (Figura 1.B) que desencadenan una respuesta celular que culmina en la inhibición del crecimiento del tubo polínico (Rea y Nasrallah, 2008).

De manera general, los sistemas de AI se clasifican en esporofítico y gametofítico. En la AI esporofítica, el fenotipo de compatibilidad del polen es otorgado por la antera que es un tejido diploide; mientras que en la AI gametofítica, el fenotipo de compatibilidad proviene del mismo polen que es haploide (Cruz-García y McClure, 2001). En el presente estudio se abordará únicamente el sistema de AI gametofítico.





**Figura 1.** Control genético de la AI por el locus *S*. **A)** En el locus *S* se encuentran codificadas tanto la determinante de especificidad alélica masculina como la femenina. **B)** La AI promueve la fecundación cruzada de manera que una planta con genotipo  $S_1S_2$  aceptará solo los granos de polen de genotipo distinto, por ejemplo  $S_3$  o  $S_4$  (Tomado de McClure y Franklin-Tong, 2006).

## 2.2 Sistema de autoincompatibilidad gametofítico.

La inhibición del crecimiento del tubo polínico en la AI gametofítica, estudiado en las familias Scrophulariaceae, Solanaceae y Rosaceae, se lleva a cabo en el primer tercio del estilo (McClure *et al.*, 1989) y está controlado genéticamente por un el locus *S* que codifica para las determinantes masculina y femenina (de Nettancourt, 1977; McClure *et al.*, 2011).

La determinante femenina fue identificada en *Nicotiana alata* y es una glicoproteína con actividad de ribonucleasa, conocida como la S-RNasa, perteneciente a la familia de ribonucleasas T2 (McClure *et al.*, 1989). La S-RNasa se expresa exclusivamente en las células del tejido de transmisión estilar y es secretada a su espacio extracelular (Anderson *et al.*, 1989). Se sabe que su participación en el rechazo del polen es mediante la degradación del RNA del tubo polínico (McClure *et al.*, 1990).

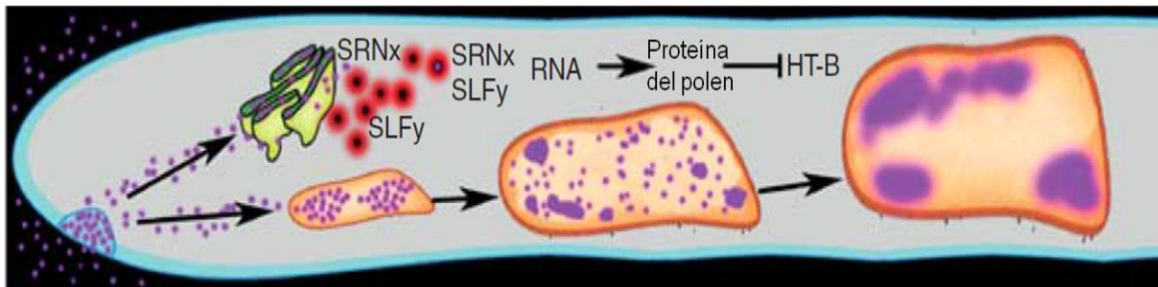
La determinante masculina es la proteína SLF (S-Locus F-box protein). Su transcrito se acumula específicamente en el polen y en los tubos polínicos (Lai *et al.*, 2002). Por medio de un ensayo de doble híbrido se demostró que la SLF de *Antirrhinum* se une a la S-RNasa *in vitro* (Qiao *et al.*, 2004). La proteína SLF incluye en su extremo N-terminal un dominio con caja F. La mayoría de las proteínas con caja F funcionan como proteínas E3 ligasas, las cuales forman parte del complejo SCF (Skp1-Cullin-F-Box). Este complejo media la poliubiquitinación de proteínas blanco para su degradación en el proteosoma 26S. Se propone que en este complejo, SLF es la encargada de transferir la ubiquitina a la proteína blanco (Hua y Kao, 2006).

La interacción S-específica entre la S-RNasa y SLF desencadena el mecanismo de AI; sin embargo, existen algunos otros genes que no están codificados dentro del locus S y cuyos productos son requeridos en el mecanismo bioquímico del rechazo del polen. Estos son conocidos como genes modificadores (GM). En pistilo se han identificado a NaStEP que es un inhibidor de proteasas, a 120K y a la proteína HT-B de función desconocida; mientras que en polen se han identificado a Cullin 1 y Spk1 que son proteínas que junto con SLF forman el complejo SCF, y por último a MdABCF que es un receptor de la membrana de polen del cual depende en gran medida la entrada de la S-RNasa al tubo polínico (McClure *et al.*, 1999; Hancock, *et al.*, 2005; Hua y Kao, 2006; Jiménez-Durán *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2014).

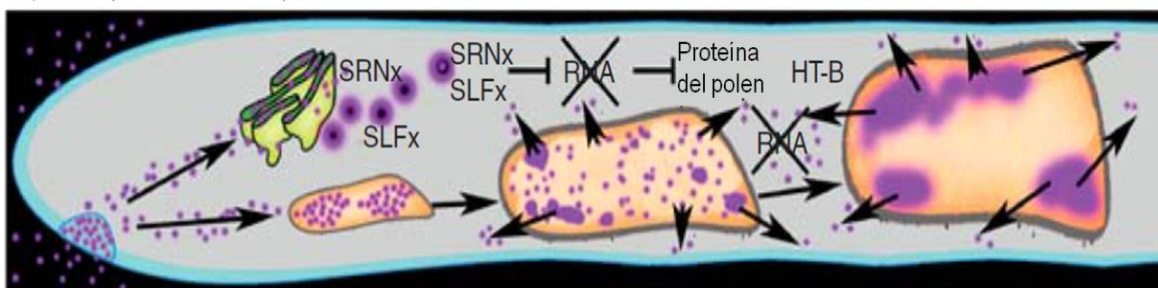
Goldraij *et al.* (2006) propusieron un modelo que establece que las S-RNasas ingresan a los tubos polínicos por endocitosis independientemente de su haplotipo S, de la misma manera ingresan las proteínas 120K y HT-B y NaStEP. Las S-RNasas se almacenan en una vacuola junto con 120K, mientras que HT-B se asocia al sistema endomembranoso del tubo polínico. Aunque una pequeña porción de S-RNasas permanece en el citoplasma en donde interactúa con SLF; si la interacción es haplotipo S específica (AC) las S-RNasas permanecen secuestradas debido a que la proteína HT-B es degradada, probablemente por una proteína del polen, hecho que permite la estabilización de la vacuola. Por el contrario, si la interacción es autoincompatible (AI), la proteína que degrada a HT-B podría estar siendo inhibida, lo cual provoca la ruptura de la vacuola y la liberación de las S-RNasas al

citoplasma en donde ejercen su acción citotóxica degradando el rRNA del tubo polínico, inhibiendo así la síntesis de proteínas y como consecuencia, su crecimiento por el estilo (Figura 2). Este es el modelo de compartimentalización de la S-RNasa.

A) Tubo polínico compatible



B) Tubo polínico incompatible



**Figura 2.** Modelo de la compartimentalización de la S-RNasa. Las S-RNasas junto con otras proteínas que se encuentran en la matriz extracelular del tejido de transmisión ingresan al tubo polínico por endocitosis y se van almacenando progresivamente dentro de vacuolas. Algunas S-RNasas pueden liberarse del sistema endomembranoso e interactuar con SLF. **A)** En una cruz compatible las S-RNasas permanecen dentro de la vacuola y no pueden ejercer su actividad citotóxica. **B)** En una cruz incompatible hay ruptura de la vacuola y liberación de las S-RNasas al citosol del tubo polínico en donde ejercen su actividad citotóxica. La ruptura de la vacuola probablemente es mediada por la proteína HT-B (Tomado de McClure et al., 2011).

Dado que el modelo de AI gametofítica dependiente de S-RNasas aún tiene muchas interrogantes, se han realizado múltiples esfuerzos para identificar otros GM, presentes en el polen o en el pistilo que podrían participar en el mecanismo del rechazo del polen. En nuestro laboratorio se han identificado algunos genes candidatos por medio de la técnica de cDNA-AFLP. Uno de ellos es una tiorredoxina

tipo *h* que se expresa mayoritariamente en pistilos de especies con entorno genético de AI (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

### **2.3 Características de las tiorredoxinas.**

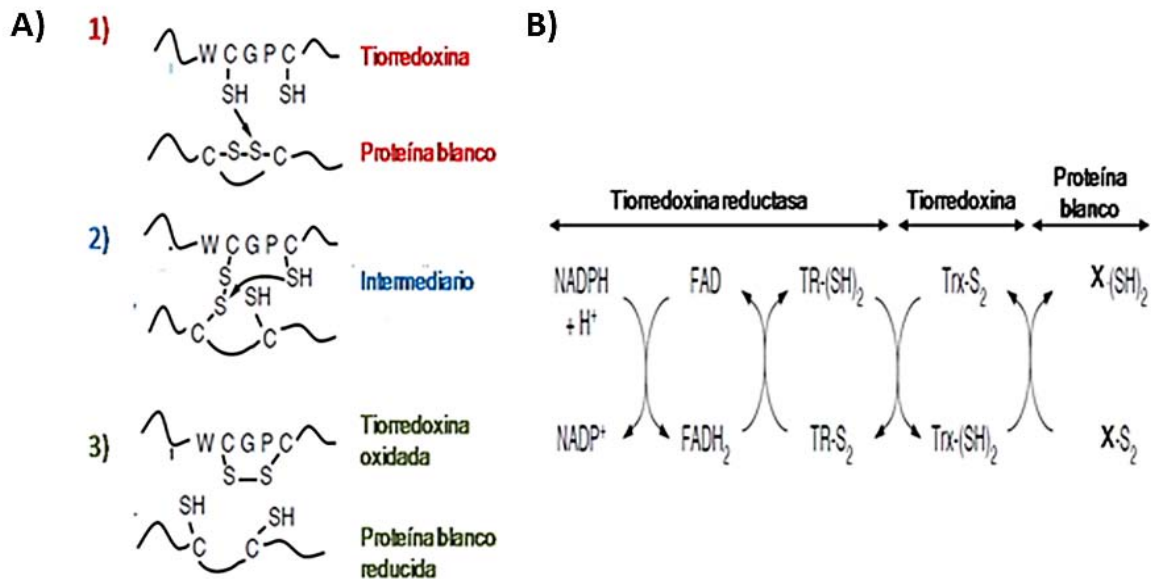
Las proteínas en el ambiente extracelular o en la superficie celular se encuentran mayoritariamente en un estado oxidado con puentes disulfuro que las estabilizan. En contraste, cuando están dentro de la célula se encuentran reducidas y las tiorredoxinas (Trx) son generalmente las responsables de mantener a las proteínas en este estado reducido (Arnér y Holmgren, 2000).

Las Trx son pequeñas proteínas globulares de aproximadamente 12 kDa, presentes en todos los organismos vivos y que pertenecen a una familia de enzimas con actividad oxidoreductasa tiol:disulfuro. Catalizan la reducción dependiente de NADPH de puentes disulfuro expuestos en otras proteínas (Holmgren, 1989), con ello participan en una gran variedad de procesos que incluyen respuesta al estrés oxidativo, transcripción, traducción, regulación enzimática, entre otros (Gelhaye *et al.*, 2004).

Las Trx se caracterizan por su sitio activo que conserva la secuencia WCGPC, el cual contribuye a la generación del potencial redox y les confiere su actividad reductora. De esta manera, en su estado reducido (SH<sub>2</sub>), las Trx pueden romper los puentes disulfuro de las proteínas (Laloi *et al.*, 2001 y Juárez-Díaz *et al.* 2006). La cisteína inicial localizada en el sitio activo es la que realiza el primer ataque nucleofílico para la reducción de la proteína blanco, lo que genera un intermediario mixto momentáneo. Posteriormente, actúa la segunda cisteína del sitio activo rompiendo el puente disulfuro del intermediario, de esta manera la proteína blanco y la tiorredoxina se liberan en sus formas reducida y oxidada, respectivamente (Figura 3.A) (Meyer *et al.*, 1999).

La energía necesaria para la reducción proviene de una molécula de NADPH y los electrones son transferidos a través de una cascada de tres proteínas. La primera es una flavoproteína homodimérica, la tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH (NTR) quien colecta los electrones del NADPH y los utiliza para reducir el

puede formar un puente disulfuro de su sitio activo, lo cual ocurre a través de su grupo prostético FAD. Posteriormente, los electrones son transferidos a la Trx oxidada, permitiendo ahora que pueda reducir a otra proteína (Figura 3. B). Todo este mecanismo se denomina sistema NADPH/NTR/Trx (Meyer *et al.*, 1999).



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

## 2.4 Tiorredoxinas vegetales.

Meyer *et al.*, (2002) clasificaron a las tiorredoxinas vegetales en 6 tipos con base en el análisis de su estructura primaria. Las Trx *m*, *x*, y *y*, están relacionadas filogenéticamente con las de procariontes, mientras que las Trx *f*, *h* y *o* son específicas de organismos eucariontes. Luego de la clasificación propuesta por Meyer se identificaron los tipos *z* y *s* (Arsova *et al.*, 2006 y Alkhalfioui *et al.*, 2008).

La localización subcelular de las diferentes Trx es un factor importante para entender los procesos fisiológicos en los que están involucradas. Se sabe que las tiorredoxinas de tipo *f*, *m*, *x*, *y* y *z* se localizan en cloroplasto y participan en la regulación de proteínas del metabolismo de carbohidratos; la tiorredoxina de tipo *o* se sitúa en la mitocondria en donde puede regular procesos como fotorrespiración, ciclo de Krebs, metabolismo de lípidos, muerte celular programada, entre otros. Por otra parte, también existe un tipo de tiorredoxina asociada a retículo endoplasmático, la tiorredoxina *s* (Collin *et al.*, 2003; Gelhaye *et al.*, 2004; Arsova *et al.*, 2006 y Alkhalifioui *et al.*, 2008).

En cuanto a la localización subcelular de las tiorredoxinas tipo *h*, inicialmente se suponía que eran citoplasmáticas puesto que no poseen una señal canónica de tránsito. Sin embargo, ahora se sabe de su presencia en distintos compartimentos celulares. Por ejemplo, la PtTrxh2 de *Populus trichocarpa* se localiza en la mitocondria (Gelhaye *et al.*, 2004b), las Trxh1 y Trxh2 contienen una extensión N-terminal de aminoácidos hidrofóbicos que unen a la proteína a la membrana plasmática (Shi y Bhattacharyya, 1996) y las Trx THL1 y THL2 de *Brassica*, que están involucradas en el mecanismo de incompatibilidad esporofítica se localizan en el citosol (Cabrillac *et al.*, 2001). Por otro lado, se ha encontrado la tiorredoxina RPP13-1 como proteína de secreción en el floema de *Oryza sativa* (Ishiwatari *et al.*, 1995).

## **2.5 Tiorredoxinas tipo *h*.**

Las tiorredoxinas tipo *h* están involucradas en procesos como la germinación de semillas en cereales, la protección celular contra el estrés oxidativo durante la desecación y la germinación de la semilla, el metabolismo del carbono y del nitrógeno y en los mecanismos de incompatibilidad sexual (Cabrillac *et al.*, 2001; Baumann *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002; Serrato y Cejudo, 2003).

Las Trx tipo *h* se clasifican en tres subgrupos (Gelhaye *et al.*, 2004):

- Subgrupo 1. Son las más estudiadas, su reducción esta mediada por la NTR y la mayoría de los miembros son exclusivamente citosólicos. En *Arabidopsis thaliana* se han encontrado abundantemente en el floema, lo cual sugiere su posible participación reguladora de los componentes del tejido vascular (Reichheld *et al.*, 2002).
- Subgrupo 2. Su principal característica es la presencia de una prolongación en el extremo N-terminal y la conservación de la secuencia del sitio activo WCGPC en todos los miembros. Se han identificado varias Trx del subgrupo 2 en *A. thaliana* (AtTRXh2, h7 y h8) y en *P. tremula* (PtTRXh2), esta última se encuentra asociada a la mitocondria (Gelhay *et al.*, 2004; Reichheld *et al.*, 2002).
- Subgrupo 3. Dentro de esta clasificación se encuentran aquellas que poseen una extensión en el extremo N-terminal que además contiene un residuo de Cys conservado en la cuarta posición. La secuencia WCGPC del sitio activo está presente en algunos miembros de este subgrupo. La PtTRXh4 de *P. tremula* es reducida por un sistema distinto al de la NTR, el cual es a través de la glutatión reductasa, también dependiente de NADPH (Gelhay *et al.*, 2004).

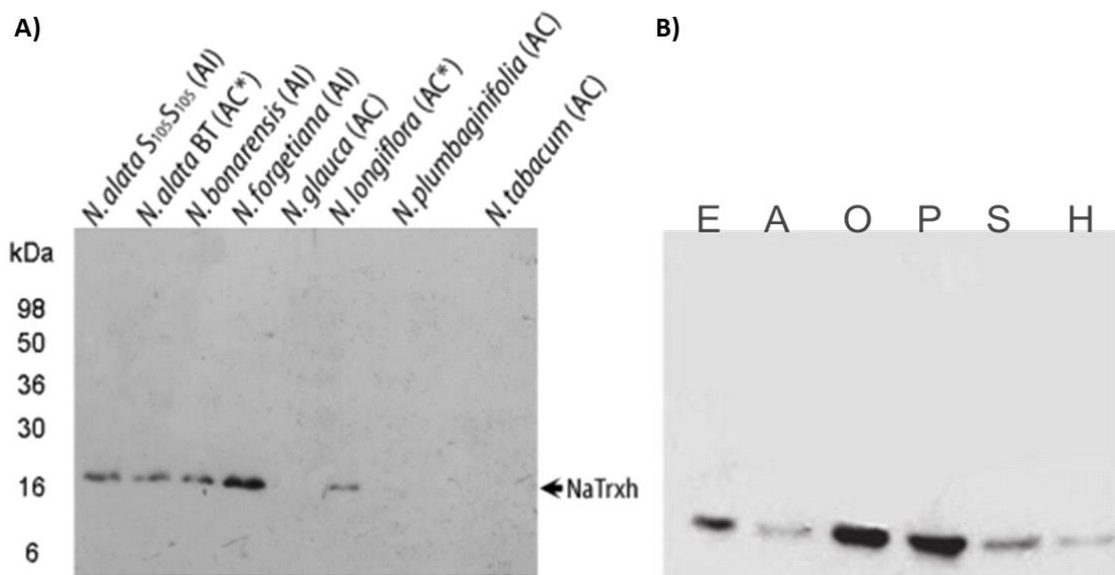
### 3. Antecedentes.

#### 3.1 NaTrxh es una tiorredoxina tipo *h* con mayor expresión en plantas AI.

Previamente, mediante la técnica de cDNA-AFLP se detectó el fragmento cDNA-AFLP25 que mostró mayor presencia en estilos de plantas con entorno genético de AI como el de *N. alata* BT en comparación con *N. plumbaginifolia* que es una planta AC.

El análisis de la secuencia completa de este transcrito reveló una gran similitud con genes de Trx vegetales. Asimismo, el análisis filogenético de su secuencia de aminoácidos permitió agruparla dentro de las tiorredoxinas tipo *h*, subgrupo 2, observando la conservación de la secuencia del sitio activo de este tipo de proteínas. La proteína fue denominada NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Mediante ensayos de inmunodetección se demostró la presencia de NaTrxh en especies con entorno genético de AI, es decir, que poseen todos los elementos necesarios para la AI pero que pueden expresar o no a la S-RNasa (AC\*). Por el contrario, en plantas AC NaTrxh no está presente (Figura 4.A).



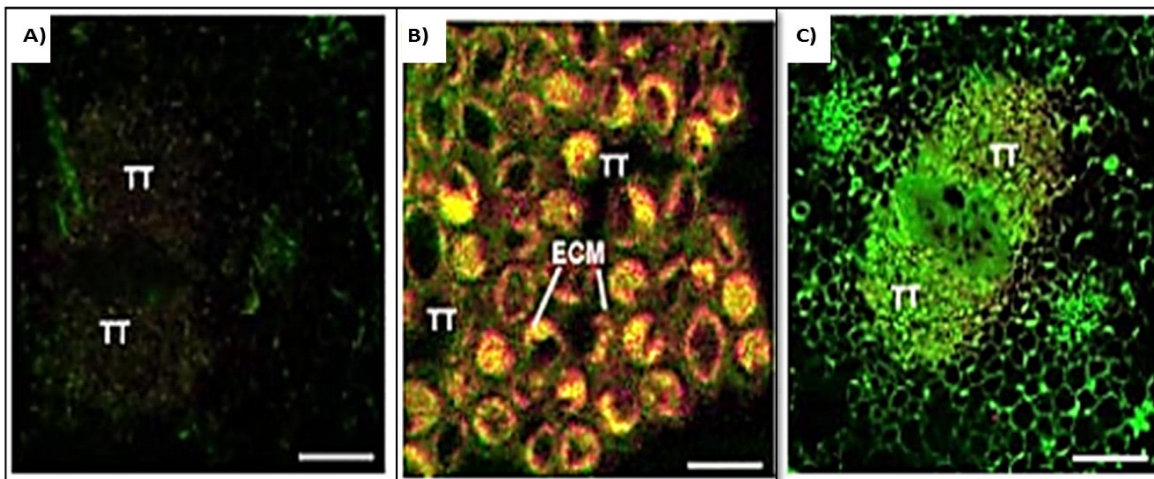
**Figura 4.** Perfil de expresión de NaTrxh **A)** Inmunodetección de NaTrxh en extractos de proteína total de los estilos de plantas autocompatibles (AC), autocompatibles que carecen de S-RNasa (AC\*) y autoincompatibles (AI) (Tomado de Juárez-Díaz, 2006). **B)** Inmunodetección NaTrxh en distintos órganos vegetales de *N. alata* BT: E (estilos), A (anteras), O (ovarios), P (pétalos), S (sépalos) y H (hoja) (Tomado de Juárez-Díaz *et al.*, 2006).



Esta acumulación preferente de NaTrxh en especies AI es una evidencia inicial de que NaTrxh puede estar involucrada en el mecanismo del rechazo del polen dependiente del locus S. Además, el análisis de su localización en distintos tejidos de *N. alata* BT mostró que la proteína se encuentra en todos ellos en distintas proporciones, siendo particularmente abundante en ovarios, estilos y pétalos (Figura 4.B) (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

### 3.2 NaTrxh colocaliza con la S-RNasa en la matriz celular del tejido de transmisión estilar.

Por medio de análisis inmunohistoquímico utilizando microscopía confocal se observó que la NaTrxh y la S<sub>C10</sub>-RNasa colocalizan en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar, lo cual demuestra la secreción de esta tiorredoxina (Figura 5) (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

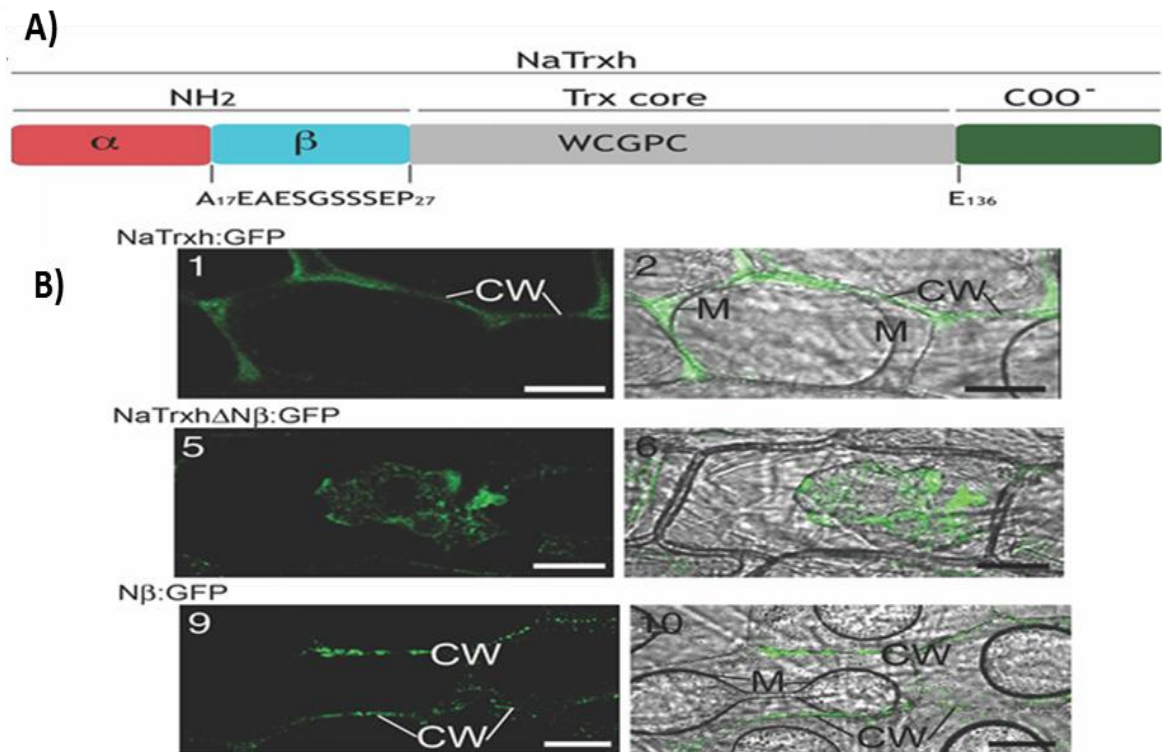


**Figura 5.** Colocalización de la proteína NaTrxh y la S<sub>C10</sub>-RNasa en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar. **A)** Control de autofluorescencia. **B)** La S<sub>C10</sub>-RNasa se muestra en color verde y la NaTrxh en color magenta; la colocalización de ambas proteínas se muestra en color amarillo. **C)** Los anticuerpos anti-NaTrxh fueron incubados con la proteína purificada previo a su aplicación al tejido. TT (tejido de transmisión) ECM (Matriz extracelular). (Tomado de Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Al igual que otras Trx tipo *h* del subgrupo 2, NaTrxh posee prolongaciones tanto en la región del N-terminal como del C-terminal. Ávila-Castañeda *et al.* (2014) han definido 3 dominios en estas extensiones y son denominados N $\alpha$ , N $\beta$  y C-terminal

(Figura 6.A). Hay evidencia de que en otras Trx el dominio hacia el extremo N-terminal está involucrado en el tránsito intracelular de la proteína, como ocurre en el caso de PtTrxh2 que se transporta a mitocondria (Gelhaye *et al.*, 2004).

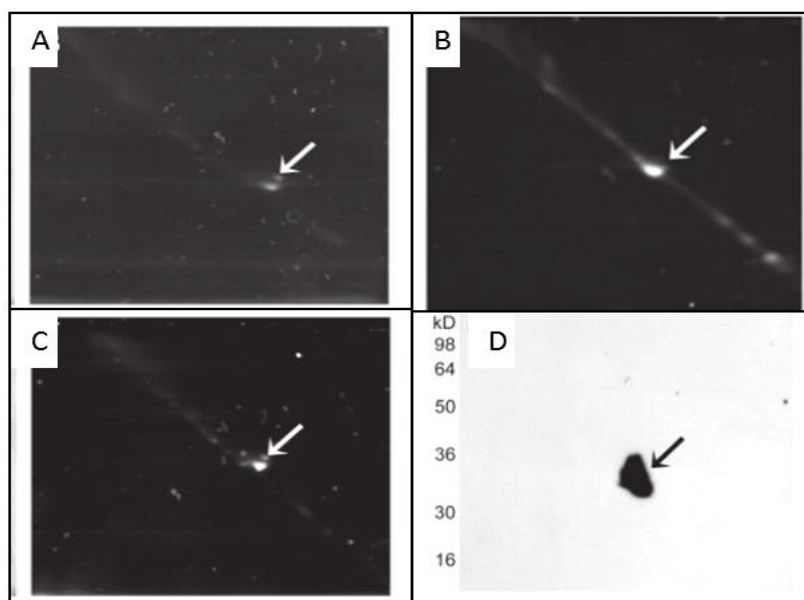
Por medio de mutantes que carecen de distintas secuencias de la NaTrxh y que estaban fusionadas a GFP, se demostró que el dominio interno hidrofílico N $\beta$  de la NaTrxh, que comprende desde el aminoácido Ala17 hasta la Pro27 (Figura 6.B) es esencial y suficiente para promover la secreción de la proteína por una vía que involucra el retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y vesículas de secreción. Dicho dominio también contribuye a la estabilización de la estructura terciaria de la proteína (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).



**Figura 6.** La secreción de NaTrxh depende del dominio N $\beta$ . **A)** Dominios N $\alpha$ , N $\beta$  y COO<sup>-</sup> de la NaTrxh, mostrando la secuencia de aminoácidos del N $\beta$ . **B)** Expresión transitoria de la NaTrxh fusionada a GFP en células de epidermis de cebolla. La NaTrxh completa es una proteína secretada, sin embargo, cuando se elimina su dominio N $\beta$  ésta permanece dentro de las células. La expresión de solo el dominio N $\beta$  fusionado a GFP dirige la acumulación de la proteína fuera de las células, corroborando que este es el dominio necesario para el transporte de NaTrxh. CW (Pared celular), M (Membrana plasmática) (Tomado de Ávila-Castañeda *et al.*, 2014).

### 3.3 NaTrxh interacciona con la S-RNasa y la reduce *in vitro*.

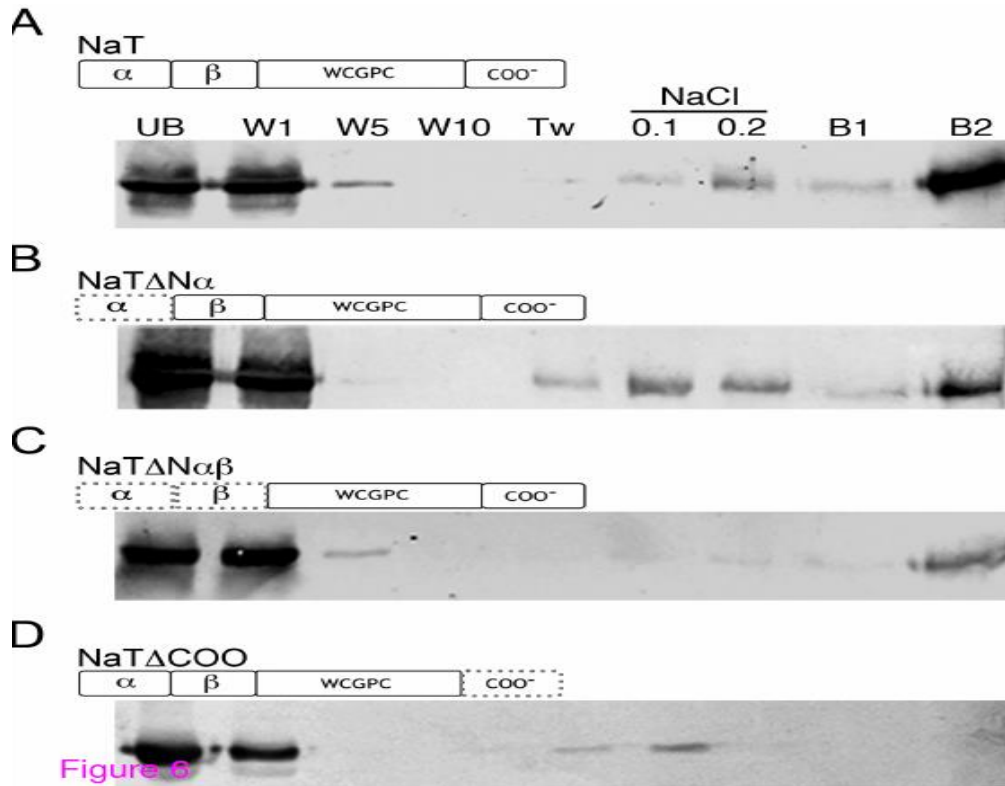
Para demostrar su actividad reductora y conocer los posibles sustratos sobre los que puede actuar NaTrxh, Juárez-Díaz *et al.* (2006) desarrollaron una serie de reacciones de reducción *in vitro* con proteínas estilares de *N. alata* y encontraron una proteína muy abundante que es reducida por NaTrxh, notablemente esta proteína es la S-RNasa (Figura 7).



**Figura 7.** Actividad reductora de NaTrxh evaluada mediante la tinción con mBBr. Extractos de proteína total de matriz extracelular de tejido de transmisión estilar de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> se sometieron a una primera dimensión de electroforesis **A)** sin agente reductor, **B)** con DTT como agente reductor o con **C)** NaTrxh/ NADPH/NTR. Los resultados demuestran que al igual que el DTT, la NaTrxh es capaz de reducir proteínas de la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar. **D)** Inmunodetección de S<sub>105</sub>-RNasa en la membrana tratada con NaTrxh/NADPH/NTR. (Tomado de Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Para conocer el dominio responsable de la interacción entre NaTrxh y la S-RNasa Ávila-Castañeda *et al.* (2014) realizaron una columna de afinidad con la proteína NaTrxh completa o mutada en cada uno de los dominios establecidos y a través de esta columna pasó un extracto de proteína total de estilo (que contiene a las S-RNasas). Los resultados demostraron que al remover el C-terminal de NaTrxh la

interacción se redujo considerablemente, revelando que este dominio es muy importante en la interacción de ambas proteínas; aunque la eliminación de los dominios N $\alpha$  y N $\beta$  también reduce a la interacción entre NaTrxh y la S-RNasa (Figura 8).



**Figura 8.** Interacción de NaTrxh con la S<sub>105</sub>-RNasa. Extractos de proteína total de estilos de *N. alata* S<sub>105</sub>S<sub>105</sub> se pasaron a través de las columnas de **A)** Affi-Gel-NaTrxh, **B)** Affi-Gel-NaTrxhΔN $\alpha$ , **C)** Affi-Gel-NaTrxhΔN $\beta$  y **D)** Affi-Gel-NaTrxhΔCOO. Nótese que la S-RNasa es capaz de unirse a la proteína NaTrxh completa y la interacción disminuye al remover los dominios N $\alpha$  y N $\beta$ ; sin embargo la interacción se elimina por completo cuando es removido en dominio C-terminal de NaTrxh. UB (fracción no unida) W1, W5 y W10 (lavados 1, 5 y 10) Tw, NaCl (lavados con Tween 20 o NaCl, respectivamente), B (elusión). Todas las fracciones se analizaron por inmunodetección con el anticuerpo Anti-S<sub>105</sub>. (Tomado de Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

La interacción específica de NaTrxh con la S-RNasa puede tener un significado en el mecanismo de AI. Oxley y Bacic (1996), determinaron la estructura de la S<sub>2</sub>-RNasa de *N. alata* la cual cuenta con 9 residuos de cisteína, 8 de ellos se encuentran formando puentes disulfuro que estabilizan su estructura tridimensional

(Cys16-Cys21, Cys45-Cys94, Cys153-Cys182, Cys165-Cys176), mientras que un residuo, Cys 95, está libre. La presencia de grupos tiol libres puede significar un rol biológico en la S-RNasa, permitiéndole la posibilidad de formar dímeros o interaccionar con otras moléculas. De hecho se ha demostrado que la S-RNasa forma complejos con otras proteínas estilares como 120K, que también es necesaria para el mecanismo de AI (Cruz-García *et al.*, 2005); sin embargo, la función de estos complejos aún es desconocida.

Los resultados anteriores sugieren que NaTrxh puede estar involucrada en el mecanismo de rechazo del polen en *Nicotiana* regulando la actividad de la S-RNasa.

#### **4. Hipótesis.**

- Si *NaTrxh* se asocia con la AI, entonces se espera que las especies de *Nicotiana* autoincompatibles expresen niveles altos de su transcrito en el pistilo, y que la reducción de la S-RNasa por esta tiorredoxina incremente su actividad catalítica.

#### **5. Objetivos.**

##### **5.1 Objetivos generales.**

- Cuantificar los niveles del transcrito de *NaTrxh* en especies AC y AI de *Nicotiana*.
- Evaluar el efecto de la reducción por NaTrxh sobre la actividad catalítica de la S-RNasa.

##### **5.2 Objetivos particulares.**

- Cuantificar los niveles del transcrito de *NaTrxh* en distintos tejidos de dos especies AI: *N. alata* y *N. rastroensis*.
- Cuantificar los niveles del transcrito de *NaTrxh* en pistilos de especies AC y AI.
- Determinar las diferencias en la secuencia de la proteína NaTrxh de especies AC y AI.
- Corroborar la reducción de la S-RNasa por NaTrxh.
- Cuantificar la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa cuando es reducida por NaTrxh.

## 6. Materiales y métodos.

### 6.1 Extracción de RNA total.

Se extrajo RNA total de *N. alata* y *N. rastruensis* de 8 diferentes tejidos: pétalo, sépalo, tallo, hoja, pistilo y antera (los dos últimos en los estadios de flor madura e inmadura), así como de pistilos en etapa madura de las especies AC *N. alata* SC<sub>10</sub>SC<sub>10</sub>, *N. rastruensis* y *N. bonarensis*; y de las especies AC *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia* y *N. alata* BT. El método de purificación de RNA empleado es el que sigue:

- a) Pesar de 50 a 100mg de tejido fresco y pulverizar en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido. Pasar la muestra a un tubo de 1.5ml y añadir inmediatamente 1ml de Trizol (Invitrogen). Mezclar vigorosamente.
- b) Incubar la muestra homogenizada por 5min a temperatura ambiente.
- c) Añadir 0.2ml de cloroformo y mezclar por inversión durante 15s. Incubar de 2 a 3 min a temperatura ambiente.
- d) Centrifugar la muestra a 12,000g durante 15min a 4°C.
- e) Pasar la fase acuosa a un tubo nuevo. Añadir de 5 a 10 µg de Glicogeno libre de RNasas y 0.5ml de isopropanol al 100%. Incubar a temperatura ambiente por 10min.
- f) Centrifugar 10min a 12,000g a 4°C.
- g) Remover por completo el sobrenadante y añadir 1ml de etanol al 75%. Agitar con vórtex.
- h) Centrifugar 5min a 7,500g. Retirar el sobrenadante y secar el pellet al aire por 10min.
- i) Resuspender el pellet en 20 a 50µl de H<sub>2</sub>O DEPC.

Se cuantificó el RNA en NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), se ajustó la cantidad a 100ng y se observó en un gel de agarosa al 2% en condiciones desnaturizantes [MAE 1X pH7 (MOPS 0.02%, acetato de sodio 5mM pH7, EDTA1mM), formaldehído 1.1%, bromuro de etidio 0.0015mg/ml]. Se cargó en el gel 1µl de RNA mezclado con 4µl de buffer de carga [80% formamida, EDTA 1mM pH 8.0, 0.1% (w/v) azul de

bromofenol y 0.1% (w/v) xilen cyanol] previamente desnaturalizados por 5min a 60°C.

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

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

Posteriormente cada muestra se trató con el kit RNA Clean & Concentrator (Zymo Research) de acuerdo a las instrucciones del mismo, como sigue:

- a) Añadir 2 volúmenes de *RNA Binding Buffer* por cada volumen de RNA.
- b) Añadir un volumen de etanol a la mezcla anterior. Agitar vigorosamente.
- c) Transferir la mezcla a una columna *Zymo-Spin* sobre un tubo colector y centrifugar a 12,000g por 1min. Descartar el sobrenadante.
- d) Añadir 400µl de *RNA Prep Buffer* y centrifugar a 12,000g por 1min. Descartar el sobrenadante.
- e) Añadir 800µl de *RNA Wash Buffer* y centrifugar a 12,000g por 30s. Descartar el sobrenadante. Repetir el lavado con 400µl de *RNA Wash Buffer* y centrifugar por 2min más.
- f) Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5ml y añadir 6µl de H<sub>2</sub>O DEPC directamente en la matriz. Incubar 1min a temperatura ambiente y centrifugar 1min para eluir. Almacenar el RNA a -70°C.



## 6.2 Cuantificación relativa del transcrito de NaTrxh.

El RNA total extraído se utilizó para determinar la cantidad relativa del transcrito de *NaTrxh* mediante la técnica de PCR cuantitativo (qPCR) con el kit SuperScript III Platinum SYBR Green One-Step qPCR with ROX (Invitrogen) en el equipo 7500 de Applied Biosystems. La mezcla de reacción que se utilizó para la amplificación y las condiciones de PCR se muestran en las tablas 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1.** Mezcla de reacción utilizada en la técnica de qRT-PCR

Reactivo	Concentración final
2X SYBR Green reaction mix with ROX (dNTPs 0.4mM, MgSO4 6mM, ROX 1µM)	1X
M-MLVT RT	2U
Oligonucleótido Foward 10µM	0.3µM
Oligonucleótido Reverse 10µM	0.3µM
RNA molde	5ng
Volumen final	10ul

**Tabla 2.** Condiciones para la amplificación por qRT-PCR.

Temperatura (C)	Tiempo	Número de ciclos
50	3min	---
95	5min	---
95	15s	40
56-60	30s	

Para estas reacciones se utilizaron los oligonucleótidos *foward* 5' CATGCCATGGATGGGATCGTATCTTTCAAG 3', y *reverse* 5' GTTTCTGACGACGATCCTGATTCTGCC 3'. Como gen normalizador se empleó el rRNA 18S el cual se amplificó con los oligonucleótidos *foward* 5' GGAACTTACCAGGTCCAGACATAG 3', y *reverse* 5' GTGGCCTAAACGGCCATAGTCCCTC 3'.

La cuantificación relativa de las muestras se hizo usando el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak y Schmittgen, 2001) que se basa en la comparación con un gen constitutivo (rRNA 18S) respecto a una muestra a la cual se le asigna el valor de 1; para el caso de la

cuantificación relativa entre los distintos órganos se utilizó como tejido normalizador la antera inmadura y, para la cuantificación entre distintas especies se utilizó pistilo de *N. plumbaginifolia*, ya que en ambos casos son las muestras que menos cantidad tienen del transcrito.

### **6.3 Amplificación de *NaTrxh* de DNA genómico de plantas AI y AC.**

Con el objetivo de conocer la secuencia y el número de copias del gen *NaTrxh* en el genoma de especies AC y AI se extrajo DNA genómico de las especies *N. alata* SC<sub>10</sub>SC<sub>10</sub>, *N. rastroensis*, *N. benthamiana* y *N. tabacum* con el kit *Plant DNA preparation* (Jena Bioscience) de acuerdo al protocolo que sigue:

- a) Pesar de 10 a 30mg de tejido fresco y pulverizar en un mortero con pistilo con nitrógeno líquido. Pasar la muestra a un tubo de 1.5ml.
- b) Añadir 300µl de *Cell Lysis Solution* e incubar a 65°C durante 60min.
- c) Añadir 1.5µl de *RNAse A solution* al lisado celular. Mezclar por inversión 5 veces e incubar a 37°C durante 30min.
- d) Pasar la muestra a temperatura ambiente y añadir 100µl de *Protein Precipitation Solution*. Mezclar la solución con vórtex.
- e) Centrifugar a 15 000g por 30s.
- f) Transferir el DNA contenido en el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 300µl de isopropanol. Mezclar por inversión 50 veces.
- g) Centrifugar a 15,000g por 1min. Descartar el sobrenadante.
- h) Añadir 500µl de *Washing Buffer* y mezclar por inversión varias veces para lavar el pellet. Centrifugar a 15,000g por 1min.
- i) Descartar el sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente 10 a 15min.

j) Añadir 50 a 100µl de *DNA Hydration Solution*. Incubar la muestra a 65°C durante 60min. Almacenar a -20°C.

Posteriormente se utilizó este DNA como templado para una reacción de PCR con los siguientes oligonucleótidos: *foward* 5' CATGCCATGGATGGGATCGTATCTTTCAAG 3' y *reverse* 5' GCGCGCGGGAATTCAATTTATTGGACATGAAA 3', los cuales hibridan con ambos extremos del transcrito de *NaTrxh* y a su vez incorporan los sitios para las enzimas de restricción NcoI y EcoRI en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente. La mezcla y condiciones de reacción se muestran en las tablas 3 y 4.

**Tabla 3.** Mezcla de reacción utilizada en la técnica de PCR

Reactivo	Concentración final
Oligonucleótido <i>foward</i> 10µM	0.3µM
Oligonucleótido <i>Reverse</i> 10µM	0.3µM
JumpStart SIGMA (Taq DNA polimerasa, 10nmol dNTPs, 15mM MgCl <sub>2</sub> )	1X
DNA Molde	100ng
Volumen final	10µl

**Tabla 4.** Condiciones para la amplificación por PCR.

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5min	---
Desnaturalización	95	30s	
Alineamiento	60	45s	40
Elongación	72	60min	
Elongación final	72	5min	---

Los productos de amplificación fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV. El DNA amplificado fue purificado a partir del mismo gel con el kit *Agarose Gel Extraction* de acuerdo al protocolo siguiente:

a) Cortar el área del gel que contiene el DNA y transferir a un tubo de 1.5ml.

- b) Añadir 3 volúmenes de *Extraction Buffer* por cada 100mg de gel. Incubar a 60°C durante 10min mezclando ocasionalmente para disolver la agarosa por completo.
- c) Colocar la columna sobre un tubo colector y activarla añadiendo 100µl de *Activation Buffer*. Centrifugar a 10,000g por 30s.
- d) Añadir la mezcla del inciso b a la columna activada. Centrifugar a 10,000g por 30s. Desechar el sobrenadante.
- e) Añadir 700µl de *Washing Buffer* a la columna. Centrifugar a 10,000g por 30s. Desechar el sobrenadante.
- f) Centrifugar adicionalmente por 2min para remover los residuos.
- g) Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5ml y añadir 30-50µl de H<sub>2</sub>O directamente en la matriz. Incubar 1min a temperatura ambiente y centrifugar 1min para eluir. Almacenar el RNA a -20°C.

#### **6.4 Amplificación del transcrito *NaTrxh* de plantas AI y AC**

Para conocer la secuencia del transcrito de *NaTrxh* de las plantas AC y AI se sintetizó cDNA a partir de RNA total de las especies *N. alata* Sc<sub>10</sub>Sc<sub>10</sub>, *N. rastroensis*, *N. benthamiana*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia*, *N. bonariensis*, *N. tabacum* y *N. alata* BT. Se empleó la enzima M-MLVRT (Invitrogen) con el siguiente protocolo:

- a) Mezclar en un volumen final de 12µl con H<sub>2</sub>O DEPC:
- 0.5µM Oligo DT
  - 1mM dNTP's
  - 50µg RNA total
- b) Incubar a 65°C durante 5min.
- c) Colocar en hielo y añadir:
- 4µl 5X *Strand Buffer*

- 2µl DTT 0.1M
- 1µl M-MLVRT (200U).

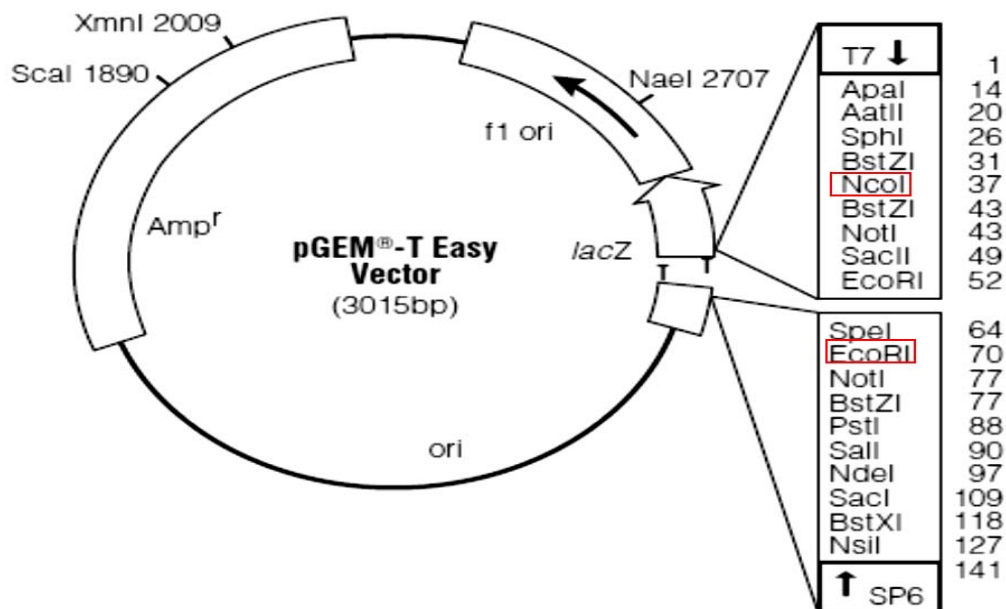
d) Mezclar con pipeteo. Incubar 50min a 37°C.

e) Incubar 15min a 70°C para desactivar la enzima.

El cDNA sintetizado fue utilizado como molde para la amplificación por PCR con las condiciones descritas anteriormente (Tablas 3 y 4).

### 6.5 Clonación de los productos de amplificación de *NaTrxh* de gDNA y cDNA.

Los productos de amplificación extraídos del gel fueron digeridos con las enzimas de restricción NcoI y EcoRI (New England Biolabs) dejando incubar la reacción durante 2h a 37°C. Posteriormente fueron ligados en el vector pGEM-T Easy (Figura 9) linearizado previamente con las mismas enzimas.



**Figura 9.** Esquema del vector pGEM-T Easy mostrando el sitio de clonación múltiple. Los fragmentos amplificados de *NaTrxh* fueron ligados en los sitios de restricción NcoI y EcoRI señalados. Nótese que el MCS se encuentra dentro de la secuencia correspondiente al gen *lacZ*.

La reacción de ligación se llevó a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) incubando a 4°C toda la noche. Con el producto de reacción de ligado se transformaron células *E. coli* TOP 10 electrocompetentes de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Vertir 2µl de DNA en un vial de células electrocompetentes.
- b) Pasar la mezcla anterior a una celda de electroporación estéril previamente enfriada en hielo.
- c) Dar un pulso de 1820V en electroporador.
- d) Recuperar las células de la celda con 1ml de medio LB (Triptona 10g, Extracto de levadura 5g, NaCl 5g en 1L de H<sub>2</sub>O, esterilizar por autoclave) mezclando suavemente y pasarlo a un tubo de 1.5ml.
- e) Incubar 1h a 37°C con agitación (~200rpm).
- f) Centrifugar 5min a 14,000rpm. Descartar el sobrenadante y resuspender en 150µl de medio LB. Verter 50µl en una placa de agar con Amp 100 µg/ml, IPTG 0.5mM y X-Gal 80µg/ml, y dispersar con perlas de vidrio.
- g) Incubar de 12 a 15h a 37°C.

El vector de clonación pGEM-T Easy (Promega) contiene el sitio de clonación múltiple dentro del gen *lacZ* que codifica para la enzima β-galactosidasa. Cuando se añade IPTG se induce la transcripción del gen *lacZ* y por lo tanto hay una acumulación de β-galactosidasa; esta enzima tiene como sustrato a X-Gal y lo hidroliza dando como resultado una coloración azul.

Si el inserto fue ligado correctamente en el sitio de clonación múltiple, entonces la secuencia del gen *lacZ* se ve interrumpida, por lo que no hay producción de β-galactosidasa y en consecuencia no hay coloración. Lo anterior permite la discriminación de colonias positivas para la transformación que son de color blanco, respecto de las colonias negativas que son de color azul.

Además de la selección por resistencia y coloración, las clonas transformadas fueron verificadas por PCR de colonia utilizando los mismos oligonucleótidos con

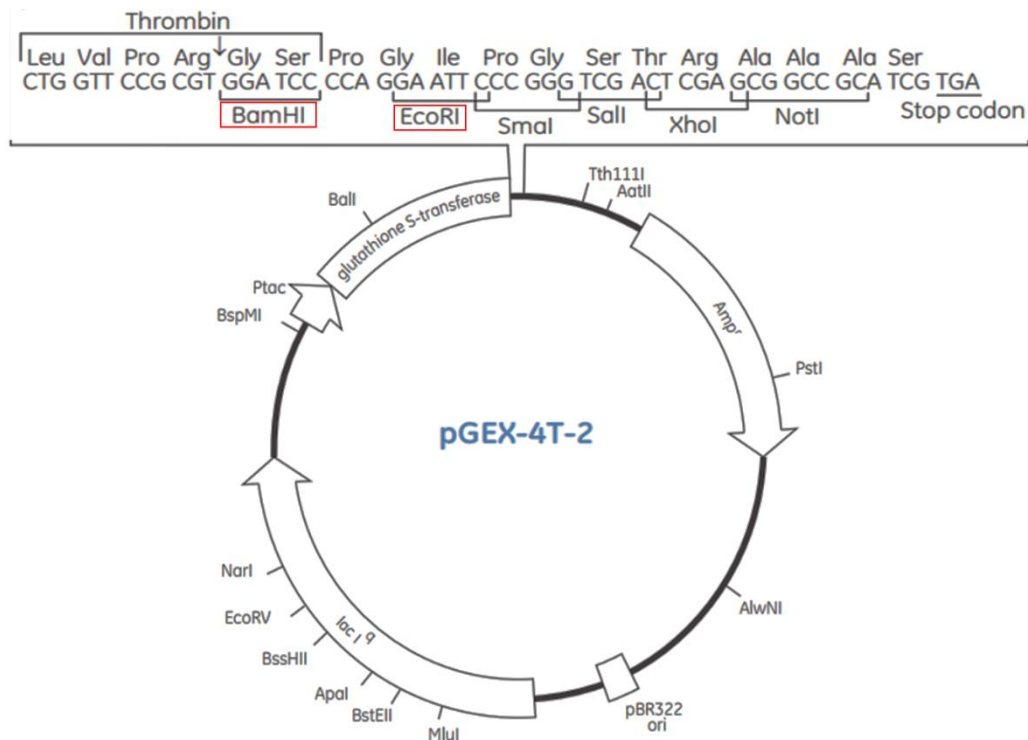
los que se amplificó el gen. Una vez corroboradas las clonas que contenían la construcción correcta se extrajo el DNA plasmídico con el kit Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo Research) como sigue:

- a) Sembrar una colonia aislada en 3ml de medio LB con el antibiótico correspondiente e incubar a 37°C con agitación durante 14 a 16h.
- b) Centrifugar el cultivo a máxima velocidad durante 1min. Decantar el sobrenadante y resuspender en 600µl de H<sub>2</sub>O.
- c) Añadir 100µl de *7X Lysis Buffer* y mezclar por inversión 4 a 6 veces. Incubar 2min a temperatura ambiente.
- d) Añadir 350µl de *Neutralization Buffer* frío. Mezclar. La neutralización se habrá completado cuando se forme un precipitado amarillo. Mezclar nuevamente por inversión 2 a 3 veces.
- e) Centrifugar a 16,000g por 2min.
- f) Transferir el sobrenadante a una columna *Zymo-Spin INN* sobre un tubo colector y centrifugar a 16,000g por 15s. Desechar el sobrenadante y situar la columna nuevamente en el tubo colector.
- g) Añadir 200µl de *Endo Wash Buffer* y centrifugar a 16,000g por 30s.
- h) Añadir 400µl de *Zyppy Wash Buffer* y centrifugar a 16,000g por 1min.
- i) Transferir la columna a un tubo eppendorf de 1.5ml y añadir 30µl de H<sub>2</sub>O directamente en la matriz de la columna. Incubar 1min a temperatura ambiente y centrifugar 30s para eluir el DNA.

El DNA plasmídico fue cuantificado por A260nm utilizando un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se secuenció el inserto en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

## 6.6 Purificación de la proteína NaTrxh.

En un trabajo previo, Juárez-Díaz (2005) obtuvo la proteína NaTrxh recombinante expresada en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. El gen *NaTrxh* está clonado dentro del vector pGEX 4T-2 (Figura 10) el cual permite la expresión de la proteína fusionada al C-terminal de la proteína glutatión-S-transferasa (GST).



**Figura 10.** Esquema del vector pGEX-4T-2 mostrando el MCS. El gen *NaTrxh* está clonado dentro de los sitios BamHI y EcoRI señalados y fusionado a la proteína GST sin alterar el marco de lectura. El sitio de reconocimiento para la proteasa trombina se encuentra en el C-terminal de la GST.

El protocolo para sobreexpresar la proteína de fusión es el siguiente:

- Tomar 15µl de un cultivo congelado en glicerol e inocularlos en 10ml de medio LB. Incubar a 37°C en agitación de 12 a 15h.
- Hacer una dilución del cultivo 1:100 en medio LB. Incubar a 37°C en agitación hasta llegar a una A600 de 0.5 a 0.7.



- c) Agregar IPTG a los cultivos a una concentración final de 0.1mM para inducir la expresión. Continuar con la incubación de 3 a 4h.
- d) Centrifugar el cultivo a 8,000rpm durante 10min a 4°C. Decantar el sobrenadante y drenar el pellet (ponerlo en hielo).
- e) Resuspender por completo el pellet en 50µl de PBS 1X a 4°C por cada ml de cultivo.
- f) Lisar las células con sonicador por periodos de 15 a 30s, entre un intervalo de 30s a 1min de reposo a una frecuencia de 20 a 30MHz hasta que la solución sea un poco transparente (sonicar sobre hielo).
- g) Agregar Tritón X-100 al 20% a una concentración final de 1%. Mezclar suavemente por 30min en hielo para mejorar la solubilización de la proteína de fusión.
- h) Centrifugar a 10,000rpm y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.

La purificación de la proteína se efectuó a partir de la fase soluble del sonicado bacteriano por cromatografía. Se utilizó la resina Glutación-Agarosa (SIGMA). La GST presenta afinidad al glutatión oxidado, el cual está unido covalentemente a la matriz, la elución de la proteína se efectúa por competencia con glutatión reducido, ya que este presenta una mayor afinidad que la GST; sin embargo para los ensayos posteriores se requiere a la NaTrxh libre de GST, por lo que se trató a la proteína unida a la resina de Glutación-Agarosa con trombina (GE Healthcare) para su liberación. La trombina es una proteasa que rompe a la cadena polipeptídica entre los residuos Arginina y Glicina dentro de la secuencia Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser. Este sitio de corte se encuentra justo en el extremo carboxilo terminal de la GST (Figura 10).

El protocolo es el siguiente:

a) Agregar a la matriz sedimentada la mezcla de reacción que consiste en 50µl de trombina resuspendida y 950µl de PBS 1X por cada ml de volumen cama. Dejar incubando con rotación continua a temperatura ambiente de 14 a 16h.

b) Centrifugar a 1,000rpm durante 5min para sedimentar la matriz y recuperar el sobrenadante.

c) Hacer un lavado con 1ml de PBS 1X por cada ml de volumen cama. Centrifugar a 1,000rpm durante 5min. Recuperar el sobrenadante.

d) Hacer dos lavados más y juntar los tres sobrenadantes.

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

## 6.7 SDS-PAGE

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

Preparación del gel separador:

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

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

Preparación gel concentrador

- 1ml de Agua

- 444µl de Amortiguador pH 6.8 [Tris 0.5M, SDS0.4% (w/v)]
- 300µl de Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)
- 20µl de PSA 20%
- 5µl de Temed

Mezclar todo y vaciar rápidamente sobre el gel separador.

Una vez polimerizado, cargar las muestras previamente desnaturalizadas por 5 min en buffer de carga para proteínas [Tris·HCl 0.28M pH6.8, glicerol 30% (v/v), SDS 1% (w/v), azul de bromofenol 0.0012%, DTT 0.5M]. La electroforesis se efectuó durante 1.5h a 120V en buffer de corrida de glicina (glicina 14.4g, Tris 3g, SDS 1g en 1L de H<sub>2</sub>O).

### **6.8 Reducción *in vitro* de la S-RNasa.**

Se incubó 1µg de RNasa purificada en un volumen final de 30µl de Tris HCl 50mM pH 7.9 bajo las siguientes condiciones:

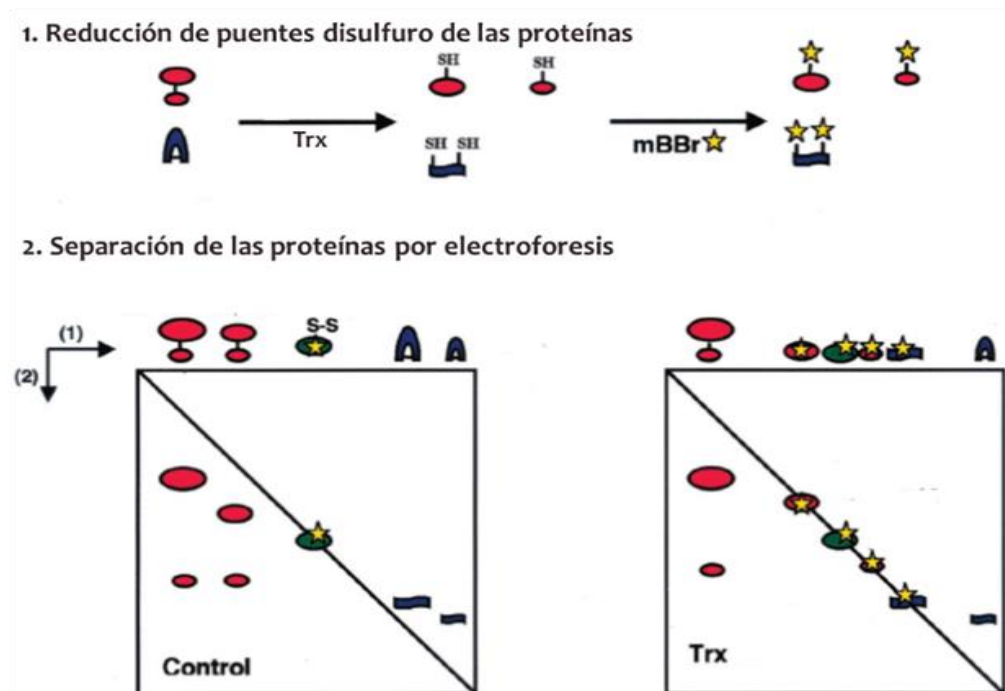
- a) Sin agentes reductores
- b) DTT 5mM
- c) 2.5µg de NaTrxh recombinante + 2µg de Tiorredoxina reductasa recombinante de *E. coli* (SIGMA) + 0.125µmol NADPH (SIGMA)
- d) 2.5µg de NaTrxh recombinante + 2µg de Tiorredoxina reductasa recombinante de *E. coli* (SIGMA)

La reacción de reducción se incubó por 3h a 37°C.

### **6.9 Sistema de electroforesis en dos dimensiones para identificación de proteínas blanco de la NaTrxh.**

La estrategia de electroforesis en dos dimensiones (reductora/no reductora) fue propuesta por Yano *et al.* (2001). Antes de realizar las dos dimensiones los grupos tiol de las proteínas son marcados con mBBBr (Monobromobimano). En el control

negativo la primera dimensión electroforética se realiza bajo condiciones no reductoras y la segunda dimensión en condiciones reductoras, en este caso las proteínas que poseen sulfhidrilos fluorescerán por el marcaje con mBBr y migrarán en una diagonal, ya que su movilidad electroforética será la misma en la primera y segunda dimensión. Para probar cuáles proteínas son reducidas por la tiorredoxina, la reducción se debe realizar antes de llevar a cabo la separación en la primera dimensión electroforética para después marcar los grupos tiol con mBBr. Con ello se espera observar sobre la diagonal las mismas proteínas que fueron identificadas en el control negativo más otras proteínas nuevas que representan los sustratos potenciales de la tiorredoxina (Figura 11).



**Figura 26.** Sistema de electroforesis en dos dimensiones para visualizar proteínas blanco de la reducción de Trx. La primera dimensión (1) se lleva a cabo en condiciones no reductoras mientras que la segunda (2) en condiciones reductoras y los sulfhidrilos fluorescen por el mBBr. En el control todas las proteínas que contienen sulfhidrilos libres fluorescen y migran en una diagonal, aquellas que contenían puentes disulfuro migraran fuera de la diagonal dado que con la segunda dimensión que es reductora se rompen éstos puentes y su movilidad electroforética se ve alterada. En la reducción por Trx, si las proteínas fueron reducidas antes de la primera dimensión migrarán sobre la diagonal y además fluorescerán.

Esta metodología se siguió con la SA<sub>2</sub>-RNasa tratada con las condiciones descritas en el apartado 6.8 de la siguiente manera:

- a) Adicionar 0.2 $\mu$ mol de mBBr (SIGMA) en 10 $\mu$ l de acetonitrilo e incubar con rotación continua por 20min a temperatura ambiente.
- b) Disolver con amortiguador de muestra libre de agentes reductores y realizar la primera dimensión electroforética.
- c) Una vez terminada la electroforesis cortar el carril y sumergirlo en amortiguador de muestra con 2-mercaptoetanol al 5% por 20min a temperatura ambiente.
- d) Colocar el carril sobre otro gel de poliacrilamida y realizar la segunda dimensión electroforética.

Visualizar las proteínas marcadas bajo luz UV.

### **6.10 Cuantificación de la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.**

Preparación del RNA sustrato:

- a) Disolver 2.5g de RNA Torula Yeast (SIGMA) en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada con adición por goteo de NH<sub>4</sub>OH.
- b) Precipitar el RNA añadiendo 1 volumen de acetato de amonio 10M y 3 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a 2,500rpm durante 10min a 4°C.
- c) Decantar y resuspender en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Repetir una vez más la precipitación.
- d) Lentamente añadir de 10-20ml de LiCl 8M frío hasta que se forme un precipitado.
- e) Centrifugar 10min a 2,500rpm a 4°C. Resuspender en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada.
- f) Añadir 15ml de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y mezclar.
- g) Centrifugar 10min a 4,000rpm a 4°C y resuspender en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Repetir los incisos f y g.
- h) Precipitar el RNA añadiendo 1 volumen de acetato de amonio 10M y 3 volúmenes de isopropanol. Centrifugar a 2,500rpm durante 10min a 4°C.

i) Decantar y resuspender en 10ml de H<sub>2</sub>O desionizada. Repetir una vez más la precipitación.

j) Lavar el pellet secuencialmente con etanol al 95% y con metanol al 100%.

k) Secar el pellet y pesarlo. Almacenar a -20°C.

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

El ensayo de actividad se realizó como sigue:

a) Enfriar tubos de 1.5ml 5min en hielo.

b) Añadir a cada tubo 200µl de buffer de actividad frío (glicerol 25% v/v, 0.1M de fosfato de potasio pH7, 0.05M de cloruro de potasio y 4mg/ml de RNA purificado).

c) Añadir 500ng de RNasa bajo las diferentes condiciones de reducción. Agitar con vórtex e incubar inmediatamente a 37°C durante 30min.

d) Añadir a cada tubo 40µl de solución de término de reacción (25% v/v ácido perclórico y 0.75% w/v uranilacetato). Agitar con vórtex y dejar precipitando en hielo al menos 15min.

e) Centrifugar 20min a máxima velocidad a 4°C. Realizar una dilución 1:10 y leer a 260nm.

La actividad es calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

## 7. Resultados

### 7.1 Cantidad relativa del transcrito *NaTrxh*.

#### 7.1.1 Diseño de oligonucleótidos.

El PCR cuantitativo (qPCR) es un método para la cuantificación específica de ácidos nucleicos; cuando se utiliza con transcripción reversa es posible detectar y cuantificar moléculas de RNA (Guénin *et al.*, 2009). El qRT-PCR es una técnica muy precisa en la cual se deben tomar en cuenta muchas consideraciones que van desde el diseño adecuado de los oligonucleótidos hasta la validación de la técnica.

El diseño de oligonucleótidos se realizó con el servidor Biology WorkBench 3.2 (<http://workbench.sdsc.edu/>) tomando como templado la secuencia del transcrito de *NaTrxh* reportado por Juárez-Díaz *et al.* en 2006. Los oligonucleótidos diseñados para qPCR deben cumplir con las siguientes características (Tevfik, 2006):

- Ser complementarios a la secuencia deseada.
- Tener una longitud de entre 19 a 25 nucleótidos.
- Contener de un 40% a un 60% de GC.
- Usar una temperatura de alineamiento en la misma reacción con una variación máxima de 1°C.
- No generar horquillas internas ni ser complementarios entre sí.

Además hay que tomar en cuenta que para una amplificación eficiente el tamaño del amplicón no debe exceder las 300 pb. El tamaño ideal oscila entre los 50 y 150 nucleótidos (Tevfik, 2006).

Los oligonucleótidos enunciados en el apartado 5.2 amplifican los primeros 150 nucleótidos de *NaTrxh*. Para determinar la probabilidad de formación de dímeros, las secuencias se analizaron con el programa OligoAnalyzer de Integrated DNA Technologies (IDT); este programa calcula el  $\Delta G$  de las estructuras secundarias y mientras más negativo sea este valor, mayor es la probabilidad de que una estructura secundaria se establezca durante la reacción de PCR. De esta manera, lo ideal es tener un valor de  $\Delta G$  mayor a -9 kcal/mol. En la tabla 5 se muestra el

porcentaje de contenido GC y los valores de  $\Delta G$  estimados para la formación de estructuras secundarias. También se analizaron los oligonucleótidos que amplifican el rRNA 18S, el cual se utilizó como gen normalizador. Como podemos observar, los oligonucleótidos cumplen con las características necesarias para emplearse en la técnica de qRT-PCR.

Oligonucleótido	$\Delta G$ de posible estructura tallo asa	$\Delta G$ de posible tipo dímeros	$\Delta G$ de posibles heterodímeros	% CG
<b>Foward NaTrxh</b>	-1.86 kcal/mol	-6.5 kcal/mol	-6.53 kcal/mol	46.7%
<b>Reverse NaTrxh</b>	0.74 kcal/mol	-4.62 kcal/mol		55.6%
<b>Foward 18S</b>	-0.59 kcal/mol	-4.64 kcal/mol	-5.02 kcal/mol	48%
<b>Reverse 18S</b>	-4.69 kcal/mol	-3.61 kcal/mol		60%

### 7.1.2 Curvas de disociación de oligonucleótidos.

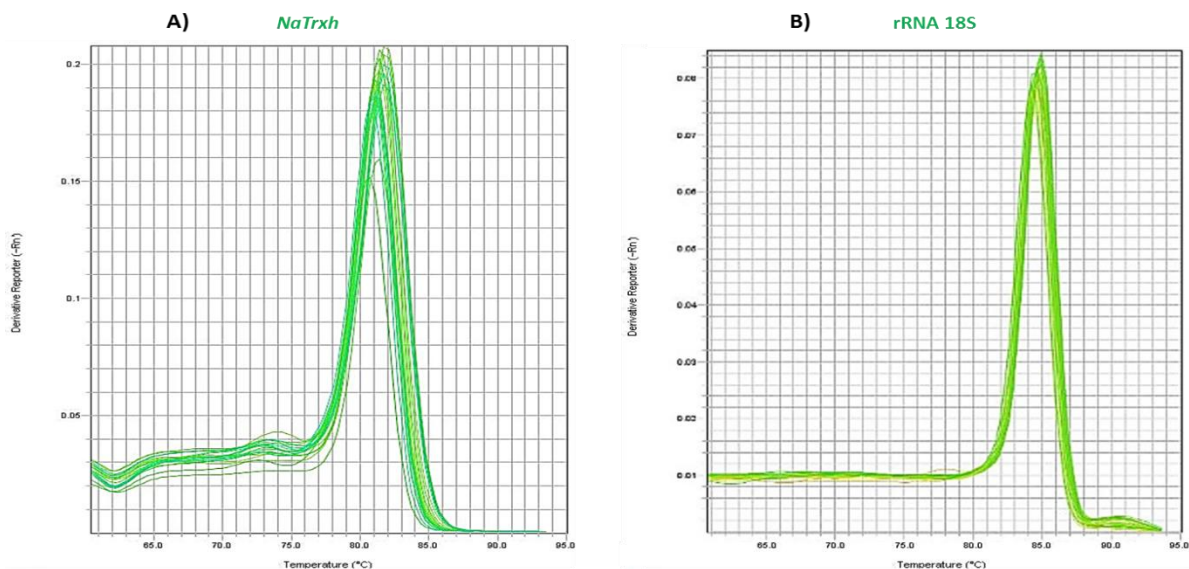
En el presente estudio se utilizó el reactivo *SYBR Green* para medir la fluorescencia durante la amplificación por PCR. El *SYBR Green* es un agente que se une al surco menor del DNA de doble cadena; al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa genera la señal que es detectada por el sistema óptico incluido en el equipo de qPCR (Guénin *et al.*, 2009).

Debido a que este compuesto se une a cualquier DNA de doble cadena, puede dar resultados de cuantificación erróneos al unirse a dímeros de oligonucleótidos o productos inespecíficos que puedan generarse durante la reacción. Por lo anterior, es de gran importancia corroborar que solo existe un producto de amplificación, ello se logra realizando las curvas de disociación de los oligonucleótidos (Huggett y Bustin, 2011).



El ensayo consiste en incrementar gradualmente la temperatura hasta los 95°C; este incremento provoca que las cadenas de DNA se desnaturalicen gradualmente con lo cual disminuye la intensidad de la fluorescencia; cuando se llega a la Tm del amplicón la fluorescencia disminuye drásticamente debido a que la mitad del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado (Huggett y Bustin, 2011).

La gráfica generada es conocida como curva de disociación, en ella se observa un pico que corresponde a la Tm del amplicón; en el caso de que el reactivo SYBR Green se una a un DNA de cadena sencilla inespecífico se forman varios picos en la gráfica. En la figura 12 se observa que las curvas de disociación generadas con los oligonucleótidos que amplifican *NaTrxh* y el rRNA 18S respectivamente, presentan un solo pico por lo que no hay formación de dímeros de oligonucleótidos o productos inespecíficos que pudieran interferir en la cuantificación de la señal de fluorescencia.



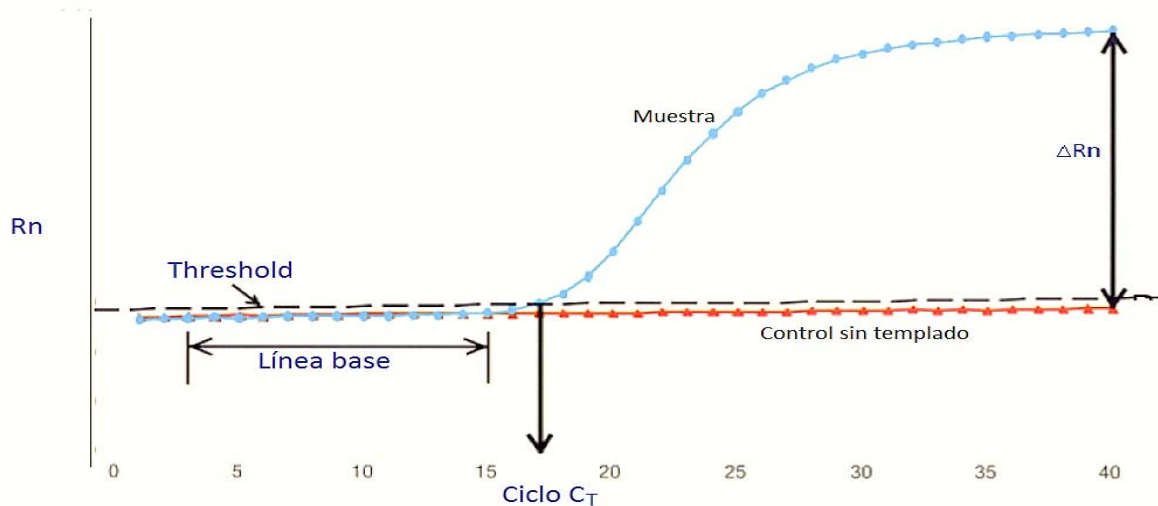
**Figura 12.** Curvas de disociación de oligonucleótidos para los genes **A)** *NaTrxh* y **B)** rRNA 18S utilizadas en qRT-PCR. En ambas curvas se utilizó como templado RNA de distintos tejidos de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>.

### 7.1.3 Curvas de calibración.

La amplificación por qPCR sigue una cinética en donde se pueden distinguir cuatro fases (Tevfik, 2006; Guénin *et al.*, 2009):

- Línea base: Comprende toda la amplificación que está por debajo del nivel de detección del equipo.
- Exponencial: Durante esta etapa todos los reactivos para la reacción se encuentran en abundancia, la eficiencia de la amplificación es cercana al 100% y por lo tanto se puede registrar el cambio en la fluorescencia.
- Lineal: Los oligonucleótidos y la enzima comienzan a ser factores limitantes por lo que la eficiencia de la amplificación comienza a disminuir.
- Estacionaria: En esta fase se detiene la amplificación y la cantidad de producto obtenido es constante sin importar cuántos ciclos más dure la reacción.

Durante una reacción de qRT-PCR se va monitoreando la amplificación por medio de la fluorescencia y se grafica en un diagrama de amplificación (Figura 13), en el cual la línea base (*baseline*) comprende los ciclos iniciales en la PCR en donde el cambio en la fluorescencia es mínimo. Para llevar a cabo los ensayos de cuantificación se define el umbral de detección (*Threshold*) donde todas las muestras pueden ser comparadas entre sí; el umbral se establece basándose en la fluorescencia de fondo y equivale a 10 veces la desviación estándar de la media de la emisión de la línea base. El ciclo en el cual cada muestra llega al umbral de detección se conoce como  $C_T$  que es inversamente proporcional a la cantidad del transcrito y es el fundamento para calcular la cantidad de mRNA en la muestra; es decir, a mayor concentración del gen blanco menor  $C_T$ . Las diferencias de un ciclo en el valor  $C_T$  indican una diferencia del doble en la cantidad del gen blanco (Guénin *et al.*, 2009).

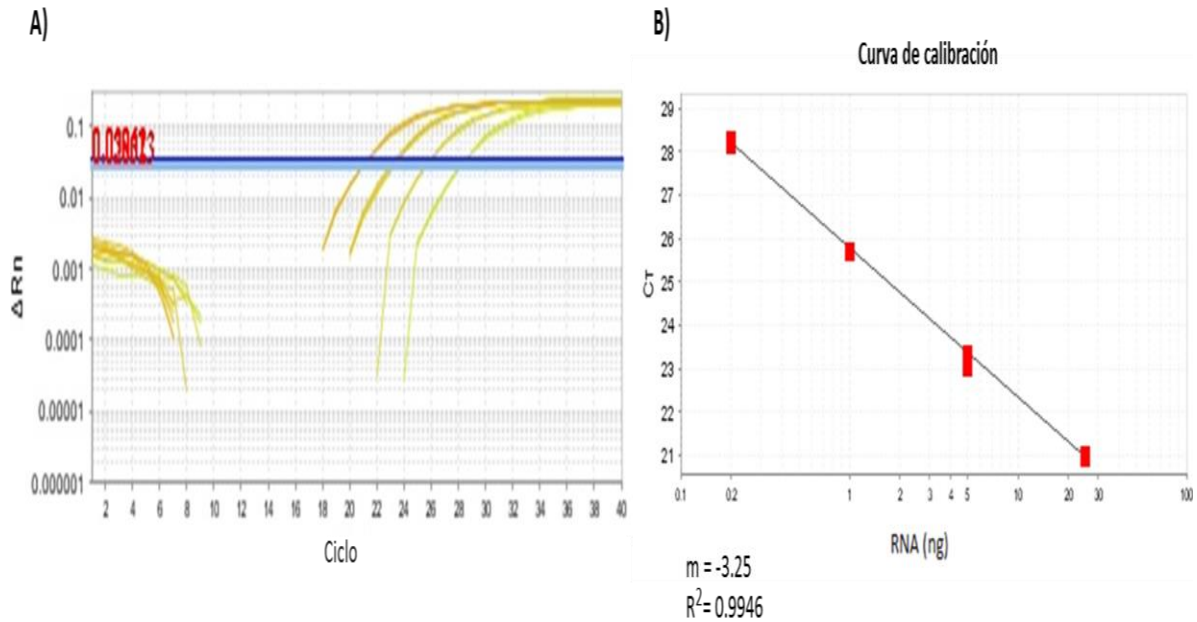


**Figura 13.** Diagrama de amplificación generado durante una reacción de qPCR.

Se elaboraron las curvas de calibración en las cuales se realizaron reacciones por triplicado de diferentes concentraciones de RNA total templado; la curva comprende 4 puntos, el de mayor concentración contiene 25ng de RNA y las diluciones fueron realizadas 1:5 (v:v); en el diagrama de amplificación se debe observar el cambio en el  $C_T$  con base en las diluciones.

En la figura 14 se muestra el diagrama de amplificación obtenido para realizar la curva de calibración para *NaTrxh* utilizando como templado RNA de pistilo maduro de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ .

Los valores de  $C_T$  se grafican en función del logaritmo de la cantidad inicial del transcrito para dar una curva estándar como la que se muestra en la figura 14B. La pendiente de la recta indica la eficiencia de la amplificación, siendo los valores cercanos al -3.3 los más óptimos. Para este estudio la pendiente obtenida fue de -3.25 lo que es una eficiencia del 98.48%.



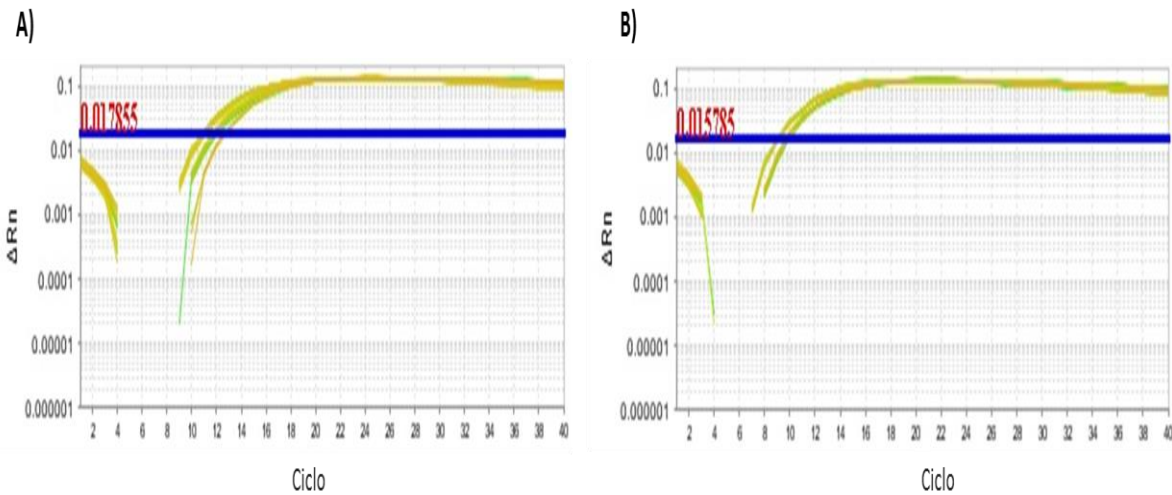
**Figura 14.** Amplificación de *NaTrxh* con diferentes concentraciones de RNA templado **A)** Diagrama de amplificación obtenido al realizar reacciones de qRT-PCR con diluciones seriadas de RNA templado. **B)** Curva de calibración generada graficando los valores  $C_T$  del diagrama de amplificación contra la cantidad de RNA templado. Cada punto muestra el resultado de tres réplicas técnicas.

#### 7.1.4 El transcrito *NaTrxh* se acumula mayoritariamente en pistilos.

Para la cuantificación relativa de un gen blanco es necesario normalizar con una referencia interna y comparar contra un gen que se exprese constitutivamente en todas las muestras del experimento (Huggett *et al.*, 2005; Guénin *et al.*, 2009). En el presente estudio se utilizó el rRNA *18S*; para ello primero se evaluó que su cantidad fuera similar entre las muestras. Se utilizaron 5ng de RNA total de cada tejido en cada reacción. La variabilidad en la cantidad de un gen de referencia representa un error acumulativo en la cuantificación del gen de interés, es por ello que las variaciones deben ser mínimas de tal forma que, cambios alrededor de 1 ciclo no son los más ideales, pero sí son suficientes para poder cuantificar un gen cuando la variación entre las muestras es de alrededor de 2 ciclos (Huggett *et al.*, 2005).

El resultado de la cuantificación del gen de referencia rRNA *18S* se muestra en la figura 15, en donde podemos observar que sí existen variaciones en la cantidad del

transcrito, sin embargo está dentro del rango que nos permite utilizarlo como un gen normalizador (1.2 y 0.8 ciclos para *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  como de *N. rastroensis*, respectivamente). Cabe destacar que la detección se observó en todos los tejidos desde ciclos muy tempranos siendo en promedio los ciclos 11.65 y 8.2 para *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y *N. rastroensis*, respectivamente. Lo anterior indica que el gen 18S tiene alta expresión en todos los tejidos.



**Figura 15.** Diagrama de amplificación del rRNA 18S en todos los ocho tejidos evaluados de **A)** *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$  y **B)** *N. rastroensis*.

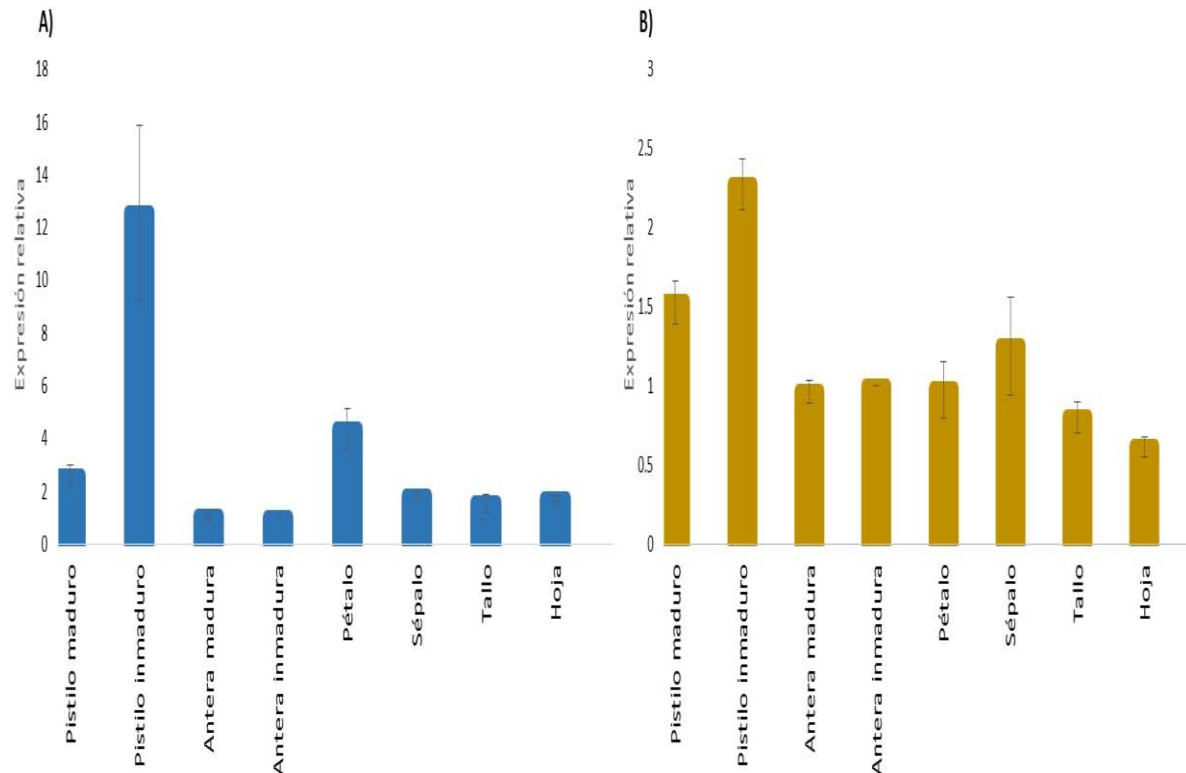
La cuantificación relativa del transcrito de *NaTrxh* se llevó a cabo por el método de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  o  $C_T$  comparativo (Livak y Schmittgen, 2001); en este método es necesario obtener los valores  $C_T$  para el gen blanco en cada muestra y utiliza las siguientes fórmulas:

$$\Delta CT = C_{T(NaTrxh \text{ tejido específico})} - C_{T(18S)}$$

$$\Delta\Delta CT = C_{T(NaTrxh \text{ tejido específico})} - \Delta CT_{(NaTrxh \text{ tejido calibrador})}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT}$$

Los resultados de triplicados biológicos de la cuantificación relativa del mensajero de *NaTrxh* respecto al rRNA 18S, para *N. alata* Sc<sub>10</sub>Sc<sub>10</sub> y *N. rastroensis* se muestran en la figura 16.



**Figura 16.** Expresión relativa de *NaTrxh* en ocho tejidos de **A)** *N. alata* Sc<sub>10</sub>Sc<sub>10</sub> **B)** y *N. rastroensis*. Las gráficas muestran que la mayor acumulación del transcrito de *NaTrxh* es en pistilo en etapas inmaduras. n=3

Los resultados de la cuantificación relativa, muestran la presencia del transcrito de *NaTrxh* en los 8 tejidos evaluados, sin embargo hay diferencias en la cantidad del transcrito. Como podemos observar en la figura 16 el tejido donde se encuentra mayoritariamente representado el RNAm de *NaTrxh* es en el pistilo, específicamente en una etapa inmadura con un decremento en la etapa madura (flor abierta).

En el caso de *N. alata*, las diferencias son más evidentes, ya que el pistilo inmaduro cuenta con 10 veces más del transcrito que en la etapa madura y 12 veces más que la antera que es el tejido donde se encuentra la menor cantidad. Asimismo, en

tejidos como sépalo, tallo y hoja, también hay cantidades muy bajas del transcrito de *NaTrxh*; mientras que en pétalo hay una abundancia.

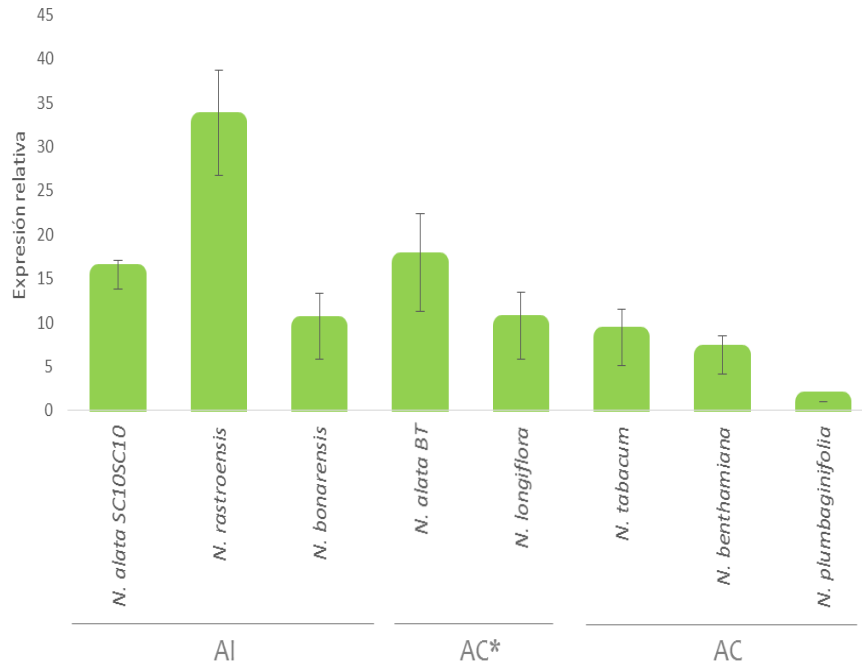
Juárez-Díaz *et al.* (2006) reportaron que a nivel de proteína, *NaTrxh* está presente en muchos tejidos en la planta; sin embargo, su abundancia difiere de un tejido respecto a otro. En concordancia con lo anterior, la cantidad de la proteína es proporcional a la del transcrito en cada tejido evaluado, por ello podríamos inferir que las diferencias en la cantidad de proteína entre tejidos podrían deberse a una regulación a nivel transcripcional. Así, tejidos como la antera con poca cantidad de proteína tendrán un bajo nivel de transcripción, contrario a lo que ocurre en tejidos con mayor cantidad del transcrito en donde también se encuentra abundantemente la proteína.

#### **7.1.5 El transcrito *NaTrxh* se acumula mayoritariamente en especies AI.**

Se evaluó la cantidad relativa del transcrito de *NaTrxh* en pistilos de las siguientes especies AI *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ , *N. rastroensis* y *N. bonarensis*; y de las especies AC *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *N. longiflora*, *N. plumbaginifolia* y *N. alata* BT. De igual manera, el análisis se efectuó por el método del  $C_T$  comparativo.

Los resultados se muestran en la figura 17, donde observamos que 2 de las 3 especies AC evaluadas (*N. plumbaginifolia* y *N. benthamiana*) muestran el menor nivel relativo de expresión, contrario a lo obtenido para 2 de las 3 especies AI evaluadas (*N. rastroensis* y *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ), en donde hay mayor cantidad relativa del transcrito de *NaTrxh*.

Por otro lado, las especies AC\* (con entorno genético de AI, pero que carecen de S-RNasa) muestran niveles intermedios de expresión. Particularmente, la especie *N. alata* BT presenta niveles mayores similares a los de *N. alata*  $S_{C10}S_{C10}$ ; este hecho podría indicar que la expresión de *NaTrxh* se ve influenciada por algún componente que está presente en ambos tipos de especies.



**Figura 17.** Expresión relativa de *NaTrxh* en pistilos de especies autocompatibles (AC), autoincompatibles (AI) y autocompatibles por carecer de la S-RNasa (AC\*). n=3

Las diferencias en la cantidad del transcrito de *NaTrxh* en pistilo se esperaban dado que este criterio se utilizó para considerar a *NaTrxh* como un GM, ya que se encontró mayoritariamente expresado en una especie AI (*N. alata* BT) respecto a una AC (*N. plumbaginifolia*) (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Los resultados de la cuantificación por qRT-PCR nos indican que no solo *N. alata* tiene altos niveles del transcrito en comparación con las especies AC, sino que hay otras especies AI que también tienen esta característica e incluso presentan mayor nivel de expresión que *N. alata*. Sin embargo, hace falta tener un mayor número de réplicas para poder realizar un mejor análisis estadístico.

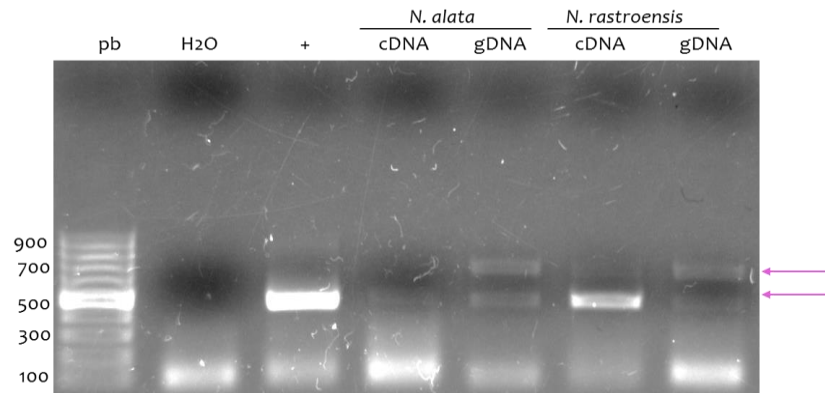
## 7.2 Existen al menos dos copias del gen *NaTrxh*.

La secuencia de *NaTrxh* disponible que fue publicada por Juárez-Díaz *et al.* (2006) proviene de cDNA de *N. alata*. Al realizar una amplificación utilizando los oligonucleótidos que reconocen los extremos del transcrito, pero tomando como

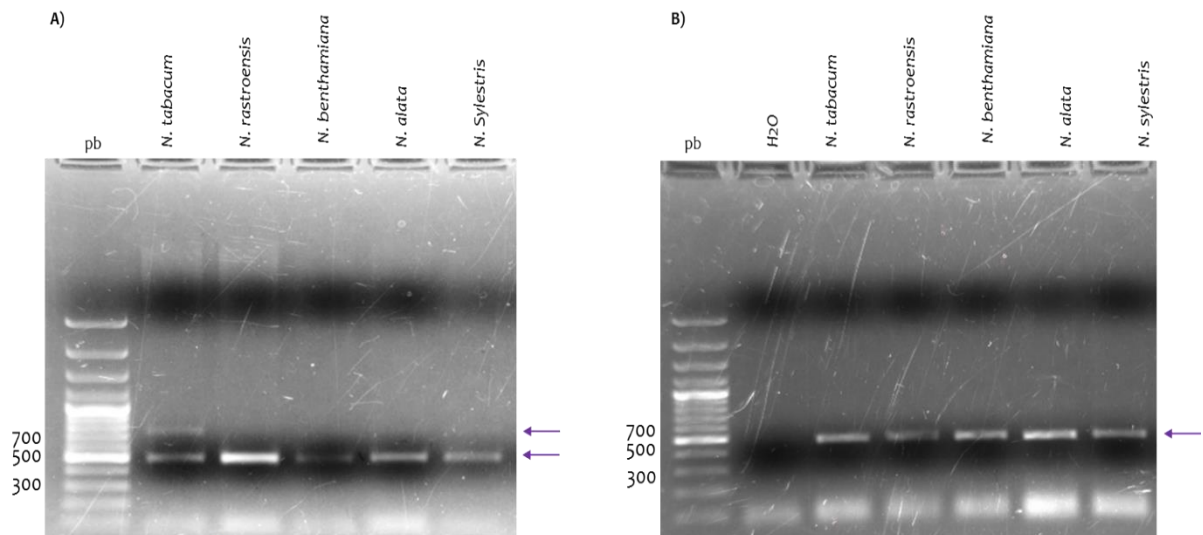


templado DNA genómico de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> o de *N. rastroensis*, amplificaron dos productos de distinto tamaño, de 500pb y 700pb aproximadamente en ambas especies (Figura 18).

Al encontrar lo anterior, se realizó la amplificación por PCR de *NaTrxh* a partir de DNA genómico de otras especies AC (*N. benthamiana*, *N. tabacum* y *N. sylvestris*) para determinar si las dos copias del gen están presentes en especies AC y AI. En la figura 19 se muestra que en todas las especies, excepto en *N. benthamiana*, hay amplificación de las dos copias de *NaTrxh* en gDNA, aunque solo se logra amplificar un transcrito para todas las especies.



**Figura 18.** Amplificación de *NaTrxh* de gDNA y cDNA de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub> y *N. rastroensis*. Control positivo (+).



**Figura 19.** Amplificación de *NaTrxh* de *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>, *N. rastroensis*, *N. tabacum*, *N. sylvestris* y *N. benthamiana* a partir de **A)** gDNA y **B)** cDNA.

Los productos de amplificación con los oligonucleótidos para el gen *NaTrxh* de todas las especies evaluadas fueron clonados y secuenciados. La longitud de los genes es de 688pb y 460pb en *N. alata* S<sub>C10</sub>S<sub>C10</sub>, *N. tabacum*, *N. rastroensis* y *N. sylvestris*. Cabe señalar que en el caso particular de *N. benthamiana* solo se logró la amplificación del gen de 460 pb; sin embargo, de acuerdo a la base de datos Sol Genomics Network (<https://solgenomics.net/>), en donde está ensamblado el genoma completo de esta especie, se encuentran reportados adicionalmente dos genes de 673pb y 691pb, respectivamente. En esta base de datos también se corroboraron las secuencias de los genes de *N. tabacum* y *N. sylvestris*.

Con las secuencias obtenidas se realizó un alineamiento múltiple con el programa CLUSTALW2 (EMBL-EBI). Los resultados muestran que existe un alto grado de similitud entre las secuencias de cada copia del gen de todas las especies (entre 93 y 99%, ver figura 21 A). Al compararlas con la secuencia proveniente del cDNA de *NaTrxh* de *N. rastroensis* se pone en evidencia que las diferencias en el tamaño de los dos genes se deben a la presencia de dos intrones de 85pb y 141pb, respectivamente (Figura 20.A).

Los intrones son regiones no codificantes que están dentro de un gen y son muy comunes en células eucariontes. El número y tamaño de estas secuencias es muy variable. La expresión de muchos genes requiere de la eliminación de los intrones en el mRNA precursor por el proceso de *splicing* (Brown, 1986).

Los intrones de mRNA nucleares poseen tres secuencias que son importantes para su procesamiento, los sitios de corte y empalme en los extremos 5' y 3' y el punto de ramificación que es una adenina (Figura 20.B). En el proceso de *splicing*, el sitio de corte y empalme del extremo 5' se escinde primero y se une por medio de una guanina a la adenina del punto de ramificación. Esto implica que el intrón se repliega sobre sí mismo para generar una estructura denominada lazo. Luego ocurre un rompimiento del enlace fosfodiéster en el sitio de corte y empalme 3' y simultáneamente los extremos de los exones adyacentes se unen covalentemente. El intrón es liberado y se lineariza cuando el enlace se rompe en el punto de ramificación y es degradado rápidamente por nucleasas (Zhiguo *et al.*, 2013).



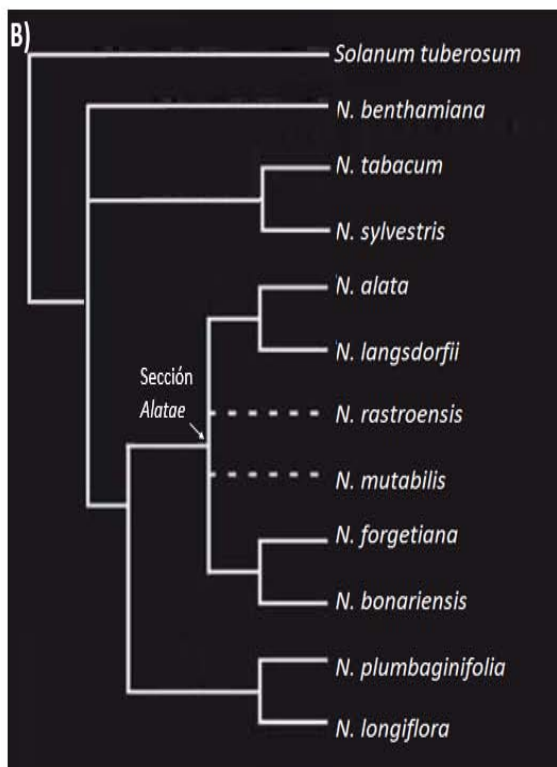


filogenia del género *Nicotiana* con un acercamiento a la sección *Alatae* (Chase *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2006) que incluye a algunas de las especies analizadas en el presente estudio (Figura 21.B), se observa que la especie más alejada, que incluso no está dentro de la sección *Alatae* es *N. benthamiana*; notablemente, es también la especie en que la secuencia de *NaTrxh* ha sufrido más mutaciones. Por otra parte, las secuencias de *NaTrxh* gDNA de *N. tabacum* y *N. sylvestris* presentan el porcentaje de identidad más alto (99.85%) y con base en la filogenia, éstas son especies muy cercanas.

A)

Matriz de porcentaje de identidad

<i>N. alata</i>	100					
<i>N. rastruensis</i>	99.42	100				
<i>N. tabacum</i>	97.67	97.97	100			
<i>N. sylvestris</i>	97.53	97.82	99.85	100		
<i>N. benthamiana_673pb</i>	92.87	93.16	93.46	93.31	100	
<i>N. benthamiana_691pb</i>	97.24	97.24	96.95	96.80	93.02	100



**Figura 21.** Porcentaje de identidad de *NaTrxh* de distintas especies de *Nicotiana* y sus relaciones filogenéticas. **A)** Matriz de porcentaje de identidad calculada para *NaTrxh* que contiene intrones en el programa CLUSTALW. **B)** Filogenia del género *Nicotiana* en base rDNA 5S y DNA de cloroplasto que incluye a la sección *Alatae* y otras especies analizadas en el presente estudio (Modificada de Chase *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 2006).

### 7.3 El transcrito de *NaTrxh* es producto de la transcripción del gen sin intrones.

Las distintas versiones de *NaTrxh* pueden existir debido a un evento de duplicación génica después del cual se fueron acumulando independientemente mutaciones en las secuencias. La presencia de ambas copias en varias especies sugiere que las dos estuvieron en el ancestro, por lo que el evento de duplicación posiblemente ocurrió antes de la diversificación de estas especies.

*N. benthamiana* es la única de las especies evaluadas que posee tres copias del gen, una de las cuales corresponde a la de 460pb. Las dos copias restantes contienen inserciones o deleciones en los intrones, ello indicaría que ocurrió un segundo evento de duplicación en esta especie.

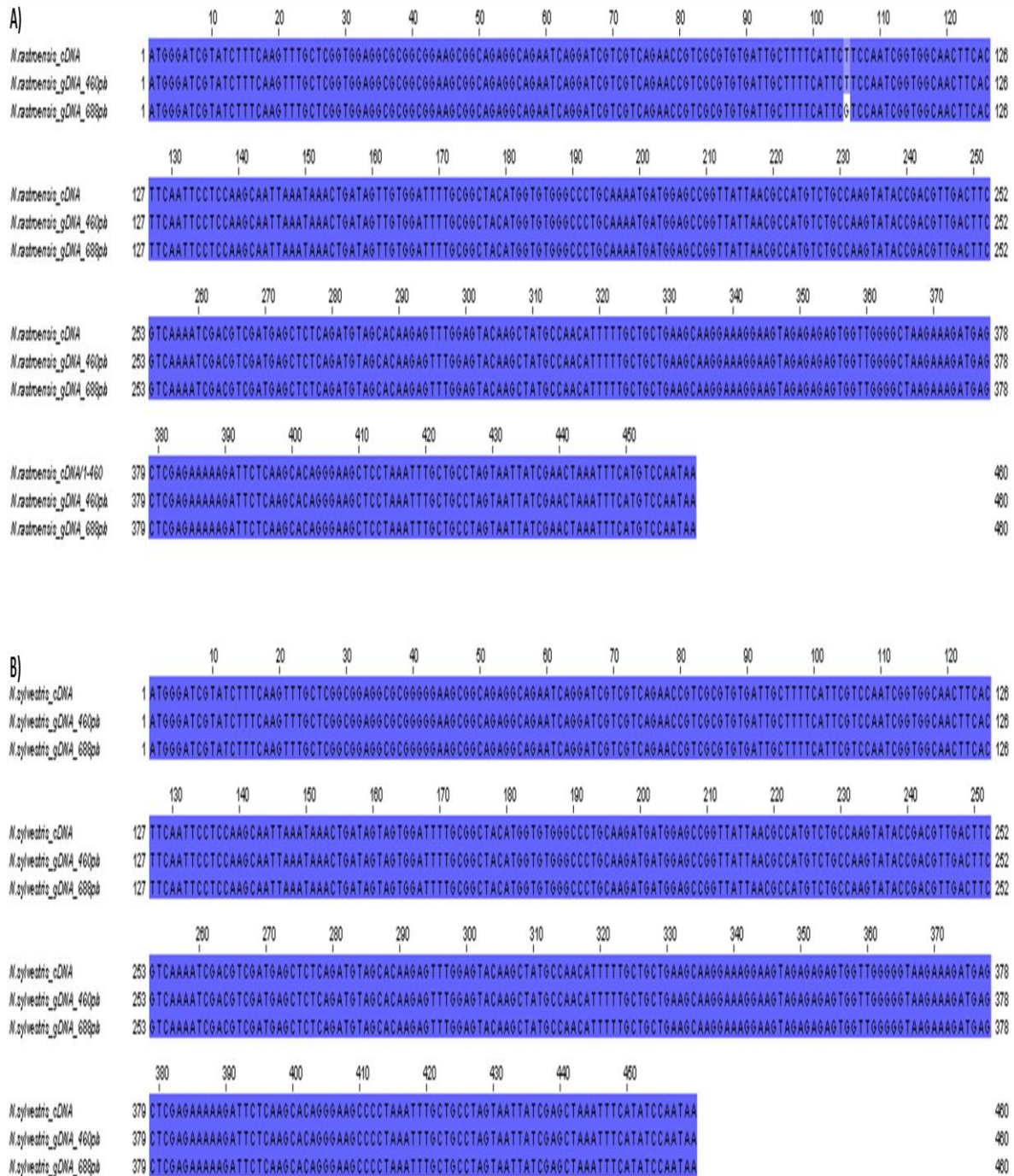
Las duplicaciones génicas son consideradas como la principal causa de generación de proteínas nuevas. En un inicio, la duplicación produce dos proteínas con funciones redundantes; sin embargo, la acumulación de mutaciones conduce a su divergencia (Hurles, 2004). En el caso de *NaTrxh* observamos que solo uno de los productos de la duplicación se expresa y el otro no. Por lo tanto, este último pudo haberse convertido en un pseudogen.

Los intrones presentes en la copia de 688pb pudieron ser adquiridos después de la duplicación génica o bien ser eliminados para dar lugar a la copia que no los posee. En general, se considera que cuando existen formas alternas de un gen con y sin intrones, lo cual se da mucho en los tRNAs, los intrones debieron ser adquiridos por el gen continuo ya que es poco probable que evolutivamente se hayan reunido varias regiones de un gen para generar un producto funcional (Blake, 1985).

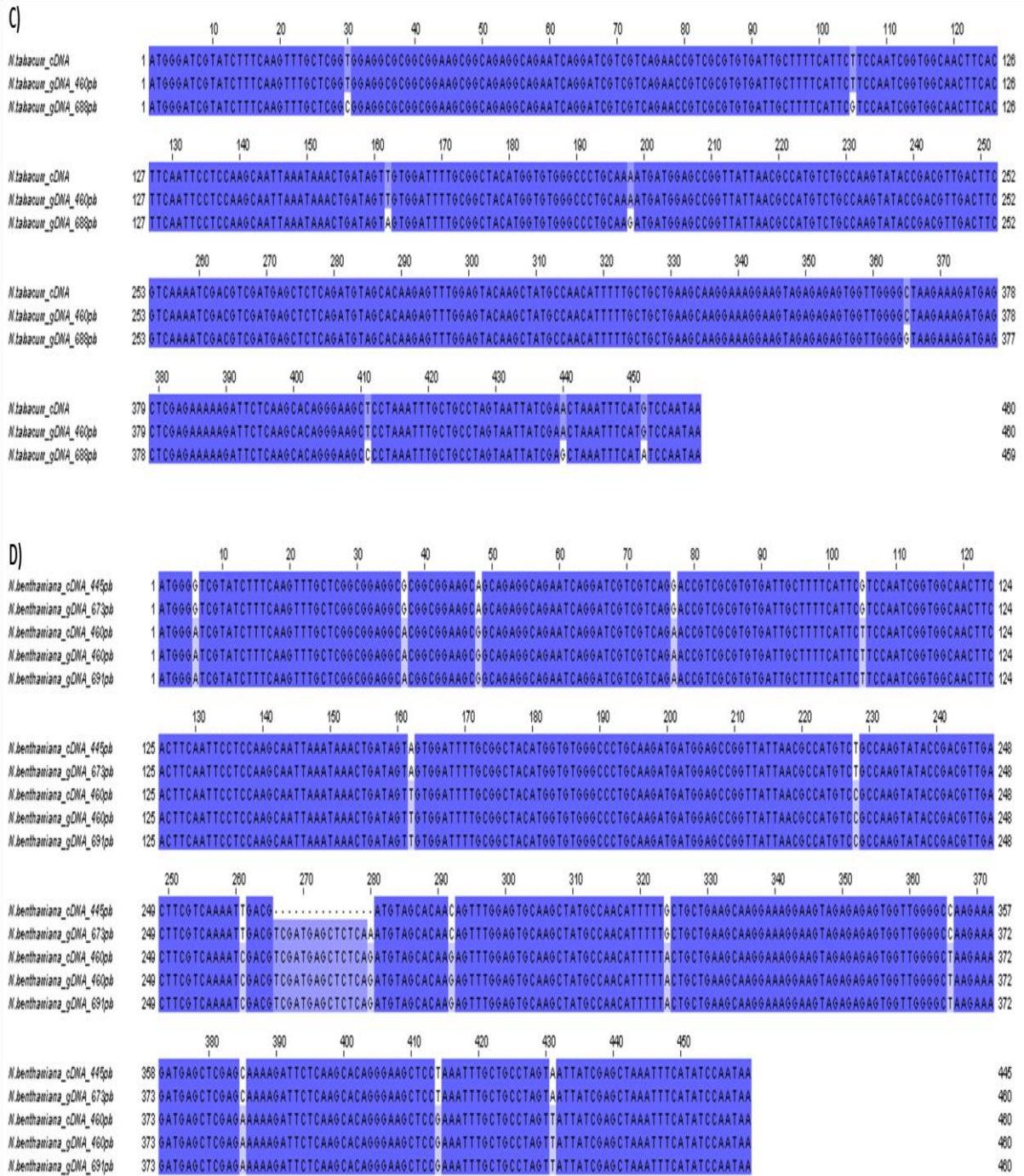
La presencia de intrones en un gen puede tener varios significados por ejemplo regular la expresión génica o promover la edición del mRNA (Hervé *et al.*, 2003; Yenerall y Zhou, 2012).

Con el objetivo de conocer cuál copia de *NaTrxh* presente en el genoma de cada especie se transcribe y da lugar al mRNA, se realizó un alineamiento entre la

secuencia de cDNA y las secuencias de gDNA de cada especie, cabe señalar que se removieron los intrones de la copia de mayor tamaño para realizar la comparación (Figura 22).



**Figura 22.** Alineamiento múltiple entre la secuencia del transcrito *NaTrxh* y los productos de amplificación de gDNA de **A)** *N. rastroensis*, **B)** *N. sylvestris*.



**Figura 22.** Continuación. **C)** *N. tabacum* y **D)** *N. benthamiana*.

En *N. rastroensis* se puede observar que el transcrito proviene del gen de 460pb ya que las secuencias son completamente idénticas, por el contrario, aun removiendo



los intrones de la copia de 688pb, existen mutaciones respecto a la secuencia del transcrito. El mismo patrón es observado en *N. tabacum* pero no en *N. sylvestris*, donde no es posible distinguir la procedencia del transcrito ya que las tres secuencias son idénticas (Figura 22). Sin embargo, es probable que el transcrito provenga del gen que no tiene intrones de manera similar a lo que ocurre en *N. rastruensis* y *N. tabacum*.

En el caso de *N. benthamiana*, existen tres copias del gen y la base de datos Sol Genomics Network reporta la presencia de dos transcritos para *NaTrxh* de 460 y 445 nucleótidos, respectivamente. De acuerdo al alineamiento realizado entre las 5 secuencias podemos observar que el transcrito de 445 nucleótidos proviene del gen de 673pb; sin embargo, en el transcrito de 460 nucleótidos no es posible distinguir cual gen lo origina.

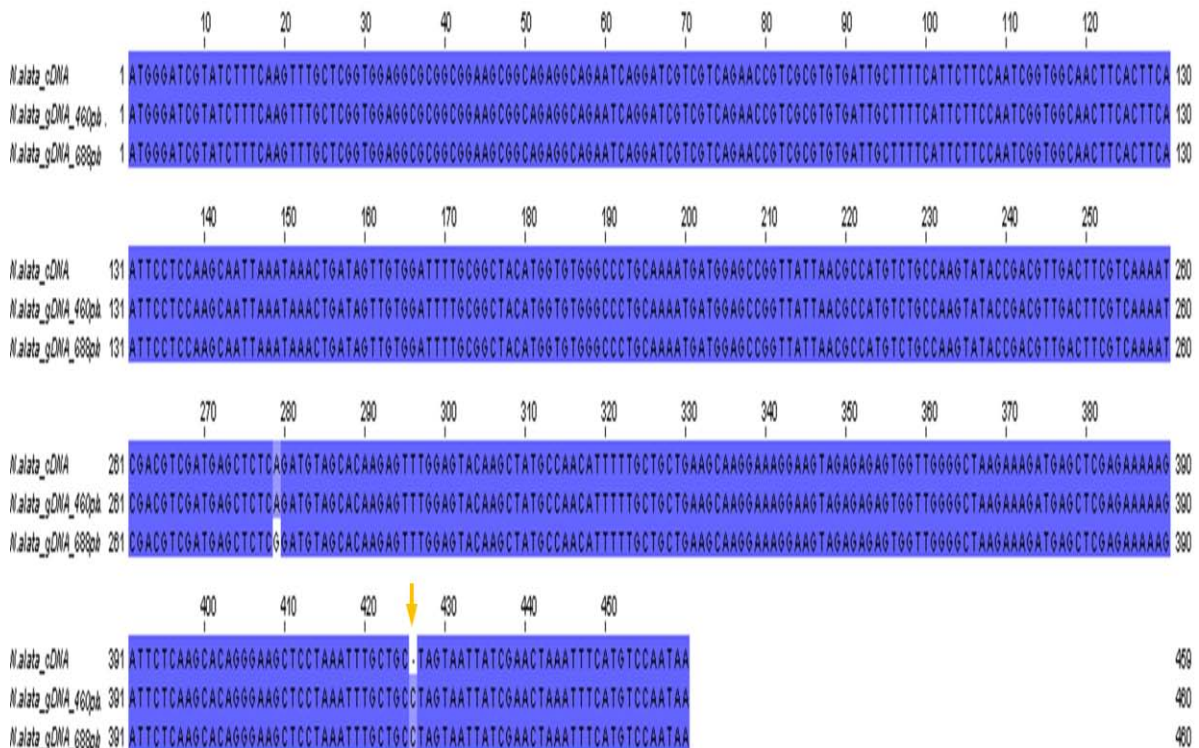
Se han reportado muchos ejemplos donde los intrones en un gen funcionan como *enhancers* o represores regulando así la expresión génica o también pueden promover la edición del mRNA (Lee *et al.*, 2003). En el caso de *NaTrxh*, el gen que posee dos intrones no se expresa, aquí la presencia de intrones podría participar como un regulador negativo; no obstante, esta observación no se puede aseverar, ya que aún se desconoce otros elementos regulatorios de *NaTrxh* en su promotor o el estado de su cromatina.

Uno de los transcritos de *NaTrxh* de *N. benthamiana* proviene de un gen de 673pb, en este caso el gen contiene dos intrones. El segundo intrón del gen contiene varias deleciones y sustituciones en comparación con el de las demás especies; es posible que estas mutaciones en la secuencia nucleotídica contribuyan a su expresión.

#### **7.4 Hay modificación del transcrito de *NaTrxh* en pistilo de *N. alata*.**

Todas las secuencias del transcrito de *NaTrxh* evaluadas en el presente estudio provienen de pistilo, dado que es muy abundante en dicho tejido y además es el sitio en donde se cree que la proteína puede tener una función, particularmente en

el mecanismo de AI. El caso de la especie *N. alata* reveló un dato de gran interés, ya que al realizar el alineamiento entre cDNA y las dos copias de *NaTrxh* de gDNA podemos observar que el transcrito carece de una citosina en la posición 426 que sí existe en ambas copias del gen (Figura 23). Este hecho podría indicar que en el mensajero producido en los pistilos de *N. alata* es modificado postranscripcionalmente por delección de un nucleótido.

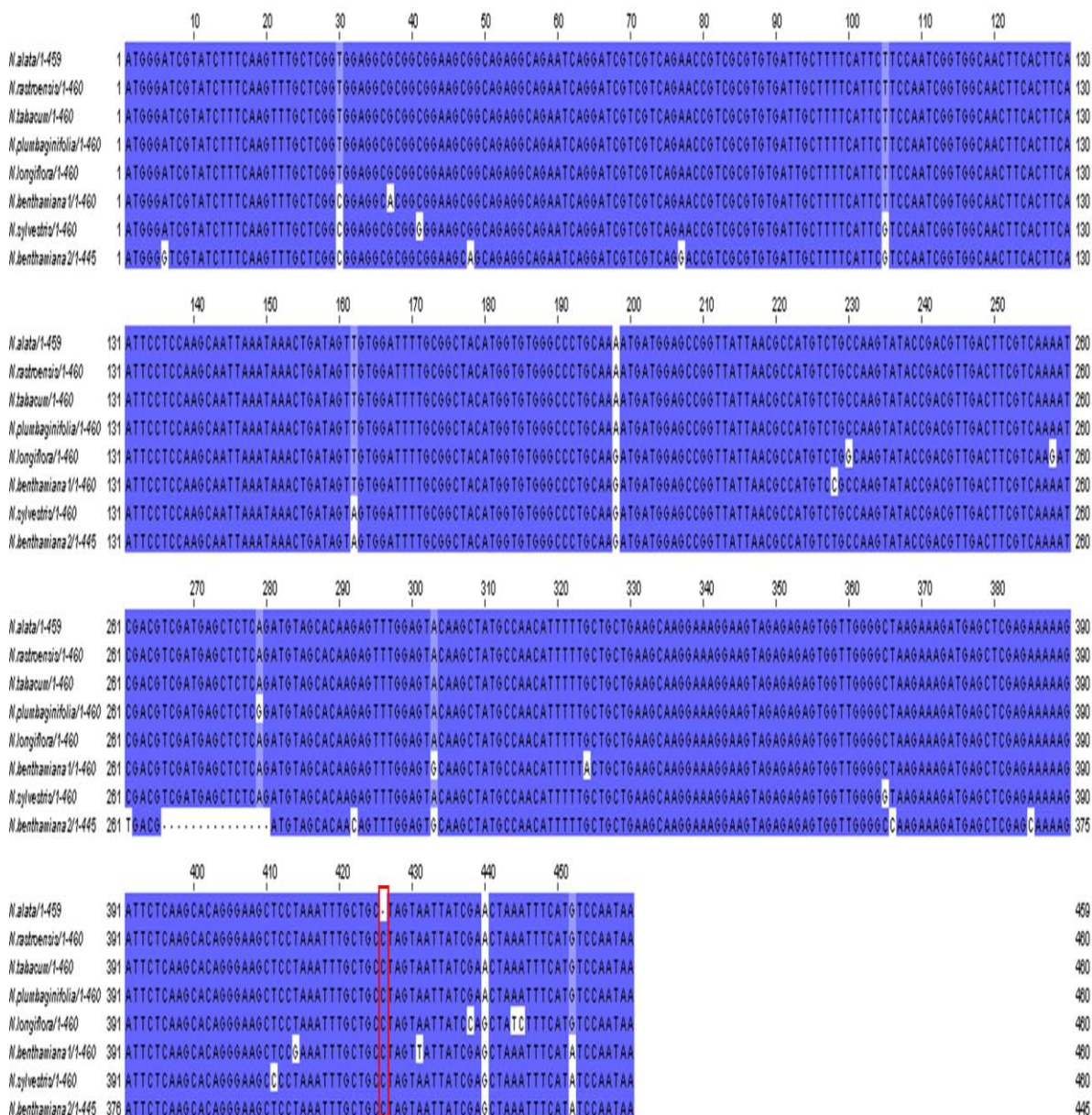


**Figura 23.** Alineamiento múltiple entre la secuencia del transcrito *NaTrxh* y los productos de amplificación a partir de gDNA de *N. alata* SC10SC10. En amarillo está señalada la C que podría ser eliminada del transcrito.

### 7.5 Las diferencias en la secuencia del transcrito de *NaTrxh* reflejan mutaciones a nivel de proteína.

Al realizar el alineamiento múltiple entre las secuencias del transcrito de *NaTrxh* de las especies evaluadas se observó que la modificación por delección de una C

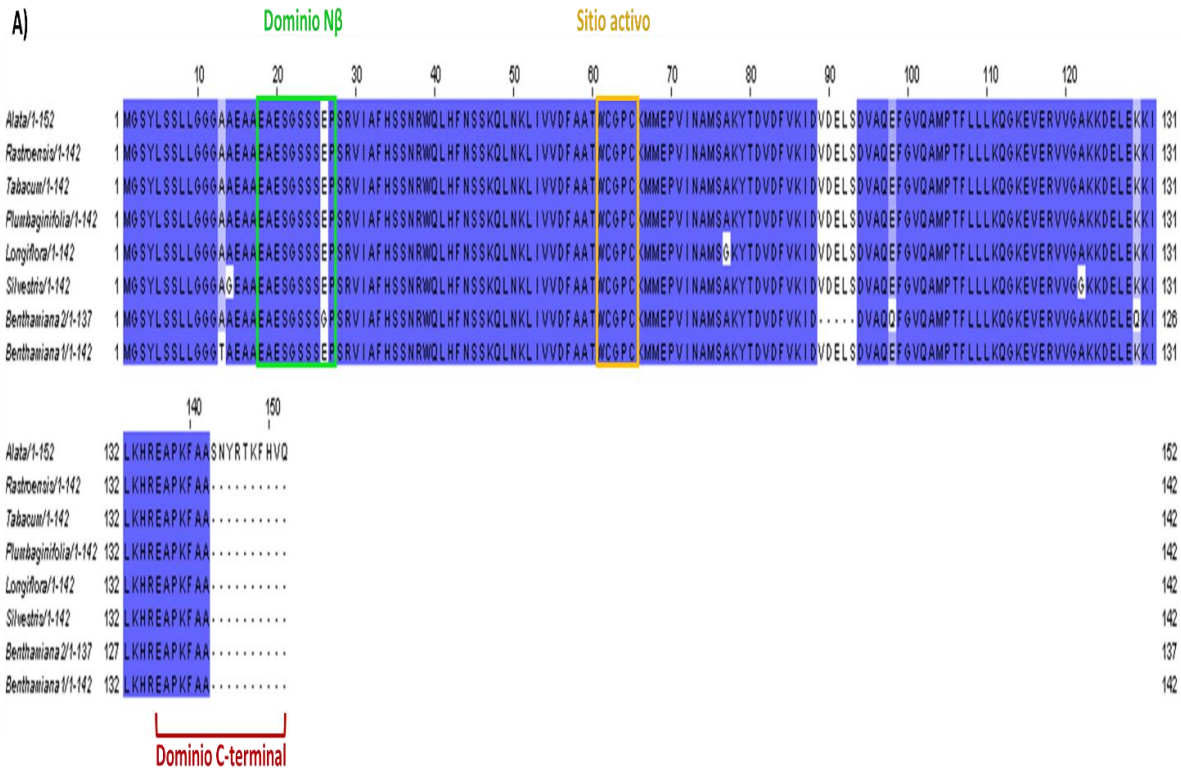
únicamente se lleva a cabo en el pistilos de *N. alata* (Figura 24). En las demás especies hay un marco de lectura diferente a partir de este nucleótido lo que cambia el marco de lectura repercutiendo en la secuencia de aminoácidos en el extremo C-terminal.



**Figura 24.** Alineamiento múltiple entre las secuencias del transcrito de *NaTrxh* de distintas especies del género *Nicotiana*. En rojo se muestra la C que podría ser eliminada del transcrito de *N. alata*.

Para establecer las diferencias a nivel de la estructura primaria de la proteína NaTrxh en las especies evaluadas y para observar que efecto tiene el corrimiento del marco de lectura provocado por la delección de la C, se tradujeron las secuencias nucleotídicas del transcrito y se compararon mediante un alineamiento múltiple.

El análisis mostró arrojó que en *N. rastroensis*, *N. tabacum* y *N. plumbaginifolia* la proteína tiene exactamente la misma secuencia y en *N. sylvestris*, *N. longiflora* y *N. benthamiana* solo hay diferencias en 1 o 2 aminoácidos; ninguna de las secuencias muestra afectaciones en el sitio activo (Figura 25.A).



**B)**

mRNA *N. alata* 5' GAAGCUCCUAAAUUUGCUGCUAGUAAUUAUCGAACUAAAUUCAUGUCCAAUAA 3'  
 E A P K F A A S N Y R T K F H V Q Stop

mRNA *N. rastronensis* 5' GAAGCUCCUAAAUUUGCUGCCUAGUAAUUAUCGAACUAAAUUCAUGUCCAAATAA 3'  
 E A P K F A A Stop

**Figura 25.** Las diferencias en el transcrito de *NaTrxh* reflejan diferencias en el C-terminal de la proteína. **A)** Alineamiento múltiple entre las secuencias de NaTrxh de distintas especies del género *Nicotiana*. En la secuencia se muestra la conservación del dominio de transporte Nβ (verde) y del sitio activo (amarillo), también se muestran los aminoácidos que corresponden al dominio C-terminal (rojo). **B)** El nucleótido C que está ausente en el transcrito de *N. alata* provoca un corrimiento de marco de lectura eliminando un codón de término y extendiéndose la síntesis de 10 aminoácidos más. En especies como *N. rastronensis* el triplete inmediato a la C (rojo) codifica para un codón de término.

Es importante recordar que en *N. benthamiana* existen dos transcritos, uno de ellos es de 445 nucleótidos que generaría una proteína con 5 aminoácidos eliminados (V89-S93). Se desconoce la función de estos aminoácidos en NaTrxh, pero están

conservados en varias tiorredoxinas vegetales. Tampoco se ha comprobado si los dos transcritos de *NaTrxh* en *N. benthamiana* se traducen.

Una observación importante es que el tamaño de la proteína es de 142 residuos, excepto la de *N. alata* que posee 10 aminoácidos más hacia el C-terminal. Esta diferencia es generada por el cambio en el marco de lectura que provoca la C que es removida del transcrito. En las demás especies, el triplete inmediato al que contiene la C codifica para un codón de término (Figura 25.B).

La ausencia de estos 10 residuos es de gran interés, ya que previamente se demostró que en *N. alata* forman parte de un dominio de unión a la S-RNasa. Este dominio C-terminal inicia en el aminoácido Glu136 y es de 17 aminoácidos (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Sin embargo, de acuerdo a los datos obtenidos en el presente estudio, en las demás especies del género *Nicotiana* solo hay 7 aminoácidos de este dominio (Figura 25.B), por lo que queda pendiente determinar si estos 7 aminoácidos son suficientes para formar el complejo con la S-RNasa. De ser así, estos aminoácidos serían la región mínima indispensable para la interacción con la S-RNasa.

Por otro lado, si la modificación en el mensajero de *NaTrxh* en *N. alata* se lleva a cabo para codificar una proteína que pueda interaccionar más fácilmente con la S-RNasa, es posible que esta modificación únicamente se lleve a cabo en el pistilo, y en aquellos tejidos donde no hay S-RNasa puede ser que el mensajero no se edite y la proteína que se detecta carezca del dominio C-terminal. Para resolver esto será necesario clonar y secuenciar los transcritos de *NaTrxh* provenientes de otros tejidos.

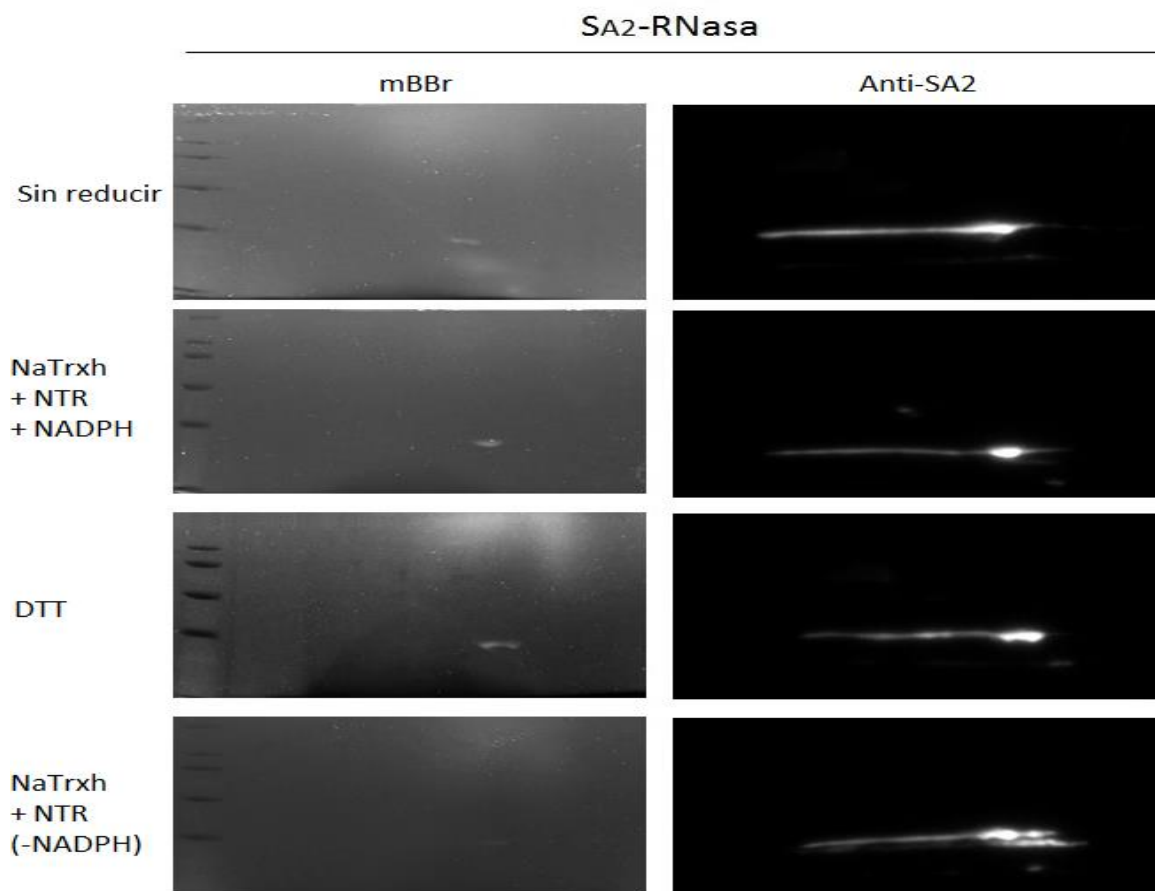
## **7.6 El efecto de la reducción de la S-RNasa por NaTrxh.**

### **7.6.1 La S-RNasa es una proteína blanco de la reducción de NaTrxh.**

La S-RNasa puede interaccionar con otras proteínas estilares como NaTTS, NaPELPIII y p11 (Cruz-García *et al.*, 2005). Juárez-Díaz *et al.* (2006) demostraron

que también existe interacción entre la S-RNasa y la NaTrxh, aunque aún se desconoce el porqué de esta interacción; además la NaTrxh es capaz de reducir a la S-RNasa *in vitro*.

El sistema de electroforesis en dos dimensiones descrito por Yano *et al.* (2001) se utilizó para corroborar la reducción de la SA<sub>2</sub>-RNasa de *N. alata* por NaTrxh.



**Figura 26.** Electroforesis de dos dimensiones de la SA<sub>2</sub>-RNasa sin reducir y reducida con NaTrxh/NTR/NADPH, DTT o NaTrxh/NTR. La unión del mBBr a los sulfhidrilos de la S-RNasa se visualizó bajo luz UV. En la columna del lado derecho se muestra el inmunoanálisis por Western Blot utilizando un anticuerpo Anti SA<sub>2</sub>-RNasa.

Como se puede observar en la figura 26 existen algunos grupos sulfhidrilos basales en la S-RNasa que se evidencian por la fluorescencia; de hecho, se ha reportado que las S-RNasas contienen 9 Cys, de las cuales 8 se encuentran formando 4 puentes disulfuro y hay una Cys libre (Oxley y Bacic, 1996), a esta última se puede

unir el mBBr (Monobromobimano). Específicamente, la S<sub>A2</sub>-RNasa evaluada en este estudio contiene las 9 Cys.

Cuando la S<sub>A2</sub>-RNasa es reducida por el DTT, la señal de la fluorescencia aumenta significativamente respecto al control negativo, lo que se puede deber a la ruptura de todos los enlaces disulfuro expuestos de la S-RNasa, quizás los 4 puentes sean reducidos por el DTT. Sin embargo, cuando la reducción es llevada a cabo por el sistema NaTrxh/NTR/NADPH, la intensidad de la fluorescencia es menor, lo cual indica que la S<sub>A2</sub>-RNasa es un sustrato de la NaTrxh pero la reducción no se da en todos los disulfuros como ocurre con el DTT, ello indica que no todos los puentes de la S-RNasa son blanco de la reducción por NaTrxh, aunque con estos resultados no se puede deducir cuántos y cuáles enlaces son los que rompe NaTrxh.

#### **7.6.2 NaTrxh aumenta la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.**

En la actualidad se desconocía si el efecto en la reducción de la S-RNasa por NaTrxh afectaba su actividad de ribonucleasa o su capacidad de generar complejos con otras proteínas; cualquiera de los dos efectos mencionados podría tener un significado en la respuesta de AI.

Con el objetivo de conocer si la reducción específica de la S-RNasa por NaTrxh tiene un efecto sobre su actividad de ribonucleasa se realizó un ensayo para evaluar la degradación de RNA.

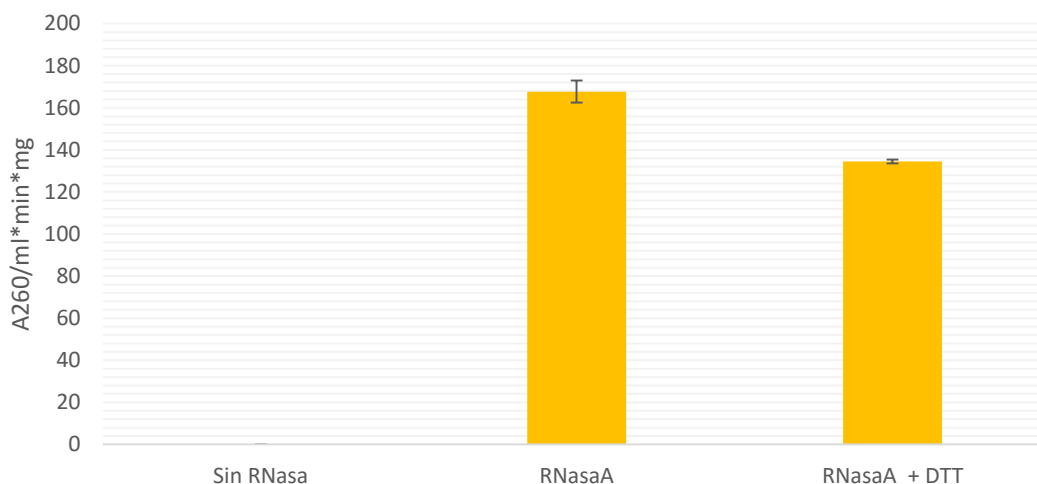
Antes de cuantificar la actividad de la S-RNasa se estableció el protocolo con una RNasa comercial (RNasa A, SIGMA). El ensayo se realizó por duplicado con RNasa A sin reducir y reducida con DTT, con el que se espera que la actividad de la enzima disminuya por su desnaturalización.

La actividad de ribonucleasa se evalúa después de 30min. Luego de este tiempo el RNA no degradado se precipita para cuantificar por A<sub>260</sub> nm los ribonucleótidos libres producto de la degradación en el sobrenadante. La actividad es calculada de acuerdo a la siguiente ecuación:



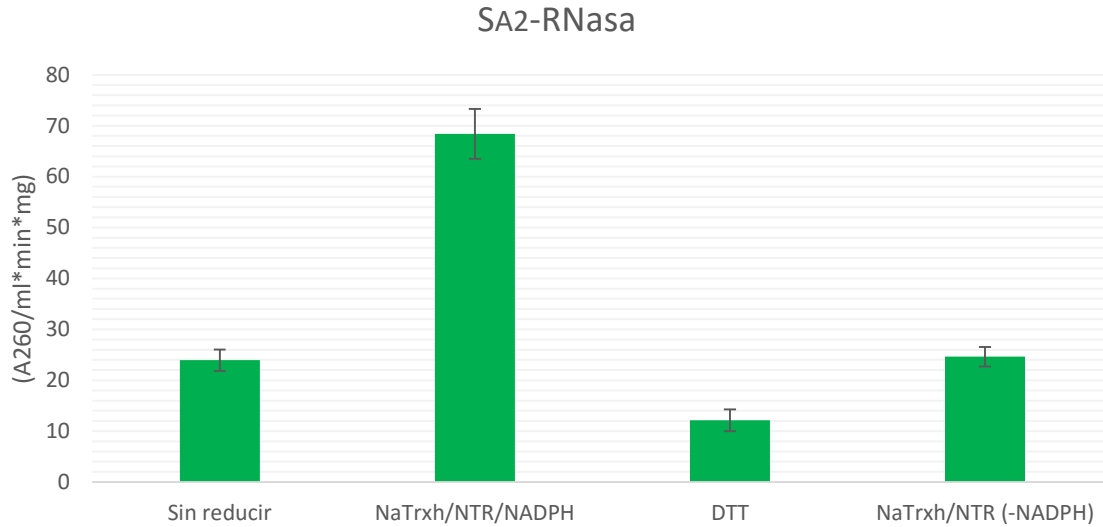
$$\text{Actividad} = \text{A260/ml*min*mg}$$

Los resultados de la figura 27 indican que la RNasa A disminuye ligeramente su actividad después de ser reducida por el DTT. Lo anterior quizás se explique porque la enzima no se desnaturaliza completamente debido a que el DTT no rompe todos los puentes disulfuro y por ello, aún después de la reducción no se ve afectada la estructura o el sitio activo de la enzima, de tal manera que aún puede degradar gran cantidad de RNA.



**Figura 27.** Degradación de RNA por la RNasa A.

La reducción de la  $S_{A2}$ -RNasa con NaTrxh se realizó bajo el sistema completo NaTrxh/NTR/NADPH. Como control negativo de la reducción se utilizó a NaTrxh en el sistema pero sin NADPH, en dicho sistema no podrá haber reducción del sustrato porque el NADPH es quien dona los electrones para la reacción. Por otra parte, también se evaluó a la  $S_{A2}$ -RNasa sin reducir y reducida con DTT. Los resultados de actividad de ribonucleasa se muestran en la figura 28.



**Figura 28.** Actividad de ribonucleasa de la SA<sub>2</sub>-RNasa sometida a distintas condiciones reductoras. Nótese que solo al ser reducida con el sistema completo NaTrxh/NTR/NADPH su actividad se ve aumentada significativamente. Cada barra representa 6 réplicas experimentales.

Como se observa en la figura 28 la SA<sub>2</sub>-RNasa tiene una actividad basal que solo al ser reducida con NaTrxh puede aumentar considerablemente, lo cual significa que NaTrxh además de que reduce a la SA<sub>2</sub>-RNasa, la reducción tiene un efecto sobre su actividad de ribonucleasa; es posible que la ruptura de algunos puentes disulfuro específicos de la SA<sub>2</sub>-RNasa le ayude a adoptar una conformación más favorable en la cual se pueda unir mejor a su sustrato (RNA) para realizar la catálisis. Para asegurar que esta actividad se debe en realidad a la reducción por NaTrxh, se empleó un control en donde se trató a la SA<sub>2</sub>-RNasa con NaTrxh/NTR sin NADPH, quien es el donador inicial de los electrones para la reducción y observamos que la actividad de la SA<sub>2</sub>-RNasa no aumentó como con la presencia del NADPH.

Al ser reducida con DTT, la actividad de la SA<sub>2</sub>-RNasa disminuyó considerablemente, ya que posiblemente este agente reductor rompe todos los puentes disulfuro de la SA<sub>2</sub>-RNasa o al menos la deja en un estado casi totalmente reducido en el cual la proteína pierda su actividad por desnaturalización.

## 8. Discusión.

### 8.1 NaTrxh se expresa mayoritariamente en pistilos de especies AI.

En la búsqueda de genes modificadores (GM) que están involucrados en el mecanismo de AI, un criterio importante a considerar es su expresión específica en los órganos sexuales (McClure, 2004).

La cantidad relativa del transcrito de *NaTrxh* se midió por medio de qRT-PCR. Los resultados mostraron que el transcrito está presente en todos los tejidos evaluados pero su presencia es mayor en el pistilo, lo cual era de esperarse debido a que el análisis a nivel de proteína mostró un patrón similar (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

No es raro encontrar la expresión de la NaTrxh en distintas partes de la planta, ya que dicha localización puede depender de sus sustratos, es decir, es posible que existan proteínas blanco de su acción reductora en distintos órganos en la planta. Llama la atención su mayor expresión en el órgano reproductor femenino, lo que coincide con la expresión de otras proteínas que están involucradas en el mecanismo de auto-incompatibilidad como HT-B, 120K y NaStEP, (McClure *et al.*, 1999; Hancock *et al.*, 2005; Jiménez-Durán *et al.*, 2013).

Dados los antecedentes de su interacción específica con la S-RNasa y su capacidad de reducirla *in vitro*, se puede proponer a NaTrxh como un GM del pistilo en *Nicotiana*. Para comprobarlo quedan varios estudios por realizar como la generación de plantas transgénicas en las que *NaTrxh* se encuentre silenciado y donde se espera que haya un efecto en el rechazo del polen.

Cabe destacar que tanto el transcrito como la proteína están mayoritariamente representados en etapas tempranas del pistilo y existe un decremento en la etapa madura, cuando se está llevando a cabo el rechazo del polen. La localización espacio-temporal de NaTrxh podría indicar que es en ese sitio en el que lleva a cabo sus funciones. Su expresión en la etapa madura coincide con nuestra hipótesis de que participa en el mecanismo del rechazo del polen; sin embargo su acumulación

es mayor en la etapa inmadura de los pistilos, ello indica que podría desempeñar otras funciones, por ejemplo, en el desarrollo de este órgano.

Tanto en *N. alata* como en *N. rastroensis* el nivel de transcrito de *NaTrxh* es similar en los tejidos evaluados, mostrando que en estas dos especies de *Nicotiana* AI se mantiene el patrón de acumulación del transcrito y esto también podría conservarse en otras especies AI.

Adicionalmente, se comparó la cantidad del transcrito de *NaTrxh* en pistilos de especies AI y AC. Los resultados mostraron que hay mayor presencia en especies con entorno genético de AI. Las especies como *N. longiflora* y *N. alata* BT carecen de S-RNasa, por lo que no son capaces de rechazar el polen propio; sin embargo, sí poseen los demás componentes de la vía y es interesante destacar que los niveles del transcrito de *NaTrxh* en estas dos especies es superior al de las demás plantas AC.

En 2006 Juárez-Díaz realizó ensayos tipo Western blot y observó que la cantidad de la NaTrxh es mayor en pistilos de plantas AI, lo cual correlaciona con los resultados de expresión; sin embargo, en algunas plantas AC (*N. plumbaginifolia* y *N. tabacum*) no hubo detección de la proteína pero sí del transcrito, ello podría indicar que existe una regulación postranscripcional de *NaTrxh* en estas plantas AC, de tal manera que no hay síntesis de la proteína.

La abundancia tanto del transcrito como de la proteína NaTrxh en plantas con entorno genético de AI es una evidencia más de que la proteína podría tener una función importante en dicho mecanismo.

## **8.2 El transcrito de *NaTrxh* en *N. alata* es modificado por delección de una citosina.**

La comparación del transcrito de *NaTrxh* de las especies evaluadas reveló que en *N. alata* puede estar ocurriendo la delección de un nucleótido. En los eucariontes se reportan diversos ejemplos de edición de RNA, el cual es un proceso que se define

como una alteración específica en una secuencia de RNA y que modifica la información genética (Emeson, 2000). La edición del RNA se ha descrito en diversos organismos y en distintos compartimentos celulares, y puede afectar el mRNA, tRNA o rRNA (Takenaka *et al.*, 2013; Shikanai, 2014).

En la mayoría de los casos, los aminoácidos que son alterados debido a la edición del RNA son necesarios para la expresión de proteínas funcionales. La información genética se puede alterar por medio de la creación de codones de inicio o de término, o bien cambiando aminoácidos específicos. Todo lo anterior permite la generación de proteínas distintas a las codificadas en el DNA genómico (Shikanai, 2014). Cabe señalar que el mecanismo de edición del mRNA puede ser un proceso cotranscripcional o postranscripcional (Takenaka *et al.*, 2013).

En angiospermas se ha reportado un tipo de edición de RNA que involucra la desaminación del nucleótido C a U y se lleva a cabo en mitocondria y cloroplasto, aunque las proteínas involucradas en el procesos son codificadas en el genoma nuclear (Gott y Emeson, 2000; Takenaka *et al.*, 2013).

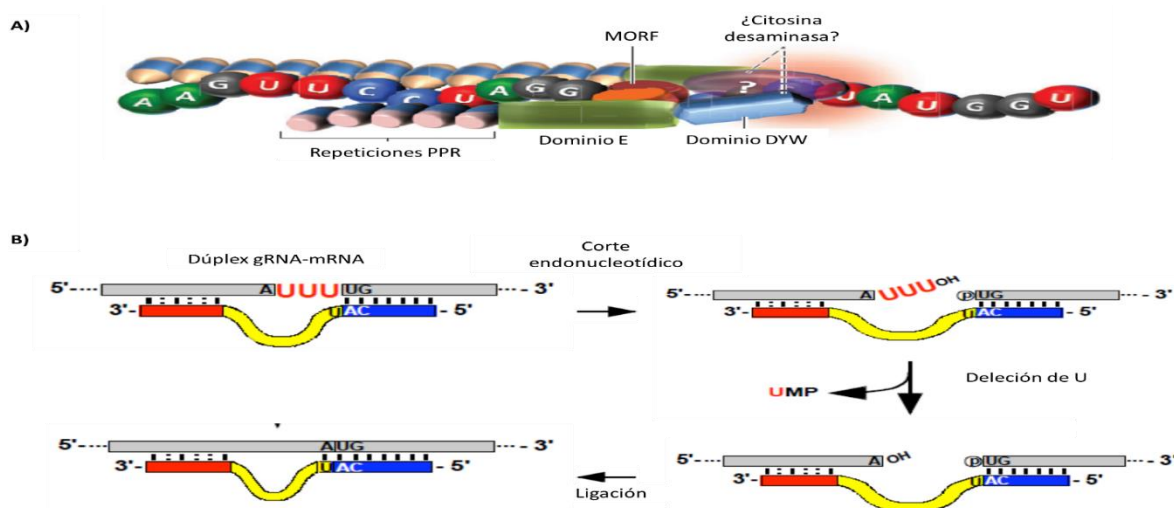
El mecanismo por el cual se da la edición del RNA en plantas aún no está bien establecido. Se sabe de la presencia de dos proteínas que son esenciales para el mecanismo; una de ellas es una PPR (Pentatricopeptide Repeat Protein) la cual posee una estructura modular de repeticiones que se propone están en contacto con los nucleótidos del RNA río arriba del sitio de edición, también posee un dominio E de función desconocida y un dominio DYW hacia el C-terminal, el cual lleva su nombre por 3 aminoácidos conservados (Aspártico, Tirosina y Triptofano), que son importantes para la actividad de desaminasa (Okuda *et al.*, 2006). La segunda proteína necesaria para la edición del RNA en plantas es MORF (Organellar RNA Editing Factor) cuya función es aún desconocida pero que puede interactuar con PPR (Takenaka *et al.*, 2012).

Con las evidencias anteriores, se ha propuesto un modelo de editosoma donde participan PPR y MORF en la desaminación de C a U (Takenaka *et al.*, 2013); en

este modelo MORF participa como un conector entre PPR y el RNA, y el dominio DYW es quien realiza la conversión de la C (Figura 29.A).

En el presente estudio se propone que la modificación del transcrito de *NaTrxh* consiste en la eliminación de una C; sin embargo, a la fecha no se tienen reportes de que ocurra este tipo de modificación en el mRNA de plantas.

La inserción o deleción de nucleótidos en el mRNA se ha reportado en protozoarios, hongos, nemátodos y virus de RNA. Específicamente, ocurre la inserción o deleción de U que es dirigida por un RNA guía (gRNA). No hay una secuencia consenso en el sitio donde se llevará a cabo la modificación; sin embargo, se ha visto que las secuencias ricas en purinas localizadas río arriba del sitio de modificación contribuyen a la estabilidad del complejo proteico que participa en el proceso (Gott y Emeson, 2000).



**Figura 29.** Mecanismos de edición de mRNA. **A)** Modelo de editosoma en plantas. Una proteína PPR se une a una combinación específica de nucleótidos en el RNA; una o múltiples proteínas MORF interactúan con PPR y atraen la actividad enzimática. La actividad de desaminasa puede ser otorgada por el dominio DYW de la misma PPR o de un factor en *trans*. Modificado de Takenaka *et al.*, 2012. **B)** Eliminación de U por medio de gRNA. Primero se genera un duplex gRNA-mRNA por medio de los nucleótidos complementarios, que es reconocido por una endonucleasa que corta el mRNA dejando expuesto el 3' OH del U a ser eliminado; el o los U son removidos por una exonucleasa que corta en su extremo 5', por último una ligasa une los dos fragmentos del mRNA.

El gRNA es complementario a algunas zonas del mRNA y posee una cola de poliU para estabilizar el complejo. Aquellas zonas del mRNA que no se aparean con el gRNA son reconocidas por la maquinaria de edición, que en caso de eliminación de U incluye una endonucleasa, una exonucleasa U-específica y una ligasa. El mecanismo es esquematizado en la figura 29.B.

La modificación del transcrito de *NaTrxh* no coincide con los reportes de edición de RNA en otros organismos, a pesar de ello no podemos descartar que la modificación exista en *N. alata*.

Una posible explicación al mecanismo es que, al igual que en las demás angiospermas, la C que se va a eliminar se convierta a U en un primer evento y posteriormente se elimine. Esto implicaría que los dos procesos de modificación pudieran actuar en un mismo sitio en el mRNA de *NaTrxh*.

Ávila-Castañeda *et al.* (2014) reportaron que NaTrxh es una proteína de secreción que alcanza el espacio extracelular a través del RE y el Aparato de Golgi. Muchas proteínas secretadas a través de esta vía llegan al RE gracias a su péptido señal hidrofóbico y se traducen en ribosomas asociados a dicho organelo (Walter *et al.*, 1981). Por lo tanto, es probable que si ocurre la modificación del mensajero de *NaTrxh* suceda antes de su llegada al RE, en el citosol o quizás en el núcleo. Aunque cabe señalar que en plantas no se ha reportado la edición de RNA en citoplasma o núcleo, solamente en mitocondrias y cloroplastos y como un proceso postranscripcional (Takenaka *et al.*, 2013).

Por otro lado, esta modificación es de gran importancia ya que genera diferencias en el C-terminal de NaTrxh, justo en la zona que se identificó anteriormente como dominio de unión con la S-RNasa (Ávila-Castañeda *et al.*, 2014). Ello indicaría que esta interacción puede afectarse por la ausencia de los aminoácidos en la proteína NaTrxh de las demás especies.

### 8.3 NaTrxh regula la actividad de ribonucleasa de la S-RNasa.

Además de ser la determinante de especificidad femenina en el mecanismo de AI en *Nicotiana*, y de participar en el reconocimiento polen-pistilo, la S-RNasa, como su nombre lo indica, tiene actividad de ribonucleasa. Ya se ha demostrado que esta proteína se encarga de degradar el RNA del tubo polínico en una crusa incompatible, lo cual conduce a su muerte y por lo tanto no hay fecundación (McClure *et al.*, 1990).

En un trabajo previo, Juárez-Díaz *et al.* (2006) demostraron que la NaTrxh se localiza en la matriz extracelular del tejido de transmisión estilar, sitio en donde también se encuentra la S-RNasa y otras proteínas provenientes del pistilo que están involucradas en el mecanismo del rechazo del polen en *Nicotiana*; además, demostraron mediante cromatografía de afinidad que NaTrxh puede interaccionar con la S-RNasa. Estos antecedentes indican que NaTrxh también podría participar en el mecanismo de AI. Otro aspecto importante a considerar es que, además de la interacción, la S-RNasa es un sustrato de NaTrxh (Juárez-Díaz *et al.*, 2006).

Tanto la S-RNasa como la NaTrxh que se encuentran en la matriz extracelular provienen de las células del tejido de transmisión del estilo; una vez presentes en la matriz celular, la S-RNasa ingresa a los tubos polínicos aunque, aún se desconoce cuál es el destino de la NaTrxh durante las polinizaciones; considerando lo anterior, existe la posibilidad de que la NaTrxh actúe sobre la S-RNasa en las células del pistilo antes de ser secretada, o bien que ingrese a los tubos polínicos y actúe ahí dentro.

En el ensayo de reducción *in vitro*, NaTrxh toma los electrones de una NTR recombinante de *E. coli* y reduce a la S-RNasa en presencia de NADPH. En *N. alata* no se ha reportado la presencia de una enzima NTR en pistilo, polen o tubo polínico; sin embargo, es muy probable que esta exista en cualquiera de estos dos tipos celulares, ya que ambos son sitios potenciales en los que NaTrxh podría reducir a la S-RNasa.



McClure *et al.* (1989) cuantificaron la actividad de ribonucleasa de varias S-RNAsas de *N. alata* y observaron que los valores de actividad oscilaban entre los 170 y 200 A<sub>260</sub> unidades min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, mientras que otras RNAsas de la familia T2 tenían actividades superiores. Estas diferencias las atribuyeron a la estabilidad de las diferentes RNAsas bajo las condiciones de purificación utilizadas. Sin embargo, Ida *et al.* (2001), resolvieron por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de la SF11-RNasa de *N. alata* y encontraron que su sitio activo tiene sustituciones en algunos residuos esenciales al compararla con otra RNasa de la familia T2 (RNasa Rh de hongos), ello podría explicar porque las S-RNAsas tienen actividades más bajas.

De acuerdo a los ensayos de actividad de ribonucleasa de la S<sub>A2</sub>-RNasa, también presenta valores de actividad bajos, pero cuando esta es reducida por la NaTrxh aumenta su capacidad de degradación de RNA, lo cual no ocurre cuando es reducida con otros agentes reductores como el DTT. Esto podría deberse a que la reducción con NaTrxh ocurre en sitios específicos de la S<sub>A2</sub>-RNasa.

Las S-RNAsas contienen en su estructura 9 aminoácidos Cys, 8 de los cuáles se encuentran formando 4 puentes disulfuro (Oxley y Bacic, 1996; Ida *et al.*, 2001); es muy probable que la NaTrxh rompa solamente algunos de los puentes disulfuro y la reducción específica podría generar una estructura distinta de la S<sub>A2</sub>-RNasa que le permita ser más activa para degradar el RNA. Por otra parte, el DTT podría estar reduciendo todos o la mayoría de los puentes disulfuro de la S<sub>A2</sub>-RNasa, de tal manera que desnaturalizaría a la proteína, inhibiendo por completo su actividad de ribonucleasa. Ello indicaría que la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh es necesaria para alcanzar un nivel de actividad que le permita degradar con mayor rapidez el RNA del tubo polínico.

Lo anterior refuerza la idea de que *NaTrxh* podría ser un gen involucrado en el mecanismo de AI, y que a través de la reducción regula positivamente la actividad de la S-RNasa cuyo papel es fundamental en el mecanismo de rechazo del polen.

Por otro lado, Ávila-Castañeda *et al.* (2015) definieron el motivo de unión de la NaTrxh con la S-RNasa que comprende 17 aminoácidos hacia el extremo C-terminal. Aún se desconoce si la interacción entre ambas proteínas a través de este dominio es necesaria para que se lleve a cabo la reducción. Para responder a lo anterior será necesario realizar ensayos de reducción de la S-RNasa con la mutante de NaTrxh en dicho dominio.

En el presente estudio también se mostró que NaTrxh de otras especies AI presenta diferencias en su extremo C-terminal que es más corto respecto al de *N. alata*; ello deja abierta la interrogación de si aún a través de esta región, ambas proteínas pueden interaccionar y consecuentemente, NaTrxh pueda reducir a la S-RNasa.

#### **8.4 Posible participación de NaTrxh en el sistema de AI de *Nicotiana*.**

Las S-RNasas se expresan abundantemente en el tejido de transmisión estilar e ingresan al tubo polínico (Goldraij *et al.*, 2006), ahí dentro pueden ser citotóxicas si no son reguladas adecuadamente.

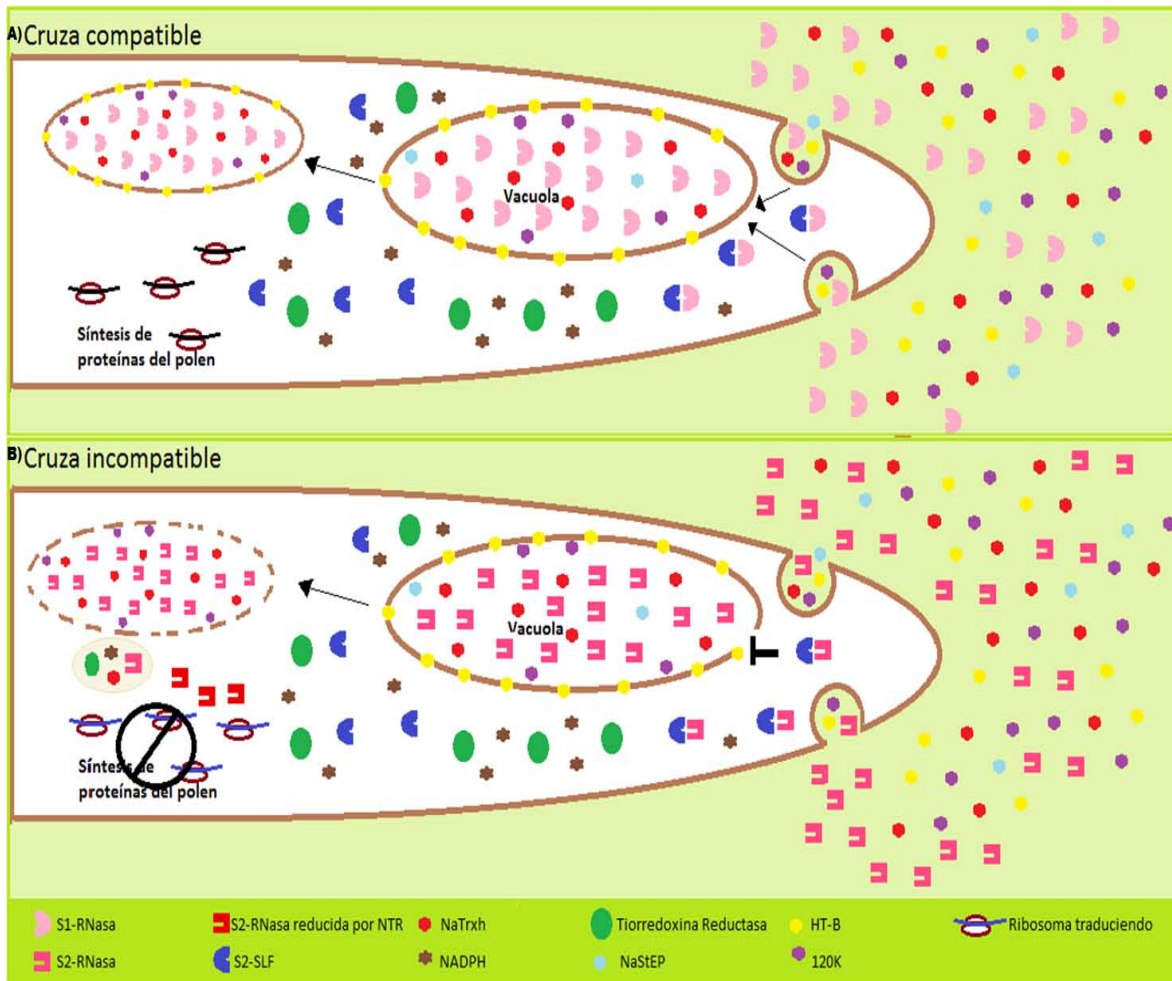
El hecho de que la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh tenga un efecto positivo sobre su actividad de ribonucleasa es de gran importancia porque esta capacidad de degradar RNA es esencial para que se lleve a cabo la inhibición del crecimiento del tubo polínico en las cruzas incompatibles. Lo anterior significaría que la participación de NaTrxh también es esencial en dicho mecanismo y solo cuando la S-RNasa es modificada por NaTrxh podría alcanzar un nivel de actividad tal que degradaría todo el RNA del tubo polínico y así ocasionar su muerte.

De acuerdo a las observaciones anteriores se propone un modelo acerca de la participación de NaTrxh en el mecanismo de AI. En primer lugar, la S-RNasa junto HT-B, 120K y NaStEP y NaTrxh son secretadas por las células del tejido de transmisión y se encuentran en la matriz extracelular por donde van creciendo los tubos polínicos. Al igual que la S-RNasa y HT-B, 120K y NaStEP, NaTrxh ingresa al tubo polínico; las S-RNasas se almacenan en una vacuola, y de la misma manera

lo haría NaTrxh; HT-B se sitúa en la membrana vacuolar. Una pequeña porción de S-RNasas permanece en el citoplasma e interactúa con SLF; en este punto la función de las S-RNasas sería únicamente el reconocimiento con la determinante femenina.

Cuando la interacción es AC, las S-RNasas, NaTrxh junto con HT-B, 120K y NaStEP permanecen secuestradas en la vacuola debido a que la proteína HT-B es degradada, posiblemente por una proteína del polen. En contraste, cuando la interacción es AI, la proteína que degrada a HT-B podría estar siendo inhibida, ello provoca la desestabilización y ruptura de la vacuola y consecuentemente, la liberación de su contenido.

Es muy probable que la reducción de la S-RNasa por NaTrxh ocurra después del rompimiento de la vacuola cuando ambas proteínas se encuentran en el citoplasma del tubo polínico que es un lugar rico en NADPH y en donde es más probable que exista una NTR (Florencio *et al.*, 1988). Las S-RNasas reducidas aumentan su actividad de ribonucleasa y se dirigen hacia su sustrato, el rRNA del tubo polínico; esto finalmente conllevaría a la inhibición de la síntesis de proteínas y como consecuencia a la muerte del tubo polínico (Figura 30).



**Figura 30.** Posible participación de NaTrxh en el mecanismo de AI gametofítica dependiente de S-RNasas. Las S-RNasas, la NaTrxh y otros GM estilares que se encuentran en la matriz extracelular del tejido de transmisión ingresan al tubo polínico por endocitosis y se van almacenando progresivamente dentro de vacuolas. Algunas S-RNasas pueden liberarse del sistema endomembranoso en donde interactúan con SLF. **A)** En una cruce compatible, las S-RNasas y NaTrxh permanecen dentro de la vacuola. **B)** En una cruce incompatible, hay ruptura de la vacuola, la liberación de las S-RNasas y de NaTrxh permite su interacción en el citosol donde también ocurre la reducción de la S-RNasa, ello conlleva a un aumento en la actividad de ribonucleasa para degradar el rRNA del tubo polínico.

Un aspecto importante para reforzar la hipótesis anterior es observar la localización de NaTrxh durante el crecimiento del tubo polínico por el estilo; en primer lugar conocer si entra o no a los tubos polínicos y si lo hace, saber cuál es su destino dentro de éste.

Por otro lado, a pesar de que ya se conoce que un efecto de la reducción de la S-RNasa por la NaTrxh radica en aumentar su actividad de ribonucleasa, es posible que el cambio en el estado redox de la S-RNasa también tenga otros efectos.

En su estructura, las S-RNasas poseen cinco regiones altamente conservadas y dos regiones hipervariables, estas últimas interaccionan con la determinante masculina SLF y son quienes discriminan el polen (Oxley y Bacic, 1996; Parry *et al.*, 1998; Ida *et al.*, 2001). La presencia de estas regiones en la superficie de la molécula depende de la estructura terciaria de la S-RNasa, la que a su vez está determinada en gran medida por sus puentes disulfuro (Parry *et al.*, 1998). Lo anterior implica que la reducción de la S-RNasa, además de afectar su actividad catalítica, también podría repercutir sobre su interacción con la determinante masculina.

Trabajos previos demuestran que la S-RNasa forma complejos con proteínas estilares con dominios ricos en cisteínas, como 120K (Cruz-García *et al.*, 2005); dichos complejos podrían generarse a través de puentes disulfuro intermoleculares, ya que la mayoría de las S-RNasas contienen al menos un residuo Cys libre (Oxley y Bacic, 1996; Parry *et al.*, 1998). Por otro lado, existe también la posibilidad de que los sulfhidrilos permitan la formación de homodímeros; aunque para ello sería necesario un cambio en la conformación de la proteína, ya que la Cys que está libre en las S-RNasas no está expuesta al solvente (Oxley y Bacic, 1996). Estos cambios podrían involucrar la ruptura de algún puente disulfuro; de tal manera que NaTrxh también podría participar en la formación, estabilización o modificación de complejos de la S-RNasa y esto también puede ocurrir dentro o fuera del tubo polínico.

## 9. Conclusiones.

- A pesar de tener un patrón de expresión ubicuo, el transcrito de *NaTrxh* se acumula con niveles más altos en el pistilo, dando sustento a la hipótesis de que *NaTrxh* podría ser uno de los GM involucrados en la respuesta del rechazo alelo S-específico del polen.
- Los ensayos de actividad de la S-RNasa dan evidencia de que cuando esta ribonucleasa es reducida por el sistema NaTrxh/NTR/NADPH, su actividad aumenta de manera considerable, lo que sugiere que la contribución de esta tiorredoxina en la respuesta del rechazo del polen sería potencializar la actividad de la S-RNasa en el citoplasma, lo que incrementaría la velocidad de degradación del RNA en el tubo polínico.

## 10. Perspectivas.

- Determinar con precisión el motivo de interacción en NaTrxh con la S-RNasa
- Determinar si el extremo carboxilo terminal de NaTrxh es esencial en la reducción de la S-RNasa.
- Confirmar si NaTrxh ingresa a los tubos polínicos durante la polinización.
- Confirmar mediante ensayos de pérdida de función en plantas transgénicas de *Nicotiana*, si NaTrxh participa en el mecanismo del rechazo del polen en *Nicotiana*.
- Evaluar si NaTrxh forma parte de los complejos 120K-S-RNasa-NaTTS y si contribuye a su rompimiento.

## 11. Bibliografía.

- Alkhalifioui F., Renard M., Frenedo P., Keichinger C., Meyer Y., Gelhaye E., Hirasawa M., Knaff D.B., Ritzenthaler C. y Montrichard F. (2008) A novel type of thioredoxins dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol.* **148**: 424–435.
- Anderson M. A., Cornis E. C., Goeffrey I., Bernatzky R., Altkinson A., Orpin T., Dedman H., Tregear G., Fernley R. y Clarke A. E. (1989) Sequence variability of three alleles of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell.* **1**: 483-491.
- Arsova B., Hoja U., Wimmelbacher M., Greiner E., Ustün S., Melzer M., Petersen K., Lein W. y Börnke F. (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell.* **22**: 1498–1515.
- Ávila-Castañeda A., Juárez-Díaz J. A., Bravo-Alberto C. E., Ibarra Sánchez C., Zavala-Castillo A., Cruz-González Y., Martínez-Castilla L., Márquez-Guzmán J. y Cruz-García F. (2014) A novel motif in the NaTrxh N-terminus promotes its secretion, whereas the C-terminus participates in its interaction with S-RNase *in vitro*. *BMC Plant Biol.* **14**:147.
- Baumann U. y Juttner J. (2002) Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. *Cell Mol Life Sci.* **59**:1042–1057.
- Blake C. C. (1985) Exons and the evolution of proteins. *Int Rev Cytol.* **93**: 149-185.
- Brown J. S. W. (1986) A catalogue of splice junction and putative branch point sequences from plant introns. *Nuc Ac Res.* **14**: 9549-9559.
- Chase M. W., Knapp S., Cox A. V., Clarckson J. J., Butsko Y., Joseph J., Savolainen V. y Parokonny A. S. (2003) Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann Bot.* **92**: 107-127.
- Collin V., Issakidis-Bourguet E., Marchand C., Hirasawa M., Lancelin J. M. y Knaff D. B. (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem.* **278**: 23747–23752.
- Gelhaye E., Rouhier N., Laurent P., Sautiere P. E., Martin F. y Jacquot J. P. (2002) Isolation and characterization of an extended thioredoxin *h* from poplar. *Physiol Plant.* **114**: 165–171.
- Gelhaye E., Rouhier N., Gérard J., Jolivet Y., Gualberto J., Navrot N. y (2004a) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101**: 14545–14550.
- Gelhaye E., Rouhier N. y Jacquot J. P. (2004b) The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol Biochem.* **42**: 265-271.



- Gott J. M. y Emeson R. B. (2000) Functions and mechanisms of RNA editing. *Annu Rev Genet.* **34**: 499-531.
- Guénin S., Mauriat M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C. y Gutierrez L. (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *J Exp Bot.* **60**: 487-493.
- Hancock C. N., Kent L. y McClure B. A. (2005) The 120kDa glycoprotein is required for S-specific pollen rejection in *Nicotiana*. *Plant J.* **43**: 716–723.
- Harikrishna K., Jampates-Beale R., Milligan S and Gasser C. S. (1996) An endochitinase gene expressed at high levels in the stylar transmitting tissue of tomatoes. *Plant Mol Biol.* **30**: 899–911.
- Hervé L. H., Nott A. y Moore M. J. (2003) How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci.* **28**: 215-220.
- Hua Z. H. y Kao T. H. (2006) Identification and characterization of components of a putative *Petunia* S-locus F-box containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. *Plant Cell.* **18**: 2531–2553.
- Huggett J., Dheda K., Bustin S. y Zumla A. (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* **6**: 279-284.
- Huggett J., y Bustin S. (2011) Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. *Accred Qual Assur.* **16**: 399-405.
- Hurles M. (2004) Gene duplication: The genomic trade in spare parts. *PLoS Biol.* **2**: 900-904.
- Ida K., Norioka S., Yamamoto M., Kumasaka T., Yamashita E., Newbigin E., Clarke A. E., Sakiyama F., Sato M. (2001) The 1.55Å resolution structure of *Nicotiana alata* SF11-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. *J Mol Biol.* **314**: 103-112.
- Ishiwatari Y., Honda C., Kawashima I., Nakamura S., Hirano H., Mori S., Fujiwara T., Hayashi H. y Chino M. (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta.* **195**: 456-463.
- Juárez-Díaz J. A., McClure B., Vázquez-Santana S., Guevara-García A., Leon-Mejía P., Márquez Guzmán J. y Cruz-García F. (2006) A novel thioredoxin *h* is secreted in *Nicotiana alata* and reduces S-RNase *in vitro*. *J Biol Chem.* **281**: 3418-3424.
- Jiménez-Durán K., McClure B., García-Campusano F., Rodríguez-Sotres R., Cisneros J., Busot J., Cruz-García F. (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol.* **161**: 97-107.

- Lai Z., Ma W. y Han B. (2002) An F-box gene linked to the self incompatibility (S) locus of *Antirrhinum* is expressed specifically in pollen and tapetum. *Plant Mol Biol.* **50**: 29–42.
- Laloi C., Rayapuram N., Chartier Y., Grienenberger J. M., Bonnard G. y Meyer Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **98**: 14144-14149.
- Lee C. B., Swatek K. N. y McClure B. (2008) Pollen proteins bind to the C-terminal domain of *Nicotiana alata* pistil arabinogalactan proteins. *J Biol Chem.* **40**: 26965-26973.
- Lim K. Y., Kovarik A., Matyasek R., Chase M. W., Knapp S., McCarthy E., Clarkson J. J. y Leitch A. R. (2006) Comparative genomics and repetitive sequence divergence in the species of diploid *Nicotiana* section *Alatae*. *Plant J.* **48**: 907-919.
- Livak K. J. y Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* **25**: 402-408.
- McClure B. A., Cruz-García F. y Romero C. (2011) Compatibility and incompatibility in S-RNase-based systems. *Ann Bot.* **108**: 647-658.
- McClure B. A., Gray J. E., Anderson M. A. y Clarke A. E. (1990) Self-incompatibility in *Nicotiana alata* involves degradation of pollen rRNA. *Nature.* **347**: 757–760.
- McClure B. A., Mou B., Canevascini S. y 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. A., Haring V. y Ebert P. R. (1989) Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana alata* are ribonucleases. *Nature.* **342**: 955–957.
- Meyer Y., Verdoucq L. y Vignols F. (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends Plant Sci.* **4**:388-394.
- Meyer Y., Vignols F. y Reichheld J. P. (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**: 394–402.
- deNettancourt D. (1977) Incompatibility in angiosperms. Monographs on theoretical and applied genetics. Springer-Verlag. USA.
- Okuda K., Nakamura T., Sugita M., Shimizu T. y Shikanai T. (2006) A pentatricopeptide repeat protein is a site recognition factor in chloroplast RNA editing. *J Biol Chem.* **218**: 377661-377667.
- Oxley D. y Bacic A. (1996) Disulphide bondin in a stylar self-incompatibility ribonuclease of *Nicotiana alata*. *Eur J Biochem.* **242**: 75-80.

- Parry S., Newbigin E., Craik D., Nakamura K. T., Bacic A. y Oxley D. (1998) Structural analysis and molecular model of self-incompatibility RNase from wild tomato. *Plant Physiol.* **116**: 463-469.
- Serrato A.J. y Cejudo F.J. (2003) Type-*h* thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta.* **217**: 392–399.
- Shi J. y Bhattacharyya M. K. (1996) A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Mol Biol.***32**: 653–662.
- Sijacic P., Wang X., Skirpan A. L., Wagn Y., Dowd P. E., McCubbin A. G., Huang A. y Kao T. H. (2004) Identification of the pollen determinant of S-RNase self-incompatibility. *Nature.* **429**: 302-305.
- Reichheld J. P., Mestres-Ortega D., Laloi C. y Meyer Y. (2002) The multigenic family of thioredoxin in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiol Biochem.* **40**: 685-690.
- Shikanai T. (2014) RNA editing in plants: Machinery and flexibility of site recognition. *Biochem Biophys Act.* **1847**: 799-785.
- Stein J. C. y Nasrallah. (1993) A plant receptor-like gene, the S-locus receptor kinase or *Brassica oleracea* L., encodes a functional serine/threonine kinase. *Plant Physiol.* **101**: 1103-1106.
- Takenaka M., Zehermann A., Härtel B., Kugelmann M., Verbitskiy D. y Brennicke A. (2012) MORF family proteins are required for RNA editing in mitochondria and plastids of plants. *Proc Natl Acad Sci USA.* **109**: 104-109.
- Takenaka M., Zehermann A., Verbitskiy D., Härtel B. y Brennicke A. (2013) RNA editing in plants and its evolution. *Annu Rev Genet.* **47**: 335-352.
- Tefvik D. (2006) Real-time PCR. New York. Taylor & Francis.
- Walter P., Ibrahimi I. y Blobel G. (1981) Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum . I. Signal recognition protein (SRP) binds to in-vitro-assembled polysomes synthesizing secretory protein. *J Cell Biol.* **91**: 545-550.
- Wong J.H., Kim Y.B., Ren P.H., Cai N., Cho M.J., Hedden P., Lemaux P.G. y Buchanan B.B. (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**: 16325–16330.
- Yenerall P. y Zhou L. (2012) Identifying the mechanisms of intrón gain: progress and trends. *Biol Direct.* **7**: 29-39.
- Zhiguo E., Wang L. y Zhou J. (2013) Splicing and alternative splicing in rice and humans. *BMN Rep.* **46**: 439-447.