

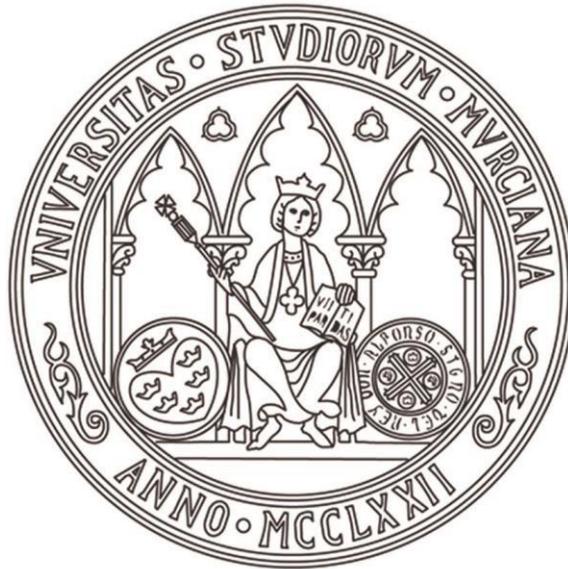


UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Tiorredoxina o1 Mitocondrial y Nuclear:
Implicación en Autofagia, Señalización Hormonal y en
Persulfuración bajo Estrés Salino

D.^a Sabrina Analía De Brasi Velasco

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Tiorredoxina o1 Mitocondrial y Nuclear:
Implicación en Autofagia, Señalización Hormonal y en Persulfuración
bajo Estrés Salino

Autor: D.^a Sabrina Analía De Brasi Velasco

Director/es: Dra. Ana María Jiménez Hurtado

Dra. Francisca Sevilla Valenzuela



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

Dña. Sabrina Analía De Brasi Velasco

doctoranda del Programa de Doctorado en

Biología Vegetal

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

**Tiorredoxina α 1 Mitocondrial y Nuclear:
Implicación en Autofagia, Señalización Hormonal y en Persulfuración bajo Estrés Salino**

y dirigida por,

Dra. Ana María Jiménez Hurtado

Dra. Francisca Sevilla Valenzuela

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 4 de Julio de 2023.

Fdo.: Firmado por DE BRASI VELASCO SABRINA ANALIA - 77136031B el día 04/07/2023 con un certificado emitido por AC FNMT

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

**“Tiorredoxina *o*1 Mitocondrial y Nuclear:
Implicación en Autofagia, Señalización Hormonal y en
Persulfuración bajo Estrés Salino”**

Memoria presentada para aspirar al
Grado de Doctor por la Universidad de Murcia

Sabrina Analía De Brasi Velasco

Directoras:

Dra. Ana María Jiménez Hurtado

Dra. Francisca Sevilla Valenzuela

RESUMEN

Las tiorredoxinas (TRXs) son proteínas de bajo peso molecular (en torno a los 12-14 kDa), presentes tanto en animales como en vegetales, bacterias y levaduras, que tienen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis redox celular. Estas enzimas se caracterizan por presentar un sitio activo conservado (WCGCP) compuesto por dos residuos de cisteína (C; Cys), a través del cual regulan la estructura y función de sus proteínas diana específicas mediante reducción de residuos de Cys oxidados en puentes disulfuro. Las diferentes isoformas de las TRXs pueden encontrarse en distintos compartimentos celulares. Concretamente, la TRX_{o1}, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, presenta una localización dual, hallándose tanto en mitocondrias como en núcleo.

La presente Tesis Doctoral, utilizando como modelos de estudio suspensiones de células de tabaco BY-2 (TBY-2, *Tobacco Bright Yellow-2*), plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia (*A. thaliana* Col-0) y plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Bonnevillie), analiza la implicación de la proteína redox TRX_{o1} en la regulación de nuevas dianas proteicas como son la proteína ATG4 (*Autophagy related protein 4*), clave en el proceso de autofagia celular, así como el receptor de la fitohormona ABA, PYR1 (*Pyrabactin Resistance 1*). Además, se estudia la participación de AtTRX_{o1} en procesos de persulfuración proteica, modificación postraduccional sobre residuos de Cys, en plantas mutantes *knock out* (KO) y sobreexpresantes (OEX) *Attrxo1* crecidas bajo condiciones de estrés salino. Por otro lado, se han obtenido dobles mutantes de Tiorredoxina Reductasa B (NTRB) y de TRX_{o1} *Psntrb/trxo1* por la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) y de *Attrxo1/ntrb* por cruzamiento de mutantes sencillos.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Ana María Jiménez Hurtado, Investigadora Científica del CSIC en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del CEBAS, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "TIORREDOXINA o1 MITOCONDRIAL Y NUCLEAR: IMPLICACIÓN EN AUTOFAGIA, SEÑALIZACIÓN HORMONAL Y EN PERSULFURACIÓN BAJO ESTRÉS SALINO", realizada por D^a. SABRINA ANALÍA DE BRASI VELASCO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de Junio de 2023

Ana

Firmado digitalmente por Ana
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=Ana, o=CEBAS-CSIC, ou,
email=ajimenez@cebas.csic.es,
C=<n
Fecha: 2023.06.08 10:10:31
+02'00'



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Francisca Sevilla Valenzuela, Profesora de Investigación del CSIC en el Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del CEBAS, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "TIORREDOXINA α 1 MITOCONDRIAL Y NUCLEAR: IMPLICACIÓN EN AUTOFAGIA, SEÑALIZACIÓN HORMONAL Y EN PERSULFURACIÓN BAJO ESTRÉS SALINO", realizada por D^a. SABRINA ANALÍA DE BRASI VELASCO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 8 de Junio de 2023

SEVILLA
VALENZUELA
FRANCISCA
GERTRUDIS - DNI
45265703R

Firmado digitalmente por SEVILLA VALENZUELA FRANCISCA GERTRUDIS - DNI 45265703R
Nombre de reconocimiento (DN): cn=SE, o=CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=CENTRO DE DEMOLOGIA Y SIGUIVA APLICADA DEL SIGUIVA, ou=45265703, serialNumber=CCES-45265703R, sn=SEVILLA VALENZUELA, givenName=FRANCISCA GERTRUDIS, c=SEVILLA VALENZUELA FRANCISCA GERTRUDIS - DNI 45265703R
Fecha: 2023.06.08 10:44:44 +02'00'

Los trabajos de investigación recogidos por la presente Memoria han sido financiados por los siguientes proyectos:

- **Avances en el papel de tiorredoxina TRXo1 en la regulación de proteínas diana en estrés salino: señalización por ABA, persulfuración y ciclos de luz/oscuridad.**
Entidad financiadora: Fundación Séneca (22051/PI/22)
IP: Dra. Ana Jiménez

- **Regulación redox por tiorredoxina (Trxo1) en plantas: implicación en ciclo celular, señalización hormonal y estrés salino.**
Entidad financiadora: MINECO/FEDER (Ref. BFU2017-86585-P).
IP: Dra. Ana Jiménez Hurtado – Dra. Francisca Sevilla Valenzuela.

- **Regulación redox mediada por tiorredoxina: en busca de sus dianas en procesos relacionados con estrés abiótico.**
Entidad financiadora: MICINN-FEDER (Ref. PID2021-127335NB-I00)
IP: Dra. Ana Jiménez Hurtado –Dra. Francisca Sevilla Valenzuela.

- **Functional analysis of antioxidant and redox systems in the abiotic stress tolerance of cultivated plants: new perspectives for their agronomical applications and their potential human health benefits.**
Entidad financiadora: Fundación Séneca. AYUDAS A LOS GRUPOS Y UNIDADES DE EXCELENCIA CIENTÍFICA DE LA REGIÓN DE MURCIA (19876/GERM/15)
IP: Dra. Francisca Sevilla Valenzuela –Dra. María Ángeles Pedreño García.

- **Señalización redox y regulación post-traducciona l en el desarrollo y respuesta a estrés de las plantas (*Redox signalling and post-translational regulation in plant development and responses to stress*)**
Entidad financiadora: Redes de Excelencia/RETOS MICINN (Ref. RED2018-102397-T)
IP: Dra. Luisa M^a Sandalio.

- **TRANSAUTOPHAGY: European Network of Multidisciplinary Research and Translation of Autophagy knowledge**
Entidad financiadora: Unión Europea (Ref: OC-2015-1-19840) Transautophagy COST n° CA15138
IP: Dra. Caty Casas Louzao.

La firmante del presente trabajo de Tesis ha disfrutado de un contrato predoctoral (PRE2018-084806) del Programa de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Agencia Estatal de Investigación).

Esta Tesis Doctoral ha dado lugar las siguientes publicaciones:

- **DE BRASI-VELASCO S.***, SÁNCHEZ-GUERRERO A.*, CASTILLO M.C., VERTOMMEN D., LEÓN J., SEVILLA F., JIMÉNEZ A. (2023). *Thioredoxin TRXo1 is involved in ABA perception via PYR1 redox regulation*. **Redox Biology**, 63, 102750. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102750> (SCI: 10,787; Q1)

- **DE BRASI-VELASCO S.***, LÓPEZ-VIDAL O.*, MARTÍ M.C., JIMÉNEZ A., SEVILLA F. (2021). *Redox regulation of autophagy by thioredoxin o1 and its involvement in tobacco BY-2 cell viability under oxidative conditions*. Part of special issue: ABSTRACTS of SFRR-INTERNATIONAL 2021 VIRTUAL MEETING. **Free Radical Biology and Medicine**, 165, Supplement 1, 57. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.426> (SCI: 8,101; Q1).

- **DE BRASI-VELASCO S.***, LÓPEZ-VIDAL O.*, MARTÍ, M.C., ORTIZ-ESPÍN A., SEVILLA F., JIMÉNEZ A. (2021). *Autophagy is involved in the viability of overexpressing thioredoxin o1 tobacco BY-2 cells under oxidative conditions*. **Antioxidants**, 10, 1884. <https://doi.org/10.3390/antiox10121884> (SCI: 7,675; Q1).

- SÁNCHEZ-GUERRERO A., NADAL M., FLOREZ-SARASA I., RIBAS-CARBÓ M., VALLARINO J.G., **DE BRASI-VELASCO S.**, FERNIE A.R., FLEXAS J, JIMÉNEZ A, SEVILLA F. (2021). *Decreased levels of thioredoxin o1 influences stomatal development and aperture but not photosynthesis under non-stress and saline conditions*. **International Journal of Molecular Sciences**, 22, 1063. <https://doi.org/10.3390/ijms22031063> (SCI: 6,202; Q1).

Los resultados obtenidos de este trabajo de investigación han sido presentados en los siguientes Congresos:

- Póster en el Plant Biology 2023: XVIII Spanish-Portuguese Congress on Plant Biology: **“Thioredoxin (TRXo1): a new player in ABA signaling through redox regulation of PYR1”** De Brasi-Velasco, S.A.; Sánchez-Guerrero, A.; Castillo, M.C.; Vertommen, D.; León, J.; Jiménez, A.; Sevilla, F. (Braga, Portugal. Fecha: 9-12 de Julio de 2023).
- Seminario del Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC): **“Papel de la Tiorredoxina o1 (TRXo1) en la autofagia inducida por estrés oxidativo en células TBY-2”** (Murcia, España. Fecha: 30 de Mayo de 2023).
- Póster en el XVI Simposio de Fitohormonas: Metabolismo y Modo de Acción, organizado por la Sociedad Española de Biología de Plantas: **“Thioredoxin (TRXo1) is involved in ABA perception via PYR1 redox regulation in Arabidopsis”**. De Brasi-Velasco, S.A.; Sánchez-Guerrero, A.; Castillo, M.C.; Vertommen, D.; León, J.; Sevilla, F.; Jiménez, A. (Segovia, España. Fecha: 19-21 de Abril de 2023).
- Comunicación oral en las VII Jornadas doctorales EIDUM-EINDOC-CMN: **“Participación de la autofagia en la viabilidad de células TBY-2 sobreexpresantes de TRXo1 bajo estrés oxidativo”** (*On line*. Fecha: 05/07/22).
- Póster en la XIII Geirli Meeting: **“The ABA receptor PYR1 is a target of redox regulation by thioredoxin o1 in the plant nucleus”**. De Brasi-Velasco, S.A., Sánchez-Guerrero, A., Castillo, M.C., Martí, M.C.; León, J.; Sevilla, F.; Jiménez, A. (Sevilla, España. Fecha: 20-22 de Julio de 2022).
- Comunicación oral en la Reunión Red de Excelencia POST-REDOX: **“Autofagia y Tiorredoxina o1 (TRXo1): Implicación en la viabilidad de células TBY-2 sometidas a estrés por H₂O₂”** (Salobreña, España. Fecha: 25/05/22).
- Comunicación oral en el Environment Workshop Understanding Plant Responses to Climate Change: Redox-Based Strategies: **“Characterization of Arabidopsis thaliana thioredoxin o1 mutants in germination and stomatal response under salt stress”** (Baeza, España. Fecha: 20-22 de Septiembre de 2021).
- Comunicación oral en el 20th Biennial Meeting of SFRR International: **“Redox regulation of autophagy by thioredoxin o1 and its involvement in tobacco BY-2 cell viability under oxidative conditions”** (*On line*. Fecha: 15-18 de Marzo de 2021).

Durante el período de formación, se ha disfrutado de las siguientes estancias:

- Visita al Grupo del Dr. José León "El Óxido Nítrico y las Hormonas en la Interacción Estrés-Desarrollo" del Departamento de Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas del IBMCP-UPV-CSIC de Valencia (Fecha: 21/11/2022-30/11/2022).

Verificación de los resultados obtenidos en la actividad de PYR1 mediante una medida indirecta a través de un método colorimétrico acoplado a la actividad fosfatasa.

- Estancia Breve en el Grupo del Dr. José León "El Óxido Nítrico y las Hormonas en la Interacción Estrés-Desarrollo" del Departamento de Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas del IBMCP-UPV-CSIC de Valencia (Fecha: 27/06/2022-10/08/2022).

Técnicas aprendidas: mutagénesis dirigida para la obtención de proteínas recombinantes de interés. Transformación de cepas bacterianas para la expresión y purificación mediante Cromatografía de afinidad en columnas de Níquel de proteínas recombinantes de PYR1 *wild type* y mutantes (C30S; C65S; C77S) marcadas con cola de histidina.

- Estancia Breve en el Grupo del Dr. Luis Cañas "Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo" del Departamento Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas, Mecanismos moleculares del desarrollo y la morfogénesis del IBMCP-UPV-CSIC de Valencia (Fecha:12/11/2019-13/12/2019)

Técnicas aprendidas: silenciamiento génico transitorio VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*) en plantas de guisante. Realización de construcciones para VIGS de los genes *PsTRXo1* y *PsNTRB*. Transformación de *E. coli* y *A. tumefaciens*. Inoculación de plantas de guisante con las construcciones para la obtención de un doble mutante *Psntrb/trxo1*.

AGRADECIMIENTOS

El primer ejercicio que se realiza ante una Tesis Doctoral es el de la paciencia...pero la paciencia de l@s que rodean a la/al doctorand@. Por tanto, siempre ha de comenzarse el camino de la despedida con los agradecimientos ante esta prueba de vida que algun@s osamos experimentar. No caben puestos ni rangos para decir Gracias y es una de las lecciones que de estos cuatro años me llevo muy dentro de mí.

A mis padres, Mary y Miguel, que se aventuraron a cambiar de vida radicalmente para que sus hijas pudieran tener un futuro, ni mejor ni peor, sino un futuro. A todos los sacrificios que hicieron para que siempre nos formásemos mi hermana y yo, siendo la educación la portadora de todas las herramientas para que pudiésemos labrar nuestra vida de la mejor manera que creyéramos para nosotras mismas.

A mi hermana Andrea, por su infinita paciencia que siempre me enseña a ver la vida desde otra perspectiva, desde la endereza y fortaleza del Ser.

A Timi, por ayudarme a no perderme en estos últimos meses que han sido cuesta arriba, por su cariño, calma y comprensión. Por mostrarme lo que es verdadero y natural. Te quiero! A su familia, por ser ahora también la mía y a Pató que nos despierta cada mañana con su ternura y alegría.

A mis Directoras de Tesis, la Dra. Ana Jiménez Hurtado y la Dra. Francisca Sevilla Valenzuela, por permitirme andar este camino que nos enriquece como seres pensantes para convertirnos en científic@s y observadores de las riquezas que esconde de forma poética y bella la Naturaleza. Por transmitirme la ética del trabajo y compartir conmigo los conocimientos y la recompensa de la ardua labor que se obtiene del trabajo en Equipo y sin las cuales, no hubiese sido posible la presente Tesis Doctoral.

Una mención especial al Dr. Omar López Vidal por su trabajo en autofagia, base fundamental para esta Tesis Doctoral y a la Dra. Ana María Ortiz Espín, que estableció las líneas celulares TBY-2 sobreexpresantes de *PsTRXo1*.

Al Dr. José León por recibirme y formarme en su grupo de investigación en el IBMCP de Valencia, junto a la Dra. Maricruz Castillo, en la mutagénesis dirigida en los residuos de cisteína de PYR1, en la expresión y purificación de proteínas por Cromatografía de afinidad, además de los ensayos de medida indirecta de la actividad de PYR1 por Espectrofotometría.

Al Dr. Luis Cañas por permitirme realizar una estancia breve en su grupo de investigación del IBMCP para aprender la técnica de silenciamiento génico transitorio inducido por virus (VIGS) y a la Dra. Rim Hamza por enseñarme a transformar y trabajar con bacterias, realizar construcciones génicas para obtener un doble mutante *Psntrb/Pstrxo1* y transformar plantas de guisante.

A la Dra. Cecilia Gotor, al Dr. Luis Romero y a la Dra. Ángeles Ároca del Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla, con quienes estamos colaborando en los ensayos de búsqueda de patrones de persulfuración de proteínas en *Arabidopsis thaliana*.

Al Profesor Javier López Jaramillo de la Universidad de Granada, por modelizar la estructura y determinar secuencias peptídicas inmunogénicas de la proteína NtATG4 para desarrollar anticuerpos específicos de *Nicotiana tabacum*.

Al Dr. Didier Vertommen del Servicio de Proteómica del *de Duve Institute* de Bélgica, por los análisis de Espectrometría de Masas para la identificación de los residuos de cisteína de PYR1 afectados tras los tratamientos de óxido-reducción.

A mis antiguos jefes en la EEZ de Granada, la Dra. Mariam Sahrawy Barragán y el Dr. Antonio Serrato Recio, por introducirme en el mundo de las Tiorredoxinas y formarme de forma rigurosa, abriéndome las puertas para continuar creciendo. Mi más sentido respeto y cariño.

A todos mis compañer@s de trabajo en el labo 2.5 del Cebas que en estos cuatro años han compartido conmigo tanto las risas como el estrés y sin los cuales no hubieran sido posibles muchos de los resultados presentados hoy aquí: a Antonio, con el cual coincidí en el final de su Tesis y ahora lo puedo comprender tan bien, por mostrar siempre una cara amable, la nobleza en forma de persona y el iniciador de la línea de investigación con PYR1 en nuestro Grupo de investigación. Mi reconocimiento a Sandra, que se deja la vida en las experiencias, su gran labor en Microscopía, captando las más bellas imágenes y su gran paciencia con todo lo que sean trabajos meticulosos, desde los *peeling de hojas* hasta los infinitos conteos, cuantificaciones, PCR...su gran y valioso trabajo. ¡Gracias! A la Dra. Marí Carmen Martí Ruiz, por sus consejos y explicaciones resolutivas, sobre todo en lo concerniente a genotipado y obtención de mutantes *knock out* de *Arabidopsis thaliana*. A Helena, persona vitamina, que con su sonrisa siempre amenizaba el ambiente y nos recargaba de buena energía; a sus libretas que eran la crónica contada con pelos y señales! A Olga, que de una estancia en nuestro laboratorio, se convirtió en mi amiga, de esas de verdad, que de adultos nos es difícil encontrar, y tanto me ayudó a volver a mí. A Yakelin, que con su alegría y su calma a la par, me aconsejó muy sabiamente y me hizo comprender que todo pasa y que la vida hay que disfrutarla a cada momento porque nunca sabes lo que puede ocurrir...y luego ocurrió el Covid, el aislamiento, la tristeza, la compañía virtual, el desasosiego. A los alumnos de prácticas que tanto nos enseñan con sus perspectivas frescas, libres aún de manías o rutinas, Marc, Miguel, Vanesa, Arsen, Laura, Clara, Alicia y a los cuales les deseo lo mejor. A las nuevas generaciones, Desiré y Raquel, que nos contagian de su juventud, aún a mis “29” años eternos!

A todas aquellas personas que forman parte de la vida de la Segunda planta y que nos sacan un poquito de la tarea solitaria en la que muchas veces estamos inmersos, además de ayudarnos los unos a los otros, práctica vital en nuestro ámbito que no para de evolucionar y especializarse, porque la Ciencia sana comienza desde una base accesible, clara, interdisciplinar y el compañerismo verdadero es clave para que esto se logre: Jesús, que me ha ayudado siempre que lo he necesitado, además de amenizar las tardes en los cruces de pasillos solitarios mientras terminábamos los experimentales infinitos. A Irene, con la cuál nos hemos puesto a dieta de adelgace y engorde mil veces, tentadas entre comida saludable y dulces!! Gracias por siempre sacarme una sonrisa en las jornadas eternas en las que muchas veces a contrareloj, cerrábamos el Cebas. También quiero agradecer a la Dra. Nieves Fernández y al Dr. Enrique Olmos por siempre tenderme una mano. A Irene, que del Cebas, nos reencontramos en Valencia, disfrutando del fin de las jornadas laborales con nuestras cenas en la playa tan revitalizantes como tranquilas. A Puri, Mai y Almudena, que de esas cosas espontáneas de la vida, descubres personas que tienen mucho para aportarte (aunque alguna no

ayude con las bolsas de Mercadona...). A Inma, que me hizo un hueco a su lado estos meses para poder escribir la Tesis y ha descubierto las vistas a las montañas...montañas de libretas y papeles que se reproducen de forma exponencial y a pesar de ello, me deleita con sus creaciones reposteras!! A Cristián, Ángela y Lidia, compañeros de pasillos que siempre llevan una sonrisa acompañada de buenas palabras.

A Puerto, que a pesar de no acabar federadas en pádel, junto a David y Victor, siempre está ahí para lo que haga falta. Gracias!! A Alicia, con la cual, desde que empezamos esta andadura del doctorado, nos hemos acompañado, en lo bueno y en lo malo. A María, Bea e Isa, compañeras en la “nueva” planta llena de vitamina C (con servicio de “zumicos” de pomelo!!)

A Edu, el famoso italiano, que llegó en un momento clave, para darme luz y vida, y con el cual nos transformamos a la par que crecimos para convertirnos en una mejor versión de nosotros mismos. Nunca olvidaré tu paso por aquí. Gracias!!

A Tamara y Lu, tanto compartido desde que comenzamos a gestar nuestra amistad en aquella aula Q22 y no hablemos de años, que ya nos quedan lejanas las tarimas. Y que a pesar de la distancia física, siempre están ahí con su apoyo y presencia de “buenorras en cuerpo y alma”!!

A Lola y Ana Leti, con las cuales la Bioquímica pasó del Voet a la amistad, cultura, viajes, risas y autenticidad. Porque son auténticas, mis “troncas” queridas!!

A Mauri, que me enriquece el alma en cada una de nuestras tertulias. Porque la gente que nos rodea no son casualidad!

A Daniela, Fernanda y Claudia, la internacionalidad es lo nuestro! Han aparecido este año y me han encantado! Además de haber vivido la catarsis conjunta en el más puro sentido.

A la Bioquímica Farmacéutica Vero, que Murcia y la música nos reencontraron! Lo que nos gusta un concierto a ambas y que nunca acaben!!

A la doctoranda Beatriz Gayubas Balaguer del IBMCP, que junto con Maricruz, amenizaban las jornadas con su alegría y complicidad al ritmo de “Despechá”!

A todos los que me hicieron un hueco en sus despachos, buscando la luz del Sol y mesas donde poder expandirme con mis miles de papeles.

A Ludovico Enaudi, por inspirarme siempre con sus creaciones en las tardes en las que los pasillos del Cebas se volvían “clásicos”!

¡Gracias a los que aún están, a los que acaban de llegar y a quienes se fueron! ¡Con tod@s he aprendido! ¡Con tod@s he crecido!

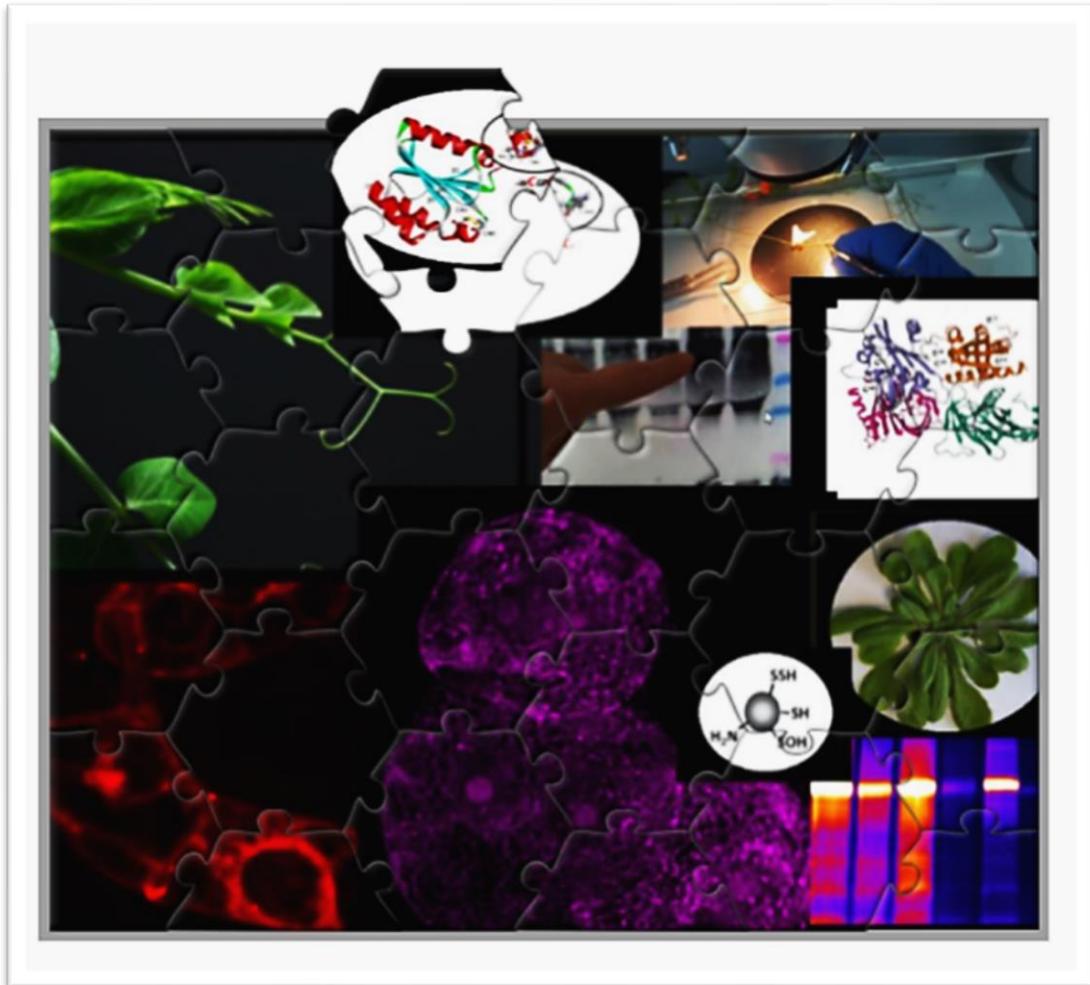
“No podemos resolver nuestros
problemas con el mismo pensamiento con el que los creamos.”

Albert Einstein

A mis padres.

A mi hermana y hermanos del alma.

A Timi.



TESIS DOCTORAL

**“TIORREDOXINA σ 1 MITOCONDRIAL Y NUCLEAR:
IMPLICACIÓN EN AUTOFAGIA, SEÑALIZACIÓN HORMONAL
Y EN PERSULFURACIÓN BAJO ESTRÉS SALINO”**

SABRINA ANALÍA DE BRASI VELASCO

Directoras:

Dra. ANA MARÍA JIMÉNEZ HURTADO

Dra. FRANCISCA SEVILLA VALENZUELA

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	9
1. Estrés abiótico en plantas	11
1.1. Homeostasis de ROS	11
1.2. Homeostasis de H ₂ S	16
2. Estrés oxidativo: modificaciones postraduccionales por ROS y H₂S	18
3. Sistema redox: tiorredoxina	21
3.1. Modo de acción y regeneración	22
3.2. Isoformas de tiorredoxina: localización y función	23
3.3. Nuevas dianas de tiorredoxina	26
3.3.1. ATG4: autofagia	27
3.3.2. PYR1: percepción de ABA	33
3.4. Papel de TRX en persulfuración en condiciones salinas	37
3.5. Obtención de dobles mutantes <i>trxo1/ntrb</i>	40
OBJETIVOS	43
MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. Material vegetal	51
1.1. Células de tabaco BY-2	51
1.1.1. Condiciones de cultivo	51
1.1.2. Comprobación de la transformación de células TBY-2 con <i>PsTRXo1</i>	51
1.1.3. Viabilidad celular	52
1.1.4. Peso fresco	52
1.1.5. Tratamiento con peróxido de hidrógeno	52
1.1.6. Incubación con inhibidores de autofagia	52
1.1.7. Visualización de autolisosomas	53
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> L.	53
1.2.1. Líneas empleadas	53
1.2.2. Cultivo en turba	54
1.2.3. Cultivo <i>in vitro</i>	56
1.2.4. Cierre estomático en respuesta a ABA	57
1.2.5. Obtención de un doble mutante <i>Attrxo1/ntrb</i>	57

1.3. <i>Pisum sativum</i> L.	60
1.3.1. Esterilización y germinación	60
1.3.2. Condiciones de cultivo	61
1.3.3. Transformación por agroinfiltración	61
1.3.4. Decapitación	62
1.3.5. Fenotipado	63
2. Bacterias	63
2.1. <i>Escherichia coli</i>	63
2.1.1. Condiciones de cultivo	63
2.1.2. Cepas empleadas	63
2.1.3. Células quimiocompetentes	64
2.1.3.1. Transformación mediante choque térmico	64
2.1.3.2. Transformación mediante electroporación	64
2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	65
2.2.1. Cepas empleadas	65
2.2.2. Células competentes	65
2.2.3. Transformación por electroporación	65
2.2.4. Transformación por agroinfiltración	66
2.2.4.1. Medio de cultivo para crecimiento	66
2.2.4.2. Medio de cultivo para infiltración	67
3. Genética molecular	68
3.1. ADN	68
3.1.1. Extracción de ADN genómico	68
3.1.2. Extracción de ADN plasmídico	69
3.1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	69
3.1.4. Cuantificación de ADN en solución	70
3.1.5. Manipulación enzimática del ADN	70
3.1.5.1. A <i>tailing</i>	70
3.1.5.2. Digestión	70
3.1.5.3. Ligación	71
3.1.6. Limpieza de muestras de ADN	71
3.1.7. Recuperación de muestras de ADN a partir de geles de agarosa	71
3.1.8. Secuenciación de fragmentos de ADN	72

3.1.9. Alineamiento de secuencias	72
3.2. PCR	73
3.2.1. PCR a punto final	73
3.2.2. PCR de colonia	74
3.2.3. PCR anidada	75
3.3. Obtención de insertos	75
3.3.1. Insertos para VIGS	75
3.3.2. Insertos para obtención de proteínas recombinantes HisAtPYR1 <i>wt</i> , HisAtPYR1C30S, HisAtPYR1C65S, HisAtPYR1C70S	76
3.4. Estrategias de clonación	78
3.4.1. Clonación convencional en pETM11 para purificación de proteínas	78
3.4.2. Clonación para VIGS	79
3.4.3. Conservación de clones en <i>stocks</i> glicerolados	82
3.5. ARN	82
3.5.1. Tratamiento del material	82
3.5.2. Métodos de extracción de ARN	83
3.5.2.1. ARN de células de TBY-2	83
3.5.2.2. ARN de hojas de <i>A. thaliana</i>	83
3.5.2.3. ARN de hojas de <i>P. sativum</i>	83
3.5.3. Cuantificación de ARN en solución	84
3.5.4. Electroforesis de ARN	85
3.5.5. Retrotranscripción	85
3.5.6. PCR cuantitativa a tiempo real	85
3.5.6.1. Expresión génica en células de <i>N. tabacum</i>	87
3.5.6.2. Expresión génica en <i>A. thaliana</i>	88
3.5.6.3. Comprobación del silenciamiento génico en guisante	88
4. Proteómica	89
4.1. Extracción de proteínas	89
4.1.1. Extractos de cultivos celulares de tabaco BY-2	89
4.1.2. Extractos foliares de <i>A. thaliana</i>	89
4.1.3. Extractos foliares enriquecidos en núcleos	90
4.2. Medida de la concentración de proteínas	90
4.2.1. Método de Bradford	90

4.2.2. Método BCA	91
4.2.3. Modificación del método Lowry compatible con detergentes	91
4.3. Técnica de concentración de proteínas	91
4.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes	92
4.4.1. Inducción del cultivo y expresión en <i>E. coli</i>	92
4.4.2. Purificación por Cromatografía de afinidad	92
4.4.3. Eliminación de la cola de histidina	93
4.5. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes: SDS-PAGE	93
4.6. Tinción de proteínas	94
4.6.1. Tinción con azul de Coomassie	94
4.6.2. Tinción con Imperial™	94
4.6.3. Tinción con rojo Ponceau	95
4.7. Técnicas inmunológicas	95
4.7.1. <i>Western blot</i>	96
4.7.1.1. Marcadores de autofagia	97
4.7.1.2. Detección de PYR1	97
4.7.1.2.1. Ensayos redox <i>in vitro</i>	98
4.7.1.2.2. Ensayos redox <i>in vivo</i>	99
4.7.2. Co-inmunoprecipitación	100
4.7.2.1. PsTRXo1/HisHsATG4	100
4.7.2.2. PsTRXo1/HisAtPYR1 y PsTRXo1C37S/HisAtPYR1	101
4.7.3. <i>Dot blot</i>	101
4.7.3.1. Interacción PsTRXo1-HsATG4	102
4.7.3.2. Interacción PsTRXo1-HisAtPYR1 y HisPsTRXo1C37S-HisAtPYR1	102
4.7.4. Inmunolocalización de ATG8	103
4.8. Actividades enzimáticas	103
4.8.1. Ensayo de procesado de ATG4	104
4.8.2. Actividad de PYR1 como inhibidor de fosfatasa	105
4.9. Persulfuración de proteínas de <i>A.thaliana</i>	106
4.9.1. Detección en gel	106
4.9.1.1. Reacción y bloqueo con Cl-NBF	107
4.9.1.2. Marcaje con DAz-2/Cy5	107
4.9.1.3. Electroforesis SDS-PAGE	108
4.9.2. Identificación de proteínas persulfuradas	109

4.9.2.1. Marcaje con DCP-Bio1	109
4.9.2.2. Análisis por Espectrometría de Masas	110
5. Tratamiento estadístico	112
RESULTADOS	113
1. Papel de TRXo1 en la autofagia inducida por estrés oxidativo	115
1.1. Medida de viabilidad y peso fresco en las líneas celulares	115
1.2. Autofagia y viabilidad celular	117
1.3. Marcadores autofágicos en líneas sobreexpresantes	120
1.4. Estructuras autofágicas en líneas sobreexpresantes tras el tratamiento oxidativo	126
1.5. Detección de la proteína ATG8 por inmunofluorescencia	129
1.6. Viabilidad celular y estructuras autofágicas tras 14 horas del tratamiento oxidativo	131
1.7. Interacción <i>in vitro</i> de ATG4 con TRXo1	135
1.8. Regulación redox de la actividad de ATG4	138
1.9. Regulación de la actividad de ATG4 por tiorredoxina o1 <i>in vitro</i>	139
2. Papel de TRXo1 en la percepción de ABA	141
2.1. Tratamiento redox de PYR1 recombinante	141
2.2. Identificación de puentes disulfuro	144
2.3. Identificación de cisteínas implicadas	146
2.4. Modulación de la actividad de PYR1 por TRXo1	148
2.5. Análisis <i>in vivo</i> del estado oligomérico de PYR1	150
2.6. Análisis <i>in vivo</i> de la existencia de puentes disulfuro en PYR1	151
2.7. Caracterización de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> sobreexpresantes <i>Attrxo1</i>	153
2.8. Patrón de oligomerización de PYR1 en líneas transgénicas <i>Attrxo1</i>	154
2.9. Papel de TRXo1 en crecimiento radicular en respuesta a ABA	156
2.10. Papel de TRXo1 en cierre estomático en respuesta a ABA	157
3. Papel de TRXo1 en persulfuración en condiciones salinas	158
3.1. Efecto de la falta y sobreexpresión de TRXo1	158
3.2. Comparativa WT con KO1 y KO2	161
3.2.1. Diferencias en ausencia de NaCl	163
3.2.2. Efecto de la salinidad en cada genotipo	167

3.2.3. Diferencias en presencia de NaCl	172
4. Obtención de dobles mutantes de <i>TRXo1</i> y <i>NTRB</i>	175
4.1. <i>Psntrb/trxo1</i> por VIGS	175
4.2. <i>Attrxo1/ntrb</i> por cruzamiento	184
DISCUSIÓN	189
1. ATG4 como diana de <i>TRXo1</i> y su implicación en autofagia inducida por estrés oxidativo	191
1.1. Autofagia, estrés oxidativo y TRX	192
1.2. Autofagia, supervivencia celular y TRX	194
1.3. Regulación redox dependiente de TRX de proteínas diana de autofagia	197
2. PYR1 como diana de <i>TRXo1</i> y su implicación en señalización por ABA	200
2.1. Crecimiento radicular en respuesta a ABA	204
2.2. Cierre estomático en respuesta a ABA	206
3. <i>TRXo1</i> en procesos de persulfuración bajo estrés salino	209
4. Obtención de dobles mutantes	215
4.1. <i>Psntrb/trxo1</i> por VIGS	215
4.2. <i>Attrxo1/ntrb</i> por cruzamiento	216
CONCLUSIONES	219
BIBLIOGRAFÍA	223
ANEXO	253
1. Índice de tablas	255
2. Índice de figuras	257

ABREVIATURAS

-fd: *forward*

-rv: *reverse*

3-MA: 3-metiladenina

ABA: ácido abscísico

ABI: insensible al ABA

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ADNg: ácido desoxirribonucleico genómico

ADN-T: ácido desoxirribonucleico transferido

Amp: ampicilina

AOX: oxidasa alternativa (*Alternative Oxidase*)

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ARNt: ácido ribonucleico de transferencia.

At: *Arabidopsis thaliana* L.

ATCA: ácido tricloroacético

ATG: *Autophagy-related protein*

ATP: adenosina trifosfato

BiFC: *Bimolecular Fluorescence Complementation*

BCA: ácido bicinconínico

BLAST: *Basic local alignment*

BP: *T-DNA Border Primer*

BSA: suero de albúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*)

C;Cys: cisteína

Cb: carbenicilina

Cl-NBF: 4-cloro-7-nitrobenzofurazán

Col-0: Columbia-0

Co-IP: co-inmunoprecipitación

cv.: cultivar

Cy5: Cy5-alquino

dATP: desoxiadenosina trifosfato

DAz-2: dimedona azida-2

DCP-bio1: 3-(2,4-dioxociclohexil)propil-biotina 1 (dimedona biotilada)

DEPC: dietil pirocarbonato

DIC: Microscopía de contraste de interferencia diferencial (*Differential Interference Contrast Microscopy*)

DMD: dimedona (*dimedone*)

D.O.: densidad óptica

DTT: 1,4-ditiothreitol

E-64d: aloxistatin

Fd: ferredoxina

FDR: *False Discovery Rate*

FTR: tioredoxina reductasa dependiente de ferredoxina

G: glicina

GAPDH-C: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa-C

GFP: *Green Fluorescent Protein*

Glu: glutamato

GO: ontología de genes (*Gene Ontology*)

GPX: glutatión peroxidasa

GSH: glutatión reducido

GSSG: glutatión oxidado

HAB: hipersensible al ABA

His: histidina

HR: humedad relativa

Hyg: higromicina

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranósido

kb: kilobase

Km: kanamicina

KO: mutante de pérdida de función (*knock out*)

LB: medio de cultivo Luria-Bertani

LC: Cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*)

LP: *Left T-DNA border Primer*

MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*

MES: tampón ácido 2-(N-morpholino)etanosulfónico

Met: metionina

MM(PEG)₂₄: metil-PEG₂₄-maleimida

MS: Espectrometría de Masas (*Mass Spectrometry*)

MSMO: Murashige Skoog Minimal Organics

NAD⁺/NADH: nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida

NADP⁺/NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada/reducida

NASC: *The European Arabidopsis Stock Centre*

NEM: N-etilmaleimida (*n-ethyl maleimide*)

NRX: nucleorredoxina

NTR: tiorredoxina reductasa dependiente de NADPH

OEX: sobreexpresante (*overexpressing*)

p/v: peso/volumen

P: prolina

PAR: radiación fotosintéticamente activa (*photosynthetically active radiation*)

pb: pares de bases

PCNA: antígeno de proliferación nuclear (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

PE: fosfatidiletanolamina

PEBV: *Pea Early Brown Virus*

PEG: polietilenglicol

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa

PK: tampón fosfato potásico

pNPP: p-nitrofenilfosfato

PP2C: fosfatasa del tipo 2C

PRX: peroxirredoxina

Ps: *Pisum sativum* L. (guisante)

PSMs: coincidencias espectrales peptídicas (*Peptide Spectrum Matches*)

PTM: modificaciones postraduccionales (*Post-Translational Modification*)

PYL: PYR1-like

PYR1: *Pyrabactin Resistance 1*

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa ó a tiempo real (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RCAR: *Regulatory Component of ABA Receptor 1*

RE: retículo endoplasmático

RHO: rodamina

RNS: especies reactivas del nitrógeno (*Reactive Nitrogen Species*)

ROS: especies reactivas del oxígeno (*Reactive Oxygen Species*)

RP: *Right T-DNA border Primer*

RSS: especies reactivas del sulfuro (*Reactive Sulfur Species*)

RTqPCR: *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*

SDS-PAGE: electroforesis en gel de acrilamida desnaturalizante

Ser: serina

SnRK2: *Sucrose nonfermenting1-related subfamily 2-Related protein Kinase 2*

TAE: tampón Tris-Acetato EDTA

TAIR: *The Arabidopsis Information Resource*

TBS: solución salina tamponada con Tris (*Tris-Buffered Saline*)

TBS-T: solución salina tamponada con Tris-Tween

TBS-TA: solución salina tamponada con Tris-Tween-albúmina

TBS-TL: solución salina tamponada con Tris-Tween-leche

TBY-2: *Tobacco Bright Yellow-2*

TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos (*Tricarboxylic acid cycle*)

TCEP: *Tris (2-carboxyethyl)phosphine*

TF: factor de transcripción (*Transcription Factor*)

TOF: tiempo de vuelo (*Time of Flight*)

TOR: diana de rapamicina (*Target Of Rapamycin*)

TR: tiorredoxina reductasa

TRX: tiorredoxina

v/v: volumen/volumen

W: triptófano

WT: genotipo silvestre (*wild type*)

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galacto-piranosido

INTRODUCCIÓN

1. Estrés abiótico en plantas

El hecho de ser sésiles no supone una maldición para las plantas, sino que les abre la puerta a la oportunidad de utilizar todos los aspectos de cada uno de los recursos celulares que tienen a su disposición para adaptarse a los cambios externos que puedan suponer un estrés. Dicho estrés se clasifica como abiótico cuando es generado por condiciones de crecimiento ambientales adversas (cambios en luz, temperatura, humedad, sequía, contaminantes en suelo y agua, salinidad...), o estrés biótico, si es producido por agentes biológicos como bacterias, virus, insectos, patógenos... Ambos tipos de estrés generan pérdidas muy importantes (más de 80% en algunos casos) en las cosechas y por tanto, uno de los retos actuales planteados en investigación es el de tratar de comprender los mecanismos implicados en la respuesta a estrés en las plantas, a fin de poder optimizar la misma y aumentar la resistencia. Todo ello resulta fundamental en un contexto como el actual de cambio climático global y aumento de población demandante de alimentos seguros y de calidad.

1.1. Homeostasis de ROS

El hecho de vivir en un ambiente aeróbico condiciona a los seres vivos a someterse a la química de los componentes del aire, principalmente, al oxígeno (O_2) y otros gases como el sulfuro de hidrógeno (H_2S), que son objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *Reactive Oxygen Species*), se consideran productos inevitables del metabolismo aeróbico. El oxígeno contiene dos electrones no apareados y puede sufrir reducción monovalente generando especies como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (HO^{\cdot}), que se generan tras la reducción con uno, dos y tres electrones, respectivamente (Fig. 1).

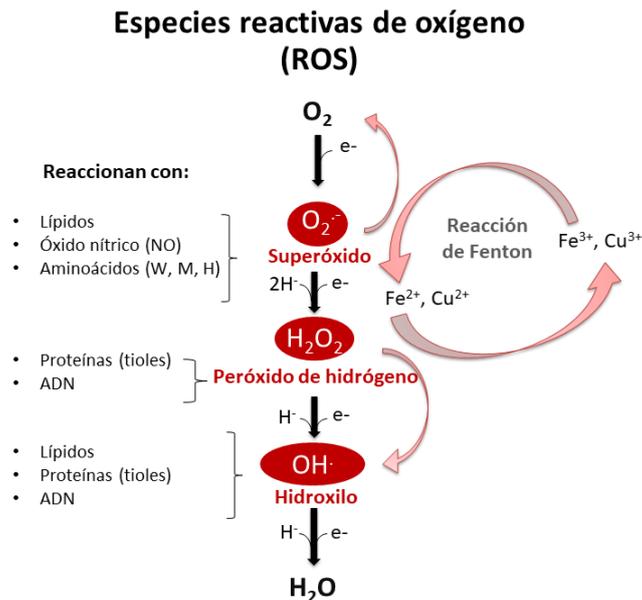


Figura 1. Producción de ROS durante la reducción del oxígeno a agua. La reducción univalente de oxígeno da lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS) como superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo. Estas ROS son capaces de reaccionar con todo tipo de macromoléculas generando productos oxidados.

Interesantemente, las ROS tienen una acción dual: inicialmente se las consideraba únicamente como dañinas por su capacidad oxidante sobre todo tipo de macromoléculas como lípidos, proteínas y ADN, conduciendo, en el peor de los casos, a la muerte celular, bien por una sobreproducción o por una insuficiencia de defensas antioxidantes endógenas. Por otro lado, cada vez hay más evidencias de su acción beneficiosa afectando al estado redox celular con una implicación en las cascadas de señalización que permiten inducir una respuesta de adaptación (Mhamdi y Van Breusegem, 2018; Martí y *col.*, 2020). Como moléculas señalizadoras, las ROS tienen una especial importancia durante procesos fisiológicos y de desarrollo en las plantas muy diversos, que incluyen entre otros a germinación, crecimiento, floración, senescencia... así como en la respuesta a estrés, que finalmente desemboca en una regulación de la transcripción génica (Foyer y *col.*, 2017). Esta respuesta va a permitir la adaptación/aclimatación o no (muerte celular) a la situación que desencadenó la generación de ROS (Waszczak y *col.*, 2018; Considine y Foyer, 2021), algo determinante no solo durante el desarrollo en condiciones normales, sino sobre todo en situaciones de estrés donde la producción de ROS puede aumentar considerablemente (Fig. 2) (Sevilla y *col.*, 2015a; Foyer y Noctor, 2016; Locato y *col.*, 2018).

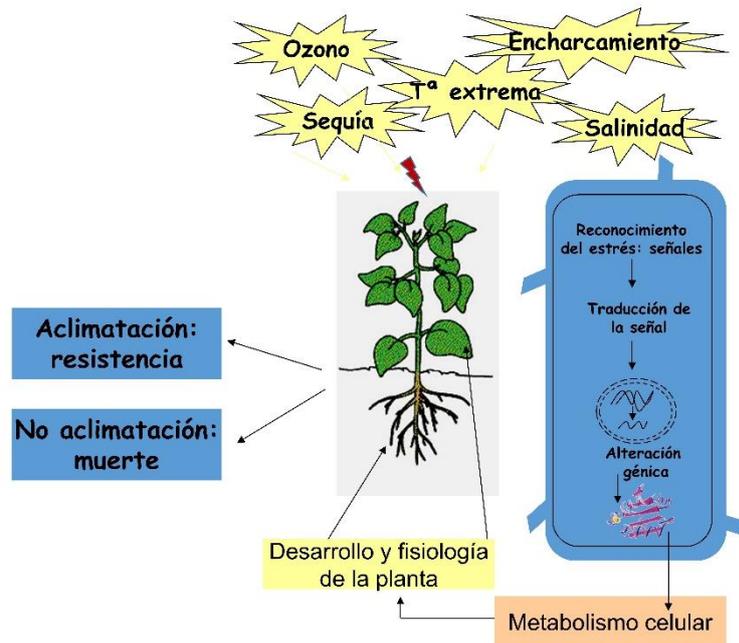


Figura 2. Efecto del estrés abiótico en plantas. Las diferentes condiciones de estrés abiótico son reconocidas por sensores celulares que producen señales que en última instancia modifican la expresión génica generando cambios en el metabolismo que alteran el desarrollo y la fisiología de la planta. Según la intensidad del estrés y de la capacidad de respuesta, las plantas se aclimatan y resisten al estrés, o no se aclimatan y mueren.

Existe una compartimentación celular tanto de la generación de ROS (esquematisada en la Fig. 3), como de los sistemas de regulación y eliminación de los mismos, que incluye a los sistemas de reducción-oxidación (redox) tiorredoxina/ glutarredoxina/ peroxirredoxina/ sulfirredoxina (TRX/GRX/PRX/SRX), y a los antioxidantes celulares, como los componentes enzimáticos y no enzimáticos del ciclo ascorbato-glutatión (ASC-GSH), las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), peroxidasa (PX), glutatión peroxidasa (GPX)... entre otros (esquematisados en la Fig. 4).

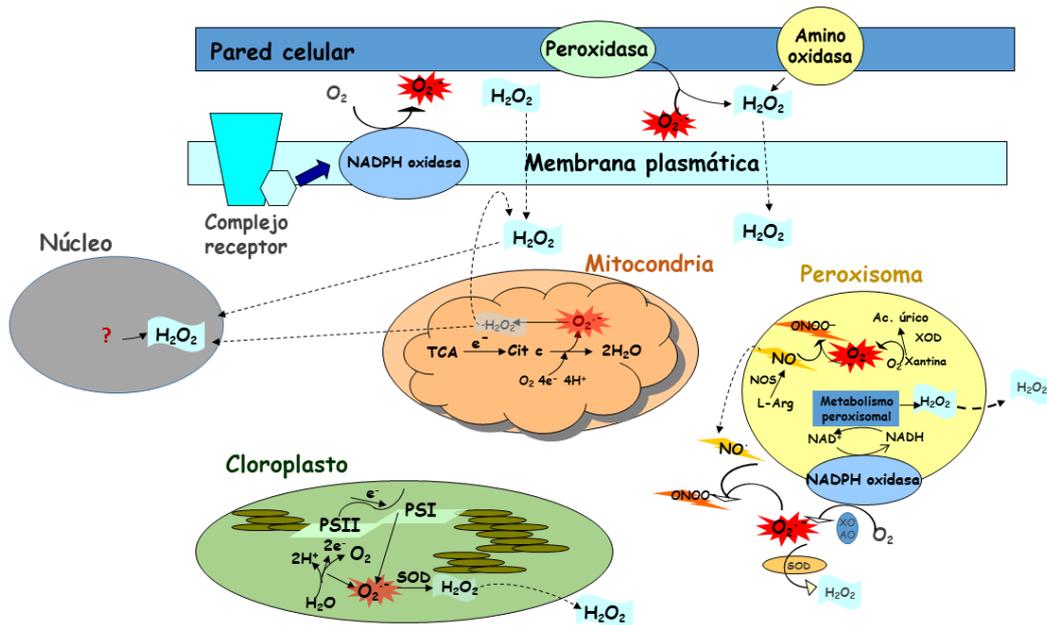


Figura 3. Sistemas de generación de ROS en plantas. Las ROS se generan en los diferentes compartimentos celulares, bien por los electrones derivados de cadenas de transporte fotosintéticas (Fotosistemas PS) o respiratorias, o bien por la acción de enzimas como superóxido dismutasa (SOD), xantina oxidasa (XOD), óxido nítrico sintasa (NOS), aminoxidasa (AO), NADPH oxidasa... Algunas de estas ROS reaccionan con especies reactivas del nitrógeno, como el NO, y otras como el H₂O₂ difunden entre los compartimentos.

En mitocondrias y núcleo, los dos compartimentos más interesantes para el desarrollo de esta Tesis Doctoral, las ROS se generan, en el caso mitocondrial, a nivel de la cadena respiratoria por el escape de electrones al oxígeno, concretamente a nivel de los complejos I, II y III cuando están sobrerreducidos, así como a nivel de la ubiquinona (Hernández y col., 1993; Turrens, 2003; Schwarzländer y col., 2009). El O₂⁻ generado es dismutado por la Mn-superóxido dismutasa (SOD) que lo transforma en H₂O₂ (Sevilla y col., 1982) Fig. 3). Este peróxido puede generar OH[•] o ser controlado por los componentes del ciclo ascorbato (ASC) glutatión (GSH) y peroxirredoxina (PRXIIIF)/tioredoxina (TRXo1), que se localizan en este orgánulo (Jiménez y col., 1997, 1998; Barranco-Medina y col., 2007; Fernández-García y col., 2009; Martí y col., 2009). Además, es importante considerar a la proteína oxidasa alternativa (AOX), que acepta los electrones de la ubiquinona, ya que evita la sobrerreducción de la cadena de transporte en los complejos I y III, siendo importante para amortiguar la formación de ROS cuando la vía citocrómica esté dañada (Millar y col., 2011) (Fig. 4).

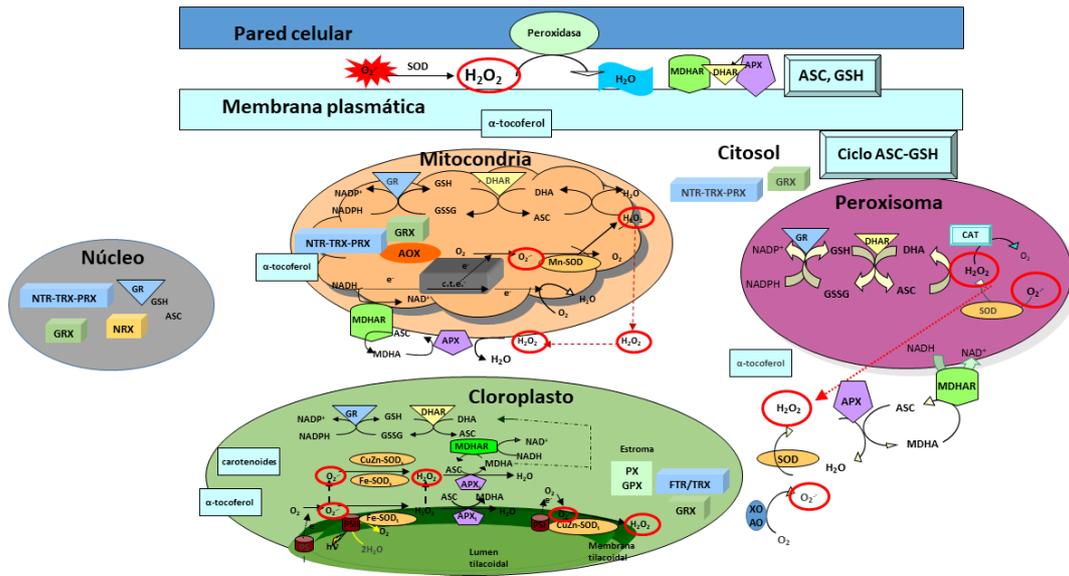


Figura 4. Sistemas de control de ROS en plantas. Los distintos compartimentos celulares contienen sistemas de reducción-oxidación como la tioredoxina (TRX), peroxiredoxina (PRX), sulfiredoxina (SRX), glutaredoxina (GRX) y nucleoredoxina (NRX), que colaboran en el control de ROS con el sistema antioxidante compuesto entre otros por α -tocoferol, ascorbato (ASC), glutatión (GSH) y las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (PX), glutatión peroxidasa (GPX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHA), deshidroascorbato reductasa (DHAR), glutatión reductasa (GR) y oxidasa alternativa (AOX).

En núcleo, la información sobre la generación de ROS es muy limitada, y se cree que éstos difunden a través de la membrana nuclear o a través de poros nucleares; aunque, se ha señalado la producción de H_2O_2 inducida por el incremento de calcio generado por tratamientos de cultivos celulares de tabaco BY-2 con criptogeína, una proteína elicitorina producida por un hongo patógeno (Ashtamker y col., 2007) (Fig. 3). Por otro lado, se ha descrito la presencia en núcleo de TRX/GRX/PRX/NTR y nucleoredoxina (NRX) junto a los antioxidantes ASC, GSH y glutatión reductasa (GR) (Fig. 4).

Ante este escenario de producción y eliminación de ROS en los distintos compartimentos celulares, una situación controlada y equilibrada podrá permitir una adecuada señalización necesaria, bien para el desarrollo normal de la planta, o bien para una respuesta eficiente que conduzca a la adaptación en el caso de una situación de estrés. Todo ello coloca a los sistemas antioxidantes junto a los sistemas redox, y dentro de ellos, a la proteína TRX, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, en una posición clave en los procesos de señalización celular inducidos por las especies reactivas de oxígeno (Fig. 5).

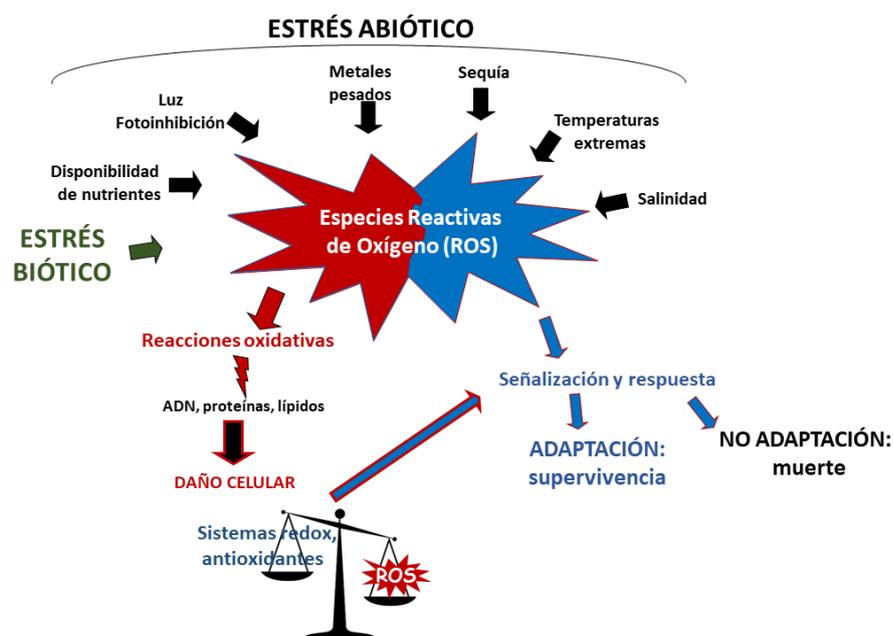


Figura 5. Control de la respuesta de plantas a estreses bióticos y abióticos. Los sistemas de reducción-oxidación (redox) junto a los sistemas antioxidantes controlan la homeostasis de ROS en respuesta a la generación inducida por diferentes estreses abióticos y bióticos. Del equilibrio entre sistemas de generación y eliminación de ROS surge la respuesta que desembocará en una adaptación o muerte celular.

1.2. Homeostasis de H₂S

De forma similar a las ROS, un nuevo actor en la señalización celular tanto en sistemas animales como vegetales y en las modificaciones postraduccionales de proteínas es el sulfuro de hidrógeno (H₂S), un gas inflamable volátil considerado como un contaminante atmosférico (Filipovic y Jovanović, 2017). En plantas, se ha comprobado que el H₂S está implicado en múltiples procesos que incluyen respuesta frente a patógenos y a estreses abióticos, regulación de la fotosíntesis, cierre estomático, germinación o autofagia (Aroca y *col.*, 2020; Laureano-Marín y *col.*, 2020; Zhou y *col.*, 2020; Aroca y *col.*, 2021a). Interesantemente, este gas está recibiendo especial atención debido, entre otras cosas, a que cuando es suministrado de forma exógena, tiene un efecto positivo en la adaptación de las plantas al estrés (Zhang y *col.*, 2009; Jin y *col.*, 2017; Aroca y *col.*, 2018), aunque el mecanismo por el que lo hace aún se desconoce. En los sistemas vegetales, el H₂S se genera principalmente en los cloroplastos a través de la vía fotosintética de asimilación de sulfato (García y *col.*, 2015) por la enzima sulfito reductasa (SIR) a expensas de ferredoxina (Fd). El sulfuro de hidrógeno es además generado como un producto del metabolismo tanto biosintético como de eliminación de cisteína (C; Cys) en diferentes compartimentos celulares (Fig. 6). Así,

durante la síntesis de Cys, el H_2S se produce a partir de o-acetilserina (OAS) que incorpora sulfuro por acción de la enzima O-acetil-serina(tiol)liasa (OASTL) con 9 isoformas en *Arabidopsis thaliana* L. localizadas en citoplasma, cloroplastos y mitocondrias (revisado por Choudhari y col., 2022), y aunque algunos autores propusieron en un inicio a la mitocondria, más que al cloroplasto o citoplasma, como la principal vía de síntesis de cisteína en *A. thaliana* (Heeg y col., 2008), se ha comprobado que la mayoría se sintetiza en el citoplasma (García y col., 2015). OASTL además es capaz de eliminar H_2S incorporándolo a OAS generando Cys (Filipovic y Jovanović, 2017). También, en estos tres compartimentos celulares las enzimas desulfhidrasas (DES1 ó L/D-CDES, miembro de la familia de O-acetil-serina(tiol)liasa, OASTL)) descomponen D/L-cisteína en H_2S , piruvato ($CH_3COCOOH$) y amonio (NH_3) (Álvarez y col., 2012; Pantaleno y col., 2020). Por último, en mitocondrias, la enzima cianoalanina sintasa C1 (CAS-C1) genera H_2S así como ciertas cisteína desulfurasas (similares a proteínas S de fijación de nitrógeno NIFS) también presentes en cloroplastos.

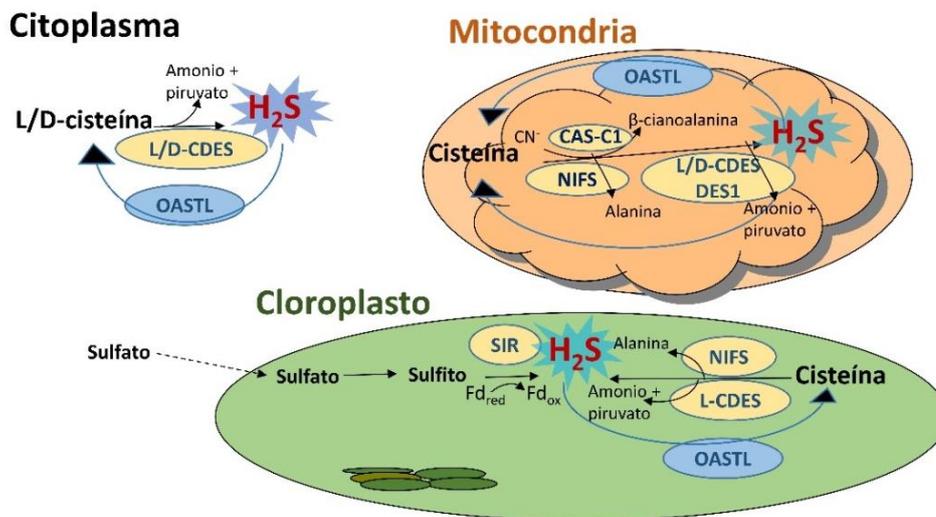


Figura 6. Rutas de generación y eliminación de H_2S en plantas. L-cisteína desulfhidrasa 1 (DES1 ó L/D CDES, miembro de la familia de O-acetil-Ser(tiol)liasa, OASTL) en citoplasma genera H_2S , amonio y piruvato a partir de L/D-cisteína. En cloroplastos, se reduce sulfato a sulfito y éste genera H_2S por la enzima sulfito reductasa (SIR) a expensas de ferredoxina (Fd); también a partir de Cys se produce H_2S y alanina por Cys desulfurasas (similares a proteínas S de fijación de nitrógeno NIFS). Estas desulfurasas NIFS junto a β -cianoalanina sintasa (CAS) que utiliza Cys y cianuro, son las responsables de generación de H_2S en mitocondrias. OASTL también cataliza la reacción reversa de eliminación de H_2S generando Cys en los distintos compartimentos. Modificada de Pantaleno y col. (2021) y Choudhari y col. (2022).

2. Estrés oxidativo: modificaciones postraduccionales por ROS y H₂S

Las especies reactivas de oxígeno, nitrógeno y azufre provocan cambios conformacionales en proteínas que se denominan de forma genérica modificaciones postraduccionales (PTMs; del inglés, *Post-Translational Modifications*). Concretamente, las ROS generadas como subproductos del metabolismo celular producen modificaciones oxidativas reversibles en las proteínas alterando su actividad o aumentando su susceptibilidad a la agregación y a la degradación (Sevilla y *col.*, 2015a). Muchos de los actores clave implicados en la defensa contra el estrés oxidativo son proteínas sensibles al estado redox celular que contienen cisteína (C; Cys), metionina (M; Met) o histidina (H; His) en su secuencia de aminoácidos o metales en sus centros activos. El estado redox de estos residuos está directamente implicado en la estructura y funcionalidad de la proteína (Couturier y *col.*, 2013). La cisteína es uno de los aminoácidos mejor conservados en las proteínas, aunque solo representa el 2% del contenido de aminoácidos en las células (Lindahl y *col.*, 2011). Los residuos de Cys desempeñan funciones importantes en la célula ya que juegan papeles estructurales como ligandos metálicos y porque son susceptibles a varias modificaciones postraduccionales (Sevilla y *col.*, 2015a). El H₂O₂ es la especie más relevante en la mediación de reacciones oxidativas debido a su reactividad con la Cys, su prolongada vida media en comparación con otras ROS y su capacidad de difusión a través de las membranas. Estas modificaciones postraduccionales en el caso de que se produzcan sobre cisteínas incluyen: la S-oxidación, la S-glutationilación, la S-nitrosilación y la S-persulfuración. Durante la señalización redox, el H₂O₂ oxida el anión tiolato (Cys-S⁻) de los residuos Cys de las proteínas a la forma sulfénica (Cys-SOH) (Fig. 7). Esta forma oxidada puede reaccionar con otro tiolato para formar un enlace disulfuro (-S-S-) intra o intermolecular. Se estima que la forma sulfénica se produce en el rango nanomolar de H₂O₂, mientras que niveles superiores oxidan los tiolatos a una especie sulfínica (Cys-SO₂H) o sulfónica (Cys-SO₃H), que puede ser irreversible. Precisamente, la reversibilidad del proceso puede servir como mecanismo de transducción de señales, asegurando una señalización transitoria y evitando la sobreoxidación irreversible de los grupos tiólicos (Brandes y *col.*, 2009; Sevilla y *col.*, 2015a). Por ello, los niveles de H₂O₂ están estrechamente controlados por sistemas antioxidantes para evitar la sobreoxidación de las proteínas funcionales. En este sentido, enzimas como la catalasa,

múltiples peroxidases con Cys en sus centros activos, incluyendo la peroxirredoxina (PRX) o la glutatión peroxidasa (GPX), así como enzimas componentes del ciclo ascorbato-glutatión (ASC-GSH), ejercen un control importante de los niveles celulares de H_2O_2 (Gómez y *col.*, 2004; Pavet y *col.*, 2005; Dietz, 2011; Foyer y Noctor, 2016; Lázaro y *col.*, 2013).

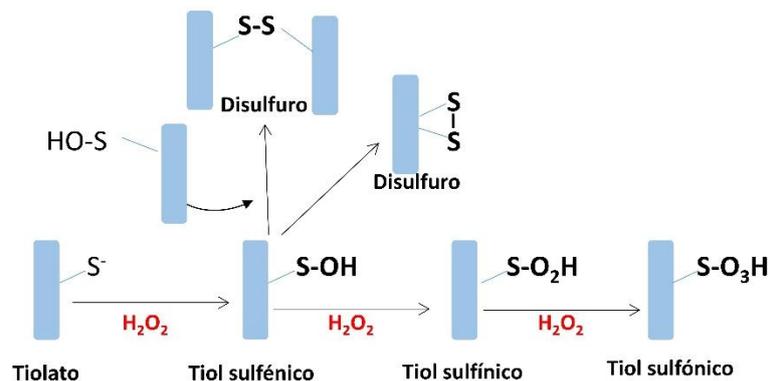


Figura 7. Estados de oxidación de residuos de cisteína. Los tioles (-SH) pueden sufrir sucesivas oxidaciones por H_2O_2 generando grupos sulfénicos (-SOH), sulfínicos (-SO₂H) y sulfónicos (-SO₃H), o bien los grupos sulfénicos pueden reaccionar con otros tioles y formar puentes disulfuro (-S-S-) intra- o inter-moleculares. Modificada de Sevilla y *col.* (2015a).

La modificación *S*-glutationilación se produce cuando la Cys-SOH reacciona con tioles de bajo peso molecular como el glutatión reducido (GSH; tripéptido Glu-Cys-Gly) generando un tiol glutationilado, o bien con nitrosoglutatión (GSNO) generando un nitrosotiol (Fig. 8) (Castillo y *col.*, 2015). Puede ocurrir por formación espontánea de enlaces disulfuro entre la forma sulfénica de la cisteína y el GSH o una forma tiolato derivada de una cisteína reducida con el glutatión oxidado (GSSG), siendo la extensión de las reacciones dependiente de la relación GSH/GSSG en los compartimentos celulares. La *S*-glutationilación puede considerarse como un mecanismo de defensa contra la sobreoxidación de residuos de cisteína durante el estrés oxidativo que disminuye la relación GSH/GSSG, por ejemplo, en orgánulos como la mitocondria (Zechmann, 2014; Sevilla y *col.*, 2015a). Tras la glutatiónilación, se pueden formar enlaces disulfuro con otro tiol proteico y ambas formas pueden ser revertidas por GSH, glutarredoxina (GRX) o tiorredoxina (TRX) como se ha descrito en sistemas animales (Beer y *col.*, 2004; Subramani y *col.*, 2016).

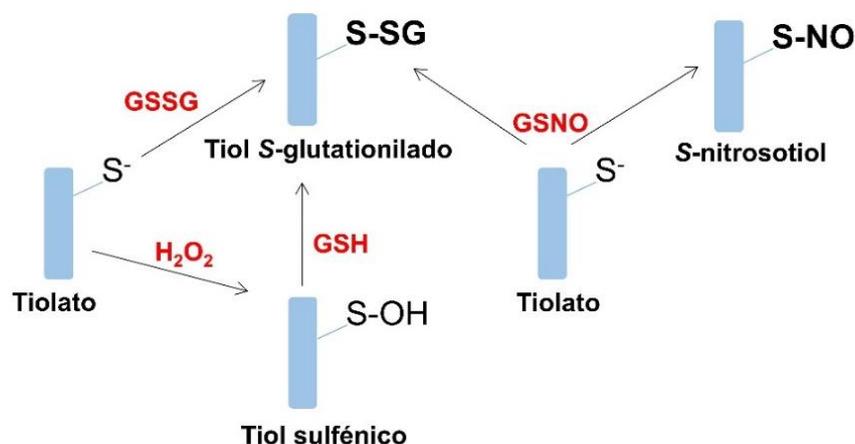


Figura 8. Estados de S-glutationilación y S-nitrosilación de residuos de cisteína. Los tiolatos de Cys (Cys-S⁻) pueden sufrir modificación por GSH, GSSG ó GSNO provocando S-glutationilación (Cys-S-SG) o S-nitrosilación (Cys-S-NO). Modificada de Sevilla y col. (2015a).

La modificación S-persulfuración se produce por reacción del H₂S sobre Cys, si bien éste no reacciona espontáneamente con grupos tioles reducidos sino con el oxidado sulfénico (Sevilla y col., 2015a; Wang y col., 2018; Huang y col., 2019) (Fig. 9). Estas formas persulfuradas son muy sensibles a ROS pudiendo oxidarse a su vez a los ácidos pertiosulfénico (-SSOH), pertiosulfínico (-SSO₂H) y pertiosulfónico (-SSO₃H). Los persulfuros oxidados pueden reducirse de nuevo a sus formas tiol (-SH) por TRXs o GRXs (Wedmann y col., 2016; Zhou y col., 2020), si bien este último aspecto no está muy estudiado en plantas.



Figura 9. Estados de persulfuración de residuos de cisteína. Los tiolatos de Cys pueden sufrir persulfuración por H₂S y posteriormente, sucesivas oxidaciones a grupos persulfénicos, persulfínicos y persulfónicos. Modificada de Sevilla y col. (2015a).

En estudios sobre dianas de persulfuración en *A. thaliana*, se han descrito proteínas implicadas en procesos muy diversos (Aroca y col., 2015, 2017), tales como fotosíntesis, respiración, síntesis de proteínas, organización celular, crecimiento vegetal, respuesta a estrés abiótico y biótico, metabolismo del carbono, traducción de ARN... Así, la importancia de estas modificaciones postraduccionales es que son capaces de traducir el desequilibrio del estado redox causado por la exposición a la situación de estrés, en una cascada de respuestas que finalmente le permiten a la planta hacer frente a la condición adversa.

3. Sistema redox: tiorredoxina

El sistema redox celular está compuesto por proteínas sensibles a cambios oxidativos clasificadas como sensores redox que incluyen a peroxirredoxinas y glutatión peroxidasa, así como de transmisores redox como son las tiorredoxinas y las glutarredoxinas, que además pueden ser sustrato de enzimas reductoras como peroxidasa y ribonucleótido reductasa (Barranco-Medina y col., 2007; Couturier y col., 2013; Lázaro y col., 2013). Así, el estado redox celular va a depender de los grupos tioles y las formas oxidadas de los antioxidantes como el GSH y de las proteínas TRX, PRX, SRX y GRX, entre otras. Se considera que el estado redox de los diferentes compartimentos celulares depende en gran medida de los cocientes relativos entre los grupos oxidados y reducidos principalmente de TRX y GSH (Noctor y col., 2018). En esta sección, se describirá a las proteínas TRXs, centrándonos en la TRXo1, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, tal y como se describe a continuación.

Las tiorredoxinas (TRXs) son proteínas de bajo peso molecular (en torno a los 12-14 kDa), encontrándose tanto en animales, como en vegetales, bacterias y levaduras. Poseen en su estructura secundaria una sucesión de elementos $\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\alpha 5$, conocida como plegamiento tiorredoxina, necesario para presentar al centro activo conservado -WCGPC- en su conformación activa (Jacquot y col., 1997). Las cisteínas en el centro activo les permiten actuar como óxido-reductasas sobre ciertas proteínas diana específicas oxidadas, normalmente inactivas (Montrichard y col., 2009; Buchanan y col., 2012; Balsera y Buchanan, 2019; Martí y col., 2020) (Fig. 10). De esta forma, las TRXs regulan la estructura y función de sus dianas mediante un intercambio tiol-disulfuro (Richter y col., 2018; Sahrawy y col., 2022).

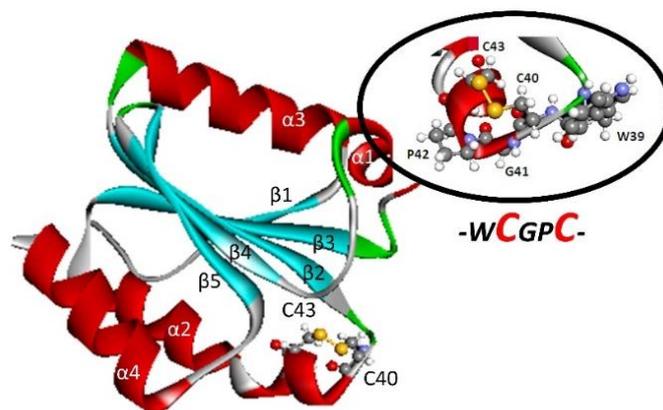


Figura 10. Estructura tridimensional de TRX. Estructura de TRX y su centro activo conteniendo dos residuos de cisteína (C).

Mientras que como aminoácido libre el grupo tiol (-SH) de la Cys tiene un pKa de aproximadamente 8,3, en las proteínas tiol oxidorreductasas, como las tiorredoxinas y las glutarredoxinas, las Cys reactivas poseen un pKa más bajo (3-7). Este pKa está influenciado por el microambiente circundante (Mailloux y *col.*, 2014). La presencia de aminoácidos adyacentes cargados positivamente como la lisina en las GRXs (Matsui y *col.*, 2019) o la proximidad de un residuo de histidina (His) en la sulfirredoxina (SRX) (Iglesias-Baena y *col.*, 2010) pueden disminuir el pKa de la Cys. Así, a un pH fisiológico, estos residuos de Cys aparecerán predominantemente como tiolatos más reactivos y facilitarán diferentes estados de oxidación en respuesta a señales redox (Lázaro y *col.*, 2013; Sevilla y *col.*, 2015a).

3.1. Modo de acción y regeneración

En el modo de acción de las TRXs sobre una diana oxidada, la Cys denominada nucleofílica, que se encuentra más expuesta, ataca al puente disulfuro de la proteína diana, formando un complejo disulfuro mixto que se rompe inmediatamente mediante el ataque de la segunda cisteína (Cys resolutive) de la TRX que ha perdido su protón probablemente por algún residuo de aspártico o glutámico cercano (Guex y Peitsch, 1997). Este proceso tiene como resultado la obtención de la proteína diana reducida y la

TRX oxidada (Holmgren, 1995) (Fig 11). Este mecanismo de acción también es compartido por la GRX, proteína disulfuro isomerasa (PDI) e incluso NTR y FTR.

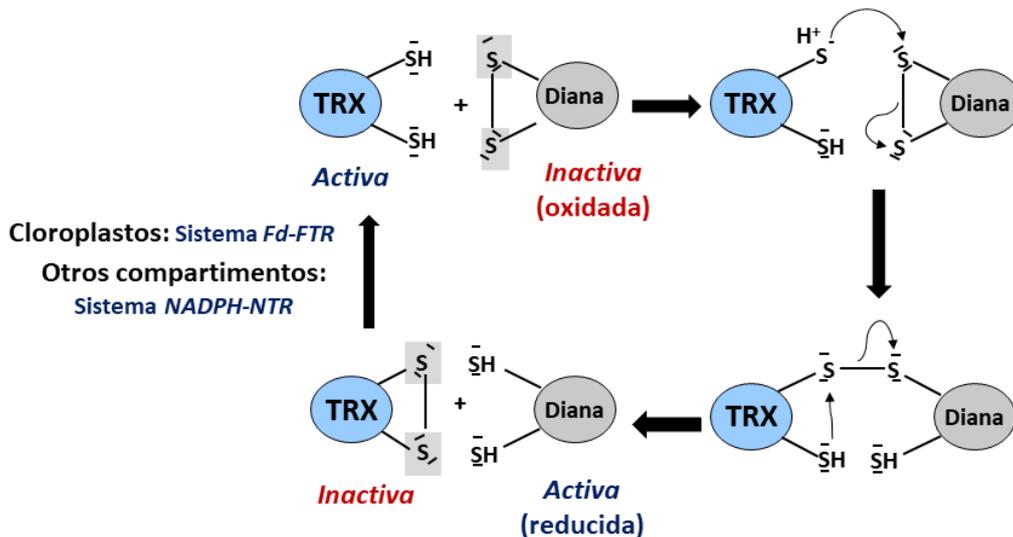


Figura 11. Mecanismo acción y regeneración de TRX. La Cys nucleofílica de TRX ataca un puente disulfuro de una proteína diana oxidada inactiva y la segunda Cys produce un ataque electrófilo para compensar el déficit de electrones resultando en la diana activa en forma reducida y la TRX oxidada. La regeneración de TRX a su forma reducida la lleva a cabo el sistema ferredoxina (Fd)/ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR) en cloroplastos, mientras que en otros compartimentos celulares es el sistema NTR dependiente de NADPH.

Tras su acción óxido-reductasa, la TRX queda oxidada y debe ser regenerada a su forma activa reducida. Esta regeneración la lleva a cabo el sistema ferredoxina (Fd)/ferredoxina tiorredoxina reductasa (FTR) en cloroplastos, o la tiorredoxina reductasa (TR) dependiente de NADPH: NTRA en citoplasma y NTRB en mitocondrias y núcleo (Serrato y *col.*, 2004; Jacquot y *col.*, 2009; Martí y *col.*, 2009; Reichheld y *col.*, 2009; Tovar-Méndez y *col.*, 2011; Ojeda y *col.*, 2017). Además, en cloroplastos y plastidios no fotosintéticos, se localiza la enzima NTRC dependiente de NADPH, que contiene dos dominios: uno NTR y otro TRX en el mismo polipéptido, por lo que puede reducir a 2-Cys PRX sin la ayuda de TRX (Pérez-Ruiz y *col.*, 2006; Pulido y *col.*, 2010).

3.2. Isoformas de tiorredoxina: localización y función

En *A. thaliana*, se han descrito al menos 21 genes de TRXs típicas: la familia I contiene a las TRXs *m1-4*, *f1-2*, *x*, *y1-2*, *s* y *z*, localizadas en los plastidios, 8 TRXs *h* en el citoplasma, núcleo, membrana plasmática y retículo endoplasmático y las TRX_{o1-2}

localizadas en mitocondria y en el caso de TRXo1 también en núcleo, siendo esta última objeto de estudio en esta Tesis Doctoral (Fig. 12) (Serrato y col., 2004; Traverso y col., 2008; Martí y col., 2009; Meyer y col., 2012; Calderón y col., 2017a; Yoshida y col., 2018; Zannini y col., 2018; Cejudo y col., 2019; Sahrawy y col., 2022). La familia II contiene a la proteína cloroplastídica NTRC que, como se ha comentado anteriormente, presenta un dominio N-terminal NTR y un dominio carboxi-terminal TRX (Pérez-Ruiz y col., 2006). Además, existen TRXs atípicas que presentan centros activos diferentes, múltiples dominios TRX o TRXs asociadas. La diversidad de isoformas parece apoyar a las plantas con un sistema antioxidante adicional, en comparación con los mamíferos, donde solo se han descrito dos tipos de TRX: Trx1 y Trx2, en el citoplasma y la mitocondria, respectivamente (Lillig y Holmgren, 2007).

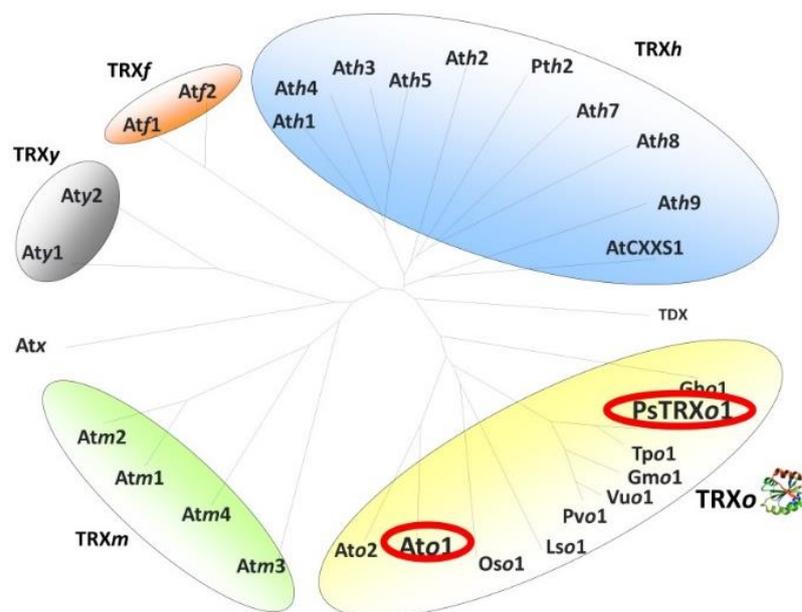


Figura 12. Familia génica TRX en plantas. Árbol filogenético de la familia TRX de *A. thaliana* y algunos homólogos de TRXo, resaltando entre estas últimas a la TRXo1 de guisante (Ps: *Pisum sativum* L.) y *A. thaliana* (At), objeto de estudio en esta Tesis Doctoral. Os: *Oriza sativa*; Ls: *Licopersicum sculentum*; Pv: *Plectranthus scutellarioides*; Gm: *Glycine max*; Tp: *Trifolium pretense*; Gh: *Gossipium hirsutum*. Modificado de Martí y col. (2009).

Las TRXs se consideran componentes clave del equilibrio redox celular a través de la regulación redox de multitud de proteínas diana implicadas en diversas rutas metabólicas en los diferentes compartimentos celulares (Yoshida y col., 2013; Sevilla y col., 2015b; Calderón y col., 2017a; Geigenberger y col., 2017; Martí y col., 2009, 2020;

Ancín *y col.*, 2022; Serrato *y col.*, 2013). Así, en cloroplastos, las diferentes isoformas de TRX actúan como factores reguladores redox con papeles centrales en múltiples procesos como la biogénesis de plastos, la aclimatación del metabolismo a los cambios rápidos de intensidad lumínica, la activación reductora de las enzimas del ciclo de Calvin-Benson y la tolerancia a la salinidad (Serrato *y col.*, 2004; Yoshida *y col.*, 2018; Fernández-Trijuete *y col.*, 2019; Serrato *y col.*, 2021; Sahrawy *y col.*, 2022). En el citoplasma, la TRX regula a proteínas del sistema antioxidante como APX y PRX, proteínas implicadas en la síntesis y degradación proteica y a varias enzimas del metabolismo como la alcohol deshidrogenasa, la fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa, gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o metionina sintasa, entre otras (Yamazaki *y col.*, 2004).

Centrándonos algo más en la **TRXo1**, objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, en mitocondrias se han localizado dos TRXs de tipo *o*: TRXo1 y TRXo2 (Laloi *y col.*, 2001; Martí *y col.*, 2009); si bien se ha descrito una TRXh2 de álamo en el orgánulo (Gelhaye *y col.*, 2005), aunque existe cierta controversia con esta localización subcelular, describiéndose más recientemente su presencia en microsomas y no en mitocondrias (Hou *y col.*, 2021). En *A. thaliana*, un análisis de la estructura-función en las isoformas de TRXo ha demostrado que ambas proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se unen a un grupo ferrosulfurado (Fe-S). En la TRXo2, el clúster de unión Fe-S depende de los residuos de cisteína que se encuentran en el motivo conservado activo, pero la relevancia fisiológica de esta observación sigue sin estar clara. Además, se observó una posible conexión entre las TRXs *o* con el grupo Fe-S mitocondrial ya que ambas TRXs participan en la maduración de ciertas proteínas Fe-S mitocondriales (Ciofi-Baffoni *y col.*, 2018). Aparte de esta función, se ha relacionado a la TRXo1 con procesos mitocondriales que incluyen a la vía respiratoria de la proteína oxidasa alternativa (AOX), la desintoxicación de ROS a través de la peroxirredoxina PRXIIF, las enzimas del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA), la síntesis de energía (ATP) y la traducción de proteínas, entre otras (Balmer *y col.*, 2004; Barranco-Medina *y col.*, 2008a; Martí *y col.*, 2009; Yoshida *y col.*, 2013). Paralelamente, se cree que la regulación transcripcional y la regulación redox a través de TRXs, desempeñan un papel crucial en la adaptación de la fotorrespiración a las condiciones ambientales cambiantes (Reinholdt *y col.*, 2019). Además, se han utilizado plantas mutadas en TRXo1 (mutantes ADN-T *Attrxo1*) para estudiar la función fisiológica que desempeña esta proteína

regulando el ciclo TCA, la fotorrespiración y las vías de transporte de electrones mitocondriales *in vivo* tanto en condiciones control como en estrés salino y sequía, si bien este último aspecto se desarrollará más adelante en esta introducción (Martí y *col.*, 2011; Daloso y *col.*, 2015; Yoshida y *col.*, 2016; Florez-Sarasa y *col.*, 2016, 2019; Ortiz-Espín y *col.*, 2017; Calderón y *col.*, 2018a; Reinholdt y *col.*, 2019; Sánchez-Guerrero y *col.*, 2019, 2021). El avance en el análisis y caracterización de estos mutantes ha permitido obtener amplia información sobre la función de esta proteína, desvelando los procesos claves por los que el sistema TRX colabora en la aclimatación de las plantas al estrés a través de un correcto funcionamiento del metabolismo antioxidante, así como su vínculo con el proceso de germinación y la progresión del ciclo celular.

En núcleo, se ha descrito la presencia de TRXo1 en hojas de guisante (Martí y *col.*, 2009) y TRXh que en condiciones de estrés oxidativo se transloca desde el citoplasma, junto a las proteínas redox NTR y nucleoredoxina (NRX) (Marchal y *col.*, 2014). En este orgánulo, las dianas de TRX identificadas son mucho más escasas por lo que su papel es más desconocido. En nuestro laboratorio, se ha descrito al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como una de ellas (Martí y *col.*, 2009, Calderón y *col.*, 2017a; Sánchez-Guerrero y *col.*, 2019) y se ha demostrado la interacción entre ambas proteínas en el núcleo, lo que implica a la TRX en división y proliferación celular. De hecho, células de tabaco BY-2 (por sus siglas en inglés, *Bright Yellow-2*) sobreexpresantes de PsTRXo1 mostraron niveles elevados de PCNA paralelos a una tasa elevada de proliferación y mitosis y un mantenimiento del GSH nuclear (Calderón y *col.*, 2017a). Además del PCNA, se han identificado varios factores de transcripción regulados de forma redox, siendo alguno de ellos diana de tiorredoxina, peroxirredoxina o glutarredoxina; y así mismo, enzimas como 1-Cys PRX y GAPDH-C se han señalado en este orgánulo como dianas de TRX (revisado en Sevilla y *col.*, 2015a; Shaikhali y Wingsle, 2017; Martins y *col.*, 2018).

3.3. Nuevas dianas de tiorredoxina

La identificación de dianas de regulación redox por TRX es un punto de partida que permite no solo el conocimiento de las vías en las que las proteínas diana están implicadas sino la importancia que pueda tener esa regulación por óxido-reducción y en ella concretamente la ejercida por las proteínas TRXs. Así, en esta Tesis Doctoral

hemos focalizado nuestro trabajo en la búsqueda de nuevas dianas no descritas aún en plantas, que amplíen el espectro de acción de TRX hacia otras rutas metabólicas. En el caso de la diana ATG4, los antecedentes bibliográficos existentes en otros sistemas no vegetales señalaban a esta proteína como una posible diana de TRX también en plantas y por otro lado, antecedentes experimentales obtenidos en nuestro laboratorio reflejados en una Tesis Doctoral anterior a ésta, demostraron la interacción de TRX α 1-PYR1, el receptor de la hormona ABA, si bien este resultado necesitaba un estudio más en profundidad para tratar de establecer el mecanismo de acción subyacente. Así, ATG4 y PYR1 han sido objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, lo que se describe a continuación con más detalle.

3.3.1. ATG4: Autofagia

La autofagia (en inglés *self-eating*, comerse a sí mismo) es un proceso degradativo en el que los componentes celulares dañados o inútiles, incluidas proteínas, agregados y orgánulos completos, se degradan en un compartimento lítico para su reciclaje o eliminación. Después de dos décadas desde que se describió la existencia de este proceso en plantas (Doelling y *col.*, 2002), se ha evidenciado que el reciclaje intracelular es esencial para el control adecuado de la mayoría de los eventos celulares, ya que además de modular los niveles de reguladores clave, es el principal encargado de eliminar los desechos y reponer los nutrientes esenciales necesarios para un nuevo crecimiento (Masclaux-Daubresse y *col.*, 2017). Aunque originalmente se pensó que era un sistema de degradación sin restricciones, la autofagia puede rivalizar con la selectividad del sistema de degradación proteica ubiquitina Ub-proteosoma al utilizar una amplia gama de receptores que reconocen la carga adecuada (Dikic, 2017). Así, proteínas específicas, agregados proteicos, complejos macromoleculares (ribosomas y proteosomas), fragmentos del retículo endoplásmico (RE) o del núcleo, orgánulos enteros (mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos) e incluso patógenos invasores, pueden ser eliminados selectivamente (Aroca y *col.*, 2022). Se ha observado que este proceso contribuye a las defensas antioxidantes (Dodson y *col.*, 2013), y de forma similar a lo descrito para otros eucariotas, es activado y regulado por las células para hacer frente al estrés biótico y abiótico (Marion y *col.*, 2018). Por otro lado, la autofagia tiene un doble filo: no solo es un mecanismo protector como colaborador en la

supervivencia frente a enfermedades como el cáncer, sino también un mecanismo que conduce a muerte celular como en la respuesta a citotóxicos. La implicación en estos procesos de la autofagia ha derivado en una importante actividad científica en los últimos años en el campo de la Fisiología y Medicina, puesta de manifiesto en la concesión del premio Nobel en 2016 por sus estudios de los mecanismos de la autofagia al Profesor Oshumi, descubridor de la autofagia en levaduras (Takeshige y *col.*, 1992). Si bien este proceso ha sido menos estudiado en plantas que en sistemas animales, la autofagia basal parece ser esencial para el crecimiento y desarrollo en ambos casos (Inoue y *col.*, 2006; Takatsuka y *col.*, 2011), con más de treinta proteínas participantes. Se ha descrito que la autofagia está regulada por diferentes vías de señalización y detección de estrés, disponibilidad de nutrientes, actividad metabólica y cambios ambientales (Yang y Klionsky, 2010; Zhang, 2015; Aroca y *col.*, 2022). En animales se han diferenciado tres tipos de autofagia: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y la más estudiada, macroautofagia (Zhang, 2013). En plantas, además de micro y macroautofagia, se ha nombrado megaautofagia al proceso extremo que ocurre en la muerte celular programada durante el desarrollo y ataque de patógenos, cuando el tonoplasto libera hidrolasas en el citoplasma después de su descomposición (Marshall y Vierstra, 2018). Durante la macroautofagia, las vesículas especializadas de doble membrana, denominadas autofagosomas, se unen a compartimentos líticos como lisosomas en sistemas animales o vacuolas en vegetales para su degradación hidrolítica (Üstun y *col.*, 2017). En plantas, los autofagosomas se producen *de novo* y la membrana externa se fusiona con el tonoplasto, generando una vesícula autofágica de membrana única en el lumen de la vacuola (Marion y *col.*, 2018). Por otro lado, los autofagosomas pueden adquirir enzimas hidrolíticas de la vacuola generando vesículas similares a los llamados autolisosomas en animales (Takatsuka y *col.*, 2011). Tanto en células animales como vegetales, la autofagia implica varias proteínas específicas conservadas denominadas ATG (*autophagy-related*), que forman complejos y en última instancia, generan el autofagosoma de doble membrana (Marion y *col.*, 2018), por lo que orquestan el secuestro de la carga, la formación de los autofagosomas y la degradación de los componentes secuestrados, si bien no todas las proteínas que se han descrito en animales o levadura se han encontrado en vegetales. En levadura, las proteínas ATG se dividen en cuatro complejos proteicos, que incluyen el complejo ATG1 asociado a ATG13 y ATG17 que forman un complejo junto con ATG29 y ATG31 implicado en la iniciación de la autofagia; la proteína transmembrana del núcleo ATG9 con

ATG2/ATG18 para la nucleación y expansión fagóforo, el complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) para la decoración del fagóforo, y los sistemas de conjugación ATG8/12 para la maduración de los autofagosomas (Tang y Bassham, 2018) (Fig. 13). En plantas, se han descrito cuatro homólogos de ATG1 y dos de ATG13, pero no se han identificado homólogos de ATG17, ATG29 ni ATG31. Además, en la regulación de la autofagia, se describió inicialmente en levadura y posteriormente en mamíferos, una proteína quinasa PI3K denominada TOR (del inglés *Target Of Rapamycin*) implicada en la inducción de crecimiento y desarrollo y que se inhibe en situaciones de estrés como ayuno de nutrientes. TOR regula negativamente a la autofagia a través de la hiperfosforilación de ATG13, lo que inhibe la formación del complejo ATG1/ATG13 y por tanto la actividad de ATG1 necesaria para la iniciación del proceso (revisado por Yoshimoto y Ohsumi, 2018). En plantas también existe una proteína homóloga a TOR activada por nutrientes y promotora de procesos de consumo energético como la división celular, translación de ARNm y anabolismo en tiempos de abundancia, así como represora de remobilización de nutrientes a través de la inhibición de la autofagia (revisado por Dobrenel y *col.*, 2016), si bien la diana de TOR en el inicio de la autofagia aún no está establecida.

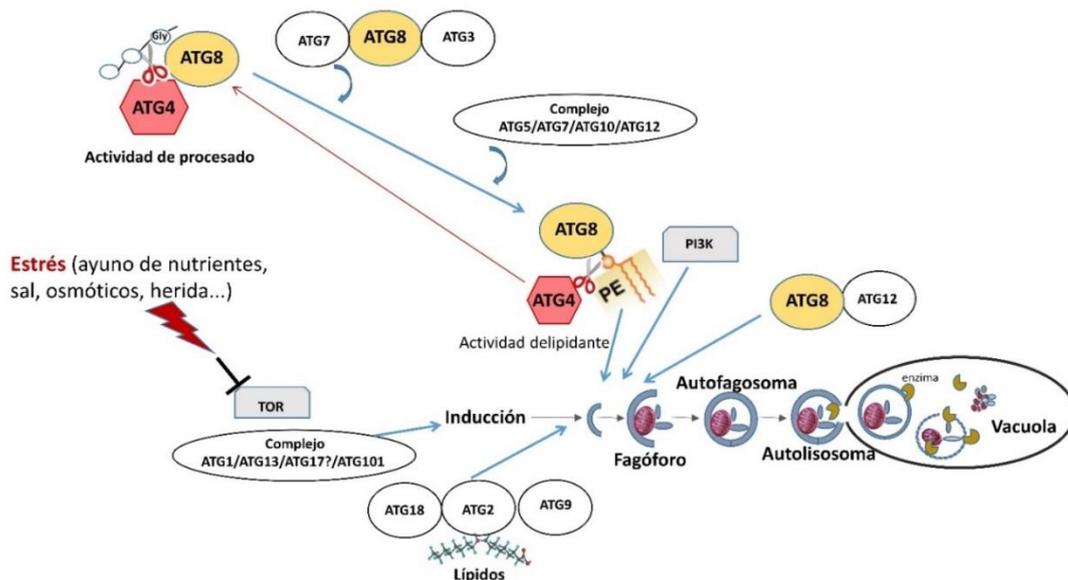


Figura 13. Iniciación y progreso de la autofagia en plantas. Esquema simplificado de la participación de distintas proteínas de autofagia como TOR (diana de rapamicina), complejos ATGs (proteínas de autofagia) y PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) en la iniciación, formación y maduración del fagóforo y posterior unión a vacuola para su degradación. En color se presentan las 2 proteínas ATGs objeto de estudio más detallado en esta Tesis Doctoral. PE: fosfatidiletanolamina.

Entre las proteínas ATG centrales y que serán objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, se encuentra la ATG8 que juega un papel clave porque se incorpora a las membranas de los autofagosomas en formación, se dirige al compartimento lítico y se degrada junto con la carga, lo que la convierte en una herramienta ideal para el seguimiento de la actividad autofágica (Klionsky y *col.*, 2016). La ATG8 es una proteína similar a ubiquitina descrita inicialmente en levadura homóloga a las posteriormente descritas LC3 y GABARAP de sistemas animales, habiéndose descrito en humanos siete proteínas ATG8 (revisado por Martens y *col.*, 2020). En plantas como *A. thaliana* hay incluso más: nueve ATG8 (Kellner y *col.*, 2017). Esta proteína se asocia con la membrana del autofosoma por unión covalente a fosfatidiletanolamina (PE) en un residuo de glicina expuesto en su extremo C (carboxilo) terminal. Antes de la conjugación de ATG8 y PE, una interesante proteína (objeto también de estudio en esta Tesis Doctoral) es la única proteasa entre las ATGs: la cisteína proteasa ATG4 que procesa el extremo C de ATG8 naciente para exponer el residuo de glicina conservado (en la denominada actividad de procesamiento de ATG4 que se usará para cuantificarla tanto en experimentos *in vitro* con proteínas recombinantes como *in vivo* en extractos celulares). Después de este proceso, ATG8 se activa a través de la enzima similar a E1 conjugadora de ubiquitina, ATG7, y la enzima similar a E2, ATG3, para finalmente conjugarse con PE. Interesantemente, ATG4 tiene una doble actividad ya que participa nuevamente con una actividad desconjugante que escinde el residuo PE de ATG8, permitiendo así el reciclaje de esta última proteína (Yu y *col.*, 2012) (Fig. 13).

La información genética de *ATGs* revelada por el análisis *in silico* de los genomas de plantas y algas verdes disponibles, ha identificado un gran número de genes *ATG4* y *ATG8* que se conservan entre los diferentes linajes. Mientras que *Chlamydomonas reinhardtii* presenta un gen *ATG4* y un gen *ATG8*, *A. thaliana* presenta dos *ATG4* y nueve *ATG8* y *Nicotiana tabacum* un gen *ATG4* y doce *ATG8* (Zhou y *col.*, 2015; Seo y *col.*, 2016; Kellner y *col.*, 2017). Concretamente, la proteína ATG8 se ha expandido y diversificado enormemente en plantas en agrupaciones (*clusters*) bien delimitados específicos en determinadas familias vegetales, lo que podría facilitar la conexión entre distintas vías de autofagia y colaborar en la plasticidad necesaria para la planta dado su carácter sésil (revisado por Kellner y *col.*, 2017).

La autofagia, como proceso de reciclaje y reutilización de componentes celulares, se encuentra regulada por segundos mensajeros, proteínas quinasas, fitohormonas, y

componentes transcripcionales y epigenéticos (revisado por Cao y col., 2021). Entre los segundos mensajeros se encuentran ROS, RNS, Ca^{2+} y los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. Relativo a ROS, éstos pueden modular la autofagia afectando a factores iniciales, componentes proteicos o a genes del proceso. En sistemas animales, se ha descrito que el estrés oxidativo inhibe la vía de degradación de proteínas y la maduración del autolisosoma, provocando la apoptosis en células del neuroblastoma, e interesantemente se ha establecido que el sistema tiorredoxina desempeña un papel central en la inhibición de la apoptosis en las células cancerosas humanas (Shao y col., 2015). Además, se ha sugerido un papel para TRX y tiorredoxina reductasa (TR) en el inicio de la autofagia. Se sabe que este sistema está implicado en la autofagia protectora temprana, mientras que su deficiencia promueve la apoptosis, situación que puede evitarse utilizando N-acetilcisteína, promoviendo la viabilidad celular (Nagakannan y col., 2016). TR también participa en la estabilidad del componente clave en el proceso de autofagia TOR (Picazo y col., 2018). Además, en plantas se ha descrito que las señales redox modulan directamente a quinasas implicadas en el proceso autofágico como AtKIN10 regulada en una de sus Cys (C200) que al estar oxidada inactiva a la proteína, si bien este residuo no está implicado en oligomerización (un proceso que suele provocar inactivación), por lo que el mecanismo de inhibición se desconoce (Wurzinger y col., 2017).

La ATG4 es la única proteína entre las ATGs para la que se ha descrito una regulación por oxidación-reducción y específicamente, su modulación por tiorredoxina se ha demostrado en *Chlamydomonas* y *Sacharomyces cerevisiae* (Pérez-Pérez y col., 2014, 2016), pero no en plantas. Como ya hemos descrito, entre las TRXs, PsTRXo1 se encuentra en las mitocondrias y el núcleo de las hojas de guisante (Martí y col., 2009) y participa en la respuesta al estrés oxidativo inducido en situaciones adversas, como salinidad, altas temperaturas, sequía y tratamiento con H_2O_2 , ejerciendo su función sobre proteínas diana específicas en ambos compartimentos (Barranco-Medina y col., 2007; Martí y col., 2011; Calderón y col., 2017a, 2018a; Da Fonseca-Pereira y col., 2019; Martí y col., 2020). Relativo a esta proteína TRXo1 y como antecedentes de esta Tesis Doctoral, comentar que en trabajos anteriores nuestro grupo de investigación describió la participación de PsTRXo1 en la respuesta al estrés oxidativo inducido por H_2O_2 en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2* (BY-2) que la sobreexpresaban (OEX). Interesantemente, las líneas OEX mantuvieron un mayor nivel

de viabilidad celular que las células que no sobreexpresaban tras el tratamiento oxidativo. En esta situación, describimos una muerte celular retardada (PCD, del inglés *Programme Cell Death*) en las células OEX, que presentaban además, un sistema antioxidante activo y menor estrés oxidativo asociado, así como un mantenimiento de la homeostasis redox colaborando con TRXo1 en la resistencia mostrada al H₂O₂ (Ortiz-Espín y col., 2015; Calderón y col., 2017a) (esquemático en Fig. 14).

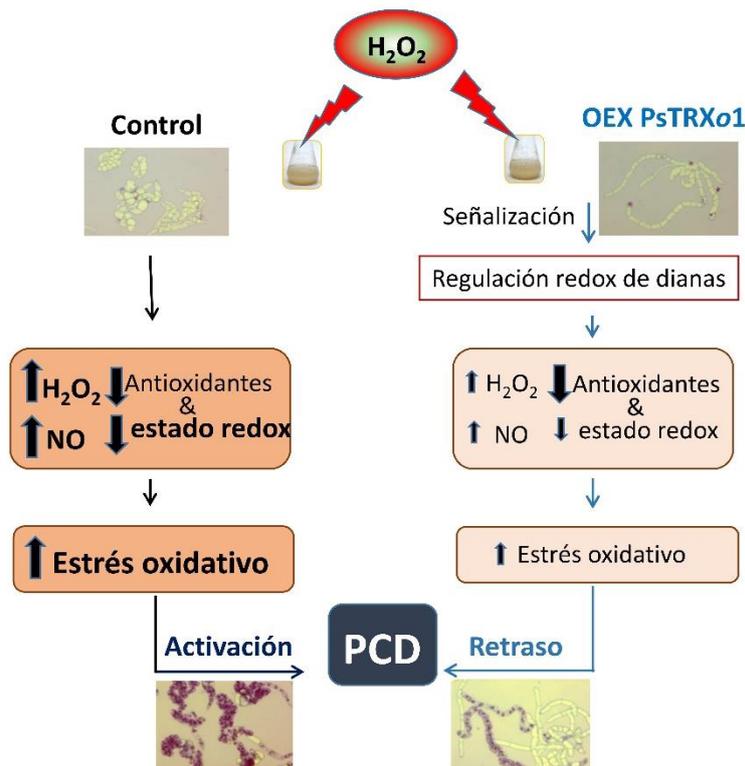


Figura 14. Efecto del tratamiento oxidativo en células TBV-2. Esquema comparativo de los cambios inducidos por el tratamiento con 35 mM H₂O₂ de células TBV-2 control (no sobreexpresante) y sobreexpresante *Pstrxo1* (OEX) descritos por Ortiz-Espín y col. (2015). Se midieron distintos componentes del sistema antioxidante celular (ascorbato y glutatión y su estado redox, enzimas catalasa y ascorbato peroxidasa), niveles de H₂O₂ y NO, parámetros de estrés oxidativo (peroxidación lipídica y carbonil proteínas) y muerte celular programada (PCD).

En este escenario, planteamos en esta Tesis Doctoral la hipótesis de la posible participación de un proceso de reciclaje como la autofagia en la viabilidad aumentada observada en las células sobreexpresantes, en el que además la TRXo1 pudiera ejercer una regulación a través de su acción sobre dianas como ATG4 al igual que en *Chlamydomonas* y levadura. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito que en sistemas

animales tratamientos farmacológicos extienden la vida a través de la activación de autofagia, por lo que este proceso se presenta como una diana prometedor para modular la longevidad (revisado por Nakamura y Yoshimori, 2018). En plantas, la autofagia participa en la promoción de la viabilidad durante el estrés biótico y abiótico (Avin-Wittenberg, 2019), aunque este proceso también influye en la promoción de la muerte celular programada (PCD) en cebada durante la embriogénesis de microesporas y estrés biótico (Bárány y *col.*, 2018). Esto indicaría una función dual de autofagia bien como promotora de supervivencia o bien de muerte celular dependiente del tipo de estrés, órgano de la planta y etapa de desarrollo (Lenz y *col.*, 2011). En esta Tesis, se analiza por tanto la posible existencia de un proceso autofágico promotor de la supervivencia en las células de tabaco sobreexpresantes de PsTRXo1 como respuesta a un tratamiento por H₂O₂, así como la posible regulación redox por TRXo1 de una nueva diana en plantas como sería ATG4, proteína clave en este proceso de reciclaje celular (Fig. 15).

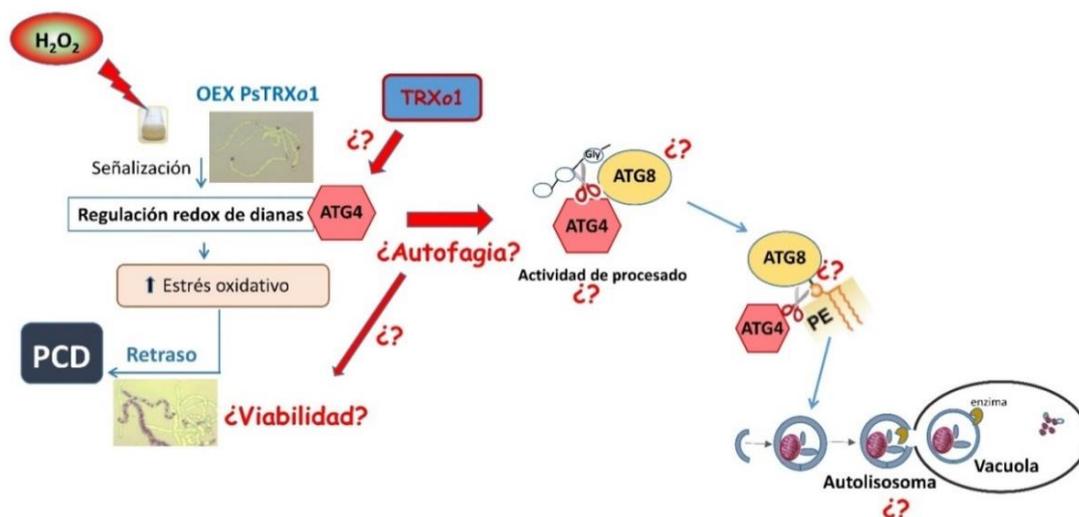


Figura 15. Proceso autofágico en células TBY-2 en respuesta a un tratamiento oxidativo, su posible relación con viabilidad celular e implicación de TRXo1 en el mismo a través de la regulación de ATG4. Los interrogantes indican los marcadores y procesos que se analizarán.

3.2.2. PYR1: Percepción de ABA

El ácido abscísico (ABA) es una hormona vegetal que desempeña funciones reguladoras clave en las vías fisiológicas relacionadas con el crecimiento y el desarrollo de las plantas, como la maduración y la latencia de las semillas, desarrollo del embrión, elongación de la raíz, entre otros, y permite la adaptación de los tejidos vegetativos al

estrés abiótico, como el estrés hídrico y salino (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Cutler *y col.*, 2010). Un efecto notorio del ABA es la promoción del cierre estomático en las células guarda, que está mediado por el flujo de solutos y que resulta fundamental en la respuesta de plantas en situaciones de déficit hídrico. Esta fitohormona regula la expresión de muchos genes, que a su vez pueden regular funciones relacionadas con la tolerancia a la deshidratación tanto en tejidos vegetativos como en semillas. Desde el descubrimiento del ABA (Liu y Carns, 1961), aunque se ha avanzado en el aislamiento y caracterización de varias proteínas clave que funcionan en la red de señalización descendente, se sabe poco sobre los mecanismos de reconocimiento o percepción de la hormona llevado a cabo por proteínas receptoras (Shibata *y col.*, 2010). Así, un aumento en el contenido endógeno de ABA es percibido por receptores específicos de la familia PYR (*PYrabactin Resistance1*)/PYL (*PYR1-like*)/RCAR (*Regulatory Component of ABA Receptor 1*) (Ma *y col.*, 2009; Nishimura *y col.*, 2010; Park *y col.*, 2009) que están acoplados a una cascada de fosforilación dirigida a la expresión de genes que codifican factores de transcripción y canales iónicos que van a dirigir la respuesta. Concretamente, la señalización del ABA se orquesta en las plantas a través de un módulo central que comprende además de estos receptores específicos, a las fosfatasa de tipo 2C (PP2C) y quinasas de la familia de la proteína quinasa 2 relacionada con la subfamilia 2 no fermentadora de sacarosa (SnRK2), además de factores de transcripción (TF del inglés, *Transcription Factor*) y canales iónicos que colaboran en la respuesta (Fujii *y col.*, 2009) (Fig. 16).

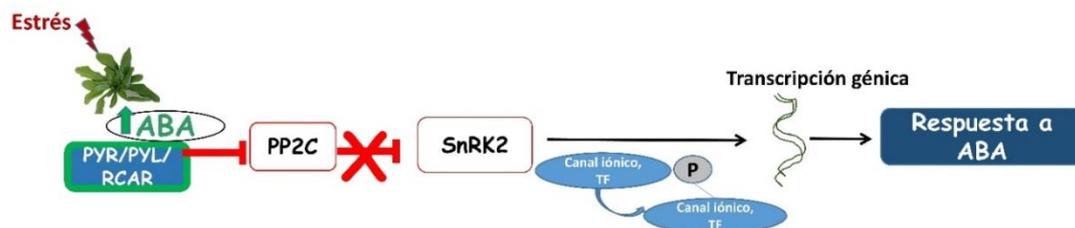


Figura 16. Ruta de señalización de ABA. Ante un aumento de ABA se induce una cascada de señalización donde ABA es percibido por la familia PYR/PYL/RCAR que une a fosfatasas PP2C y libera a éstas de su unión con quinasas SnRK2, pudiendo entonces estas últimas actuar fosforilando canales iónicos y factores de transcripción (TF) implicados en transcripción génica de componentes necesarios para la respuesta a la hormona.

La familia de fosfatasas PP2Cs, que son los principales reguladores negativos de la señalización de ABA, se subdividen en once clases en arroz y *A. thaliana* (Singh *y col.*,

2018) y actúan como inhibidores de MAPK (Fuchs y *col.*, 2013). Las PP2C de *A. thaliana* como ABI1 y ABI2 (insensibles al ABA) y HAB1, HAB2 (hipersensibles al ABA) regulan negativamente la respuesta al ABA (Bheri y Pandey, 2019), inhibiendo la actividad quinasa de tres SnRK2 (Cutler y *col.*, 2010) que se requieren para fosforilar factores de transcripción y canales iónicos que propagan la señalización aguas abajo a través de eventos transcripcionales y no transcripcionales necesarios para producir la respuesta a la hormona.

Los avances recientes y las tendencias emergentes en la señalización de hormonas vegetales se centran en la comprensión de proteínas clave como los receptores a nivel molecular y estructural. Las proteínas PYR/PYL/RCAR de *A. thaliana* forman la familia denominada START que contiene catorce miembros que se clasifican en tres subfamilias (I-III), estando PYR1 situado entre las que constituyen la familia III tras datos obtenidos de su purificación, cristalización y rayos X en presencia de ácido (+)-abscísico (Shibata y *col.*, 2010). Se ha descrito que la afinidad por el ABA puede ser diferente para los miembros de las distintas subfamilias, lo que podría proporcionar la base molecular para una variedad de respuestas de las plantas a diferentes niveles de ABA (Finkelstein y Gibson, 2002; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006). Por otro lado, los receptores en *A. thaliana* se pueden clasificar también en dos clases según formen monómeros o dímeros. PYR1 como PYL1 y PYL2 son cis-homodímeros mientras que PYL3 también forma un trans-homodímero intermedio (Zhang y *col.*, 2012). Tras la unión a ABA, estos receptores se separan ligeramente creando una superficie de unión para PP2Cs y los dímeros PYL se disocian y forman un heterodímero PYL/PP2C, liberando la inhibición de SnRK2 mediada por PP2C (Fujii y *col.*, 2009; Melcher y *col.*, 2009; Zhang y *col.*, 2012; Yang y *col.*, 2021). Sin embargo, el mecanismo exacto, la importancia de la oligomerización en la actividad PYR/PYL y la implicación de la regulación redox en estos receptores de ABA no han sido dilucidados. En este sentido, la modificación postraducciona (PTM) de varios componentes de la vía de señalización del ABA está emergiendo como un punto clave de control, y junto con la *S*-nitrosilación, *S*-persulfuración, Tyr-nitración y ubiquitinación, se ha descrito la regulación redox para algunos miembros de la familia PP2C como ABI1 y ABI2 (Meinhard y Grill, 2001; Meinhard y *col.*, 2002; León, 2022) pero no para los receptores PYR/PYL. Curiosamente, se ha descrito la *S*-nitrosilación y *S*-persulfuración de PYR1, así como de algunas fosfatasa y quinasas (Aroca y *col.*,

2017, 2021), lo que sugiere que la regulación redox sobre residuos de Cys podría ser un mecanismo de control para la señalización del ABA (Lozano-Juste y León, 2010). De hecho, las modificaciones en enzimas que contienen tioles (-SH) se describen como reguladores de su estructura, localización celular y funcionalidad, estando así involucradas en la percepción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS, RNS) especialmente bajo situaciones de estrés (revisado por Lázaro y *col.*, 2013; Camejo y *col.*, 2015; Sevilla y *col.*, 2015a; Martí y *col.*, 2020).

Los antecedentes del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral que señalan la implicación de la regulación redox en las vías de señalización por ABA a través de la modulación de su receptor PYR1 por TRX fueron obtenidos en nuestro grupo en el transcurso de la Tesis del Dr. Antonio Sánchez Guerrero. Así, se describió al receptor de ABA PYR1 como una nueva diana de TRX α 1 en el núcleo, demostrando la interacción de ambas proteínas mediante diferentes técnicas como Cromatografía de afinidad, *Dot blot*, co-inmunoprecipitación y ensayos de complementación por bifluorescencia. Estudios de oxidación-reducción de HisAtPYR1 recombinante mostraron que la función de la proteína ejercida sobre la fosfatasa HAB1 sufría una regulación redox que implicaba una inactivación por oxidación con H₂O₂ reversible por reducción con DTT e interesantemente por TRX α 1 recombinante, si bien el mecanismo por el que TRX α 1 era capaz de ejercer su función se desconocía. Además, se realizaron estudios *in vivo* analizando la respuesta a ABA en procesos como germinación, deshidratación y cierre estomático de un mutante KO y un sobreexpresante *Attrx α 1*, encontrando alterada su respuesta comparándola a la de plantas silvestres WT. Así, se sugirió entonces la existencia de una nueva regulación redox de PYR1 posiblemente mediada por TRX α 1 que podría ser relevante para la señalización por ABA. Por tanto, quedaba por profundizar en el posible mecanismo de acción de TRX α 1 sobre PYR1 enfocado hacia la actividad reductora de puentes disulfuro y procesos de oligomerización por oxidación, que se planteó como otro de los Objetivos de la presente Tesis Doctoral (Fig. 17).

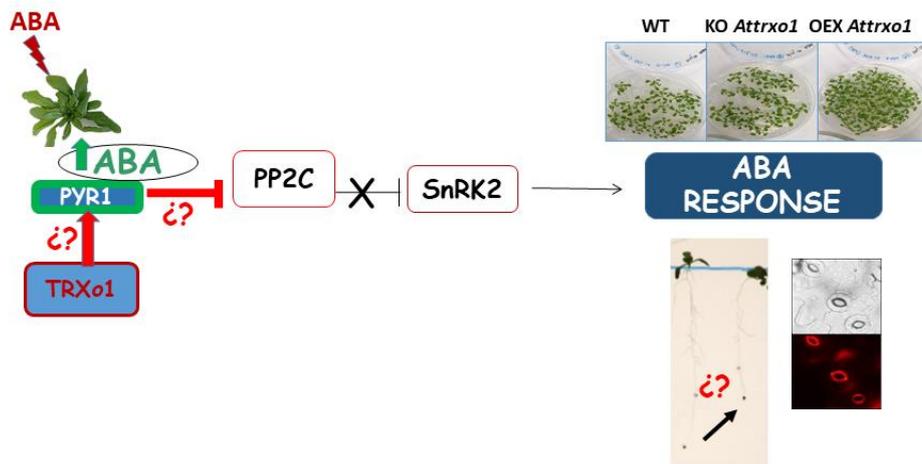


Figura 17. Regulación redox de PYR1 mediada por TRXo1 y su implicación en procesos dependientes de ABA como son el crecimiento de raíz y el cierre estomático, analizados en mutantes KO y sobreexpresantes (OEX) *Attrxo1*. Los interrogantes señalan los procesos en los que se analizará la función de TRXo1.

3.4. Papel de TRX en persulfuración en condiciones salinas

El estrés salino es uno de los estreses abióticos más importantes en regiones como la de Murcia, donde convergen condiciones de alta temperatura y baja pluviometría provocando salinización de suelos y aguas de riego. Esta situación se encuentra agravada en los últimos años por el aumento de la frecuencia y la intensidad de dichos estreses como resultado del calentamiento global y el cambio climático. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene comprender los mecanismos que aumentan la resistencia y adaptación de las plantas a estas condiciones de estrés. Como ya se ha comentado, un componente asociado al estrés abiótico es el estrés oxidativo generado por el incremento en ROS que afecta el estado de óxido-reducción de proteínas implicada en distintas rutas metabólicas, modificando así las distintas vías de señalización y transducción de la señal de estrés. En nuestro grupo de investigación del CEBAS, venimos trabajando en las últimas décadas en el campo del estrés oxidativo en plantas en situaciones de estrés ambiental como el salino, y concretamente en el papel que ejerce TRXo1 en la respuesta adaptativa. Así, el análisis de mutantes KO *Attrxo1* crecidos en condiciones salinas ha permitido implicarla entre otros, en procesos como la eliminación de ROS, respiración mitocondrial, metabolismo del carbono, crecimiento, germinación o desarrollo y apertura estomática (Martí y *col.*, 2009, 2011; Ortíz-Espín y *col.*, 2017; Calderón y *col.*, 2018a; Sánchez-Guerrero y *col.*, 2019, 2021).

Como un aspecto relacionado con la modulación de la vía de señalización por ABA en situaciones de estrés, nos gustaría destacar la regulación postraduccional ejercida por la persulfuración y su efecto sobre ciertos componentes de dicha vía, así como su posible dependencia del sistema redox TRX. Esta vía de regulación, supondría otro punto de control de la respuesta de plantas a estrés oxidativo en situaciones como la salinidad. A diferencia de lo que ocurre con las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, cuyo papel en la señalización celular y en diversos procesos fisiológicos ha sido ampliamente estudiado, la implicación de las especies reactivas del sulfuro (RSS) en la homeostasis redox celular, su metabolismo tanto en animales y en plantas y la señalización, han comenzado a atraer la atención científica en la última década (Paulsen y Carrol, 2013). Como ya se ha descrito anteriormente, H₂S ejerce su capacidad señalizadora a través de la persulfuración de grupos tiólicos siendo los efectos muy diversos: en animales enzimas como Mn-SOD sufren persulfuración para protegerse de la sobreoxidación, si bien ésta no afecta su actividad. En otros casos, la persulfuración inhibe la actividad enzimática como la de gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa o adenilato quinasa en eritrocitos o citocromo c oxidasa en mitocondrias. Por el contrario, esta modificación postraduccional incrementa la actividad de proteínas como gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa o actina (revisado en Mishanina y *col.*, 2015; Aroca y *col.*, 2021b). En plantas, en los últimos años se ha descrito que tratamientos con H₂S aumentan el crecimiento y el vigor, y por otro lado, alivian y protegen frente a diferentes estreses abióticos, jugando un papel en sequía y en salinidad como componente de la señalización por ácido abscísico (ABA) en las células guarda estomáticas (Doodley y *col.*, 2013; Scuffi y *col.*, 2014; Aroca y *col.*, 2015). También, se ha descrito que juega un papel en procesos de autofagia regulándola negativamente (Álvarez y *col.*, 2012). Esta modificación se ha descrito que incrementa bajo estrés oxidativo y se ha postulado como un mecanismo de defensa frente al daño oxidativo evitando la formación de la forma sobreoxidada -SO₂H o la irreversible -SO₃H. Como mecanismo de señalización, la persulfuración de proteínas debe ser controlada y en este sentido, interesantemente, se ha propuesto al sistema redox tiorredoxina (TRX) como regulador del proceso en sistemas animales (TRX humana, tiorredoxina reductasa (TR) y NADPH), siendo la TRX diez veces más reactiva sobre la Cys persulfurada que sobre la Cys oxidada, pudiendo por tanto eliminar la persulfuración con la consiguiente liberación de H₂S (Yadav y *col.*, 2020). También bajo estrés oxidativo persistente, las

formas sobreoxidadas de persulfuros pueden ser revertidas a tioles por TRX y GSH en sistemas animales (Dóka y col., 2020) (Fig. 18).

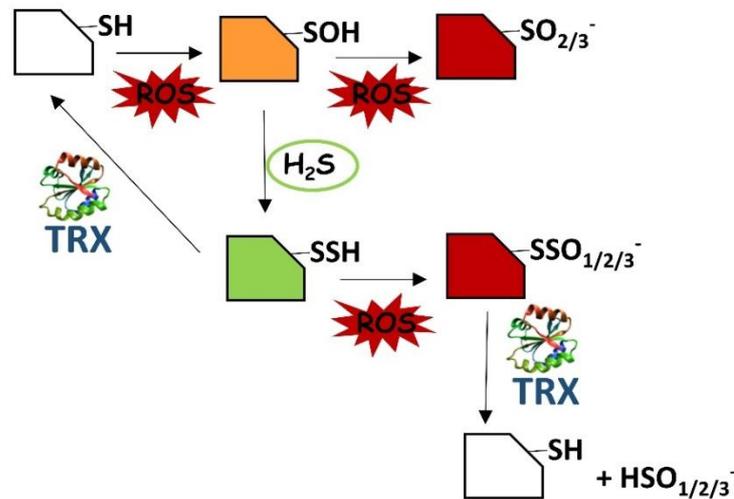


Figura 18. Persulfuración proteica y su posible papel protector en sobreoxidación. H₂S produce persulfuración (-SSH) de grupos de Cys evitando la sobreoxidación. Las proteínas persulfuradas pueden sufrir sucesivas oxidaciones por ROS y TRX podría estar encargada de revertirlas a formas tiólicas (-SH). Modificada de Filipovic y Jovanovic (2017).

Por otro lado, en plantas se han realizado algunos trabajos de identificación de dianas de persulfuración encontrando entre ellas a varias proteínas mitocondriales implicadas entre otros procesos en la síntesis de ATP, respiración, función chaperona, síntesis proteica y a todas las enzimas del ciclo TCA y fotorrespiración, así como proteínas de autofagia a las que regula negativamente (Álvarez y col., 2012; Aroca y col., 2015; Scuffi y col., 2014). Interesantemente, se han identificado como persulfuradas la propia TRX_{o1} y algunas de sus dianas descritas en mitocondrias como la subunidad α de ATP sintasa tiosulfato-3-mercaptopiruvato sulfotransferasa, el factor de elongación Tu y la PRXII (Martí y col., 2009), implicando que la TRX_{o1} mitocondrial podría tener un papel en la persulfuración proteica tal y como se ha descrito para otras TRXs (Filipovic y Jovanović, 2017). Así mismo, se ha descrito a PYR1 como proteína persulfurada en *A. thaliana* (Aroca y col., 2017), pudiendo entonces hipotetizar que la TRX_{o1} nuclear podría estar implicada también en este proceso. Hasta nuestro conocimiento, hay muy poca información sobre el efecto de la persulfuración en la actividad de las enzimas mitocondriales, siendo esta información mucho más escasa en las de proteínas nucleares. Con estos antecedentes y como otro Objetivo, pretendemos iniciar en esta

Tesis Doctoral un estudio sobre la posible participación de *TRXo1* en procesos de persulfuración, analizando mutantes KO y sobreexpresantes OEX *Attrxo1* comparados con plantas silvestres WT crecidas en condiciones salinas posiblemente inductoras de esta PTM. Así, trataremos de identificar inicialmente dianas de persulfuración relacionadas con *TRXo1* con localización mitocondrial, vista la importancia que se le ha dado a este orgánulo en la señalización por persulfuros (R-SSH) (Fig. 19). Este estudio ampliará el espectro de actuación de nuestra proteína de interés *TRXo1*, permitiéndonos adquirir nuevo conocimiento sobre la regulación de la respuesta a estrés salino, en el que sabemos que esta proteína ejerce una importante función a través de procesos de regulación postraduccional redox de proteínas clave, incluyendo la S-nitrosilación y S-glutationilación, en el que están implicadas también peroxirredoxina y sulfirredoxina (Camejo y col., 2013, 2015; Calderón y col., 2017b).

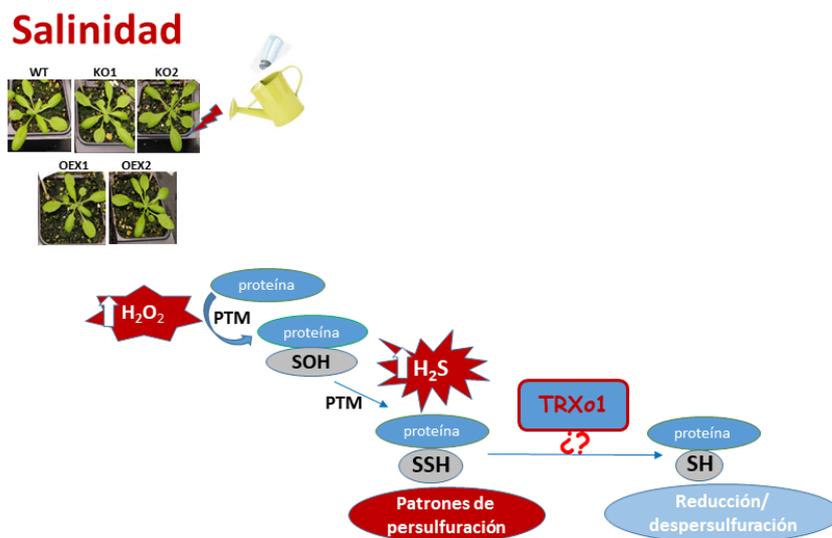


Figura 19. Estudio de patrones de persulfuración proteica en mutantes KO y sobreexpresantes OEX *Attrxo1* crecidos en condiciones de salinidad. Se señala con interrogantes el posible papel de *TRXo1* a estudiar en esta Tesis Doctoral.

3.5. Obtención de dobles mutantes *trxo1/ntrb*

Las tiorredoxinas, tal y como se ha comentado anteriormente, forman parte de una familia génica con numerosos miembros, y esta diversidad indica o bien un alto nivel de redundancia o una alta especialización funcional. Se ha descrito que la redundancia génica confiere una ventaja evitando los efectos deletéreos de mutaciones puntuales en genes únicos (Reicheld y col., 2009). Además, la redundancia tiene otra vertiente positiva y es que permite a la planta generar una alta respuesta específica en cada

situación y proceso celular, pero también una desventaja a la hora de su estudio funcional, ya que para manifestar un fenotipo a veces es necesario la obtención de mutantes múltiples de diferentes isoformas, Como ejemplo, destacar la generación de cuádruples mutantes de los receptores de ABA PYR/PYL *Atpyr/pyl1/pyl2/pyl4* para manifestar una hiposensibilidad a la hormona durante la germinación o triple mutante de fosfatasas *Athab1/abi1/pp2ca* para manifestar hipersensibilidad (Park y col., 2009; Rubio y col., 2009). También, se han generado mutantes duodécuplos *pyr1/pyl1/2/3/4/5/7/8/9/10/11/12* extremadamente sensibles en germinación, crecimiento de plántula, cierre estomático, senescencia foliar y expresión génica (Zhao y col., 2018) que han puesto de manifiesto el papel del ABA basal en estos procesos.

Dado que los mutantes simples de *Attrxol* no muestran fenotipos acusados comparados a plantas silvestres WT, al igual que ocurre con mutantes simples *Atntrb*, en esta Tesis Doctoral nos propusimos la generación de dobles mutantes *trxol/ntrb*, y para ello utilizamos dos estrategias: una en plantas de guisante por técnicas de silenciamiento génico transitorio inducido por virus (VIGS, *Virus-Induced Gene Silencing*) en colaboración con el Dr. Luis Cañas (IBMCP, Valencia), experto en esta técnica, y otra por cruzamientos de mutantes simples de *A. thaliana* KO *Attrxol* y *Atntrb* (Fig. 20).

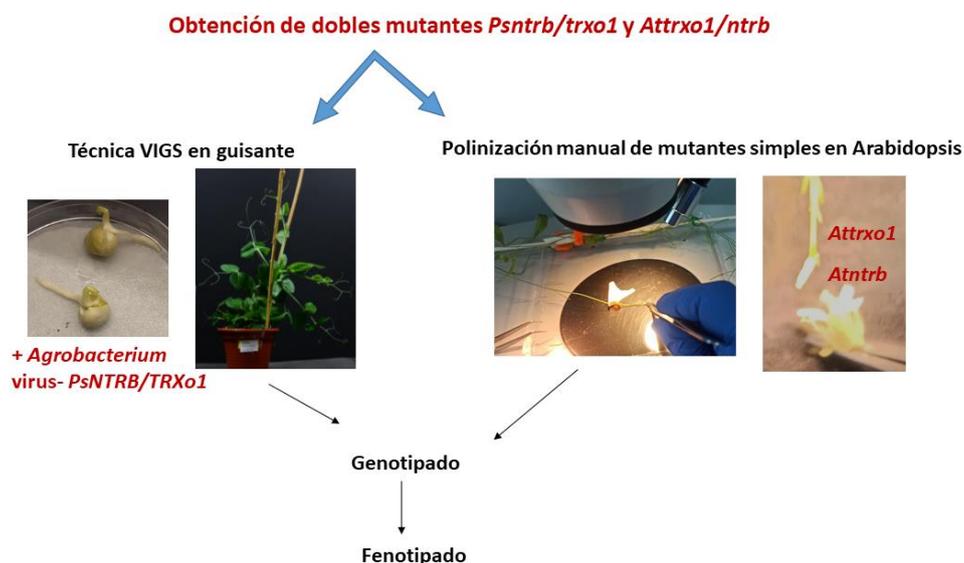


Figura 20. Obtención de dobles mutantes *Psntrb/trxo1* y *Attrxol/ntrb* por técnicas VIGS y cruzamiento de mutantes simples, respectivamente.

VIGS es una tecnología que explota los mecanismos naturales de defensa antivirales mediados por ARN que contienen las plantas. En las plantas infectadas con virus sin

modificar, el mecanismo va dirigido específicamente contra el genoma viral. Sin embargo, cuando estos vectores virales son modificados para que contengan insertos derivados de genes huéspedes, el proceso puede ser adicionalmente dirigido contra los ARNm correspondientes (Lu y *col.*, 2003). Esta técnica tiene sin embargo un condicionante y es que además de ser transitoria la transformación, el silenciamiento no se produce en todas las células por igual, y por tanto, es necesario tener un fenotipo visible o detectable para saber qué tejidos están transformados. Es por ello que paralelamente nos propusimos obtener dobles mutantes en *A. thaliana* por la técnica del cruzamiento manual de los mutantes simples, como hemos comentado anteriormente.

OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación “**Estrés Abiótico, Producción y Calidad**”, perteneciente al Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) de Murcia, dentro de la línea de investigación enfocada al estudio de proteínas tiorredoxinas mitocondriales y nucleares implicadas en regulación por reducción/oxidación (redox). Concretamente, se pretende avanzar en la función celular de la tiorredoxina *o1* (PsTRX*o1* y AtTRX*o1*) localizada en ambos orgánulos celulares, en procesos vinculados a la respuesta adaptativa de plantas a condiciones ambientales adversas, a través de la regulación que ejerce sobre dianas específicas implicadas en dicha respuesta. La información de que se dispone del papel de TRX*o1* en mitocondrias la vincula al proceso respiratorio modulando la actividad de la proteína oxidasa alternativa (AOX), a proteínas del sistema redox a través de la regulación de PRXIII y a la activación por reducción y también en la desactivación de varias enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA), así como en la respuesta a estrés salino, en cooperación con sus dianas AOX y PrxIII. Por otro lado, y en núcleo, nuestro grupo de investigación ha descrito la participación de PsTRX*o1* en procesos relacionados con la respuesta a estrés abiótico, en el proceso de germinación de semillas y en muerte celular programada. Además, hemos vinculado a PsTRX*o1* con la proteína PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferación Celular) y en base a esta interacción, con el proceso de viabilidad y proliferación celular y con el ciclo celular en la respuesta al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en cultivos celulares de *Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2* (BY-2) que la sobreexpresaban (OEX).

En relación a ello, en esta Tesis Doctoral planteamos como objetivo el analizar la posible participación de un proceso de reciclaje como la autofagia, en la viabilidad aumentada que previamente describimos en las células de tabaco BY-2 sobreexpresantes de TRX*o1*, en el que además la TRX*o1* pudiera ejercer una regulación a través de su acción sobre dianas como la proteína ATG4, por similitud a lo descrito en levadura y *Chlamydomonas*.

Como resultado de una Tesis Doctoral previa a la presente, describimos la interacción proteína-proteína con el receptor de la hormona ácido abscísico (ABA), concretamente con PYR1 (*Pyrabactin resistance 1*), si bien el mecanismo por el que TRX*o1* pudiera ejercer una función reguladora de la señalización por ABA, se desconoce y ha sido uno de nuestros Objetivos de estudio en esta Tesis Doctoral.

Otro de los aspectos a analizar relacionado con los mecanismos implicados en la respuesta a estrés, está centrado en determinar la posible participación de TRXo1 en el proceso de la modificación postraducciona1 de proteínas ejercida por el sulfuro de hidrógeno (H₂S) denominado persulfuración, ya que esta modificación de cisteína en las proteínas susceptibles, está muy relacionada con la previa modificación de la misma por oxidación de los grupos tiólicos a su estado sulfénico, proceso en el que intervienen las tiorredoxinas.

Relativo a la investigación sobre la participación de TRXo1 en plantas en la respuesta adaptativa al estrés salino, comentar que su avance requiere también contar con plantas modificadas en TRXo1 que puedan ser analizadas en su respuesta diferencial a la de plantas silvestres (*wild type*; WT) no modificadas. Así, disponemos de líneas mutantes de pérdida de función (*knock out*; KO) y sobreexpresantes (OEX) *Attrxo1* que en un inicio y con algunas leves diferencias, no presentan fenotipo evidente. Por todo ello, otro de nuestros Objetivos en el grupo ha sido el de la obtención de dobles mutantes *trxo1/ntrb* que puedan presentar diferencias fenotípicas más acusadas y servirnos como herramienta para el estudio de la funcionalidad de este sistema redox localizado en mitocondrias y núcleo.

Consideramos que la investigación realizada en esta Tesis Doctoral representa un avance en el estudio funcional de la proteína TRXo1, pues nos ha permitido identificar nuevos aspectos en la regulación de procesos importantes para la adaptación de plantas a estrés.

De acuerdo con todo ello, en este trabajo de Tesis Doctoral se han propuesto los siguientes Objetivos parciales:

- **Objetivo 1:** Estudio de la existencia de un proceso autofágico en células TBY-2 como respuesta a un tratamiento oxidativo, su posible relación con viabilidad celular e implicación de *TRXo1* en el mismo a través de la regulación de ATG4.

- **Objetivo 2:** Estudio de la regulación redox de PYR1 mediada por *TRXo1* y su implicación en procesos dependientes de ABA como son el crecimiento de la raíz y el cierre estomático, analizado en mutantes KO y sobreexpresantes (OEX) *Attrxo1*.

- **Objetivo 3.** Estudio de patrones de persulfuración proteica en mutantes KO y sobreexpresantes OEX *Attrxo1* crecidos en condiciones de salinidad.

- **Objetivo 4:** Obtención de dobles mutantes *Psntrb/trxo1* y *Attrxo1/ntrb* por técnicas VIGS y cruzamiento de mutantes simples, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material vegetal

Las experiencias de esta Tesis Doctoral se han realizado utilizando como material vegetal suspensiones de células de tabaco BY-2 (TBY-2, *Tobacco Bright Yellow-2*), plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia (*A. thaliana* Col-0) y plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Bonneville).

1.1 Células de tabaco BY-2

En el laboratorio, contamos con dos líneas estables de sobreexpresión de *PsTRXo1* a partir de células de tabaco derivadas de *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* (TBY-2). Las suspensiones de células de los genotipos silvestre transformado con la proteína marcadora GFP (*Green Fluorescent Protein*; línea A, control), línea OEX1 (B, sobreexpresante del gen *PsTRXo1*) y línea OEX2 (C, sobreexpresante de *PsTRXo1*) fueron obtenidas tal y como se describe en Ortiz-Espín y col. (2015). Las tres líneas cuentan con la proteína GFP como control de transformación.

1.1.1. Condiciones de cultivo

La propagación de las líneas celulares se mantuvo rutinariamente cada semana por subcultivo en proporción 4:100 (v/v) cuando se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento. Se preparó medio líquido fresco MS (Murashige y Skoog) con sales básicas (4,4 g/L MS; *Duchefa Biochemie*) suplementado con 0,1 mg/mL tiamina, 0,2 mg/mL 2,4-D, 0,02 mg/mL KH_2PO_4 , 3% sacarosa (p/v), 1% mioinositol (v/v), a pH 5,8, esterilizado a 121°C durante 20 minutos. Para mantener el crecimiento celular, se utilizó un incubador (*Panasonic*) a 26°C y oscuridad y agitación orbital a 120 rpm (*Elmi*).

1.1.2. Comprobación de la transformación de células TBY-2 con *PsTRXo1*

Para comprobar la estabilidad de la transformación en los cultivos celulares TBY-2, se midió la expresión génica de *PsTRXo1* mediante RT-PCR como se describe posteriormente en la Sección 3.5.6.1. Asimismo, mediante Microscopía de fluorescencia usando un microscopio *Leica* DM6 equipado con óptica *Nomarski* y cámara digital Hamamatsu C11440, se pudo comprobar la transformación visualizando a la proteína GFP, tanto en los callos celulares como en los cultivos establecidos desde los mismos, cuyo gen había sido fusionado junto al de la proteína *PsTRXo1* (*PsTRXo1-GFP*) (Ortiz-Espín y col., 2015).

1.1.3. Viabilidad celular

Previamente a la realización de los ensayos con las líneas celulares fue necesario comprobar su estado. Para ello, se midió la viabilidad celular utilizando la tinción con azul de tripán (*Gilco*). Este colorante solo es capaz de penetrar dentro de las células cuando presentan las membranas dañadas, y por tanto sirve como indicativo de muerte celular (Ortiz-Espín y *col.*, 2015). Para las medidas, se transfirió en una relación 1:1 (v/v) una alícuota de suspensión celular a un microtubo que contenía una solución de azul de tripán y la mezcla se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, se transfirieron 50 μ L de la mezcla a un portaobjetos y se contaron las células en un microscopio *Leica DM6*. Se calculó la viabilidad celular como el porcentaje de células que no se tiñeron (células vivas) sobre el total (sumatoria de células viables (sin tinción) y no viables (teñidas de azul)). Para cada muestra, se observaron 5.000 células y se realizaron cuatro experimentos independientes.

1.1.4. Peso fresco

Se realizaron curvas de crecimiento de las diferentes líneas celulares cuantificando el peso fresco a intervalos diarios de las células en 100 mL de cultivo de al menos tres réplicas. Para ello las suspensiones celulares se filtraron por un *Kitasato* a través de papel de filtro *WhatmanTM 3M* acoplado a un embudo de vacío.

1.1.5. Tratamiento con peróxido de hidrógeno

Las células de tabaco BY-2 de las tres líneas en el día 5 de crecimiento (fase exponencial) se expusieron a un tratamiento oxidativo con 35 mM de H_2O_2 (concentración final) (Ortiz-Espín y *col.*, 2015). En los puntos de tiempo indicados, se recogieron alícuotas de células para su análisis directo según el ensayo, o las células fueron filtradas a vacío. Posteriormente, las muestras se congelaron en N_2 líquido y conservaron a $-80^\circ C$ para su posterior uso.

1.1.6. Incubación con inhibidores de autofagia

Para realizar los tratamientos oxidativos de las células TBV-2 en presencia de inhibidores de autofagia se depositaron 2 mL de cultivo a los 5 días de crecimiento en placas de ELISA y se añadió H_2O_2 a una concentración final de 35 mM en ausencia o presencia de 10 μ M E-64d (aloxistatin, un inhibidor de cisteína proteasa, disuelto en metanol; *Sigma*) o 10 μ M E-64d más 5 mM 3-MA (3-metiladenina, un inhibidor de la

fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase III, disuelto en agua MilliQ; *Sigma*), como se describe en Takasutka y *col.* (2004). Como control para el tratamiento con E-64d, se añadió 1% metanol (v/v) a las células. Una vez realizados los tratamientos, las células se cultivaron en un agitador orbital a 118 rpm, a 26°C en oscuridad y se llevaron a cabo análisis de viabilidad celular y autofagia en los tiempos indicados.

1.1.7. Visualización de autolisosomas

Las células TBY-2 en suspensión (200 µL) se centrifugaron a 4.000 xg durante 5 minutos y el sedimento se resuspendió en 200 µL de tampón 100 mM fosfato potásico (PK) pH 6,5 que contenía 1 µM de LysoTracker Deep Red (*Invitrogen, Thermo Fisher*) según describen Voitsekhovskaja y *col.* (2014). La mezcla se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 6 minutos. Posteriormente, la preparación se centrifugó a 1.000 xg durante 1 minuto, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó tres veces con tampón PK, pH 6,5 a 1.000 xg durante un minuto. El precipitado final se resuspendió en 150 µL del mismo tampón. Se transfirieron 50 µL al portaobjetos y las estructuras se visualizaron en un microscopio de fluorescencia motorizado *Leica DM6* equipado con óptica *Nomarski* y una cámara digital *Hamamatsu C11440*. Para la detección de los autolisosomas, las preparaciones se observaron utilizando un paso de banda (BP) 545-580 nm, DM 600 nm y un filtro BA de 610 nm. Se evaluaron al menos diez campos (aproximadamente 20 células por campo) en tres experimentos independientes. El análisis de imágenes se realizó utilizando el *software* ImageJ (*NIH*; <https://imagej.nih.gov/ij/>)

1.2 *Arabidopsis thaliana* L.

1.2.1. Líneas empleadas

Las semillas de *A. thaliana* empleadas en esta Tesis han sido del ecotipo Columbia (Col-0; el tipo silvestre, WT) y los mutantes de inserción de T-ADN *knock-out Attrxol1* obtenidos del banco de germoplasma *The Salk Institute for Biological Studies Joseph R. Ecker* SALK_143294C (KO1) y SALK_042792 (KO2) (Tabla 1). La medida de expresión génica reveló ausencia del gen en el caso de KO1 mientras que algo de expresión, aunque muy baja, se detectaba en la línea KO2 (Ortiz-Espín y *col.*, 2017). También, se analizaron dos líneas transformadas estables de *A. thaliana* sobreexpresantes del gen *AtTRXol1* generadas previamente en nuestro Grupo por el Dr. Aingeru Calderón (descrito el procedimiento en la Sección 1.2.4 de Materiales y

Métodos en su Tesis Doctoral, 2017). Se eligieron dos líneas OEX (OEX1(1.1) y OEX2 (1.4)) para su posterior análisis en esta Tesis Doctoral.

Tabla 1. Líneas de *A. thaliana* utilizadas en esta Tesis.

Nombre	Mutante	Inserción	Gen ^a	Línea SALK	Línea NASC
Col-0 AtWT	Cepa silvestre				N60000
KO1 Attrxo1	<i>Knock out</i> de Tiorredoxina <i>o1</i>	ADN-T	AT2G35010	SALK_143294	N659590
KO2 Attrxo1	<i>Knock out</i> de Tiorredoxina <i>o1</i>	ADN-T	AT2G35010	SALK_042792C	N659374
OEX1 Attrxo1	Sobreexpresante 1 de Tiorredoxina <i>o1</i>		AT2G35010		
OEX2 Attrxo1	Sobreexpresante 2 de Tiorredoxina <i>o1</i>		AT2G35010		
Atntrb	Tiorredoxina reductasa-b dependiente de NADPH	ADN-T	AT4G35460	SALK_027935C	N527935

^aNúmero de acceso del gen en la web TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>)

1.2.2. Cultivo en turba

Para la siembra en turba de *A. thaliana*, se preparó una mezcla de turba:perlita:vermiculita en proporción 2:1:1 en alveolos (4x4 cm) que se regaron por inmersión con agua y se cubrieron con un *film* de plástico para crear una cámara de humedad, además de proteger a las semillas. Para garantizar la germinación simultánea en los lotes de semillas, posterior a la siembra, se las dejó estratificando durante 72 horas a 4°C y en oscuridad.

Para los estudios de **persulfuración proteica** en plantas crecidas en ausencia y presencia de NaCl, las plantas crecieron en cámaras de cultivo con condiciones ambientales controladas en fotoperíodo largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad). La iluminación artificial fue suministrada por tubos LED (*Philips*) con luz neutra de 120 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. El porcentaje de humedad relativa se mantuvo en torno al 65% y la temperatura a 24°C/18°C (día/noche). A los cuatro días de la germinación de las plantas,

se las comenzó a aclimatar a las condiciones programadas en la cámara de forma paulatina (primero, con pequeñas aperturas en el *film* protector, que fueron ampliándose hasta el total destape de las bandejas). A los 7 días, se regaron las bandejas por la base con Solución Hoagland ½ y en los estudios de salinidad y persulfuración, el primer riego de tratamiento se realizó a los 12 días, utilizando solución nutritiva enriquecida con 300 mM de NaCl y las plantas se recogieron tras 7 días del tratamiento (plantas de 19 días de edad).

Tabla 2. Solución Hoagland completa.

Reactivo	PM (g/mol)	Stock	Concentración final (mg/L)
1.- KH_2PO_4	136,08	1 M	205
2.- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	1 M	826
3.- KNO_3	101,10	1 M	303
4.- NaCl	58,44	3 M	115
5.- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	1 M	739
6.- K_2SO_4	174,27	0,5 M	174
7.- Micronutrientes	*	*	*
8.- Quelato de Fe	55,00	0,34 M	18

*7.- Micronutrientes	PM (g/mol)	Stock	Concentración final (mg/L)
H_3BO_3	61,33	0,03 M	2,00
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	169,02	0,018 M	3,07
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287,54	0,0099 M	2,86
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	0,000315 M	0,08
$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1235,86	0,00007 M	0,09

El material foliar fue congelado en N_2 líquido y almacenado a -80°C para su posterior análisis de persulfuración, realizando tres réplicas biológicas para cada genotipo y condición, en una primera aproximación de los genotipos WT, KO1 y OEX1, y en un segundo estudio de plantas WT, KO1 y KO2.

En el caso del estudio de **cierre estomático** con ABA, las plantas se crecieron en cámaras controladas en condiciones de día corto (8/16 horas luz/oscuridad) durante 33 días, con $300 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ PAR, 65-70% humedad relativa y temperaturas de $24/18^\circ\text{C}$ (luz/oscuridad), con el fin de obtener hojas bien desarrolladas y grandes en las que

realizar más fácilmente el pelado y obtención de epidermis, como se describió en trabajos previos del grupo (Sánchez-Guerrero y *col.*, 2021).

1.2.3. Cultivo *in vitro*

Para la preparación y manipulación del cultivo *in vitro*, se trabajó en condiciones de esterilidad dentro de cabina de flujo laminar, previamente esterilizada con luz UV durante 15 minutos (*Telstar Aeolus V*). Se prepararon placas Petri de diferente diámetro con medio de cultivo 0,5x MS suplementado con vitaminas (Murashige y Skoog, 1962, *Duchefa*) que contenía 1% sacarosa (p/v), 0,5 g/L MES y agar para plantas (7 g/L; *Duchefa*) autoclavado a 121°C durante 20 minutos (*Bunsen*). Para la esterilización superficial de las semillas de *A. thaliana*, se preparó una solución con 20% hipoclorito sódico comercial (v/v) y detergente 0,1% Tritón x-100 (v/v) y las semillas se trataron durante 5 minutos con agitación constante, eliminándose entonces la solución con una micropipeta. Posteriormente, se trataron con 70% etanol (v/v) durante 5 minutos con agitación constante, tras lo cual se realizaron cinco lavados de 1 minuto con agua MilliQ estéril para eliminar los restos de los reactivos de esterilización. Para la siembra en placas Petri, se utilizó *Sloopy* agar (0,1% agar planta (p/v); *Duchefa*) estéril que permite depositar una a una las semillas. Todo el material utilizado con restos de semillas fue autoclavado antes de su desecho por tratarse de semillas modificadas genéticamente. Para garantizar el comienzo de la germinación simultáneo, una vez sembradas las semillas, se dejaron estratificar durante 48 horas en frío y oscuridad, antes del paso a luz en condiciones controladas en cámara fitotrón (GER-360; *Radiber*, S. A.). El cultivo *in vitro* se realizó en fotoperíodo de día largo (16 horas de luz y 8 horas de oscuridad) con una intensidad de luz de $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ suministrada por luces LED de luz neutra de 4.000K (T832120UL; *Samsung*), 50% de humedad relativa y temperatura 24/18°C (luz/oscuridad).

Para el estudio de comprobación de la sobreexpresión de TRXo1 en orgánulos purificados de hojas, las plantas se crecieron en placa durante 21 días a fin de tener un material foliar suficiente (10 placas por experimento de cada genotipo) y con tricomas menos duros (que puedan romper los orgánulos en la extracción), que plantas crecidas en tierra. Para el estudio de oligomerización de PYR1 *in vivo* las plantas crecieron durante 14 días y se transfirieron a placas MS con y sin 10 μM ABA dejándolas durante 48 horas tras lo cual, se congeló en N₂ líquido la parte aérea y se almacenó a -80°C. Para

el estudio de crecimiento de raíz, plantas de cuatro días de edad cultivadas en luz con longitud radicular similar, se transfirieron a placas verticales en ausencia y presencia de 10 μM ABA y se registró y midió la longitud radicular tras 4 y 18 días de crecimiento en la cámara fitotrón. La longitud de la raíz se midió con el programa Image J (*NIH*). Se analizaron nueve plantas de cada genotipo y tratamiento, realizándose tres experimentos independientes.

1.2.4. Cierre estomático en respuesta a ABA

Para el estudio del cierre estomático inducido por ABA, se siguió el método de Eisele y col. (2016) con algunas modificaciones. Se usaron hojas completamente desarrolladas cortadas con un bisturí por el peciolo en las dos primeras horas de luz (con la mayoría de los estomas abiertos). La epidermis se retiró de la superficie abaxial con ayuda de cinta adhesiva y se dividió en tres partes. Una de ellas se observó a tiempo cero (apertura inicial), otra se incubó a 23°C durante 2,5 horas en luz (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ PAR) flotando en un tampón MES-KOH (10 mM MES, 10 mM KCl, pH 6,15), y la tercera parte se incubó en ese mismo tampón suplementado con 10 μM ABA. La epidermis tratada se tiñó con 0,5 μM de rodamina 6G durante 5 minutos en la oscuridad para una mejor visualización y medición del poro estomático. Después de lavar la epidermis con tampón MES-KOH para eliminar el exceso de colorante, la epifluorescencia permitió contrastar las células guarda y analizar la apertura estomática utilizando un microscopio *Leica* CTR6 (objetivo 40x con luz de excitación a 541 nm y luz de emisión a 565 nm). El índice de apertura se calculó dividiendo la anchura del poro estomático por la longitud. Se realizaron tres experimentos independientes con al menos la medida de 500 estomas por genotipo y tratamiento. El análisis de las imágenes se realizó con el *software* ImageJ (*NIH*).

1.2.5. Obtención de un doble mutante *Attrxo1/ntrb*

Para la obtención de un doble mutante *knock out* (KO) con pérdida de función *Attrxo1/ntrb* se partió de dos líneas mutantes simples de fondo silvestre Columbia-0 de inserción de ADN-T en homocigosis: *Atntrb* (línea SALK_027935; semillas N654570) y nuestro mutante KO1 *Attrxo1* descrito anteriormente (línea SALK_143294C; semillas N659590). Para la comprobación de las líneas, se aisló ADNg (como se describe en 3.1.1 de Materiales y Métodos) de las rosetas tanto de las líneas a estudiar como de los controles WT (Col-0) y de los mutantes simples para utilizarlos como molde de PCR. El

fragmento amplificado por PCR con la combinación de los oligonucleótidos LP y RP (Tabla 3) para saber si se encuentra el gen silvestre en el caso de *AtTRXo1* será de 1.113 pb y en el caso de *AtNTRB* a 1.052 pb (líneas heterocigóticas en segregación). Para saber si se produjo la inserción del ADN-T, se realizó la amplificación combinando los oligonucleótidos BP y RP, observándose banda si hubo mutación con un tamaño de amplificación entre 518-818 pb para *Attrxo1* y entre 492-792 pb para *Atntrb*. Estos rangos de pares de bases son dados por SALK, pero experimentalmente, hemos observado en ambos casos, las bandas en torno a los 600 pb (Fig. 21).

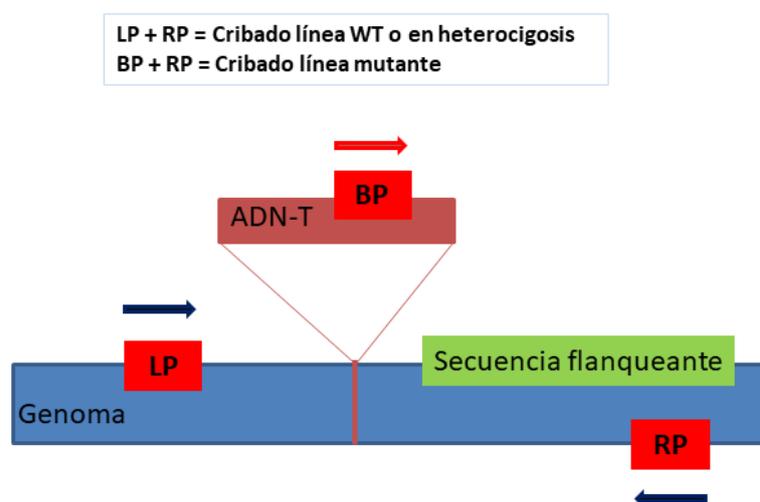


Figura 21. Esquema general de la inserción de ADN-T en el genoma, interrumpiendo la lectura correcta del gen. Modificada de la página web *Signal-Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Las combinaciones de los oligonucleótidos LP (*Left T-DNA Border Primer; forward*) + RP (*Right T-DNA Border Primer; reverse*) amplifican el gen silvestre, por tanto, sin inserción de ADN-T. Para comprobar si existe la mutación, se debe realizar la PCR con la combinación de los oligonucleótidos BP (*T-DNA Border Primer*), que se pega a la secuencia del ADN-T junto al RP, cebador de la secuencia del gen a mutar.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para el genotipado.

Oligonucleótidos	Secuencia
LBb1.3 (BP)	5'-ATTTTGCCGATTCGGAAC-3'
g- <i>AtTrxo1</i> -N659590- <i>fd</i> (LP)	5'-AATCATCATCGTTGACTTGCC-3'
g- <i>AtTrxo1</i> -N659590- <i>rv</i> (RP)	5'-ACACATCCACTTAGCGTGAGG-3'
g- <i>AtNtrb</i> -027935- <i>fd</i> (LP)	5'-GGAAGAATCATTCTGGTTTGG-3'
g- <i>AtNtrb</i> -027935- <i>rv</i> (RP)	5'-TTTCAATCCTCCAAGCACATC-3'

A partir de los mutantes simples en homocigosis para ambos genes, se llevaron a cabo cruzamientos manuales nombrando a esta generación como F_0 (generación parental). Para realizar los cruces por polinización dirigida (*Attrxo1* x *Atntrb*), se crecieron en turba, como se describe en 1.2.2. de Materiales y Métodos, las líneas parentales. Se seleccionaron como gametos femeninos inflorescencias que tuvieran los botones florales cerrados, indicando la ausencia de autopolinización. Del botón floral cerrado se aisló el gineceo retirando los sépalos, pétalos y estambres con ayuda de pinzas de cirugía y una lupa de aumentos (*Motic[®] Microscopes*). Posteriormente, se pusieron en contacto las anteras maduras del donante de polen (parental masculino) al gineceo seleccionado, favoreciendo la fecundación cruzada (Fig. 22) y observando mediante la lupa de aumentos, que el polen quedaba depositado. Para obtener mayor tasa de éxito de cruzamiento, se utilizaron ambas líneas tanto como gametos femeninos como masculinos, indicando en cada cruce qué genotipos eran el óvulo y el polen, para hacer los seguimientos pertinentes.

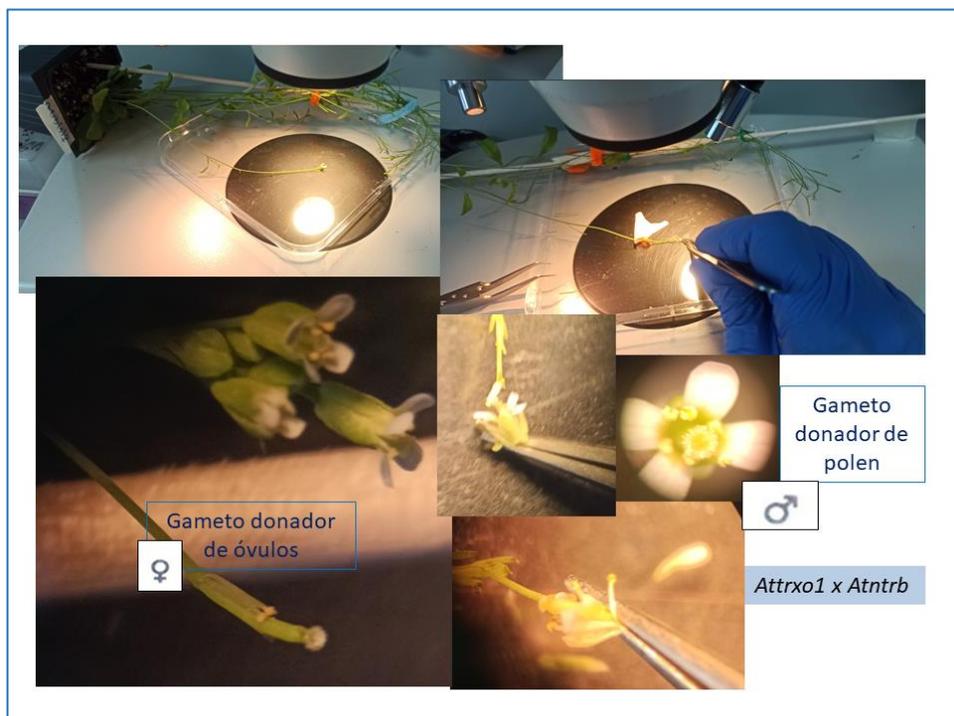


Figura 22. Imágenes tomadas en la realización de los cruces *Attrxo1* x *Atntrb* para la obtención de dobles mutantes de pérdida de función mediante líneas SALK con inserción de ADN-T.

Se marcó la flor polinizada, de la cual, posteriormente, se desarrollaría la silicua y se obtendrían las semillas maduras a comprobar. Tras ello, se obtuvo la primera generación

filial (F_1) cuyas plantas fueron analizadas por PCR para la comprobación de tanto la presencia del ADN-T como la ausencia de ambos genes *TRX01* y *NTRB*. Tras seleccionar plantas mutantes heterocigóticas, se obtuvieron sucesivas generaciones por autopolinización que fueron asimismo genotipadas por PCR hasta homocigosis. Los oligonucleótidos usados en los genotipados se presentan en la Tabla 3 con las condiciones de reacción descritas en 3.2.1 de Materiales y Métodos. Según las Leyes de Segregación de Mendel, del cruce de *Attrx01* x *Atntrb* (F_0), se obtendrá una primera generación filial (F_1) 100% dobles heterocigotos. A partir de ésta, se obtendrá una F_2 compuesta de 1/16 mutante doble homocigoto, 7/8 heterocigoto para algún carácter y 1/16 homocigoto tipo silvestre.

1.3. *Pisum sativum* L.

Se han utilizado plantas de guisante (*Pisum sativum*, cv. *Bonneville*) para realizar la técnica de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS; del inglés, *Virus-induced gene silencing*) con el fin de tratar de obtener plantas dobles mutantes *Pstrx01/ntrb* en esta especie. Esta técnica fue aprendida en una Estancia Breve en el Grupo de Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo (IBMCP-CSIC-UPV) del Dr. Luis Cañas Clemente y bajo la supervisión de la Dra. Rim Hamza.

1.3.1. Esterilización y germinación

Trabajando dentro del flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad, se esterilizaron las semillas cedidas por la Dra. E. Johansen (Faculty of Agricultural Sciences, Aarhus University; Frederiksberk Dinamarca), mediante inmersión con agitación de las mismas en una solución 10% hipoclorito sódico comercial (v/v) y una gota de detergente en tubos FalconTM de 50 mL o en duquesitas de 120 mL, según el número de semillas a esterilizar. Se mantuvieron las semillas en la solución de esterilización durante 10 minutos, con agitación constante. Transcurridos los 10 minutos, se eliminó la solución y se realizaron 5 lavados con agua MilliQ estéril de 2 minutos cada uno de ellos.

Para la germinación, se prepararon placas de Petri pequeñas (9 cm de diámetro) con un soporte de dos papeles de filtro previamente esterilizados (autoclavados a 121°C durante 20 minutos). Se humedecieron los papeles de filtro con 2 mL de agua MilliQ estéril, evitando encharcamientos, ya que ello favorecería la aparición de hongos,

depositándose 3 semillas por placa, separándolas unas de otras. Se sellaron las placas con esparadrapo y protegiéndolas de la luz, se las dejó germinar en cámara de crecimiento con fotoperíodo largo (16 horas de luz/ 8 horas de oscuridad) durante 7 días a 24°C. Cada dos días, se comprobó la humedad en las semillas y se verificó la ausencia de hongos. Como precaución, a los 4 días, se hizo un cambio de los papeles de filtro, aunque no hubiesen aparecido hongos visibles para evitar contaminaciones.

1.3.2. Condiciones de cultivo

Una vez germinadas las semillas, se procedió a su siembra individual en tierra. Se preparó una mezcla de sustrato con proporción 1:1:1 (turba:vermiculita:perlita) en macetas de 12-14 cm de diámetro. Se humedeció la tierra con agua destilada y se depositaron las semillas en un hueco de 1 cm de profundidad pulverizándose la superficie con Ridomil (1g/L; *Syngenta*). Se las cubrió con un vaso de plástico transparente para mantener la humedad y se las dejó en una cámara de cultivo con fotoperíodo largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de luz, 24°C/18°C (día/noche) y 65% de humedad relativa. Al segundo día, se regó en la bandeja con solución nutritiva (Hewitt, 1996) a pH 6,5 (Tabla 4). A los 6 días, se colocó el vaso de plástico inclinado para que comenzase a aclimatarse la planta y al séptimo día se retiró.

Tabla 4. Composición de la solución nutritiva para guisantes *Boneville* (Hewitt, 1966).

Reactivos	Peso molecular (g/mol)	Concentración stock	Concentración final (mg/L)
KH_2PO_4	136,08	1 M	102
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236,15	1 M	855
KNO_3	101,10	1 M	381
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,48	1 M	367,5
H_3BO_3	61,33	33 mM	32,55
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	169,02	18 mM	28,95
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	284,54	9,9 mM	9,76
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249,68	0,315 mM	0,315
$\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1235,86	0,07 mM	1,51
Quelato de Hierro (Fe)	55,00	18 g/L	34,95

1.3.3. Transformación por agroinfiltración

Para la obtención de un doble mutante *Pstrxol1/ntrb* se generaron construcciones dobles en *tándem* para el silenciamiento génico de los genes *NTRB* y *TRXo1* en guisante

por agrotransformación, tal y como se describe en las secciones siguientes (apartado de *Agrobacterium*). La disposición experimental de la siembra para las agroinfiltraciones fue la siguiente:

- **Plantas control (sin tratar):** en ellas se realizaría extracción de ARN, síntesis de ADNc y comprobación de la expresión génica en las plantas silvestres WT de los niveles de expresión de *NTRB* y *TRXo1*.
- **Plantas agroinfiltradas con pCAPE1 (control negativo):** vector que contiene el ARN con la virulencia, por tanto, serviría para determinar si el virus ejerció algún efecto por si solo en el fenotipo a estudiar.
- **Plantas inoculadas en proporción 1:1 con pCAPE1:pCAPE2-PDS (control positivo):** inoculación que sirvió para saber cuándo se podía empezar a hacer un estudio del fenotipo en las plantas con la construcción de interés. Una vez que en estas plantas se comenzó a apreciar decoloración foliar, se tomó como referencia de que ya estaba activo el virus.
- **Plantas inoculadas en proporción 1:1 con la construcción doble pCAPE1:pCAPE2-PsTRXo1-PsNTRB (construcción de interés).**

En plantas de dos semanas de edad, se realizó la infiltración en el envés de las hojas superiores más jóvenes, evitando las más pequeñas y las más senescentes por la dificultad de agroinfiltrarlas. Para la agroinfiltración se utilizaron jeringuillas de 1 mL sin aguja, teniendo la precaución de no romper la hoja. Entre cada construcción, fue necesario cambiar los guantes y la jeringuilla para no contaminar y limpiar con 70% etanol (v/v). Se marcaron las hojas donde se produjo la infiltración con una cuerda de algodón y una etiqueta que indicaba la construcción usada. Una vez inoculadas las plantas, se colocaron las distintas construcciones en bandejas separadas y con gran distancia entre las plantas para evitar contaminaciones cruzadas.

1.3.4. Decapitación

Tras 6 días desde la agroinfiltración (detallada en los apartados siguientes), se cortaron las plantas por encima de la marca de la inoculación, evitando así, por una parte, que se diluyera la transformación en las ramas laterales, y por otro lado, para hacer el seguimiento en las nuevas hojas nacientes. A partir de ahí, se esperaba que las nuevas ramas tendrían los genes interrumpidos de haber sido exitosa la transformación.

1.3.5. Fenotipado

Las plantas transformadas con la técnica VIGS son quimeras y, por tanto, hay que tener en cuenta que se espera obtener una variedad de fenotipos entre fuerte, leve o ninguno, y además considerar que no todas las hojas van a presentarlo e incluso no toda la superficie de la hoja por igual. Así, esta técnica es muy útil cuando se presenta un fenotipo claro, sea de hoja o de otra parte de la planta. Por ello, es importante trabajar con un gran número de plantas para asegurar que se pueda observar un fenotipo con claridad. Tal y como se ha comentado, una vez que las plantas control positivo portadoras de las construcciones pCAPE1: pCAPE2-*PDS* empiecen a blanquear sus hojas, es el momento de analizar las plantas objeto de interés pCAPE1:pCAPE2-*PsTRXo1-PsNTRB*.

2. Bacterias

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1. Condiciones de cultivo

Para los cultivos bacterianos, se utilizó el medio LB al que se añadió previo a la esterilización, 15 g/L de bactoagar en caso de la preparación de placas con medio sólido. El programa de esterilización para medios de cultivos fue de 121°C durante 20 minutos sin etapa de secado. Los medios se suplementaron con los antibióticos estériles correspondientes cuando se alcanzaron los 55°C de preenfriamiento tras el autoclavado de los mismos. Tras las inoculaciones, los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron toda la noche a 37°C con agitación a 220 rpm. En el caso de cultivos en medio sólido, se dejaron crecer toda la noche en estufa a 37°C, colocando las placas invertidas para evitar contaminaciones y que el agua condensada caiga sobre el medio.

2.1.2. Cepas empleadas

Para los experimentos de VIGS la cepa de *E. coli* empleada en las transformaciones fue ElectroMAX™ DH10B™ (*Life technologies*). Para la purificación de proteínas recombinantes los cultivos se crecieron a 37°C y agitación a 220 rpm con movimiento circular durante 24 horas. Estos cultivos se usaron para obtener ADN plasmídico para transformar células competentes BL21 y Rosseta aptas para la inducción de la producción de las proteínas.

2.1.3. Células competentes

Para la transformación de células competentes de *E. coli*, se utilizaron dos estrategias, dependiendo de la cepa empleada, que se detallan a continuación.

2.1.3.1. Transformación mediante choque térmico

Para la transformación mediante choque térmico de células competentes *E. coli* DH5 α y JM109 se partió de alícuotas de 50 μ L conservadas a -80°C que se descongelaron en hielo manteniéndolas 20 minutos antes de añadir entre 0,1-1 μ g de ADN del plásmido o el producto de ligación de interés. La mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo y posteriormente se sometió a choque térmico exponiéndolas a 42°C durante 30 segundos antes de devolverlas rápidamente al hielo. Tras 5 minutos en hielo, se añadieron por resuspensión suave 500 μ L de medio LB suplementado con 2% (v/v) de 1 M glucosa y 1% (v/v) de 1 M MgCl₂, todo estéril. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C en agitación (250 rpm). Posteriormente, se centrifugó a bajas rpm (2.000-5.000) durante 5 minutos y el sedimento bacteriano se resuspendió en 100 μ L de medio remanente, se sembró en una placa Petri con medio LB y los antibióticos adecuados según el tipo de plásmido utilizado. Si el vector empleado lo permitía se seleccionaron las células transformadas por α -complementación, se añadieron al medio 0,8 mg por placa del sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) (*Duchefa*) y 0,8 mg por placa del inductor IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) (*Sigma-Aldrich*). Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C.

2.1.3.2. Transformación mediante electroporación

Se partió de alícuotas que contenían 40 μ L de bacterias en un medio que contenía glicerol para evitar la formación de cristales de hielo. Para evitar la muerte celular, se partió de preparaciones diluidas de plásmidos, probando diferentes concentraciones y así transformar con 1 μ L en cada una de las reacciones. Las celdas de electroporación se enfriaron previamente en hielo y se añadió la mezcla de reacción con la cautela de evitar la formación de burbujas que generarían en el paso de la corriente chispazos letales para las bacterias. Se dio un pulso de 1.700 V en el caso de *E. coli*. Una vez que el plásmido se introdujo dentro de las células a transformar, trabajando en condiciones de esterilidad, se añadieron 200 μ L de medio de cultivo líquido LB en la cubeta, se resuspendió suavemente y se traspasó todo el volumen a un microtubo. Las bacterias

transformadas se dejaron durante 1 hora a 37°C y agitación. Una vez pasada la hora, para realizar el cribaje y seleccionar las colonias transformadas, se plaquearon las células en medio de cultivo LB sólido con el antibiótico de selección para que se exprese el gen de resistencia y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido; C₁₄H₁₅BrClNO₆). Para la identificación de clones bacterianos recombinantes se utilizó el sistema de α -complementación. La inducción del gen *lacZ* mediante IPTG produce la hidrólisis de X-Gal y la formación de un precipitado de color azul intenso (4-cloro-3-bromo-índigo) en las colonias que no fueron transformadas, mientras que las transformadas quedan blancas.

2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

2.2.1. Cepas empleadas

Para la transformación de *Pisum sativum* mediante electroporación con los vectores binarios pCAPE1 y pCAPE2 se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58/pMP90 (GV3101) (Koncz y Schell, 1986).

2.2.2. Células competentes

Para la preparación de células competentes, se picó una colonia de *Agrobacterium tumefaciens* y se resuspendió en 200 mL de medio LB líquido estéril (10 g/L de triptona; 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L NaCl). El cultivo se dejó crecer a 28°C toda la noche, con agitación (200 rpm) hasta que se alcanzó a una O.D._{600nm} entre 0,5 y 0,7. Se preenfriaron frascos de centrifugación y una vez alcanzada la densidad óptica óptima, se centrifugaron los cultivos a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 mL de 10% glicerol (v/v) estéril frío, realizando la resuspensión en hielo. Se repitió el paso de centrifugación (6.000 rpm, 10 minutos, 4°C), se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 100 mL de 10% glicerol (v/v) frío. Se centrifugó nuevamente dos veces, resuspendiendo cada vez el precipitado en 4 mL de 10% glicerol (v/v) y se alicuotaron 40 μ L de las células competentes obtenidas en microtubos, trabajando siempre en frío. Las alícuotas se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C.

2.2.3. Transformación por electroporación

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación, se utilizaron 40 μ L de células competentes descongeladas en hielo y se añadió 1 μ L de

plásmido con la construcción de interés para transformar las células. El plásmido se resuspendió lentamente, para evitar la formación de burbujas, trabajando siempre en hielo. Se traspasó la mezcla a una cubeta de electroporación de 0,1 cm estéril preenfriada y se la colocó en un electroporador Gene Pulser™ (BioRad). Las condiciones de electroporación fueron de 400 Ω , 25 μ F y 1,8 kV. Después del pulso eléctrico, se añadieron 200 μ L de medio LB en la cubeta conteniendo el antibiótico de resistencia conferido por el plásmido con el que se transformó a las bacterias.

2.2.4. Transformación por agroinfiltración

Aproximadamente, unos 11 días después de haber sembrado en tierra las semillas germinadas de guisante, se prepararon los medios de cultivo necesarios para el mantenimiento de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con las diferentes construcciones.

2.2.4.1. Medio de cultivo para crecimiento

Se prepararon placas Petri con 20 mL de medio de cultivo estéril LB-agar (10 g/L Triptona; 5 g/L Extracto de Levadura; 10 g/L NaCl y 15 g/L de bactoagar) añadiendo los antibióticos sulfato de 50 μ g/mL kanamicina para selección por la resistencia conferida por los vectores utilizados previamente esterilizado con un filtro Millex GP 0,22 μ m (Millipore) y 25 μ g/mL (stock 25 μ g/ μ L rifampicina para la selección de la cepa de *Agrobacterium*.

Se partió de stocks glicerolados de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa vacía inicial GV3101) mantenidos a -80°C con las distintas construcciones, trabajando con más de un vial para cada construcción para asegurar el crecimiento bacteriano. Se dispuso de los siguientes stocks de *Agrobacterium*:

- Agrobacterium* transformada con el vector pCAPE1 (virulencia),
- Agrobacterium* transformada con el vector pCAPE2-PDS (control positivo que provoca blanqueo de las hojas).
- *Agrobacterium* transformada con el vector pCAPE2- *NTRB-TRXo1*- (construcción doble en *tándem* de interés).

Para realizar la siembra en estrías, se trabajó dentro del flujo laminar para evitar contaminaciones. Se picaron los viales con los stocks glicerolados que contenían la

construcción correspondiente con el hilo de siembra y se sembró por dilución para obtener colonias individuales en la placa que se dejaron crecer en estufa a 28°C durante 16-18 horas. A partir de una colonia individual de cada construcción, se procedió a preparar un precultivo en tubos de ensayo a partir de 3 mL de medio de cultivo líquido LB más los antibióticos kanamicina (resistencia de los vectores pCAPE1 y pCAPE2) y rifampicina (resistencia de la cepa de *Agrobacterium*), trabajando siempre por duplicado de cada construcción como mínimo para garantizar que el crecimiento bacteriano. Los antibióticos se añadieron cuando el medio de cultivo estuviese templado, tras el proceso de esterilización húmeda por autoclavado (121°C durante 20 minutos), evitando así la desnaturalización de los mismos. Se picó una colonia aislada con una punta de micropipeta P200 estéril y se dejó la misma dentro del medio de cultivo líquido toda la noche con agitación a 200 rpm y 28°C. Una vez que se obtuvo el precultivo, se inocularon distintos volúmenes de medio LB más los antibióticos 25 µg/mL rifampicina y 50 µg/mL kanamicina, usando como referencia para agroinfiltrar 10 plantas, el uso de 130 mL de medio con 65 µL de cada preinoculo. En las inoculaciones, se utilizó una proporción 1:1 del vector pCAPE1 (necesario para de virulencia) y el vector pCAPE2 con la secuencia específica del gen a infectar. Se incubaron entonces los inóculos a 28°C y con agitación a 200 rpm durante toda la noche (17 horas aproximadamente). Se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro (D.O._{600 nm}), utilizando como blanco una cubeta con medio de cultivo líquido más los antibióticos kanamicina y rifampicina a las concentraciones con las que se estaba trabajando, hasta alcanzar una D.O._{600 nm} entre 1,2 y 1,5.

2.2.4.2. Medio de cultivo para infiltración

Una vez medidas las densidades ópticas de los cultivos, se calcularon las cantidades de medio de infiltración IVIM (10 mM NaCl, 1,75 mM CaCl₂, 100 µM acetosiringona (3', 5'- dimetoxi-4'- hidroxiacetofenona preparada en DMSO) que eran necesarias para resuspender las células bacterianas de los precipitados obtenidos mediante centrifugación a 3.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, según la siguiente fórmula:

$$\text{mL IVIM} = 0,1 \times (\text{mL cultivo inicial}) \times (\text{D.O.}_{600 \text{ nm}})$$

Se incubó cada cultivo a temperatura ambiente y sin agitación durante 2 horas para que la acetosiringona activase la transfección de *Agrobacterium*. En el caso de las

construcciones dobles (pCAPE1:pCAPE2-*PDS*; pCAPE1:pCAPE2-*PsNTRB-PsTRXo1*), se realizó una mezcla de cada cultivo correspondiente en proporción 1:1 una vez transcurridas las dos horas de incubación.

3. Genética molecular

3.1. ADN

3.1.1. Extracción de ADN genómico

Para extracciones rápidas de ADN como las utilizadas en los ensayos de genotipado de plantas transgénicas, se siguió el protocolo de Edwards y *col.* (1991) con algunas modificaciones. Cabe destacarse que para este tipo de extracciones es conveniente partir de hojas jóvenes y de poco tamaño para obtener una buena calidad de la extracción. Se maceró una hoja a temperatura ambiente con un pistilo autoclavado sin tampón de extracción, durante 15 segundos. Se añadieron 400 μ L de tampón de extracción (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS) y se continuó macerando con el pistilo, tras lo cual, se agitó en vórtex (*VELP Scientifica*) durante 5 segundos. Los extractos se centrifugaron a 13.000 rpm durante 3 minutos. Del sobrenadante obtenido, se pasaron 300 μ L a un tubo nuevo y se añadieron 300 μ L de isopropanol (2-propanol). Se mezcló por repipeteo y se dejó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Mediante la bomba de vacío, se eliminó el isopropanol de las muestras, teniendo la cautela de no arrastrar los precipitados que se dejaron terminar de secar al aire dentro de la campana extractora de gases. Una vez eliminado el alcohol de la muestra (que podría interferir en futuras reacciones), se añadieron 60 μ L de agua MilliQ esterilizada y sin resuspender se dejó a 4°C durante toda la noche (a fin de que el ADN se disolviera evitando movilizar los restos vegetales que pudiesen quedar en el precipitado). Se cuantificó entonces la concentración y pureza en el Nanodrop ND-100 (*Agilent Technologies*) y las muestras se conservaron a -20°C.

En los casos en los que era necesario obtener un ADNg de mayor pureza, por ejemplo, en las muestras enviadas a analizar por secuenciación, paso posterior a una amplificación por PCR, se recurrió al uso de *DNeasy Power Plant Pro Kit* (*Qiagen*), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.2. Extracción de ADN plasmídico

Para la extracción de ADN plasmídico a pequeña escala, se utilizaron los siguientes kits comerciales siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes: Plasmid DNA purification NucleoSpin® Plasmid (5.1) Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli* (Macherey-Nagel) y E.Z.N.A. Plasmid DNA Mini Kit I (Omega Bio-Tek). Se partió de cultivos bacterianos líquidos saturados de 5 mL crecidos en condiciones óptimas (ver en Materiales y Métodos en las secciones de *E. coli* y *A. tumefaciens*) durante 24 horas en medio LB suplementado con los antibióticos específicos en cada caso para la selección de clones. Ambos métodos están basados en un procedimiento de lisis alcalina y retención de ADN plasmídico en una columna formada por una matriz de sílice, donde es lavado con etanol y eluido con agua libre de nucleasas. Se precipitaron las células por centrifugación y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en tampón de lisis celular y se añadió posteriormente un tampón de precipitación de proteínas y ADN genómico. Se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos a temperatura ambiente para clarificar los lisados. Se decantaron las muestras en columnas provistas con membranas de sílice de unión. Mediante centrifugaciones sucesivas se limpió el ADN plasmídico que posteriormente fue eluido en agua MilliQ. Se cuantificó mediante un Espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Agilent Technologies) y se conservó a -20°C hasta su uso. Todos los desechos líquidos generados en la extracción, por provenir de bacterias, fueron tratados con lejía al menos por 24 horas y los residuos sólidos autoclavados para su eliminación.

3.1.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en matrices de agarosa fue utilizada para la separación y el análisis de fragmentos de ADN basados en su tamaño mediante sometimiento a un campo eléctrico constante. El porcentaje de agarosa de los geles utilizados fue determinado por el tamaño de los fragmentos a resolver. En el caso de productos de PCR, la concentración de agarosa utilizada fue de 1,5% (p/v), porcentaje efectivo para separar fragmentos entre 200 y 3.000 pares de bases (pb). Los geles se prepararon en tampón TAE 1x (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA; pH 8,3). Para la visualización de los fragmentos, así como el patrón de bandas de referencias (*DNA Molecular Weight Marker VI*, 0,15-2,1 kpb, *Sigma-Aldrich*), se añadió en el tampón de carga a concentración final 1x (6x DNA Loading Dye; *Thermofisher*) el intercalante de ADN GelRed™ Nucleid Acid Stain (*Biotium*). La migración estándar para los productos de

PCR fue a 80 voltios durante 40 minutos en una cubeta de electroforesis conteniendo tampón de migración TAE 1x. La resolución electroforética se reveló en un instrumento Amersham Imagen 600 (*GE Healthcare*) mediante fluorescencia UV a 312 nm (longitud de onda de excitación).

3.1.4. Cuantificación de ADN en solución

En un Nanodrop ND-100 (*Agilent Technologies*), se determinó espectrofotométricamente la cantidad de ADN que contenían las muestras, donde se midió la absorbancia a 260, 280 y 230 nm frente a un blanco de agua ultrapura. La concentración de las muestras se calculó en relación al valor estándar $D.O._{260nm}=1$ para soluciones de 50 ng/ μ L de ADN, así como la pureza de las mismas dada por la relación de absorbancia $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$, la cual debía presentar un valor entre 1,8-2,0.

3.1.5. Manipulación enzimática del ADN

3.1.5.1. A tailing

La enzima Taq polimerasa simple añade adeninas (A) en el extremo terminal 3'. Estas adeninas fueron utilizadas como estrategia para clonar los fragmentos dentro del vector pGEM[®] T-Easy (*Promega*) que comercialmente se distribuye en conformación abierta, con timinas libres en la cadena simple. Se añadió mediante *A tailing* una adenina (A⁺) en los fragmentos por incubación en termobloque a 72°C durante 20 minutos utilizando en la mezcla dATPs como bases para la reacción con la enzima Taq polimerasa (*Biotoools*) para que generara un extremo que se aparee a la timina (T) en tampón 1x de la enzima suplementado con MgCl₂.

3.1.5.2. Digestión

Para la digestión de productos de PCR o plásmidos, se hizo uso de enzimas de restricción especificadas en cada caso. Mediante mipreparaciones (Minipreps) de plásmidos, se los extrajo y fueron digeridos en una mezcla de 1 μ g de ADN conteniendo 5 U de enzima de restricción y 3 μ L del tampón correspondiente (10x) en un volumen final de 30 μ L. Las preparaciones se incubaron a 37°C durante 90 minutos en un termobloque. La digestión fue finalmente verificada mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

3.1.5.3. Ligación

Tras la obtención de fragmentos de ADN purificados para ser ligados a vectores plasmídicos, previamente linearizados éstos, se realizaron las reacciones de ligación manteniendo una relación estequiométrica inserto:vector de 3:1 ó de 5:1. Para calcular la relación molar a utilizar, se aplicó la fórmula:

$$\text{cantidad de inserto (ng)} = \frac{(\text{cantidad de vector (ng)}) \cdot (\text{tamaño del inserto (kb)})}{\text{tamaño del vector (kb)}} \cdot \text{relación molar inserto : vector}$$

Las mezclas se realizaron en tampón de ligación 1x (*Invitrogen*) y 1 U de enzima T4 ADN ligasa (*Invitrogen*) en un volumen de 20 µL. Las condiciones de reacción fueron a 25°C durante 1 hora ó 4°C toda la noche. En las reacciones de ligación con el vector pGEM[®]T-Easy (*Promega*), se utilizaron los reactivos proporcionados por la casa comercial, siguiéndose las recomendaciones.

3.1.6. Limpieza de muestras de ADN

Los fragmentos de ADN que fueron utilizados en reacciones de ligación o digestión, así como los productos de PCR que se secuenciaron, necesitaron un paso previo de limpieza. Para la limpieza de esta muestra se utilizó el *kit DNA Clean & Concentrator*TM (*Zymo Research*) siguiendo las especificaciones del fabricante. En un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, se añadieron 2 (en el caso de plásmidos ó ADN_g mayor de 2 kb) ó 5 (si se trataba de un producto de PCR ó un fragmento de ADN) volúmenes de tampón de unión de ADN por cada volumen de muestra. En una columna Zymo-SpínTM provista de un tubo colector, se transfirió la muestra y se centrifugó 1 minuto a 10.000 rpm. Se añadieron 200 µL de tampón de lavado y se volvió a centrifugar. El paso de lavado se repitió una vez más, desechándose lo que atravesó la columna. Para secar la columna y eliminar el etanol contenido en el tampón de lavado, se centrifugó 2 minutos. Se recuperó la muestra de la columna por adición de 10 µL de tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8,5; 0,1 mM EDTA) y centrifugación a 12.500 rpm durante 1 minuto, recolectando la muestra en un tubo de microcentrífuga.

3.1.7. Recuperación de muestras de ADN a partir de geles de agarosa

Para la recuperación y limpieza de fragmentos de ADN que fueron previamente migrados en un gel de agarosa, se utilizó ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit (*Zymo Research*). Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador para poder seleccionarlas y recortadas del gel de agarosa, intentando minimizar el tiempo de

exposición del fragmento de ADN a la luz ultravioleta para evitar su degradación. Se transfirió la banda a un microtubo y se la pesó. Se añadieron 3 volúmenes del tampón de disolución de la agarosa y se incubó a 55°C durante 5 a 10 minutos con agitación a 800 rpm. Una vez disuelta la banda de agarosa, se transfirió la solución a una columna Zymo con un tubo colector. Se centrifugó durante 1 minuto y se descartó lo que atravesó la columna. Se añadieron 200 µL de tampón de lavado y se centrifugó durante 30 segundos. Tras descartar el desecho del tubo colector, se volvió a centrifugar 2 minutos para secar la columna. Se colocó la columna dentro de un microtubo y se añadieron 6 µL de tampón de elución (10 mM Tris-HCl pH 8,5 conteniendo 0,1 mM EDTA) de ADN a la matriz de la columna. Se centrifugó 1 minuto para eluir el ADN.

3.1.8. Secuenciación de fragmentos de ADN

Para comprobar que las secuencias de los insertos en las construcciones eran correctas y se hallaban en la disposición predicha, los productos de PCR se enviaron a secuenciar mediante analizadores automáticos de secuencias y fragmentos de ADN (*Applied Biosystems*) al Centro de Apoyo a la Investigación y Desarrollo (CAID), Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. Las muestras y oligonucleótidos fueron diluidas con agua MilliQ estéril a la concentración requerida por el servicio, no siendo necesario ningún tratamiento previo.

Para los análisis realizados en las Estancias Breves en Valencia, las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-CSIC), donde se utilizó un secuenciador capilar ABI 3100 (*Applied Biosystems*).

3.1.9. Alineamiento de secuencias

Los resultados de las muestras de ADN secuenciadas fueron analizados mediante alineamiento en CLUSTAL Omega (*Multiple Sequence Alignment Omega*) del *European Bioinformatics Institute* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

Para realizar los alineamientos de las secuencias amplificadas con los oligonucleótidos en dirección inversa (*Reverse*) se debió obtener la secuencia reversa complementaria. Para ello, se hizo uso de herramientas bioinformáticas (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). Las secuencias de ADN genómico en formato FASTA de los genes de interés se obtuvieron a través de BLAST de la

página web de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR; <https://www.arabidopsis.org/>).

Para la búsqueda de secuencias mediante el Número de Acceso (*Accession Number*), se utilizó la base de datos *ENA* (*European Nucleotide Archive*) (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>).

Para hallar la secuencia de NTR de *Pisum sativum* para VIGS, se utilizó la base de datos Pulse Crop Database (<https://www.pulsedb.org/>). Con las secuencias disponibles, se realizó un alineamiento múltiple para obtener la secuencia consenso mediante Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>).

3.2. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR; *Polymerase Chain Reaction*) es un método enzimático de amplificación de fragmentos de ADN mediante secuencias específicas de oligonucleótidos (cebadores) que se unen por complementariedad de bases al molde catalizándose la extensión en dirección 5' → 3'. Haciéndose eco de un proceso fisiológico, mediante una enzima termoestable Taq-polimerasa (procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*), en cada ciclo de reacción, se consigue duplicar *in vitro* la secuencia de interés obteniéndose un gran número de copias siguiendo la fórmula exponencial 2^n , donde n se refiere al número de ciclos de replicación. Para los análisis pertinentes de esta Tesis Doctoral, se partió de moldes de ADN de diferente naturaleza, incluyendo ADN genómico (ADNg), plásmidos recombinantes purificados ó ADN complementario (ADNc), obtenido a partir de la retrotranscripción del ARN.

3.2.1. PCR a punto final

La preparación de la mezcla de reacción de PCR fue a volumen final variable, según los requerimientos experimentales, conteniendo a concentración final 0,5 μ M de los oligonucleótidos sentido (*f*; *forward*) y antisentido (*r*; *reverse*) específicos del fragmento a amplificar; 0,2 mM de una mezcla equimolar de cada desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP; *Bioline*); tampón de reacción 1x (suministrado por el fabricante); 0,025 U de Taq polimerasa (*Biotoools*); ADN molde en concentración variable (50-100 ng de ADNg; 5-10 ng de ADN_{plasmídico}) y agua MilliQ estéril libre de DNAsas. Las reacciones se llevaron a cabo en un Termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (*AppliedBiosystems* by *Thermo Fisher Scientific*). El

programa de amplificación estándar consistió en un ciclo inicial de desnaturalización del ADN molde de 10 minutos a 94°C para la apertura de la doble hebra, seguido de 35 ciclos comprendidos de: 1 minuto a 94°C (desnaturalización); 1 minutos a la temperatura óptima de hibridación (*annealing*) de los cebadores a la hebra molde de cadena simple; entre 1 y 1,5 minutos a 72°C (extensión que depende del tamaño del fragmento a amplificar teniendo en cuenta que la enzima ADN polimerasa *Biotools* amplifica 1 kilobase (kb) por minuto). Finalmente, un ciclo de extensión final de 10 minutos a 72°C. En todos los casos se incluyó un control negativo (mezcla de reacción sin ADN) y cuando fue posible, uno positivo. Para la puesta a punto de la temperatura óptima de alineamiento de los oligonucleótidos empleados, se realizaron pruebas considerando 5°C menos sobre la temperatura de fusión estimada (T_m ; temperatura de *melting*) de los cebadores mediante PCR en gradiente de temperatura. Las mismas se realizaron en un Termociclador TC-5000 Plus (*Techne*).

Para el diseño de cebadores utilizados en reacciones de PCR a punto final (semicuantitativas), se utilizó Primer3Plus (<https://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>). La longitud de los mismos fue de 18-24 nucleótidos, buscando que las parejas de cebadores, tuviesen temperaturas de fusión (*melting temperature*) y de hibridación o anillamento (*annealing temperature*) similares entre ellas, sin superar los 5°C de diferencia, con un contenido de G + C (guanina más citosina) entre 40-60%. Otra característica es que no contuviesen secuencias palindrómicas ni fuesen complementarios entre sí para evitar la formación de dímeros de *primer* (cebador). Para los análisis de genotipado, se obtuvieron los oligonucleótidos del *Salk Institute Genomic Analysis Laboratory* (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) a partir de las líneas seleccionadas con la inserción de ADN-T (ADN transferido), utilizando para amplificar el ADN transferido el oligonucleótido LB (*Left border primer of the T-DNA insertion*), específicamente, el LBb1.3 (5'-ATTTTGCCGATTTCGGAAC-3'; ver Tabla 3 en la sección de Materiales y Métodos 1.2.5). Las secuencias de los oligonucleótidos fueron sintetizadas por la casa comercial *Isogen Life Science B.V.*

3.2.2. PCR de colonia

Para comprobar la transformación de células competentes de *E. coli* sin realizar minipreparación de plásmidos, se utilizó como molde de ADN 2 μ L de una dilución de

las colonias bacterianas para evitar inhibiciones de la reacción en 100 μL de agua MilliQ picando sobre las mismas con una punta de micropipeta estéril. Se realizó la amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos de la secuencia del gen con el que se las transformó siguiendo las condiciones de reacción descritas en 3.2.1. de esta sección. Los productos de PCR fueron finalmente comprobados mediante secuenciación (3.1.8 de Materiales y Métodos). Las colonias se conservaron para su posterior uso en caso de resultar positivas tras la PCR replicando mediante estría en medio selectivo o bien inoculando una gota (2 μL) del agua donde quedó disuelta la fracción de colonia utilizada para la PCR.

3.2.3. PCR anidada

Utilizando como molde el amplicón generado en una PCR anterior, la PCR anidada permite añadir nuevos nucleótidos al primer amplicón, y para ello se usan oligonucleótidos diseñados para hibridar con la primera secuencia amplificada e incorporar los nuevos nucleótidos. Así, se utilizaron dos parejas de primers en el proceso completo: en la primera PCR se utilizó una concentración de primers 2 μM mientras que en la segunda, se usó una concentración de 20 μM , para asegurar una completa y selectiva amplificación, aumentando la especificidad de las PCR al usar oligonucleótidos más cortos y seleccionar los amplicones definitivos.

3.3. Obtención de insertos

3.3.1. Insertos para VIGS

Las construcciones VIGS de los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1* para silenciar se generaron utilizando el vector pCAPE2-PDS. La región codificante *PsPDS* del vector pCAPE2-PDS está flanqueado por los sitios de restricción *NcoI*, *SpeI* y *XbaI* al inicio y *PstI*, *BglIII* y *EcoRI* al final, permitiendo cortar el fragmento y ligar el ADNc de los genes de interés a silenciar. Para diseñar las construcciones para silenciar los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1*, los fragmentos fueron amplificados con los oligonucleótidos específicos que añadieron al inicio y al final del fragmento, sitios de restricción que se utilizaron para clonarlos dentro del vector pCAPE2. Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en el vector pGEM[®] T-Easy (*Promega*) con las enzimas de restricción. Se aislaron los plásmidos mediante mini-preparaciones (*EZNA Plasmid DNA mini kit*, *Omega*) y se digirieron con la enzima de restricción a 37°C durante 15 minutos. La digestión se migró en un gel de agarosa y se pudo obtener el fragmento de

los genes a silenciar separados del vector pGem[®]T-Easy. Luego, se subclonaron en el vector pCAPE2 linearizado donde se sustituyó el fragmento *PsPDS* con el fragmento en *tándem* de ADNc *PsNTRB-PsTRXo1*.

Tabla 5. Parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar por PCR los fragmentos de los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1* a partir de ADNc de guisante Bonneville *wild type* para clonarlos dentro del vector pGem[®]T-Easy.

Pareja	Oligonucleótido	Secuencia
Set 1	Set1-PsNtrb- <i>fd</i>	5'-GGACCTCCTTGCTTCACTATG-3'
Set 1	Set1-PsNtrb- <i>rv</i>	5'-CTCAAACCTAGACCGCAGAGAG-3'
Set 2	Set2-PsNtrb- <i>fd</i>	5'-AAAGTGCCAATGGTGTGGA-3'
Set 2	Set2-PsNtrb- <i>rv</i>	5'-GCAGAGATGATTCCTCCATCAG-3'
Set 2	Set2-PsTrxo1- <i>fd</i>	5'-TCCTTGTTAATTCTGCGGAAGAG-3'
Set 2	Set2-PsTrxo1- <i>rv</i>	5'-GATTCAATCGCGCAACATCTG-3'

3.3.2. Insertos para obtención de proteínas recombinantes HisAtPYR1WT, HisAtPYR1C30S, HisAtPYR1C65S, HisAtPYR1C70S

Para poder realizar estudios de óxido-reducción en las formas monoméricas y oligoméricas de la diana de Tiorredoxina *o1* PYR1 mediante ensayos *Western blot*, se introdujeron mutaciones de interés para obtener proteínas truncadas en las distintas cisteínas que contiene PYR1 (C30, C65 y C77), transformando estas cisteínas (-SH) en serinas (-OH) mediante mutagénesis dirigida a través de PCR. A continuación, se presentan las secuencias nucleotídica (TAIR: At4g17870) y aminoacídica (UniProtKB: O49686) de AtPYR1.

CDS *wild type*:

ATGCCTTCGGAGTTAACACCAGAAGAACGATCGGAACTAAAAACTCAATC
GCCGAGTTCCACACATACTCACTCGATCCAGGAAGCTGTTCACTCACTCCACG
CGCAACGAATCCACGCGCCTCCGGAACCTCGTCTGGTCAATCGTACGACGAT
TCGACAAACCACAAACATAACAACTTCATCAAATCCTGCTCCGTCGAAC
AAAACCTTCGAGATGCGCGTCCGGATGCACGCGCGACGTGATCGTCATCAGTG
GATTACCGGCGAACACATCAACGGAAAGACTCGATATACTCGACGACGAAC
GGAGAGTTACCGGATTCAGTATCATCGGAGGCGAACATAGGCTGACGAATT
ACAAATCCGTTACGACGGTGCATCGGTTTCGAGAAAGAGAATCGGATCTGGA
CGGTGGTTTTGGAATCTTACGTCGTTGATATGCCGGAAGGTAACCTCGGAGG
ATGATACTCGTATGTTTGCTGATACGGTTGTGAAGCTTAATTTGCAGAACT
CGCGACGGTTGCTGAAGCTATGGCTCGTAACTCCGGTGACGGAAGTGGTTC
TCAGGTGACG**TGA**

Secuencia en Fasta:

```

MPSELTPEERSELKNSIAEFHTYQLDPGSC30SSLHAQRIHAPPELVWSIVRRFDK
PQTYKHFIKSC65SVEQNFEMRVGCT77TRDVIVISGLPANTSTERLDILDDERRVTG
FSIIGGEHRLTNYKSVTTVHRFEKENRIWTVVLESYVVDMPGNSSEDDTRMFAD
TVVKLNLQKLATVAEAMARNNSGDGSGSQVT

```

Tal y como se presenta en la secuencia de aminoácidos, las cisteínas 30 y 65 presentan un entorno nucleofílico al estar rodeadas también de serinas.

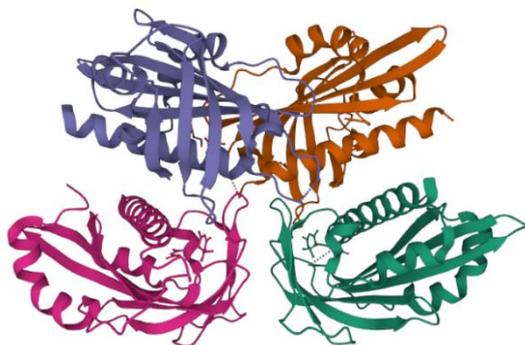


Figura 23. Estructura en 3D de PYR1 en su forma tetramérica. (*Protein Data Bank*; <https://www.rcsb.org/structure/3k90>)

Para realizar la mutagénesis de cambio de cisteína a serina (C→S) en PYR1, se diseñaron oligonucleótidos de unión en torno a la secuencia que se quería mutar y en éstos se introdujo un codón que en vez de traducir para cisteína (TGT / TGC), lo hacía por serina (TCT / TCC / TCA / TCG / AGT / AGC), forzando la mutación por ambos lados de la amplificación. Además, se incluyeron en las construcciones, sitios de corte de las enzimas de restricción en el codón de inicio de la secuencia codificante de la proteína (CDS) y en el codón de parada para poder posteriormente, escindir los fragmentos. Para cada una de las mutaciones de las tres cisteínas presentes en PYR1, se prepararon dos mezclas de reacción, conteniendo cada una de ellas, un sitio de corte para las enzimas de restricción. Luego, de que se amplificaran los fragmentos desde ambos lados en dos PCR separadas para insertar la mutación, se utilizaron estos productos como molde para obtener un único fragmento. Para esta última PCR, se utilizaron los oligonucleótidos para generar los sitios de corte de las enzimas de restricción. También, se añadió una cola de histidina en el extremo N-terminal, para su purificación, además de servir como sitio de reconocimiento para posteriores ensayos.

Tabla 6. Oligonucleótidos diseñados para la generación de construcciones modificadas de la proteína PYR1 etiquetadas con cola de polihistidina y cambios de Cys a Ser mediante PCR y mutagénesis dirigida para la posterior transformación de *E. coli* con las construcciones mutagenizadas (C30S, C65S, C77S) y expresión de las proteínas recombinantes que luego fueron purificadas mediante Cromatografía de afinidad en matrices de Níquel.

Oligonucleótidos para clonación	Secuencia
Pyr1-NcoI- <i>fd</i>	5'-aaAACCATGGCTTCGGAGTTAAC-3'
Pyr1-EcoRI- <i>rv</i>	5'-aaAAGAATTCTCACGTCACCTGAGAAC-3'
Pyr1C30S- <i>fd</i>	5'-CAGGAAGCTCATCATCACTC-3'
Pyr1C30S- <i>rv</i>	5'-GAGTGATGATGAGCTTCCTG-3'
Pyr1C65S- <i>fd</i>	5'-TCAAATCCTCGTCCGTCGAA-3'
Pyr1C65S- <i>rv</i>	5'-TTCGACGGACGAGGATTTGA-3'
Pyr1C77S- <i>fd</i>	5'-CGTCGGATCGACGCGC-3'
Pyr1C77S- <i>rv</i>	5'-GCGCGTCGATCCGACG-3'

3.4. Estrategias de clonación

3.4.1. Clonación convencional en pETM11 para purificación de proteínas

En la clonación convencional, utilizada para la expresión y purificación de proteínas recombinantes, en el fragmento de ADN amplificado por PCR se generaron los extremos específicos con enzimas de restricción (Sección 3.3.1.) para ser incorporados en el vector de expresión pETM11 (Fig. 24), vector de clonaje (digestión para generar sitios de restricción en la ORF de PYR1 y al final también, y se clona) y se liga con la T4 ligasa.

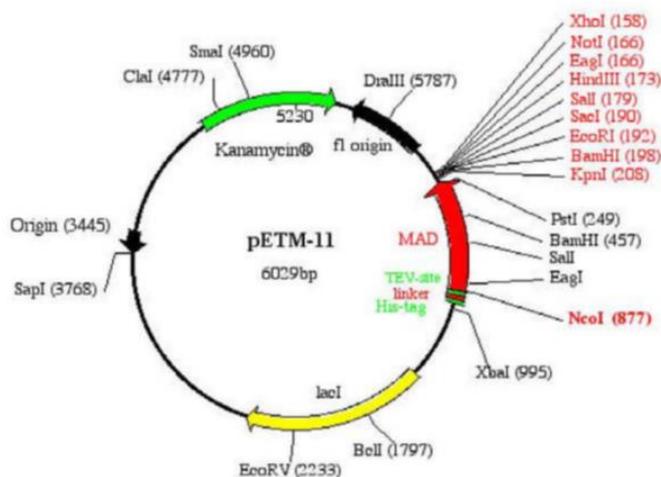


Figura 24. Vector pETM11 utilizado para generar construcciones para transformar células BL21.

Para que el inserto pueda ser ligado en el vector, este último deberá ser digerido con las endonucleasas de restricción correspondientes. Los tratamientos de ligación de fragmentos de ADN se desarrollaron en volúmenes pequeños (20 µL) de tampón de ligación con la enzima T4 ligasa (*Life TechnologiesTM*). La reacción de ligación se llevó a cabo utilizando los tampones y el tiempo de incubación recomendado por el fabricante y en relaciones molares vector:inserto 1:3.

Una vez transcurrida la ligación se procedió a transformar bacterias de *E. coli* BL21 para la purificación de proteínas recombinantes, tal y como se describe en la Sección 4.4.2. para obtener un clon que contuviese la construcción pertinente, la cual sería purificada y secuenciada.

3.4.2. Clonación para VIGS

Los fragmentos fueron amplificados con los oligonucleótidos específicos que añadieron al inicio y al final del fragmento, sitios de restricción que se utilizaron para clonarlos posteriormente, dentro del vector pCAPE2 (como se describe en 3.3.1 de esta sección). Estos fragmentos primero se purificaron y se les añadió mediante *A tailing* una adenina (A⁺) en los fragmentos a clonar en el vector por incubación en termobloque a 72°C durante 20 minutos utilizando dATPs (3.1.5.1 de Materiales y Métodos) como bases para la reacción con la enzima Taq polimerasa (*Biotoools*) para generar un extremo que se aparee con la timina (T) del vector pGem[®]T-Easy (Fig. 25), donde se clonaron y posteriormente se escindieron mediante enzimas de restricción.

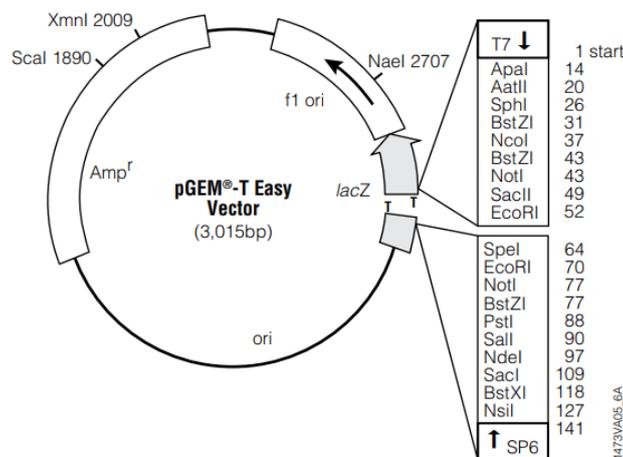


Figura 25. Vector pGem[®]T-Easy utilizado para el primer paso de clonación en *E. coli* cepa DH10B. Contiene resistencia a ampicilina (Amp^r) aunque en nuestro caso, hemos utilizado para seleccionar al antibiótico carbenicilina (Cb), también de la familia de las penicilinas pero de mayor espectro. LacZ que sirve para seleccionar las colonias transformadas (azules) de las

no transformadas (blancas). Puntos de referencia: Sitio de inicio transcripción de la ARN pol. T7 (1 pb); Región de clonación múltiple (10-128 pb); Promotor ARN pol. SP6 (-17 a +13) (139-158 pb); Unión a oligo Rv M13 (176-197 pb); Codón de inicio LacZ (180 pb); Operador *lac* (200-216 pb); Región codificante β -lactamasa (1.337-2.197 pb).

Los tratamientos de ligación se hicieron en volúmenes de 10 μ L de tampón de ligación con la enzima T4 ligasa (*Promega*) en las proporciones especificadas por el fabricante, en relaciones molares vector:inserto 1:3. Se ligaron los fragmentos A⁺ de los genes a silenciar en el vector durante 1 hora a temperatura ambiente o bien a 4°C durante toda la noche (3.1.5.3. de Materiales y Métodos), utilizando para la reacción 1 μ L de vector, 5 μ L de tampón de ligación, 1 μ L de enzima ligasa (*Invitrogen*), 3 μ L de dATPs y se transformó en una alícuota (40 μ L) de bacterias de *E. coli* ElectroMAXTM DH10B (*Invitrogen*) mediante electroporación (1.700 V) con 0,85 μ L de la reacción de ligación en una cubeta previamente enfriada. La ligación sobrante se conservó a -20°C y las células transformadas se recogieron de la cubeta de electroporación por adición de 200 μ L de medio LB y se pasaron a un microtubo donde se dejaron crecer a 37°C con agitación en posición horizontal durante 1 hora. Este vector tiene en el lugar de clonación múltiple; el operon LacZ, que está interrumpido por unas timinas desapareadas. El sistema regula la expresión de la β -galactosidasa, una enzima capaz de hidrolizar la galactosa, pero para discriminar el color, se usa en su lugar la galactosa unida a un sustrato fenólico que cuando es hidrolizado por la enzima genera un color azul a la colonia. De esta forma, en las colonias blancas el inserto habrá interrumpido el operón y no podrá degradarse el reactivo fenólico. Se plaquearon 80 μ L de la transformación en placas de LB con X-gal y carbenicilina 100 μ g/mL y se dejaron crecer 24 horas a 37°C en posición invertida. Las colonias positivas a la transformación fueron seleccionadas mediante resistencia a antibióticos en placas que a su vez contenían X-gal para la selección de clones por α -complementación. Se prepararon preinóculos en medio líquido LB más carbenicilina que se dejaron crecer 24 horas a 37°C con agitación (220 rpm).

En los experimentos de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) en *Pisum sativum*, se utilizaron los vectores pCAPE1 y pCAPE2-PDS (cedidos por la Dra. Elisabeth Johansen, Aarhus University, Dinamarca), que contienen el ARN1 y el ARN2 del *Pea early-browning virus* (PEBV), respectivamente. Estos vectores se encuentran

bajo el control del promotor CaMV 35S y el terminador NOS, clonados en el vector binario pCAMBIA-1300 (Fig.26; *CambiaLabs*) (Constantin y col., 2004).

Tabla 7. Plásmidos utilizados en VIGS.

Plásmido	Características	Referencia/Origen	Uso
pGEM [®] T-Easy	Amp ^r , lacZ, promotores T7 y SP6	Promega	Clonaje de fragmentos
pCAMBIA 1300	Hyg ^r , Kan ^r , promotor CAMV 35S	CambiaLabs	Construcciones pCAPE
pCAPE1	Kan ^r , promotor CAMV 35S, PEBV RNA1	Constantin y col., 2004	Construcción VIGS
pCAPE2	Kan ^r , promotor CAMV 35S, PEBV RNA2	Constantin y col., 2004	Construcción VIGS

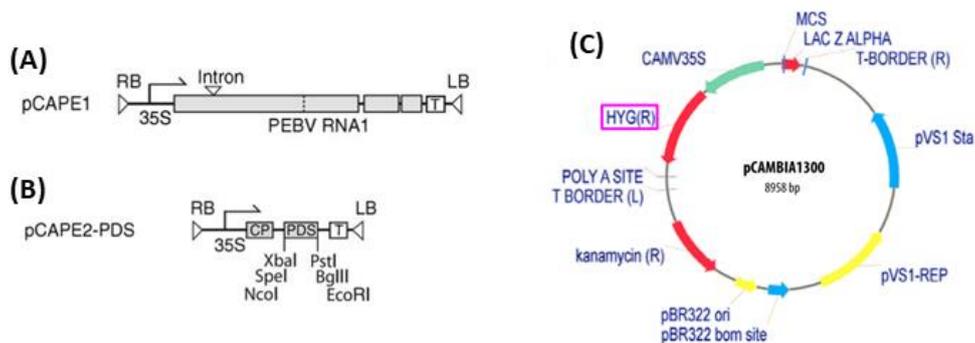


Figura 26. Descripción de los vectores pCAPE1, pCAPE2 y pCAMBIA-1300. Los casetes RNA1 y RNA2 de expresión del PEBV (*pea early brown virus*) insertados entre los bordes izquierdo y derecho de un vector derivado del pCAMBIA-1300, se integran entre el promotor 35S y el terminador NOS (T). **a)** pCAPE1 contiene el ADNc completo del ARN1 (RNA1) y un intrón insertado para estabilizar el plásmidos en la bacteria. **b)** pCAPE2-PDS contiene el ADNc del ARN2 con una inserción de un fragmento de 470 pb del *PsPDS*; CP es la región codificante de la proteína de la cápside (Imágenes tomadas de Constantin y col., 2004). **c)** Mapa del plásmido pCAMBIA-1300. El casete de resistencia a la higromicina (recuadro rosa) es eliminado para la generación de las construcciones pCAPE. (Tomado de la tesis de Joanna Serwatowska, 2012. “Aislamiento y caracterización de genes MADS-box en *Medicago truncatula*: duplicaciones génicas y subfuncionalización en el linaje *euAGAMOUS*”).

Las construcciones VIGS de los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1* para silenciar se generaron utilizando el vector pCAPE2-PDS. La región codificante *PsPDS* del vector

pCAPE2-*PDS* está flanqueado por los sitios de restricción *NcoI*, *SpeI* y *XbaI* al inicio y *PstI*, *BglII* y *EcoRI* al final, permitiendo cortar el fragmento y ligar el ADNc de los genes de interés a silenciar. Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en el vector pGEM[®] T-Easy (*Promega*) con las enzimas de restricción correspondientes. Luego, se subclonaron en el vector pCAPE2 linearizado donde se sustituyó el fragmento *PsPDS* con el fragmento en *tándem* de ADNc *PsNTRB-PsTRXol*.

3.4.3. Conservación de clones en *stocks* glicerolados

Para preservar las construcciones, se preparó glicerol 50% (v/v) que fue esterilizado por calor húmedo a 121°C durante 20 minutos en autoclave. En criotubos de 2 mL, también estériles trabajando dentro de cabina de flujo laminar, se añadieron 500 µL de glicerol, y sobre los mismos, se añadieron 500 µL del medio de cultivo líquido con la cepa a conservar crecida durante 24 horas con el correspondiente antibiótico (cultivo crecido hasta saturación) a 220 rpm. Se mezcló por resuspensión y rápidamente, se los pasó por nitrógeno líquido hasta su conservación a -80°C. Una vez dispensadas las bacterias en este medio de conservación se evitaron procesos de congelación/descongelación, con la consecuente formación de cristales que podrían dañar las células, transportándose siempre los criotubos en nitrógeno líquido. Para hacer uso de estas cepas conservadas, o bien se raspó con una punta de micropipeta estéril, o con un asa metálica caliente y devolviéndose rápidamente al N₂ líquido. La punta o el asa con las bacterias, se dispensaron por agitación en un medio LB líquido con el antibiótico correspondiente trabajando siempre en condiciones de esterilidad. Cuando se terminó de trabajar, todo el material, incluido los restos de medio a desechar, se trataron con lejía durante 24 horas dentro de la campana de extracción de gases.

3.5. ARN

3.5.1. Tratamiento del material

Para evitar la degradación del ARN por la presencia ubicua de las ARNasas, todo el material utilizado para su extracción y manejo fue descontaminado previamente con una solución “RNasaZap” (0,05% NaOH; 5% H₂O₂; 0,1% SDS).

3.5.2. Métodos de extracción de ARN

Para los análisis de esta Tesis Doctoral, se han utilizado distintas técnicas de extracción de ARN según el material de partida. Al finalizar las extracciones, en todos los casos se cuantificó en un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (*Agilent*) y se verificó la integridad del ARN como se describe a continuación. Todas las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso debido a la labilidad del ARN.

3.5.2.1. ARN de células de *TBY-2*

Los cultivos celulares de *N. tabacum* en fase exponencial de crecimiento (día 5), se filtraron mediante vacío, eliminándose así el medio de cultivo. Se pesaron rápidamente y se prepararon sobres con 100 mg de material vegetal que fueron congelados en N_2 líquido y se almacenaron a -80°C hasta su análisis. Para el aislamiento de ARN total a partir del sedimento celular se utilizó el *RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)* siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras se pulverizaron en N_2 líquido y se lisaron y homogenizaron en condiciones desnaturalizantes mediante la adición de un tampón de desnaturalización conteniendo tiocianato de guanidina, que inactiva las RNAsas, asegurando la purificación del ARN intacto. Mediante adición de un tampón con alto contenido salino, se favoreció la unión específica del ARN a una membrana de sílica contenida en una columna *RNeasy Mini Spin*, a través de la cual se eluyó el ARN purificado en agua MilliQ estéril libre de RNAsas. Con este método, se obtuvo un aislamiento enriquecido en ARNm, excluyendo por la membrana las moléculas de ARN menores de 200 nucleótidos, como son el ARNr 5,8S, ARNr 5S y los ARNt.

3.5.2.2. ARN de hojas de *A. thaliana*

Las muestras de los tejidos vegetales utilizadas para la extracción de ARN se recogieron directamente de la planta, se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesado. Se extrajo el ARN total de las hojas de *A. thaliana* utilizando el *RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen)*.

3.5.2.3. ARN de hojas de *P. sativum*

Para los aislamientos de ARN a partir de hojas de guisante, se utilizó el reactivo TRI (*Sigma-Aldrich*). Se pulverizó el material vegetal en un mortero con nitrógeno líquido y se pesaron 100 mg de tejido molido en un microtubo resistente a bajas temperaturas. Trabajando dentro de campana extractora de gases, se añadieron 700 μL de reactivo TRI

y se homogeneizó con un pistilo estéril. Se centrifugó en frío a 12.000 xg durante 10 minutos, eliminándose así todo el material insoluble (membranas extracelulares, polisacáridos, ADN de alto peso molecular) por precipitación. Se transfirió a un tubo nuevo el sobrenadante que contenía el ARN junto a proteínas y para asegurar la completa disociación de los complejos nucleoproteínicos, se dejaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 200 μL de cloroformo y mediante vórtex se agitaron las muestras vigorosamente durante 15 segundos. Se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron en frío a 12.000 xg durante 15 minutos para conseguir separar la mezcla en tres fases: fase superior acuosa (ARN), interfase (ADN) y fase inferior orgánica (proteínas). Para el aislamiento del ARN total, se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo (evitando contaminar la muestra con la interfase), se añadieron 500 μL de alcohol isopropílico (2-propanol) y se mezcló mediante repipeteo. Se dejaron reposar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugaron durante 10 minutos en frío a 12.000 xg. De esta forma, el ARN precipitó en el fondo del microtubo, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado por adición de 1 mL de 75% etanol (v/v), agitación mediante vórtex y centrifugación en frío a 7.500 xg durante 5 minutos. Se descartó el lavado y se dejó secar el precipitado de ARN durante 10 minutos dentro de la campana extractora de gases. Comprobando que no quedaban restos de etanol, se añadieron 40 μL de agua MilliQ estéril libre de RNAsas y se resuspendió el ARN para su posterior cuantificación y comprobación. Las muestras fueron almacenadas a -80°C en un ultracongelador.

3.5.3. Cuantificación de ARN en solución

La determinación de la concentración de ARN en las muestras, así como su pureza, se obtuvieron mediante la utilización del equipo Nanodrop ND-1000 (*Agilent Technologies*) donde se midió la absorbancia a 260, 280 y 230 nm frente a un blanco de agua ultrapura. La concentración de la muestra se calculó en relación al valor estándar $D.O._{260\text{nm}}=1$ para soluciones de 40 ng/ μL de ARN. Las relaciones entre las absorbancias mediante los ratio $D.O._{260\text{nm}}/D.O._{280\text{nm}}$ y $D.O._{260\text{nm}}/D.O._{230\text{nm}}$ indican la existencia de contaminación por proteínas y compuestos aromáticos o por sales, fenoles y carbohidratos respectivamente. Como estándar de calidad, estos cocientes deben

presentar un valor cercano a 2,0 y valores inferiores a 1,7, indican la presencia de contaminación por estos sustratos.

3.5.4. Electroforesis de ARN

Para evaluar la integridad del ARN extraído se analizaron 200 ng de ARN en geles de agarosa 1% (p/v en TAE 1x). Para la electroforesis, se aplicó un voltaje constante de 80 V durante 20 minutos en una cubeta que contenía TAE 1x. La resolución electroforética se reveló en un instrumento Amersham Imagen 600 (*GE Healthcare*) mediante fluorescencia UV a 312 nm. La presencia de dos bandas nítidas a 2.000 y 5.000 pb correspondientes al ARN ribosómico 18S y 28S indicaron una integridad del ARN suficiente para su completa retrotranscripción posterior.

3.5.5. Retrotranscripción

El ADNc (ADN complementario) se obtuvo a partir del ARN utilizando el *kit* de retrotranscripción QuantiTect®Reverse (*Qiagen*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, realizando las incubaciones y reacciones en un Termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (*AppliedBiosystems by Thermo Fisher Scientific*). A partir de 1 µg de ARN, se realizó un paso previo de eliminación del ADNg a 42°C durante 2 minutos por adición de tampón limpieza 7x (*gDNA Wipeout buffer*) en un volumen final de 14 µL en agua MilliQ estéril tratada con DEPC. Posteriormente, para la síntesis del ADNc se añadió una mezcla maestra al vial conteniendo el ARN compuesta de la enzima retrotranscriptasa (*Quantiscript Reverse Transcriptase*; incluye inhibidor de RNasas), tampón de retrotranscripción (*Quantiscript RT buffer 5x*; incluye Mg²⁺ y dNTPs) y una mezcla de hexámeros aleatorios (5'-d(NNNNNN)-3' con N= G, A, T ó C) como cebadores (*RT Primer Mix*) que se incubó a 42°C durante 15 minutos. Se realizó un paso final de inactivación de la enzima retrotranscriptasa a 95°C por 3 minutos. El ADNc obtenido fue diluído 1:5 en agua MilliQ estéril y cuantificado en un Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (*Agilent*). Se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

3.5.6. PCR cuantitativa a tiempo real

Los análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real ó qPCR, permiten monitorizar el progreso de la reacción a medida que va transcurriendo. La técnica se basa en la unión específica del fluoróforo SYBR Green a hebras de ADN de doble cadena que se van formando, haciendo posible visualizar la acumulación de los

productos de PCR (amplicones), observándose un incremento proporcional de la intensidad de fluorescencia durante el transcurso de los ciclos de reacción con los oligonucleótidos específicos. Como desventaja, también pueden visualizarse productos de doble cadena no específicos por lo que es primordial optimizar las condiciones de reacción.

Esta técnica ha sido utilizada para comprobar la expresión génica relativa tanto en células de *N. tabacum*, plantas de *A. thaliana* y *P. sativum*.

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores específicos en las reacciones fueron diseñados a partir de las regiones génicas de interés con el programa Primer3-Blast (*National Center for Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Las secuencias codificantes (CDS) en FASTA para *A. thaliana* fueron obtenidas de TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <https://www.arabidopsis.org/>). Se especificaron como parámetros para el diseño de los cebadores el tamaño del producto de la PCR (entre 60 y 200 pb) y la temperatura de fusión (T_m ; *melting temperature*; entre 57 y 63°C). Se seleccionaron al menos dos parejas de oligonucleótidos de las obtenidas por el programa, que solo dieran como producto un amplicón del gen de interés, cuyas eficiencias fueron luego determinadas. Las secuencias de los cebadores fueron sintetizadas por la casa comercial *Isogen Life Science B.V.*

Para la medida de expresión génica relativa se ha utilizado un equipo QuantStudio 5 (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*) en los Servicios de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10 μ L incluyendo el ADN molde (ADNc), los oligonucleótidos específicos (diseñados utilizando Primer Express v 2.0; *Thermo Fisher*) y Power SYBR[®]Green PCR Master Mix 5x (*Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific*). La mezcla maestra del fluoróforo incluye en su composición ADN polimerasa AmpliTaq Gold[™], dTTP/dUPT y el colorante ROX[™], referencia pasiva interna que se utiliza para normalizar las fluctuaciones de fluorescencia y minimizar la variabilidad entre pocillos causados por el error de pipeteo y la evaporación de muestras. En cada placa de 96 pocillos, se dispusieron tres réplicas técnicas de cada muestra y tres réplicas biológicas, como mínimo, para cada genotipo y condición. En un mismo análisis, se incluyeron los oligonucleótidos para los genes de expresión constitutiva (*housekeeping*)

utilizados para normalizar los resultados, corrigiendo posibles diferencias en la cantidad y calidad del ARN.

Las condiciones de reacción comprendieron una fase de espera (*Hold Stage*) de 2 minutos a 50° C y 10 minutos a 95°C; la fase de PCR (*PCR Stage*) compuesta de 40 ciclos con 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C, seguida de una etapa final de curva de fusión (*Melt Curve Stage*) de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y nuevamente, 15 segundos a 95°C.

Para el análisis de los resultados de expresión génica relativa se utilizó el Método de la C_T comparativa (Pfaffl, 2001), donde C_T se refiere al ciclo umbral (*threshold cycle*) en el cual la fluorescencia supera un límite fijado, referenciando el valor obtenido de C_T para la diana con respecto al del gen de referencia en la fase exponencial de la reacción. El nivel de expresión se calculó como la potencia $2^{\Delta\Delta C_T}$, realizándose previamente un experimento de validación de las eficiencias de amplificación de los oligonucleótidos utilizados.

3.5.6.1. Expresión génica en células de *N. tabacum*

Cada reacción se realizó como mínimo por triplicado, utilizando las secuencias del banco de datos *NtATG4* (Número de acceso: KR336561) y *NtATG8a* (Número de acceso: KR336564) para diseñar oligonucleótidos específicos especificados a continuación (Tabla 8). Para la normalización de los datos, se utilizó la expresión del gen de *NtACTINA8* (*NtACT8*; GQ339768).

Tabla 8. Oligonucleótidos utilizado en la expresión génica en células de *N. tabacum*.

(-fd indica *forward* -rv indica *reverse*)

Oligonucleótido	Secuencia
q-NtAtg4-fd	5'-AAGAGAGAAGAAAVGGGGAATG-3'
q-NtAtg4-rv	5'-CCAACGGAAGCTAAGAAAAGAACAG-3'
q-NtAtg8a-fd	5'-CCTGCTGATCTGACTGTGGG-3'
q-NtAtg8a-rv	5'-CTGTCGGAGGAAGGATATTTTC-3'
q-NtAct8-fd	5'-TACAACGAGCTTCGTGTTGC-3'
q-NtAct8-rv	5'-ACAAGGAAAGGACAGCCTGA-3'

3.5.6.2. Expresión génica en *A. thaliana*

Para comprobar la sobreexpresión o el silenciamiento génico en plantas de *A. thaliana*, se obtuvo ARN total de hojas en roseta de las líneas homocigóticas sobreexpresantes (OEX1 y OEX2) y *knock out* (KO1 y KO2). El nivel de expresión de *AtTRXo1* se estimó tal y como se ha descrito previamente en Ortiz-Espín y col., 2017, utilizando los oligonucleótidos para *AtTRXo1* (diana) y para el gen de expresión constitutiva *ACTINA8* (At1g49240) que se detallan en la Tabla 9. Se analizaron cinco réplicas biológicas con sus respectivas réplicas técnicas. Cada réplica biológica consistió en grupos de 10 plántulas.

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en la expresión génica en *A. thaliana*.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>q-AtTrxo1-fd</i>	5'-TCGAAGAAAGGGGAGGTTG-3'
<i>q-AtTrxo1-rv</i>	5'-CACTTGTAGAGCTGTTCCATGAG-3'
<i>q-AtAct8-fd</i>	5'-TGCCTGGACCTGCTTCATC-3'
<i>q-AtAct8-rv</i>	5'-AGCTGCAGGGATCCACGAGA-3'

3.5.6.3. Comprobación del silenciamiento génico en guisante

Con el fin de comprobar el silenciamiento génico en las plantas transformadas por VIGS, se muestrearon plantas conteniendo tanto el control negativo (pCAPE1) como el control positivo, indicador del comienzo del silenciamiento génico a través de la decoloración de las hojas (pCAPE1:pCAPE2-*PDS*; 1:1) así como las plantas transformadas con la doble construcción en *tándem* para el silenciamiento de *PsNTRB* y *PsTRXo1* (pCAPE1:pCAPE2-*PsNTRB-PsTRXo1*). Se realizó una medida de expresión génica relativa a la *ACTINA8* utilizando los oligonucleótidos especificados en la Tabla 10.

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión génica relativa en las muestras de las plantas de *P. sativum* transformadas mediante VIGS.

Oligonucleótido	Secuencia
q-PsTrxo1- <i>fd</i>	5'-CCTTGCAGGTTTCATTTCTCC- 3'
q-PsTrxo1- <i>rv</i>	5'-CTGCAACCTGCTCAATGTGT- 3'
q-PsNtrb- <i>fd</i>	5'- CCCTGTTTGGCATCTGAATG- 3'
q-PsNtrb- <i>rv</i>	5'- GACGGCAGAGATGATTCCTC- 3'
q-PsAct8- <i>fd</i>	5'-TGGTGTTAGTCACACGGTTC- 3'
q-PsAct8- <i>rv</i>	5'-CTGCAGAAGTGGTGAAAGTG- 3'

4. Proteómica

4.1. Extracción de proteínas

Para los ensayos proteómicos *in vivo*, se utilizaron distintos métodos de extracción de proteínas totales según la procedencia del material vegetal y del objetivo final del estudio.

4.1.1. Extractos de cultivos celulares de tabaco BY-2

Las células TBV-2 de los distintos genotipos control y sobreexpresantes del gen *PsTRXo1* (GFP, OEX1, OEX2) suspendidas en medio de cultivo, se filtraron al vacío con un matraz Kitasato, se pesaron e inmediatamente se congelaron con N₂ líquido y almacenaron a -80°C hasta su uso. Las muestras (3 g) se homogeneizaron con un mortero pre-enfriado en 3 mL de tampón de extracción que contenía 50 mM HEPES-KOH, 5 mM DTT (1,4-ditiotreitol), 0,5 mM PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), 1 mM EDTA (ácido etilendinitrilotetraacético) y 0,1% Tritón X-100(v/v), pH 7,4. La mezcla se sonicó con 30 pulsos en un SONICLAB al 70% de amplitud y finalmente se centrifugó a 16.000 xg a 4°C durante 15 minutos. Se obtuvo el sobrenadante y se estimó el contenido de proteínas mediante el método de Bradford (1976).

4.1.2. Extractos foliares de *A. thaliana*

Los extractos de hojas usados para el estudio de patrones de oligomerización de PYR1 se obtuvieron homogeneizándolas en un tampón de lisis compuesto por 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, cóctel de inhibidores de proteasas (*Roche*) y 5 mM N-etilmaleimida (NEM) para bloquear todos los tioles de cisteína libres. Los extractos se incubaron durante 30 minutos en la

oscuridad a temperatura ambiente y agitación suave, y después los lisados se centrifugaron a 15.000 xg durante 5 minutos a 4°C. Las proteínas solubles se cuantificaron utilizando una dilución 1:5 para evitar interferencias por el detergente.

4.1.3. Extractos foliares enriquecidos en núcleos

Los núcleos se aislaron de hojas de roseta de *A. thaliana* de los genotipos WT, OEX1 y OEX2, crecidas 21 días en placas de cultivo *in vitro* con medio MS 0,5x pH 5,7, enriquecido con 1% sacarosa y congeladas en N₂ líquido. Se siguió el método de aislamiento descrito por Bae y *col.* (2003), homogeneizando el material en nitrógeno líquido y resuspendiendo en tampón 0,5 M PIPES (ácido piperazina-'N'-bis-2-etanosulfónico) frío, pH 7,0 que contenía 1 M de hexilenglicol, 10 mM de MgCl₂ y 1 mM de DTT. El homogenado se filtró a través de dos capas de miracloth (Filter, Mesh 100, Nylon; *Sigma*). Todos los pasos siguientes se llevaron a cabo en hielo o a 4 °C siguiendo a Liu y *col.* (2018), con pequeñas modificaciones. Brevemente, el homogeneizado se centrifugó a 1.500 xg durante 5 minutos en frío (Centrífuga Beckman Coulter Avanti J-30I Rotor JA-17) y el precipitado se resuspendió en tampón glicerol (20 mM Tris-HCl pH 7,9 conteniendo 50% de glicerol, 75 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,85 mM DTT, 0,125 mM PMSF y cóctel inhibidor de proteasas (*Roche*)). Se añadió un volumen igual de tampón de lisis de núcleos pre-enfriado (10 mM HEPES, pH 7,6, 1 mM DTT, 7,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,3 M NaCl, 1 M urea, 1% NP-40, 0,5 mM PMSF, 10 mM β-mercaptoetanol y cóctel inhibidor de proteasas de *Roche*) y se agitó la mezcla con vórtex (*FisherBrand*), se incubó durante 2 minutos en hielo y se centrifugó a 14.000 rpm durante 2 minutos (Microcentrífuga 5425R; *Eppendorf*). El sobrenadante se recogió como fracción nucleoplásmica y las proteínas se midieron por el método de Bradford (1976) antes de analizarlas por *Western blot* según se describe a continuación.

4.2. Medida de la concentración de proteínas

4.2.1. Método Bradford

Las proteínas totales se han cuantificado mediante una adaptación del método de Bradford (1976), basado en el cambio de absorbancia a 595 nm que presenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 (10 mg de Coomassie Blue G-250, 10 mL de 88% fosfórico (v/v), 4,7 mL de etanol absoluto; se enrasa añadiendo agua MilliQ hasta 100 mL, filtrado con papel y guardado en oscuridad), al interaccionar con aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. La concentración proteica del micrométodo se

calcula usando una recta estándar de albúmina calibrada en un rango 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20 mg/mL utilizando un espectrofotómetro (JASCO V-630 *Spectrophotometer*) o un lector de placas (FluoStar OPTIMA, *BMG-LABTECH*).

4.2.2. Método BCA

El ácido bicinconínico (BCA; Smith y *col.*, 1985) es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible (0-1,5 mg/mL), y que muestra compatibilidad con compuestos que afectan a otros métodos. La concentración de proteínas se mide por absorbancia a 562 nm tras incubar las muestras durante 10 minutos a 60°C con la preparación de los reactivos A y B en la proporción 100:2, respectivamente.

Reactivo A: 1% BCA, 2% Na_2CO_3 , 0,16% tartrato sódico, 0,4% NaOH y 0,95% NaHCO_3 . Se ajusta el pH a 11,25 con NaOH.

Reactivo B: 4% CuSO_4

4.2.3. Modificación del método de Lowry compatible con detergentes

En los ensayos donde fue necesaria una alta concentración de detergentes para solubilizar las proteínas, se hizo uso del reactivo comercial DC *Protein Assay* (BioRad) basado en una modificación del método colorimétrico de Lowry y *col.*, (1951). Se determinó la concentración de proteínas totales espectrofotométricamente midiendo absorbancia a 650 nm con una sensibilidad de 0,2–1,5 mg/mL de proteína siguiendo las indicaciones de la casa comercial.

4.3. Técnica de concentración de proteínas

Para concentrar proteínas de tamaño molecular superior a 3.000 Dalton de soluciones inferiores a 1 mL se emplearon filtros Amicon™ Ultra-0,5mM 3K (*Millipore*). Estos filtros facilitan una concentración rápida junto con una desalinización del homogenado, por lo que se utilizaron también para eliminar DTT o H_2O_2 de así requerirlo en ensayo. Para su uso se siguieron las recomendaciones descritas por el fabricante.

4.4. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

En el transcurso de esta Tesis Doctoral se han generado las proteínas recombinantes en *E. coli*: versiones *wild type* AtPYR1, mutadas de cisteína a serina de AtPYR1 (AtPYR1C30S, AtPYR1C65S, AtPYR1C77S), todas ellas etiquetadas con cola de 6xHistidina.

4.4.1. Inducción del cultivo y expresión en *E. coli*

Para generar construcciones con versiones modificadas de la proteína PYR1 etiquetada con cola de polihistidina mediante cambios de los aminoácidos cisteína a serina se ha usado la técnica de PCR y mutagénesis dirigida. Una vez obtenidas las construcciones, se han transformado distintas cepas de expresión de *E. coli* para inducir la expresión de estas proteínas recombinantes y purificarlas mediante Cromatografía de afinidad en matrices de níquel.

4.4.2. Purificación por Cromatografía de afinidad

Para la purificación de proteínas recombinantes con colas de histidina, utilizamos como biorreactor de expresión a cepas de *Escherichia coli* BL21. Se han usado tanto medios líquidos como sólidos de LB para el crecimiento bacteriano tratados con diferentes antibióticos para la selección de las bacterias transformadas con vectores que contenían el inserto del gen de interés. Las colas de histidina permiten purificar proteínas por Cromatografía de afinidad en columnas de Níquel por elución en gradientes con imidazol.

Realizando la expresión de proteínas recombinantes heterólogas en bacterias *E. coli* BL21 transfectadas con los vectores que contienen las secuencias codificantes para las mismas, se obtuvieron las proteínas recombinantes en las siguientes construcciones: AtPYR1WT (pETM11-PYR1wt), AtPYR1C30S (pETM11-PYR1C30S), AtPYR1C65S (pETM11-PYR1C65S), AtPYR1C77S (pETM11-PYR1C77S). Para ello, los diferentes fragmentos de residuos mutados en la secuencia PYR1 (At4g17870; TAIR) en los que los residuos de Cisteína Cys³⁰, Cys⁶⁵ y Cys⁷⁷ fueron sustituidos por serina, se obtuvieron mediante transcripción inversa-PCR. Estos fragmentos se clonaron en los sitios NcoI/EcoRI del vector de expresión pETM11 que añade una cola de histidina (Castillo y col., 2015). Se transformaron cepas de *Escherichia coli* BL21 con las construcciones resultantes y se indujo la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de 1 mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) durante 3 horas a 37°C. La

purificación de las proteínas recombinantes mutadas de HisAtPYR1 se realizó utilizando un sistema de Cromatografía de Afinidad de Níquel siguiendo las instrucciones del fabricante (Ni-NTA Agarosa; *Qiagen*).

4.4.3. Eliminación de la cola de histidina

En el caso de requerirlo se eliminó la cola de poliHis de las proteínas recombinantes usando el kit *Thrombin CleanCleaveTM* (*Sigma-Aldrich*) siguiendo las instrucciones del fabricante tras filtrar las preparaciones proteicas por columnas Amicon, tal y como se ha descrito anteriormente, y sustituyendo el tampón de elución por el tampón de escisión (50 mM Tris-HCl pH 8,0 conteniendo 10 mM CaCl₂).

4.5. Electroforesis en condiciones desnaturizantes: SDS-PAGE

La separación de proteínas en geles SDS (dodecil sulfato sódico, agente desnaturizante) por electroforesis en geles verticales de poliacrilamida (PAGE) es un paso previo a su identificación por técnicas inmunológicas como el *Western blot*. El SDS es un detergente aniónico que confiere carga negativa a las proteínas de forma que estas se separan por su tamaño molecular bajo un campo eléctrico. Esta electroforesis se puede realizar en condiciones no reductoras o reductoras (añadiendo 2 mM DTT). Las reductoras separan complejos proteicos unidos por enlaces -S-S-, favoreciendo el desplegado de algunas formas terciarias y cuaternarias de las proteínas, rompiendo las subunidades oligoméricas.

En esta Tesis los extractos proteicos se analizaron según el método descrito por Laemmli (1970). La electroforesis se ha realizado en geles prehechos (*BioRad*) tipos TGX o Any kD en el sistema MiniProtean II (*BioRad*) según el peso molecular de la proteína de interés. Como tampón de desarrollo electroforético se usó un tampón Tris-Glicina formado por 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Gly, 0,1% SDS (p/v). La electroforesis se inició a 40 V hasta la completa difusión de las muestras dentro del gel concentrador y una vez alcanzado el gel de resolución, se llevó a un voltaje constante de 120 V hasta el final de la migración.. La cantidad de muestra por calle osciló entre 25 y 50 µg de proteína. Los homogenados proteicos se trataron con DTT en caso de requerirlo añadiendo 20 mM DTT, con incubación de 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió tampón de carga Laemmli 4x (277,8 mM Tris-HCl

pH 6,8, 44,4% glicerol (v/v), 4,4% LDS (dodecil sulfato de Litio), 0,02% Azul de Bromofenol). La mezcla se incubó a 95°C durante 5 minutos. Como marcadores de peso molecular se emplearon los estándares *Molecular Precision Plus ProteinTM Standards Dual Color* de 10-250 kDa (*BioRad*) o *BlueStar Prestained protein Marker* de 11-170 kDa (*Nippon genetics*).

4.6. Tinción de proteínas

4.6.1. Tinción con azul de Coomassie

La tinción de proteína tras SDS-PAGE se realizó sumergiendo el gel en una solución de tinción que contenía 6,25% azul brillante Coomassie R-250 (p/v), 10% ácido acético (v/v), 40% etanol (v/v) en agua, agitando suavemente durante 45-60 minutos (Garfin, 1990). Posteriormente, se eliminó dicha solución de tinción y se sustituyó por una solución decolorante (10% ácido acético (v/v) y 40% etanol (v/v) en agua). El gel se mantuvo en agitación y con frecuentes cambios de dicha solución para eliminar el colorante extraído. La decoloración se realizó durante el tiempo necesario para que las bandas de proteína quedaran patentes sobre fondo claro. Con esta técnica, se detectaron cantidades de proteína del orden de 0,1–1 µg. Los geles se conservaron en una solución de 5% ácido acético (v/v), 7% metanol (v/v) y 1% glicerol (v/v) en agua.

4.6.2. Tinción con ImperialTM

Para la comprobación de las proteínas purificadas por Cromatografía de afinidad, se ha utilizado la tinción el reactivo ImperialTM (*Thermo Scientific*) debido a su rapidez y a su fácil manipulación al no requerir el uso de soluciones fijadoras ni decolorantes, solo lavados con agua MilliQ. Entre sus componentes se encuentra el colorante Coomassie R-250 y es útil para detectar cantidades de proteínas del orden de 3 ng, además de ser compatible con la secuenciación de proteínas y el análisis de Espectrometría de Masas. Para llevarla a cabo, luego de finalizar la migración de la electroforesis en geles de acrilamida, se lavaron los mismos con agua MilliQ tres veces durante 5 minutos y posteriormente, se añadió volumen de reactivo ImperialTM suficiente para cubrirlos. Se incubaron con agitación suave siguiendo las indicaciones del fabricante. Al finalizar la tinción, se recuperó el reactivo y se realizaron lavados con agua MilliQ (3 x 10 minutos), quedando los geles listos para la detección de las bandas de proteínas.

4.6.3. Tinción con rojo Ponceau

Se ha utilizado el colorante rojo Ponceau para visualizar y controlar la carga de proteína en los geles transferidos a membranas de nitrocelulosa, antes de su análisis por técnicas inmunológicas con anticuerpos específicos. Para ello las membranas se sumergieron en una solución de tinte que contenía 0,1% rojo Ponceau S (p/v) y 5% ácido acético (v/v) en agua.

4.7. Técnicas inmunológicas

Se han utilizado las técnicas de *Western blot* para la detección específica de proteínas transferidas a membranas tras su separación por SDS-PAGE, la co-inmunoprecipitación y el *Dot blot* para el estudio de interacción entre proteínas recombinantes y la inmunolocalización para la identificación y localización de proteínas por Microscopía de fluorescencia. En todas, se usan anticuerpos primarios específicos frente a las proteínas de interés (Tabla 11) y anticuerpos secundarios frente a la especie en la que se generaron los primarios (Tabla 12).

Tabla 11. Anticuerpos primarios empleados.

Proteína frente a la que se desarrolla	Casa comercial	Especie productora	Tipo	Dilución de uso
PsTRXo1	<i>Sigma</i>	Conejo	Policlonal	1:2.000
CrATG4	<i>Agrisera</i>	Conejo	Policlonal	1:5.000
HsATG4B	<i>Abcam</i>	Ratón	Monoclonal	1:5.000
CrATG8A	<i>Agrisera</i>	Conejo	Policlonal	1:2.000
AtPYR1	<i>Agrisera</i>	Conejo	Policlonal	1:10.000
Histidina	<i>Agrisera</i>	Ratón	Monoclonal	1:5.000
AtTRXo1	Dr Reicheld	Conejo	Policlonal	1:10.000

Tabla 12. Anticuerpos secundarios empleados conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) o Alexa-Fluor 568.

Proteína frente a la que se desarrolla	Casa comercial	Especie productora	Dilución de uso
IgG de conejo-HRP	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Cabra	1:30.000
IgG de ratón-HRP	<i>Abcam</i>	Cabra	1: 10.000
IgG de ratón- Alexa fluor 568	<i>Molecular Probes</i>	Cabra	1: 1.000

El anticuerpo policlonal frente PsTRXo1 fue obtenido en conejos blancos de Nueva Zelanda por la empresa *Sigma-Genosys* (UK), contra el péptido sintético ARLNHTEKLFKGD presente en la región C-terminal de la proteína y presenta una alta antigenicidad. El anticuerpo frente a AtTRXo1 fue cedido por el Dr. Reicheld (CNRS, Perpignan, Francia).

4.7.1. *Western blot*

La técnica de *Western blot* usa la unión específica de un anticuerpo primario generado en un sistema animal diferente de ratón en el caso de policlonales, o generados en ratón y mediante otra estrategia en el caso de monoclonales, que se unen a la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, acoplado con un sistema enzimático, y generado contra la especie en la que se ha producido el primer anticuerpo, se emplea para localizar los complejos antígeno anticuerpo.

Tras realizar la electroforesis de las muestras mediante SDS-PAGE, tanto el gel como una membrana de nitrocelulosa (AmershamTM ProtranTM 0,2 µm NC, *GE Healthcare Life Science*) de las mismas dimensiones se equilibraron durante 15 minutos en un tampón de transferencia (48 mM TRIS; 39 mM glicina; 0,03% SDS (p/v) y 20% (v/v) metanol, pH 8,9). La transferencia se realizó a un voltaje constante de 25 V, 2,5 A durante 10 minutos usando un equipo de transferencia de tipo semi-seco (*Trans Blot, BioRad*). La comprobación de la transferencia se hizo mediante la incubación de la membrana en rojo Ponceau, tal y como se ha descrito anteriormente. Tras esta

comprobación, la membrana se desteñía con agua destilada. Con el fin de comprobar las proteínas aun retenidas en el gel y no transferidas, el gel se teñía con azul de Coomassie.

La membrana se bloqueó con 3% (p/v) albúmina de suero bovino (BSA) en tampón TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,5 y 150 mM NaCl) durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana. Tras esta etapa, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico (Tabla 11) frente a la proteína de estudio, diluido con 1% BSA (p/v) en tampón TBS (25 mM TRIS-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl), toda la noche a 4°C con agitación suave. Posteriormente, la membrana se lavó en TBS-T (3 x 10 minutos) y se incubó durante 1,5 horas con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido con 1% BSA (p/v) en TBS (Tabla 12). Se descartó el anticuerpo secundario y se procedió al lavado de la membrana con TBS-T (3 x 10 minutos). Para la detección de la proteína se empleó un método quimioluminiscente (*kit SupersignalTM West Picoplus, Fisher Scientific*). Las bandas se visualizaron y densitometraron usando un analizador de imagen (Amersham Imager 600, *GE Healthcare*) y el programa Amersham ImageQuantL 8.1 Program (*Cytiva*).

4.7.1.1. Marcadores de autofagia

Para el análisis de los marcadores de autofagia ATG4 y ATG8 se usaron geles prehechos AnykD (*BioRad*) transfiriendo 40 µg de extractos de proteínas TBY-2 a membranas de nitrocelulosa y los anticuerpos primarios policlonales anti-CrATG4 (*Agrisera*) y anti-CrATG8A (*Agrisera*). Para la inmunodetección en membranas, se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (*Santa Cruz Biotechnology*). Se utilizó tinción de Ponceau para corregir el control de carga de cada muestra.

4.7.1.2. Detección de PYR1

La proteína recombinante HisAtPYR1 previamente modificada por tratamientos de reducción/oxidación (redox) o la proteína *in vivo* de extractos foliares de *A. thaliana* se sometieron a análisis *Western blot* utilizando el anticuerpo primario anti-PYR1 (*Agrisera*) / (Tabla 11) y el secundario anti-IgG de conejo (*Santa Cruz*) (Tabla 12) de forma similar a lo descrito en el apartado anterior. Los diferentes experimentos redox se detallan a continuación.

4.7.1.2.1. Ensayos redox *in vitro*

Para los ensayos del análisis del estado redox de PYR1 *in vitro*, se disolvieron 50 μg de proteína recombinante HisAtPYR1 en 500 μL de tampón de reacción 20 mM Tris-HCl pH 7,9. Para obtener la proteína reducida, se añadió 2 mM DTT y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para el tratamiento oxidativo, la proteína se incubó con 4 mM de H_2O_2 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Otra muestra se trató previamente con 2 mM de DTT, como se ha descrito anteriormente y el exceso de DTT se eliminó utilizando filtros Amicon (por centrifugación durante 30 minutos a 14.000xg a 4°C y 2 minutos a 2.000 xg por inversión de la columna en un tubo recolector nuevo), tratándola después con 4 mM de H_2O_2 para oxidarla, como se ha descrito anteriormente. Todos los tratamientos se realizaron protegiéndolos de la luz y con agitación suave. De las muestras tratadas, 2,5 μg se sometieron a SDS-PAGE y *Western blot* utilizando anticuerpo anti-AtPYR1 (1:10.000; Agrisera). Cuando se utilizó el sistema TRX como reductor en lugar de DTT, la proteína PYR1 previamente reducida con 2 mM de DTT se oxidó con H_2O_2 siguiendo el mismo proceso anterior y a continuación, 3 μg de proteína se incubaron en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 10,7 μM de PsTRX α 1, 0,3 μM de NTRB y 2,8 mM de NADPH durante una hora a 30°C. También se realizó un control con NADPH y NTRB sin PsTRX α 1.

Para el análisis por **Espectrometría de Masas** de la proteína recombinante PYR1 se realizaron diferentes tratamientos de óxido-reducción a fin de identificar los residuos de Cys afectados. Partiendo de 80 μg de proteína AtPYR1, se redujeron con 2 mM de DTT (ditiotreitól) en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5 durante 1 hora a 4°C con agitación suave y oscuridad. Se eliminó el DTT con una columna Amicón 3K 0,5 mL (*MerckMillipore*), centrifugándose a 14.000 xg durante 30 minutos a 4°C. Luego, se invirtió la columna en un tubo nuevo y se centrifugó a 2.000 xg a 4°C durante 2 minutos, obteniéndose la proteína AtPYR1 reducida. Se cuantificó la concentración de proteínas por el Micrométodo de Bradford (*Biorad*) en el lector de placas (FluoStar OPTIMA, *BMG-LABTECH*). Se apartaron 15 μg de PYR1 reducida para enviar a analizar por masas, 3 μg para corroborar mediante *Western blot* y el resto de proteína, se dividió en dos tubos que se trataron durante 1 hora a temperatura ambiente agitación y oscuridad, uno con 4 mM de H_2O_2 (PYR1 oxidada) y el otro fue incubado a la vez con 2 mM de dimedona (5,5-dimetil-1,3-ciclohexanodiona; *stock* preparado en DMSO) y 4 mM de H_2O_2 para etiquetar el posible estado sulfénico de los residuos de cisteína. Se

eliminó el exceso de reactivos con una columna Amicón como se ha descrito anteriormente. De la resultante PYR1 oxidada y PYR dimedona-oxidada, se apartaron 3 µg para analizar por *Western blot*. Finalmente, todas las muestras para enviar a secuenciar por MS/MS, se trataron con 4 mM NEM (N- etilmaleimida en tampón 50 mM Tris-HCl pH 7,5) protegiéndolas de la luz con agitación suave durante 10 minutos a temperatura ambiente para etiquetar los grupos -SH libres. A continuación, las proteínas recombinantes se precipitaron con 15% ácido tricloroacético (ATCA; v/v) durante 20 minutos en frío y se lavaron dos veces con 1,5 mL de 80% acetona (v/v) fría mezclándose con el vórtex y centrifugando tras cada lavado a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, eliminando los sobrenadantes). Se dejaron secar los precipitados dentro de la campana extractora de gases. Para su análisis por Espectrometría de Masas en el Servicio de Proteómica del Instituto *de Duve* de Bélgica, se resuspendieron en 40 µL de 100 mM bicarbonato amónico pH 8,0 y se digirieron con tripsina para separar los péptidos previamente al análisis por MS. Las muestras se analizaron mediante nano LC-MS en Fusion Lumos, DDA, OT/selección de carga/CID:IT o EThcD:OT. Los datos MS brutos se procesaron con el programa Proteome Discoverer 2.5. El patrón de disulfuro se analizó con el programa pLink2.

Para realizar un ensayo de desplazamiento de **movilidad redox** con el fin de comprobar la posible existencia de puentes disulfuro en la proteína recombinante, se alquiló HisAtPYR1 de forma similar a lo descrito anteriormente por nuestro grupo para la proteína PCNA diana de TRX α 1, con algunas modificaciones (Calderón y *col.*, 2017a). Se redujeron previamente con 2 mM de DTT 80 µg de proteína recombinante AtPYR1 en 100 µL de tampón de reacción 50 mM Tris-HCl pH 7,5 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de DTT, 50 µg de proteína recombinante tratada con DTT se oxidaron en un volumen total de 50 µL con 4 mM de H₂O₂ durante 1 hora a temperatura ambiente en el tampón de reacción y posteriormente se dializaron utilizando las columnas Amicon descritas. Se incubaron 5 µg de proteína AtPYR1 reducida y oxidada con el alquilante 10 mM MM(PEG)₂₄ durante 20 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y después se analizaron en geles AnykD (*Bio-Rad*) mediante SDS-PAGE no reductor y *Western blot*.

4.7.1.2.2. Ensayos redox *in vivo*

Para determinar el patrón de oligomerización de PYR1 *in vivo*, se extrajeros las proteínas de rosetas de *A. thaliana* crecidas en placa, tal y como se detalló en el

apartado 4.1.2. de extractos foliares de *A. thaliana*. Se migraron 5 μg (para una mejor visualización del dímero) y 15 μg (para la visualización del monómero y los oligómeros) de proteínas totales en una electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en geles AnykD (*BioRad*). Para el *Western blot* se incubaron con anti-PYR1 (1:10.000; *Agrisera*).

Para comprobar el efecto de tratamientos reductores y oxidativos en extractos foliares de plantas silvestres (WT), éstos se incubaron en presencia de 50 mM DTT durante 1 hora a 4°C o 4 mM H₂O₂ durante 1 hora a temperatura ambiente para ser analizados posteriormente mediante *Western blot*.

Para identificar la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) en las diferentes formas oligoméricas de PYR1, los extractos de hojas obtenidos como se ha descrito anteriormente en presencia de NEM, se dializaron y concentraron con filtros Amicon (*Millipore*) para eliminar el reactivo NEM restante y, a continuación, se trataron con 5 mM de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a temperatura ambiente durante 30 minutos para reducir todos los disulfuros de cisteína. Los tioles de cisteína recuperados se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 4 horas con 6,25 mM metil-PEG₂₄-maleimida (MM(PEG)₂₄; *ThermoScientific Pierce*), que añade una etiqueta de 1.239,44 Da a los tioles libres y se dializaron de nuevo en filtros Amicon. Las proteínas etiquetadas se analizaron mediante *Western blot* tras una electroforesis SDS-PAGE no reductora en geles AnykD (*BioRad*).

4.7.2. Co-inmunoprecipitación

4.7.2.1. PsTRXo1/HisHsATG4

La co-inmunoprecipitación de las proteínas recombinantes PsTRXo1 (obtenida en nuestro laboratorio (Martí y col., 2009), e HisHsATG4 (*Abcam*) se realizó utilizando el *kit* comercial μ MACS Anti-His MicroBeads (*MACS Miltenyi Biotec*). Para ello, se diluyeron las proteínas recombinantes a interactuar (4 μg de HisHsATG4B y 8 μg de PsTRXo1) en 500 μL de tampón de lisis proporcionado por el *kit*. Se mantuvo una fracción de 50 μL para su uso como control de carga que contenía ambas proteínas (entrada en el gel). Se añadieron 50 μL de microesferas magnéticas anti-histidina y la mezcla de proteínas se incubó durante 2 horas a 4°C con agitación suave.

Las columnas proporcionadas por el *kit* se colocaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante sobre el soporte magnético diseñado y se prepararon pasando 200 μ L de tampón de lisis del *kit*. Una vez finalizado el tiempo de incubación entre las proteínas y las microesferas anti-histidina, la solución se depositó en las columnas y se lavó 4 veces con 200 μ L de tampón de lavado 1 y una vez con 100 μ L de tampón de lavado 2 (fracción nombrada como “Lavado” en el gel). Se agregaron a la columna 20 μ L de tampón de elución precalentado a 95°C y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron 50 μ L de tampón de elución precalentado a 95°C a la columna y el eluido se consideró como co-proteínas PsTRXo1/HisHsATG4B inmunoprecipitadas (CoIP). Las muestras se analizaron mediante transferencia *Western blot* después de SDS-PAGE usando anti-histidina (Tabla 11). Posteriormente la membrana se incubó en TBS-T a temperatura ambiente durante 1 hora y se reveló la presencia de PsTRXo1 usando anti-PsTRXo1 (Tabla 11).

4.7.2.2. PsTRXo1/HisAtPYR1 y PsTRXo1C37S/HisAtPYR1

La co-inmunoprecipitación de las proteínas recombinantes PsTRXo1 o su versión mutada HisTRXo1C37S con la proteína HisAtPYR1 se realizó utilizando el mismo *kit* descrito en el apartado anterior. En este caso, previamente, se utilizó trombina para eliminar la cola de histidina de HisTRXo1C37S utilizando el *kit* Thrombin CleanCleave™ (*Sigma*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El eluido final de la co-inmunoprecipitación se analizó por SDS-PAGE en geles AnykD (*Bio-Rad*) y *Western blot* como se describió previamente. Se utilizó el anticuerpo policlonal frente a PsTRXo1 como se ha descrito anteriormente y el anticuerpo primario monoclonal en ratón anti-histidina (1:5.000 en TBS-TA; *Agrisera*) y el anti IgG de ratón (1:10.000 en TBS-TA; *Abcam*) como anticuerpo secundario para la detección de PYR1. Se realizó un experimento control utilizando anti-histidina en una mancha de proteínas HisPsTRXo1C37S y AtPYR1 tratadas con trombina (como control positivo) para asegurar la ausencia de histidina en la proteína recombinante TRXo1 mutada, utilizando diluciones seriadas de alícuotas de 0,4 mg/mL. Para la visualización de las proteínas se utilizó el *kit* PIERCE ECL 2 (*ThermoScientific*).

4.7.3. Dot blot

El ensayo de *Dot blot* trampa se utiliza para demostrar la interacción entre dos proteínas identificadas por sus respectivos anticuerpos, en este caso PsTRXo1 y sus

posibles dianas HsATG4 y AtPYR1. También usamos la versión mutada de TRXo1 (PsTRXo1C37S) que estabilizaría el complejo de las dos proteínas al no contener la segunda Cys resolutive responsable de la escisión del mismo.

4.7.3.1. Interacción PsTRXo1-HsATG4

Las proteínas recombinantes PsTRXo1 (1,5 µg), HsATG4B (2,3 µg; *Abcam*) y como control negativo albúmina de suero bovino (BSA) (1,5 µg; *Sigma*) se depositaron como una gota en 6 tiras de membrana de nitrocelulosa (2 membranas para cada proteína). Las membranas se incubaron en TBS durante 5 minutos y luego se bloquearon en tampón TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 1% BSA (p/v) y 0,1% Tween-20 (v/v) (*Sigma*) durante una hora a temperatura ambiente. Luego, las membranas se incubaron con 0,2 µg de PsTRXo1 recombinante (membranas A) o 0,1 µg de HsATG4B recombinante (membranas B) en TBS-T y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las membranas A se incubaron con el anti-PsTRXo1 policlonal (1:1.000) y las membranas B con anti-HsATG4B monoclonal (1:5.000; *Abcam*) diluido v/v en TBS-T, durante la noche a 4°C con agitación. Posteriormente, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo (1:30.000 (v/v en TBS-T), *Santa Cruz*) para TRXo1 y anti-IgG de ratón (1:2.000 (v/v en TBS-T); *Abcam*) para HsATG4B, ambos ligados a peroxidasa de rábano. Finalmente, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente y una vez más con TBS. La inmunodetección se realizó utilizando un *kit* de quimioluminiscencia (SupersignalTM West Picoplus; *Fisher Scientific*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

4.7.3.2. Interacción PsTRXo1-HisAtPYR1 y HisPsTRXo1C37S-HisAtPYR1

Cinco gotas de igual volumen (10 µL) conteniendo cada una 1 µg o 0,5 µg de las proteínas recombinantes PsTRXo1 e HisPsTRXo1C37S (centro activo mutado en Cys37 por una serina (Martí y col., 2009), o 10 µg de BSA (albúmina de suero bovino; *Sigma-Aldrich*), como control negativo se colocaron en dos tiras de membrana de nitrocelulosa (Hybond, *Amersham Pharmacia*). Tras un lavado de 5 minutos con TBS (25 mM Tris-HCl pH 7,5), las tiras de nitrocelulosa se bloquearon mediante incubación en tampón TBS-TL (25 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 5% de leche en polvo desgrasada (p/v; *Hero Baby Nutrasense*) y 0,1% Tween-20 (v/v)) o tampón TBS-TA (25 mM Tris-HCl pH 7,5 que contenía 1% BSA (p/v) y 0,1% de Tween-20 (v/v)) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las membranas se cubrieron con

10 µg/mL de proteína HisAtPYR1 recombinante disuelta en TBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras los lavados, la membrana A se trató con el anticuerpo policlonal anti-PYR1 (1:10.000 en TBS-TL, *Agrisera*) y la membrana B se incubó con el anticuerpo policlonal anti-PsTRXo1 (1:2.000 en TBS-TA, *Sigma*). Tras un lavado exhaustivo con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa de rábano picante (1:30.000 en TBS-TA, *Santa Cruz Biotechnology*). Para la visualización de las proteínas se utilizó el *kit* PIERCE ECL 2 (*ThermoScientific*).

4.7.4. Inmunolocalización de ATG8

Para la inmunolocalización de ATG8 en las células de tabaco BY-2 se utilizó Microscopía de fluorescencia ya que se usó un anticuerpo secundario ligado a un compuesto fluorescente (Alexa-Fluor 568). Las células TBV-2 se fijaron y tiñeron como se describe en Voitsekhovskaja y *col.* (2014) con algunas modificaciones. Las células se fijaron con 1% glutaraldehído en medio MS y se trataron con una mezcla de celulosa (5 U/mL, Onozuka, *Duchefa Biochemie*), 10% hemicelulosa (Macerozyme R-10, *Duchefa Biochemie*) y 5 U/mL de pectinasa (*Sigma, Merck*) en medio osmótico. Después de lavar y tratar con 0,3% Tritón X-100 y bloquear con 5% BSA, las células se incubaron con el anticuerpo primario anti-ATG8 policlonal (1:1.000, *Agrisera*) durante 1 hora y después con el secundario anti IgG de ratón conjugado a Alexa-Fluor 568 (1:100, *Molecular Probes, Thermo Fisher*) durante otra hora antes de lavar cuatro veces. Las células se observaron con un microscopio de fluorescencia motorizado *Leica DM6* equipado con una cámara digital con una longitud de onda de excitación de 579 nm y emisión de 603 nm, utilizando un filtro de rodamina (RHO) y un objetivo de aceite 100x /1,30. Se evaluaron al menos diez campos (aproximadamente 20 células por campo) en cada uno de los tres experimentos independientes llevados a cabo. Cuando se indica, las imágenes se trataron con el software de análisis de Microscopía esencial Huygens (SVI, Stockton) en la Universidad de Murcia (Servicio de Tratamiento de Imágenes Científicas) para una mejor visualización de las vesículas. El análisis de imágenes se realizó utilizando el *software* ImageJ (*NIH*).

4.8. Actividades enzimáticas

En esta Tesis se han medido las actividades enzimáticas del marcador autofágico ATG4 y del receptor de ABA PYR1. ATG4 es una enzima que procesa el sustrato

ATG8 y cuya actividad se detecta por *Western blot*, habiendo sido necesaria su puesta a punto en el sistema celular TBX-2 utilizado en esta Tesis. La actividad de PYR1 se mide indirectamente en un ensayo donde se analiza su capacidad inhibitoria de la actividad fosfatasa de la proteína PP2C HAB1, medida por Espectrofotometría y aprendida durante una estancia en el laboratorio del Dr. José Leon (IBMCP, Valencia), tal y como se describe a continuación.

4.8.1. Ensayo de procesamiento de ATG4

La actividad de ATG4 se midió mediante separación electroforética de un sustrato ATG8 escindido (pATG8 procesado) comercial que contiene una etiqueta C-terminal después del sitio de escisión: se trata de una proteína GABARAP humana recombinante (Fc Chimera, ATG8-Fc, Abcam) que también contiene una etiqueta 6His N-terminal, como se describió anteriormente en el grupo (López-Vidal y *col.*, 2020). El ATG8 escindido se detectó mediante transferencia *Western blot* usando un anticuerpo anti-histidina como se describe a continuación.

Para analizar el efecto de las condiciones reductoras y oxidantes sobre la actividad de HsATG4 *in vitro*, una mezcla de reacción típica contenía 0,22 µg de HsATG4B recombinante tratada con reductor (15 µM DTT durante 5 minutos a 25°C) u oxidante (1 mM H₂O₂ o 3 mM H₂O₂ durante 5 minutos a 25°C) en un tampón TBSK (50 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 30 mM KCl, pH 8,0) y, cuando se indique, en condiciones reductoras, eliminando posteriormente el reductor por filtración en Amicon, seguidas de oxidantes. A continuación, las mezclas de reacción se incubaron con 0,48 µg del sustrato ATG8-Fc durante 45 minutos a 30°C y se detuvieron mediante la adición de tampón de muestra Laemmli sin reductor seguido de incubación durante 5 minutos a 95°C. Las proteínas se resolvieron en geles TGX 4-20% SDS-PAGE (*BioRad*). Se realizaron dos controles negativos usando solo HsATG4B en ausencia de ATG8-Fc, y con ATG8-Fc en ausencia de HsATG4B. Tras transferencia a membrana de nitrocelulosa, el *Western blot* se realizó utilizando el anticuerpo primario monoclonal anti-6His (Agrisera, 1:5.000) y el anticuerpo secundario IgG anti-ratón HRP (1:5.000; *Abcam*) seguido de inmunodetección con el *kit* de quimioluminiscencia (SupersignalTM West Picoplus; *Fisher Scientific*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que permitió la detección del producto de reacción de la actividad ATG4 como el ATG8 procesado (pATG8).

Para analizar la actividad *in vitro* de HsATG4 en presencia del sistema tiorredoxina, se trató HsATG4B previamente reducido con 15 μM DTT con 1 mM H_2O_2 como se describió anteriormente. Previamente, se comprobó la actividad de la PsTRXo1 recombinante por reacción de reducción sobre la Insulina en Espectrofotómetro (JASCO V-630 *Spectrophotometer*) a $\lambda = 650$ nm y 30°C con un aumento de la Absorbancia por la precipitación de esta diana de tiorredoxina (Martí y *col.*, 2009). La proteína HsATG4B oxidada se redujo entonces usando 2,5 μg de PsTRXo1 (o una versión mutada mutPsTRXo1C37S (Martí y *col.*, 2009), 1,5 μM de AtNTRA (tiorredoxina reductasa A dependiente de NADPH) y 0,04 mM de NADPH en tampón TBSK (Calderón y *col.*, 2017a). Se realizaron varias reacciones control en ausencia de cualquiera de estos componentes o utilizando 10 μM DTT en lugar del sistema NADPH/TRXo1/NTRA. Las diferentes mezclas de reacción se incubaron con 0,48 μg de ATG8-Fc durante 45 min a 30°C antes de añadir el tampón de muestra Laemmli y continuar con SDS-PAGE como se describió anteriormente, identificando el producto escindido de ATG8-Fc tras la transferencia *Western blot*.

Para la actividad ATG4 *in vivo*, seguimos un método descrito anteriormente (López-Vidal y *col.*, 2020), en el que se incubaron 50 μg de extractos de proteína celular TBY-2 con ATG8-Fc recombinante (0,6 μg) en tampón de reacción TBSK y 100 μM DTT a 30°C durante 45 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de muestra (tampón de Laemmli sin reductor) y 5 minutos de ebullición, tras lo cual las muestras se resolvieron en geles AnykD (BioRad) mediante SDS-PAGE y posteriormente se analizaron mediante *Western blot* con el anticuerpo anti-histidina. Se realizó un control negativo en un extracto celular (línea OEX1) sin sustrato ATG8-Fc para revelar señales no específicas.

4.8.2. Actividad de PYR1 como inhibidor de fosfatasa

La actividad PYR1 se midió colorimétricamente como se ha comentado anteriormente, en un ensayo acoplado a la actividad fosfatasa HAB1 que desfosforila el sustrato p-nitrofenil fosfato (pNPP) dando lugar al producto intermedio p-nitrofenol, que en condiciones alcalinas genera un producto final coloreado, el p-nitrofenolato, que permite monitorizar la reacción midiendo el aumento de la absorbancia a 405 nm (Castillo y *col.*, 2015). La presencia de PYR1 y ABA disminuyen la velocidad de la reacción al inhibir la fosfatasa y esa disminución se debe a la actividad de PYR1.

Para los ensayos con proteínas PsTRX α 1 e HisAtPYR1 reducidas u oxidadas se realizaron tratamientos previos modificando ligeramente el método seguido por Calderón y *col.* (2017a). Se disolvieron entre 100-120 μ g de proteína recombinante en un volumen final de 500 μ L de tampón 20 mM Tris-HCl pH 7,9 conteniendo 50 mM NaCl y 5% glicerol (v/v). En el caso de las proteínas reducidas, se añadió a la disolución 2 mM de DTT y se mantuvo en agitación por inversión a 4°C durante 1 hora, mientras que para las proteínas oxidadas se añadió 4 mM de H $_2$ O $_2$ y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras los tratamientos de reducción u oxidación, los 500 μ L con proteínas modificadas se filtraron a través de dispositivos Amicon™ Ultra-0,5 mL 3K. A continuación, se cargaron 400 μ L de tampón nuevo sin DTT y se centrifugaron. Este proceso se repitió dos veces para recoger finalmente las proteínas concentradas sin DTT.

Para medir la actividad fosfatasa, la relación molar utilizada fue de 1:2 (fosfatasa: PYR1) y, cuando se indicó, se añadieron 2 μ M de PsTRX α 1, previamente reducida por DTT como se ha descrito anteriormente. Las proteínas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente en agua Milli-Q en ausencia (-) y presencia (+) de 10 μ M de ABA. La reacción tuvo lugar en 100 μ L de solución de reacción que contenía 25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM MnCl $_2$ y 10 mM pNPP (*Sigma-Aldrich*) midiendo cada 30 segundos durante 30 minutos en un Espectrofotómetro de microplaca (Multiskan GO, *Thermoscientific*).

4.9. Persulfuración de proteínas de *A. thaliana*

Los ensayos de persulfuración proteica se han realizado en plantas de 19 días de los genotipos WT (Col-0) y de los mutantes *Attrx α 1* KO1 y KO2, así como el sobreexpresante OEX1, crecidos en ausencia y presencia durante 7 días de 300 mM NaCl, tal y como se describió en el apartado 1.2.2.

4.9.1. Detección en gel

Siguiendo el protocolo descrito en Aroca y *col.* (2022), se realizó el ensayo para detectar y comparar de forma semicuantitativa el patrón de persulfuración de las proteínas de *A. thaliana* en las condiciones descritas. En este método basado en el cambio de dimedona, se realizan dos pasos principales en los extractos proteicos. En el primer paso, todas las cisteínas y grupos amino en las proteínas reaccionan con 4-cloro-7-nitrobenzofurazán (Cl-NBF) para producir una variedad de aductos con una señal de

fluorescencia verde característica que podría utilizarse para medir la carga proteica total. En el segundo paso, solo los aductos de cisteína persulfurada se marcan selectivamente con una mezcla de dimedona azida-2 (DAz-2; *Cayman Chemical*) y Cy5-alquino (*Lumiprobe*), que contiene una fracción de fluorescencia Cy5 para generar una señal de fluorescencia roja.

4.9.1.1. Reacción y bloqueo con CI-NBF

Se partió de 500 mg de material pulverizado en nitrógeno líquido y se resuspendió en 500 µL de tampón de bloqueo frío (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2% SDS, 5 mM CI-NBF (preparado en DMSO) y cóctel inhibidor de proteasas 1x libre de EDTA, (*Roche*)). Se incubaron las muestras en un termobloque a 37°C durante 30 minutos con agitación leve protegidas de la luz. Pasado el tiempo de bloqueo, se centrifugaron las muestras a 12.000 xg en una microcentrífuga durante 20 minutos a 4°C para eliminar los restos vegetales y se recogieron los sobrenadantes en un nuevo microtubo, siempre protegiendo de la luz. A continuación, se precipitaron las proteínas añadiendo a los sobrenadantes igual volumen de metanol y un cuarto de volumen de cloroformo. Se agitaron las muestras mediante vórtex, y se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 xg en frío. Tras la centrifugación, las proteínas se precipitaron en una intercapa formada entre una fase acuosa/metanol (fase superior) y fase orgánica/cloroformo (fase inferior). Para obtener el precipitado de proteínas, se retiró con cuidado la fase acuosa superior por inclinación del microtubo y posteriormente, la fase orgánica. La fase proteica se lavó con 500 µL de agua MilliQ, 500 µL de metanol y 125 µL de cloroformo. Se mezcló mediante vórtex, y se centrifugó durante 10 minutos en frío a 16.000 xg. Se eliminaron las dos capas, como se explicó anteriormente, y se volvió a recuperar el precipitado de proteínas. Se realizó un último lavado con 500 µL de metanol, se agitó mediante vórtex y se centrifugó a 16.000 xg en frío durante 10 minutos. Se eliminó el metanol y se dejó secar el precipitado dentro de la campana extractora de gases, protegido de la luz. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

4.9.1.2. Marcaje con DAz-2/Cy5

Para proceder con el segundo paso de marcaje con la mezcla DAz-2/Cy5, se resuspendieron los precipitados de las muestras obtenidas como se ha descrito en la sección anterior, añadiendo primero 30 µL de 10% SDS (p/v). Luego, se añadieron 120 µL de PBS 1x (pH 7,4), suplementado con el cóctel inhibidor de proteasas 1x libre de

EDTA (*Roche*). Las muestras se agitaron mediante vórtex y para la completa disolución del precipitado se utilizó un Bioruptor (o baño de sonicación) con 10 ciclos de 60 segundos ON y 30 segundos OFF. Se determinó la concentración total de proteínas espectrofotométricamente utilizando el DC *Protein Assay* (*BioRad*) a 650 nm, reactivo compatible con detergentes. Se ajustó la concentración final de proteínas a 2 µg/µL.

Se preparó la mezcla DAz-2/Cy5 con antelación, combinando PBS 1x pH 7,4; 30% acetonitrilo (v/v); 1 mM DAz-2 (*stock* preparado en DMSO; *Cayman Chemical*); 1 mM Cy5-alquino (fluoróforo; *stock* preparado en DMSO; *Lumiprobe*); 2 mM de complejo TBTA-Cu y 4 mM de ácido L-ascórbico, en un volumen final de 150 µL. Para obtener una mezcla homogénea, se dejó la preparación durante toda la noche a temperatura ambiente en un agitador rotatorio. Al día siguiente, la reacción se paró por adición de EDTA a una concentración final de 20 mM durante 1 hora. La mezcla final se alícuotó (20 µL/alícuota) y se almacenó a -20 °C (tiempo inferior a dos meses).

Las muestras de proteínas fueron incubadas con 25 µM de la mezcla DAz-2/Cy5 durante 30 minutos a 37°C y protegidas de la luz. Luego, las proteínas fueron precipitadas añadiendo un volumen igual de metanol y un cuarto de volumen de cloroformo. Se agitaron las muestras mediante vórtex y se centrifugaron durante 10 minutos a 16.000 xg en frío. Tras la centrifugación, las proteínas se precipitaron en una intercapa formada entre una fase acuosa/metanol (fase superior) y fase orgánica/cloroformo (fase inferior). Para obtener el precipitado de proteínas, se retiró con cuidado la fase acuosa superior por inclinación del microtubo y posteriormente, la fase orgánica. La fase proteica se lavó con 500 µL de agua MilliQ, 500 µL de metanol y 125 µL de cloroformo. Se mezcló mediante vórtex y se centrifugó durante 10 minutos en frío a 16.000 xg. Se eliminaron las dos capas, como se explicó anteriormente, y se volvió a recuperar el precipitado de proteínas. Se realizó un último lavado con 500 µL de metanol, se agitó mediante vórtex y se centrifugó a 16.000 xg en frío durante 10 minutos. Se eliminó el metanol y se dejó secar el precipitado dentro de la campana extractora de gases, protegido de la luz. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

4.9.1.3. Electroforesis SDS-PAGE

Las muestras obtenidas según se ha descrito en la sección anterior fueron disueltas en 30 µL de 10% SDS (p/v) y 120 µL de PBS 1x (pH 7,4), suplementado con cóctel

inhibidor de proteasas 1x libre de EDTA (*Roche*). Se determinó espectrofotométricamente la concentración de proteínas totales utilizando el reactivo DC *Protein Assay* (*BioRad*). Se mezclaron 3 partes de la muestra disuelta que contenía 50 µg de proteína, con 1 parte de tampón Laemmli 4x suplementado con 10% β-mercaptoetanol (v/v). Las muestras se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos y se separaron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 10%, protegiendo a las muestras de la luz durante la electroforesis. Al finalizar la migración, se fijaron los geles (solución de fijación: 12,5% metanol (v/v) y 4% ácido acético (v/v) en agua) durante 30 minutos con agitación suave y protegidos de la luz. Se registró el gel a 640 nm para la señal Cy5 y a 488 nm para la señal NBF en un analizador de imagen fluorescente Typhoon 9500 FLA (*AmershamTM, GE Healthcare*). El nivel total de persulfuración en los extractos de proteínas totales marcadas de *A. thaliana* se cuantificó midiendo la intensidad de la señal de fluorescencia Cy5 (en color rojo; correspondiente a las proteínas persulfuradas P-SSH) y NBF (en color verde; correspondiente al total de proteínas cargadas) utilizando el *software* de análisis digital de imágenes ImageJ (*NIH*) y calculando la relación mediante la ratio Cy5/NBF (Fig. 27a).

4.9.2. Identificación de proteínas persulfuradas

Para la identificación de proteínas persulfuradas mediante análisis proteómico, una vez bloqueadas las cisteínas con Cl-NBF, se utilizó un método modificado del de intercambio con biotina (*Biotin Swich*) que permite detectar cisteínas modificadas postraduccionalmente mediante persulfuración, marcando con una sonda de DCP-Bio1 (3-(2,4-dioxociclohexil) propil-biotina 1), una forma biotilada de la dimedona. Posteriormente las muestras se analizarían por LC/MS/MS como se detalla a continuación.

4.9.2.1. Marcaje con DCP-Bio1

Siguiendo la metodología de Aroca y *col.* (2022) y en colaboración con este grupo del laboratorio de la Dra. Cecilia Gotor y del Dr. Luis Romero (IBVF-CSIC, Sevilla), se partió de 500 mg de material vegetal pulverizado que se resuspendieron en 500 µL de tampón de lisis frío (PBS 1x pH 7,4, 1 mM EDTA, 2% SDS (p/v)), y se bloquearon con Cl-NBF, como ha descrito en el apartado anterior, hasta obtener el precipitado de proteínas. Se añadieron 200 µM de DCP-Bio1 (*stock* preparado en DMSO, *Merck*) y se incubó la mezcla a 37°C durante 2 horas. Se precipitaron las proteínas como se

describió en el apartado de bloqueo con Cl-NBF. Se resuspendieron las muestras de proteínas en 500 μ L de PBS 1x (pH 7,4), suplementado con 0,1% SDS (p/v) y cóctel inhibidor de proteasas 1x libre de EDTA (*Roche*). Se añadieron 150 μ L de microesferas magnéticas de estreptavidina Sera-Mag (*Cytiva*) y se incubaron las muestras a 4°C durante toda la noche con agitación suave en agitador rotatorio. Los microtubos se colocaron en un imán rotatorio (*Invitrogen™ DynaMag™-Spin Magnet*) y, tras varios segundos, las microesferas se separaron del sobrenadante, el cual fue desechado. Los microtubos se retiraron del imán y las microesferas magnéticas se lavaron resuspendiéndolas en 1 mL de PBS 1x (pH 7,4), suplementado con 0,001% Tween-20 (v/v) a temperatura ambiente. Se volvieron a colocar los microtubos en el imán para realizar los lavados, desechando el sobrenadante. Este paso fue repetido tres veces. A continuación, las microesferas magnéticas se lavan dos veces con 1 mL de PBS 1x pH 7,4 como se ha descrito anteriormente y una vez con 1 mL de H₂O con calidad para LC/MS. Después de los seis lavados, las microesferas se incubaron con 2,25 M de hidróxido de amonio (NH₄OH) a temperatura ambiente durante toda la noche, con agitación suave. A continuación, las muestras se localizaron de nuevo en el imán rotatorio, recogiendo los sobrenadantes en microtubos nuevos (tubos con alta calidad para no contaminar las muestras a analizar por Espectrometría de Masas) y las microesferas magnéticas fueron desechadas. Las muestras se neutralizaron con ácido fórmico puro (CH₂O₂; calidad para LC/MS). Se determinó la concentración de proteínas espectrofotométricamente.

4.9.2.2. Análisis por Espectrometría de Masas

Para identificar las proteínas persulfuradas se tomó una alícuota de 50 μ g de proteínas de cada grupo de tratamiento marcadas con DCP-Bio1 y se digirieron con tripsina modificada (calidad para secuenciación por MS; *Sigma Aldrich*) a 37°C durante toda la noche en un agitador. Una alícuota de 1 μ g de los péptidos obtenidos de cada muestra se separaron e identificaron mediante Cromatografía líquida nano (nLC; *Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus, AB SCIEX*) acoplada a un Espectrómetro de masas de alta velocidad TripleTOF 5600 (*AB SCIEX*) con una fuente Nanospray III en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC; Madrid, España). Los datos obtenidos se procesaron utilizando el *software* Analyst® TF 1.5.1 (*AB SCIEX*). Las búsquedas de las proteínas de *A. thaliana* se realizaron en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org>) y sus correspondientes entradas invertidas utilizando Mascot

Server v. 2.5.1 (*Matrix Science*, Londres, Reino Unido) (Aroca y col., 2017). El análisis de enriquecimiento singular (SEA) de *Gene Ontology* (GO) se realizó utilizando la herramienta *web* y la base de datos específica para especies agrícolas AgriGO (*GO Analysis Toolkit and Database for Agricultural Community*; <http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>) para la clasificación de las distintas ontologías: función molecular (GOTERM_MF; *Molecular Function*), componentes celulares (GOTERM_CC; *Cellular Content*) y procesos biológicos (GOTERM_BP; *Biological Process*) de los resultados obtenidos (Du y col., 2010). A través de *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID2021; <https://david.ncifcrf.gov/>), actualizada en 2021, utilizando los términos GO se realizaron las búsquedas de las proteínas incluidas en los enriquecimientos (Sherman y col., 2022) (Fig. 27b).

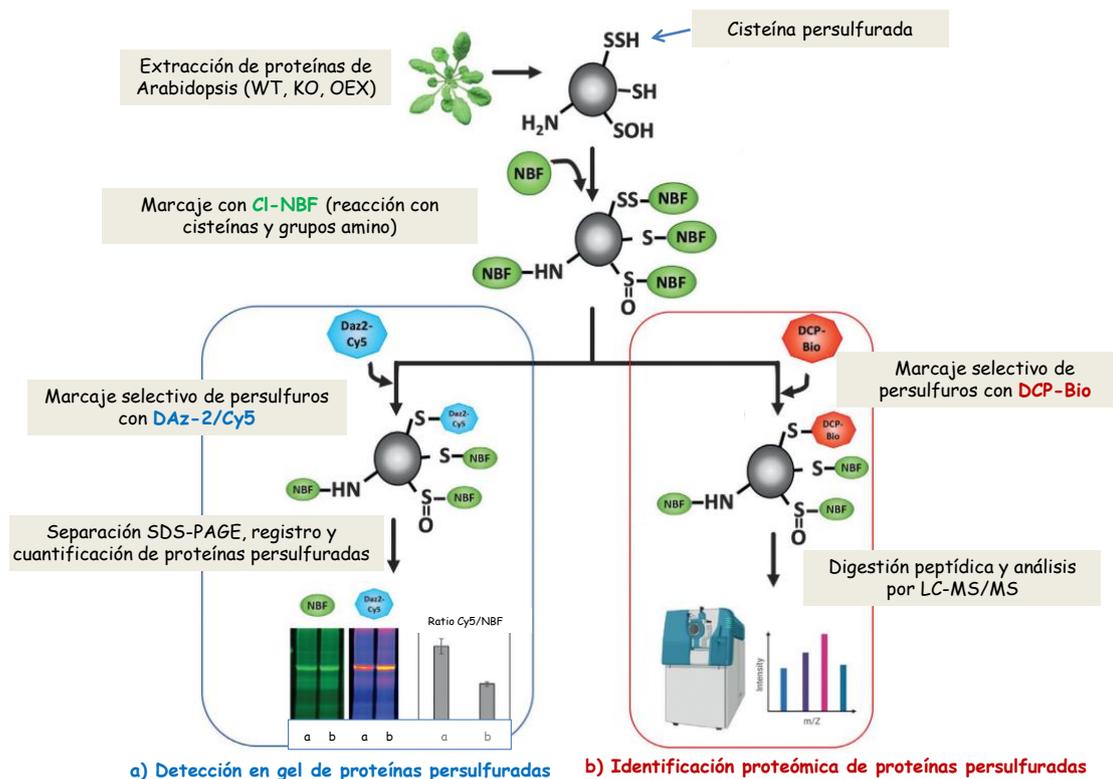


Figura 27. Esquema resumen del tratamiento de las muestras para analizar la persulfuración (P-SSH). a) Detección en gel del patrón de persulfuración de proteínas a partir de extractos foliares de *A. thaliana* de los genotipos WT (Col-0) y mutantes KO y OEX de *Attrxol1* tras un bloqueo inicial con el fluoróforo Cl-NBF de los grupos tiol, persulfuros y aminos (control de carga total de proteínas), y un posterior marcaje selectivo con Daz-2 de aductos de cisteínas persulfuradas. Mediante el cálculo de la ratio de las señales de intensidad de fluorescencia Cy5/NBF, se obtiene el nivel de persulfuración, relación que puede ser comparada de forma semicuantitativa entre los distintos genotipos y condiciones. b) Identificación

proteómica de las proteínas persulfuradas mediante Espectrometría de Masas. Partiendo de un bloqueo total de las cisteínas con NBF, se realiza un marcaje selectivo de persulfuros con DCP-Bio. Tras una digestión con tripsina, se obtienen fragmentos peptídicos que son separados mediante Cromatografía líquida (LC) e identificados mediante Espectrometría de Masas en *tándem* (MS/MS). Modificado de Aroca y *col.* (2022).

5. Tratamiento estadístico

En los diferentes estudios, cada experimento se repitió al menos tres veces en el tiempo con tres repeticiones biológicas por tratamiento para cada genotipo en cada experimento. Los valores presentados son la media \pm error estándar.

En los estudios de autofagia para representar las diferencias significativas ($p < 0,05$) entre genotipos en cada condición se utilizaron distintas letras según la prueba b de Tukey, usando el software SPSS (IBMVR SPSSVR Statistics 19). Para comparar en cada genotipo la condición control con el tratamiento con H_2O_2 , las diferencias significativas se utilizó la prueba *t* de Student $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**) o $P < 0,001$ (***).

En los ensayos relativos a PYR1, los datos se sometieron a la prueba *t* de Student ($P < 0,05$ (*)) utilizando el programa IBM SPSS Statistics (*Statistical Package for Social Sciences*, 2011).

En los estudios de persulfuración se analizaron dos réplicas biológicas para cada genotipo y condición (WT, KO1, OEX1) en un primer estudio, y tres réplicas biológicas en un segundo ensayo (WT, KO1, KO2) con un mínimo de 4 plantas por réplica. Se ha considerado un nivel de péptidos con FDR (*False Discovery Rate*) $\leq 1\%$ en los análisis cuantitativos. Una descripción detallada del análisis por Espectrometría de Masas se presenta en Aroca y *col.* (2017).

RESULTADOS

1. Papel de la TRXo1 en la autofagia inducida por estrés oxidativo

Con el objetivo de llevar a cabo un estudio de la existencia de un proceso autofágico en células de tabaco BY-2 sometidas a un tratamiento oxidativo con H₂O₂, así como la función que pueda tener la TRXo1 en el proceso, se han analizado líneas control (GFP) y sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2). Inicialmente, comprobamos que las líneas estaban transformadas, visualizando el marcador de transformación GFP por Microscopía de fluorescencia, verificándose que, efectivamente, las células presentaban fluorescencia GFP tanto en la línea control transformada con un vector con la proteína GFP dirigida al retículo endoplasmático (“vacío” sin *PsTRXo1*), como en las líneas OEX1 y OEX2 que portaban junto a GFP, el gen *PsTRXo1* bajo un promotor CaMV 35S (Ortiz-Espín y col., 2015) (Fig. 28).



Figura 28. Comprobación de la transformación GFP/*PsTRXo1* en células TBY-2. Visualización de GFP por Microscopía de fluorescencia y contraste de fase en líneas transformadas control (GFP) y sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2). Se presentan también las imágenes de contraste de fase de cada una de ellas.

1.1. Medida de viabilidad y peso fresco en las líneas celulares

Los cultivos celulares TBY-2 de la línea control (GFP) y dos sobreexpresantes (OEX1 y OEX2) se sometieron a un tratamiento con 35 mM H₂O₂ en el día 5 de crecimiento, tal y como ya se había hecho en un trabajo anterior del grupo (Ortiz-Espín y col., 2015). La sobreexpresión de *PsTRXo1* provocaba un aumento de la viabilidad en el cultivo después del tratamiento oxidativo junto a un incremento del estado antioxidante y al retraso de la muerte celular que presentan en estas condiciones (Ortiz-Espín y col., 2015). En el transcurso de esta Tesis Doctoral, hemos analizado si el proceso de reciclaje celular autofagia también podría estar colaborando en dicho incremento observado de la viabilidad celular. Para abordar este estudio, inicialmente confirmamos que, de forma similar a la encontrada en dicho trabajo, las tres líneas

presentaban una viabilidad similar (cerca al 100%) durante el crecimiento del cultivo hasta los 8 días del mismo (Fig. 29A). También comprobamos que como describimos anteriormente, el tratamiento con H_2O_2 provocaba una mayor mortalidad en las células que no sobreexpresan *PsTRXo1*, presentando alrededor del 30% de viabilidad a las 24 horas (Fig. 29B) en comparación con el 70% observado en las dos líneas OEX.

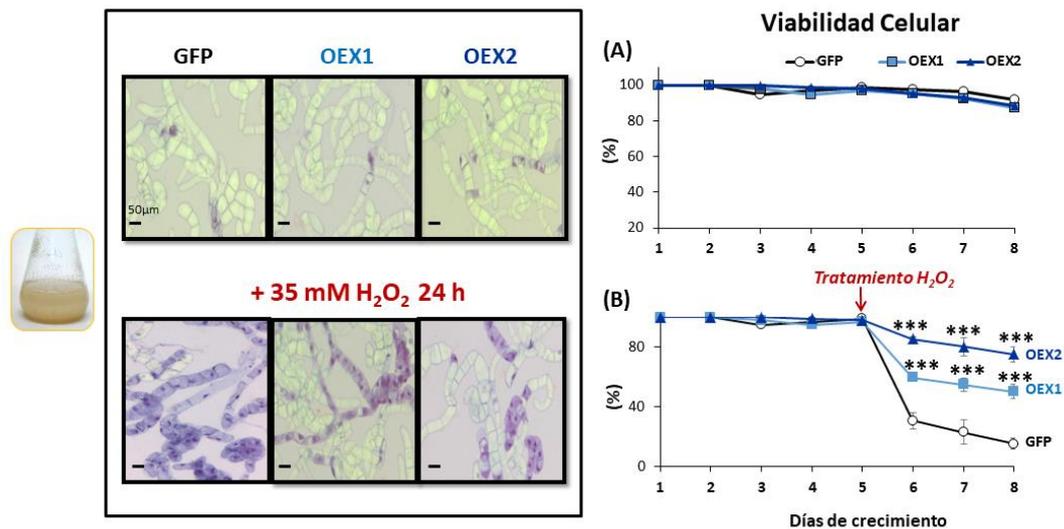


Figura 29. Viabilidad celular de la línea TBY-2 no sobreexpresante (GFP control) y dos líneas sobreexpresantes *PsTRXo1* (OEX1 y OEX2) sin tratar (A) y tratadas con 35 mM H_2O_2 (B). La viabilidad celular (en porcentaje) se midió usando colorante azul de tripán durante los 8 días de cultivo, añadiendo H_2O_2 el día 5 de crecimiento como se indica en la figura. Los valores representan la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. Las diferencias de los valores de las células OEX relacionadas con la línea de control en cada tiempo en ausencia de tratamiento no fueron significativas según la prueba t de Student ($P < 0,05$ (*), $n > 1000$ células) mientras que se encontraron diferencias significativas en el tratamiento con H_2O_2 ($P < 0,001$ (***), $n > 1000$ células).

Además, se analizó el peso fresco de los cultivos y se encontró que era similar en las tres líneas durante el crecimiento en ausencia de H_2O_2 (Fig. 30A). El tratamiento con H_2O_2 disminuía drásticamente el peso fresco en las células control, mientras que las líneas OEX mantenían un peso fresco alto después del tratamiento (Fig. 30B), lo que implicaba que en estas condiciones el crecimiento se encontraba menos comprometido como efecto de la sobreexpresión de *PsTRXo1*.

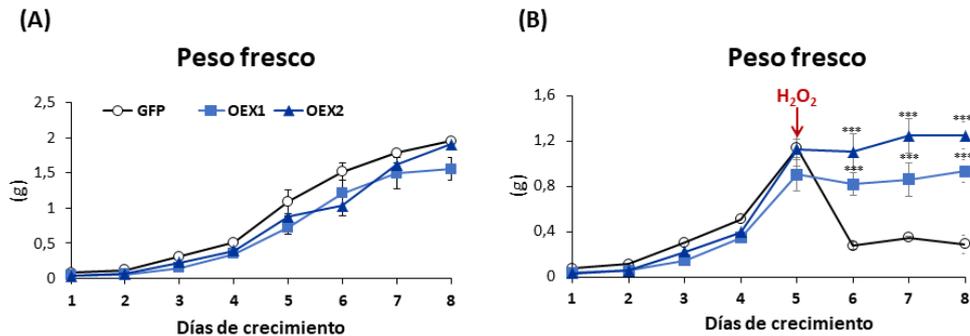


Figura 30. Peso fresco del cultivo de la línea TBY-2 no sobreexpresante (GFP control) y dos líneas sobreexpresantes *PsTRXo1* (OEX1 y OEX2) en ausencia (A) y tras el tratamiento con 35 mM H_2O_2 (B). El peso fresco (g) se midió durante los 8 días de cultivo, añadiendo H_2O_2 el día 5 de crecimiento como se indica en la figura. Los valores representan la media \pm error estándar de cuatro experimentos independientes. Las diferencias de los valores de las células OEX relacionadas con la línea de control en cada tiempo en ausencia de tratamiento no fueron significativas según la prueba t de Student ($P < 0,05$ (*)) mientras que se encontraron diferencias significativas en el tratamiento con H_2O_2 ($P < 0,001$ (***)).

1.2. Autofagia y viabilidad celular

La diferencia observada en la viabilidad entre las líneas celulares 24 horas después del tratamiento oxidativo nos llevó a pensar en la posible participación de la autofagia en el aumento en viabilidad observado en las células OEX. De esta forma, la autofagia podría actuar como un mecanismo protector probablemente eliminando componentes dañados en respuesta a la situación de estrés oxidativo, aumentando así la viabilidad. Lo primero que quisimos averiguar fue si una inhibición de la autofagia tendría un efecto en la viabilidad celular, así que tratamos a las células bajo estrés oxidativo con E-64d, un inhibidor de cisteín proteasas que funciona suprimiendo las proteasas lisosomales y da como resultado la acumulación de estructuras similares a autofagosomas y (auto) lisosomas. Por otro lado, si se tratan las células con E64d en conjunto con 3-metiladenina (3-MA), se revierte el efecto del E-64d, tal como ha sido descrito en células de tabaco sometidas a autofagia inducida (Takatsuka y *col.*, 2004; 2011).

De manera similar a lo mostrado en la Figura 29, medimos la viabilidad de las células control no sobreexpresantes en ausencia de tratamiento y 24 horas después del tratamiento oxidativo con H_2O_2 (+ H_2O_2). Este tratamiento provocó una disminución en la viabilidad del 96% al 20% en la línea control (Fig. 31). Paralelamente, se comprobó

que el inhibidor E-64d (+ E-64d) solo sin H₂O₂ no afectaba a la viabilidad celular. Cuando se aplicaron al cultivo no sobreexpresante (línea GFP) tanto H₂O₂ como E-64d, bien juntos o en combinación con 3-MA, no se observó ningún efecto, sugiriendo que la autofagia no estaba involucrada en la viabilidad de las células control en condiciones de tratamiento oxidativo con H₂O₂. Sin embargo, se observó un efecto diferente en las células OEX1, que mostraban una disminución en la viabilidad del 99% al 65% con el tratamiento oxidativo (Fig. 31). De nuevo, el tratamiento con el inhibidor E-64d solo no afectó su viabilidad. Interesantemente, cuando se aplicó H₂O₂ junto con E-64d a la línea OEX, se observó una marcada disminución en la viabilidad celular (alrededor del 33%), revertiéndose en presencia de 3-MA (última imagen en la Fig. 31), lo que nuevamente condujo a una alta viabilidad celular (76%), indicando una situación de supervivencia celular dependiente del proceso de autofagia.

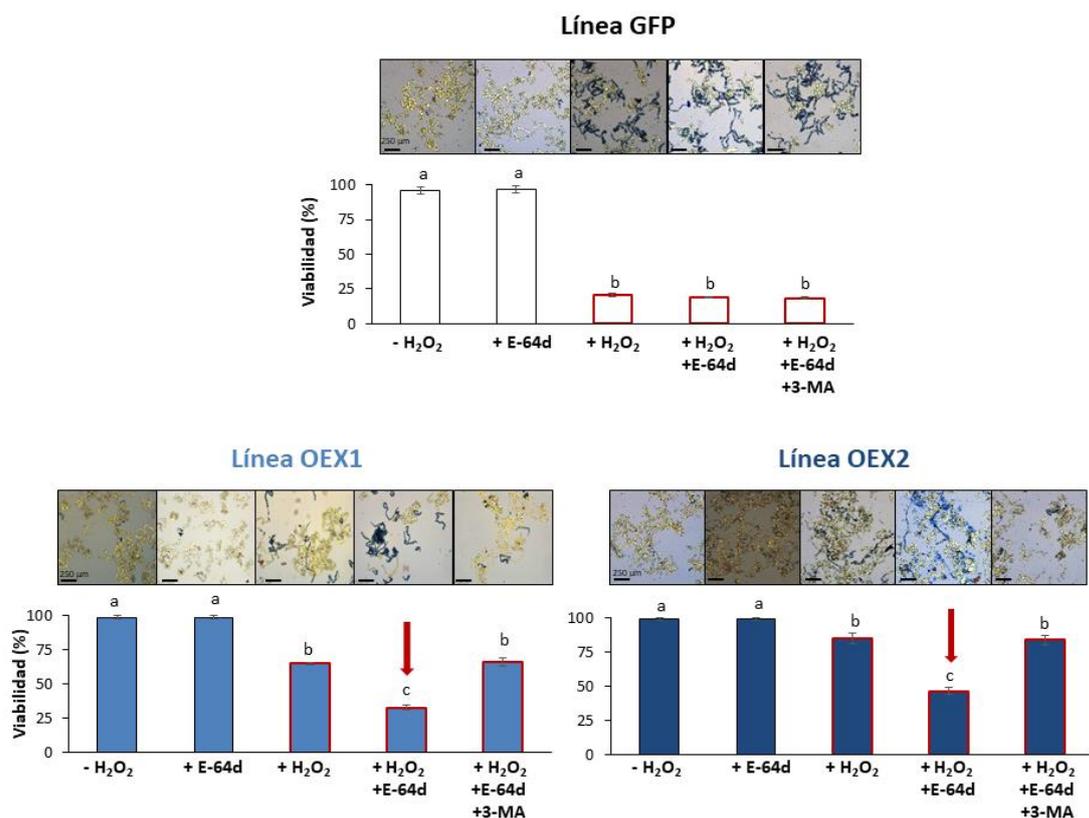


Figura 31. Viabilidad celular de las líneas TBY-2 control no sobreexpresante (GFP) y sobreexpresantes de *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de los inhibidores de autofagia E-64d y 3-MA. Se analizó la viabilidad celular (porcentaje) sin tratamiento (-) y después del tratamiento (+) con H₂O₂, E-64d, H₂O₂ + E-64d y H₂O₂ + E-64d + 3-MA utilizando colorante azul de tripán 24 horas después de los respectivos tratamientos. Los valores representan la media ± error estándar de cuatro experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05) entre tratamientos según la prueba de Tukey.

Posteriormente, investigamos si el efecto de los dos inhibidores se observaba aún en las líneas OEX 48 horas después del tratamiento con H_2O_2 , obteniéndose resultados similares (Fig. 32), por lo que el efecto de los inhibidores duró al menos este tiempo. No se analizó el efecto de los inhibidores en la línea GFP control 48 horas después del tratamiento oxidativo porque la tasa de viabilidad celular era mínima (cerca al 0%).

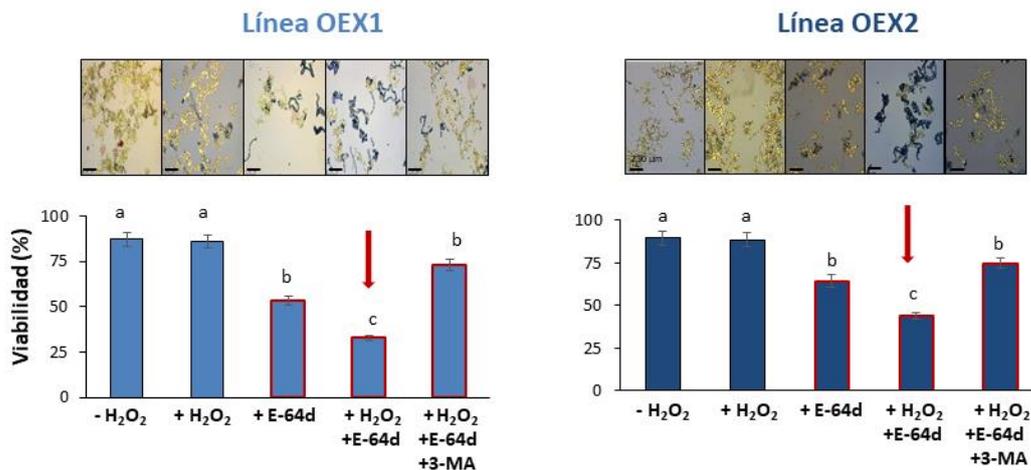


Figura 32. Viabilidad celular de las líneas TBY-2 transformadas *Pstrx01* (OEX1 y OEX2) 48 horas después del tratamiento con 35 mM H_2O_2 en ausencia y presencia de los inhibidores de la autofagia E-64d y E-64 más 3-MA.

Por otro lado, también determinamos que el 3-MA individualmente no afectaba a la viabilidad de la línea OEX1 (Fig. 33) tanto en ausencia como en presencia de H_2O_2 24 horas después del tratamiento oxidativo; mientras que a las 48 horas del tratamiento, la viabilidad disminuyó en torno al 25%.

Todos estos experimentos apuntan a una relación entre el proceso de autofagia y la viabilidad en la respuesta celular a la situación oxidativa que ocurre 24/48 horas después del tratamiento con H_2O_2 , solo cuando *PsTRX01* está sobreexpresado.

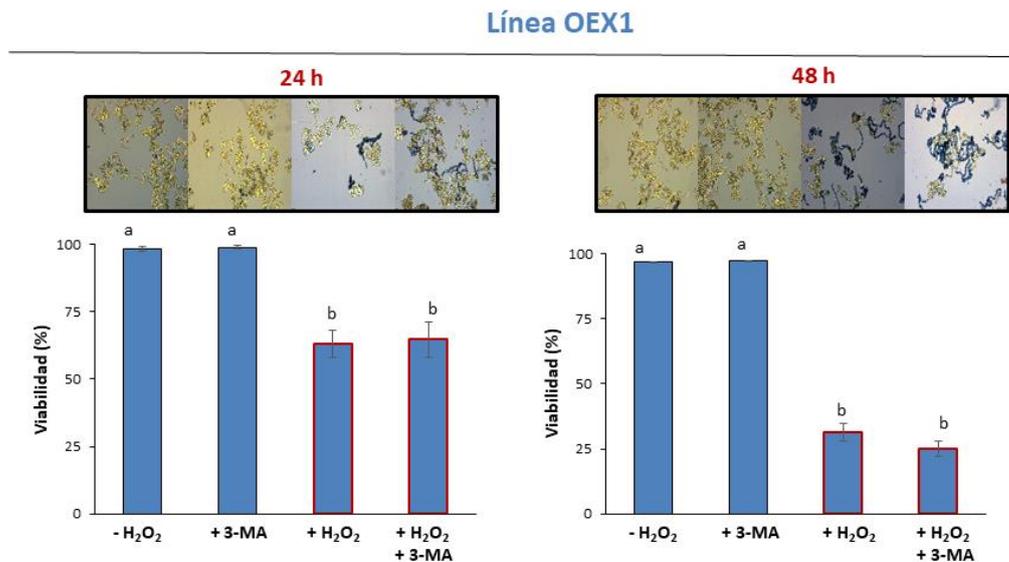


Figura 33. Viabilidad celular de la línea TBY-2 transformada con *PsTRXo1* (OEX1) 24 horas y 48 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor de la autofagia 3-MA.

1.3. Marcadores autofágicos en líneas sobreexpresantes

Tras implicar al proceso de autofagia en la mayor viabilidad celular presentada por las células sobreexpresantes de *PsTRXo1*, decidimos analizar si diferentes marcadores del mismo pudieran estar afectados por la sobreexpresión de *PsTRXo1* y por el estrés aplicado a día 5 de crecimiento, analizando los cultivos 24 horas después del tratamiento oxidativo. Así, se eligieron los genes *ATG8a* y *ATG4* como marcadores de autofagia, destacando que de los cinco genes descritos en tabaco para *ATG8*, elegimos *ATG8a* por ser de los pocos descritos que regulan su expresión en algunas situaciones de estrés. De hecho, el nivel de expresión de *ATG8a* se ha usado como marcador de autofagia en estrés en células de *A. thaliana* y tabaco (Zhou y col., 2015; Rose y col., 2006). La transformación de las células TBY-2 con *PsTRXo1* no afectó la expresión del gen *ATG8a* (Panel izquierdo en Fig. 34), mientras que el tratamiento con H₂O₂ afectó solo a las células no sobreexpresantes (GFP) (Panel derecho en Fig. 34), descendiendo la expresión génica de forma significativa (asterisco), mostrando así que la sobreexpresión permite mantener unos niveles altos de este marcador autofágico en estas células OEX. El análisis del contenido en proteína de ATG8 por *Western blot* en células no sobreexpresantes mostró dos bandas de diferentes pesos moleculares

correspondientes a las formas citosólicas libres, a saber, ATG8 alrededor de 13 kDa y debajo de ella la forma lipidada ATG8-PE (PE: fosfatidiletanolamina), que a pesar de tener mayor tamaño, migra antes por su estructura, tal y como se ha descrito anteriormente (Álvarez y *col.*, 2012). La sobreexpresión de *PsTRXo1* aumentó el nivel de ambas formas proteicas y el tratamiento con H_2O_2 aumentó el contenido de ATG8 particularmente en las líneas OEX (más del doble), especialmente en la forma ATG8-PE lipidada.

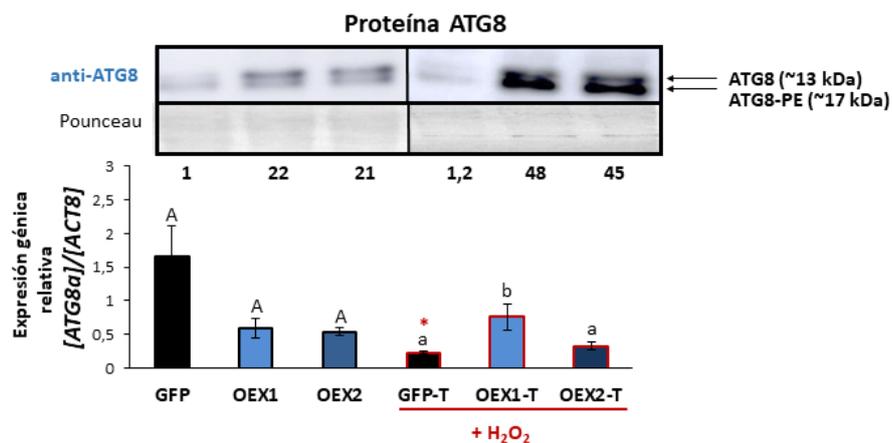


Figura 34. Expresión del gen *ATG8a* y contenido en proteínas ATG8 en la línea TBY-2 no sobreexpresante GFP y dos líneas sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) en el día 6 de crecimiento (panel izquierdo) y 24 horas después del tratamiento con 35 mM H_2O_2 (células tratadas (-T), panel derecho). El nivel de ARNm se determinó mediante qPCR en tiempo real. Los valores se expresan como expresión relativa frente al gen *NtACTINA8* (*ACT8*). Las barras muestran medias \pm error estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas biológicas en cada una y tres réplicas técnicas. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre genotipos en cada condición según la prueba de Tukey y el asterisco indica diferencia significativa del genotipo después del tratamiento con H_2O_2 en comparación con las células no tratadas, según lo determinado por la prueba t de *Student* ($P < 0,05$ (*)). *Western blot* representativo de las proteínas ATG8 (panel superior) de extractos celulares separados por SDS-PAGE y visualizados por quimioluminiscencia, señalando las formas no lipidadas y lipidadas (PE) de la proteína. Se utilizó tinción Ponceau de la membrana para corregir la carga. Los valores bajo la membrana son la media de tres experimentos cuantificados después de la densitometría (los números muestran la suma de ambas formas de ATG8) y se refieren a la intensidad de banda más baja cuyo valor es 1.

El análisis de la expresión del gen *ATG4* en las células crecidas en un medio sin H_2O_2 (Fig. 35) reveló que la transformación con *PsTRXo1* aumentó la expresión de dicho gen. El tratamiento con H_2O_2 solo afectó a las células no sobreexpresantes (GFP-T), disminuyendo la expresión del gen *ATG4*, demostrando así que la sobreexpresión de *PsTRXo1* permite el mantenimiento de niveles elevados de gen *ATG4* en las células

OEX. El análisis *Western blot* de los niveles de proteína ATG4 reveló la presencia de dos bandas reconocidas por el anticuerpo alrededor del peso molecular descrito de las isoformas X1 y X2 de las proteínas del tabaco, 53 y 57 kDa (base de datos Uniprot: XP_016513796 y XP_016513797). Además, comprobamos que la sobreexpresión de *PsTRXo1* aumentó el nivel de proteína ATG4 y, de hecho, ATG4 se detectó solo en células OEX y no en la línea control en condiciones no oxidativas. El tratamiento oxidativo indujo la acumulación de ambas isoformas ATG4 en la línea Control (GFP-T) pero de forma más intensa en las líneas OEX-T, que presentaron un mayor contenido de proteína a 53 kDa.

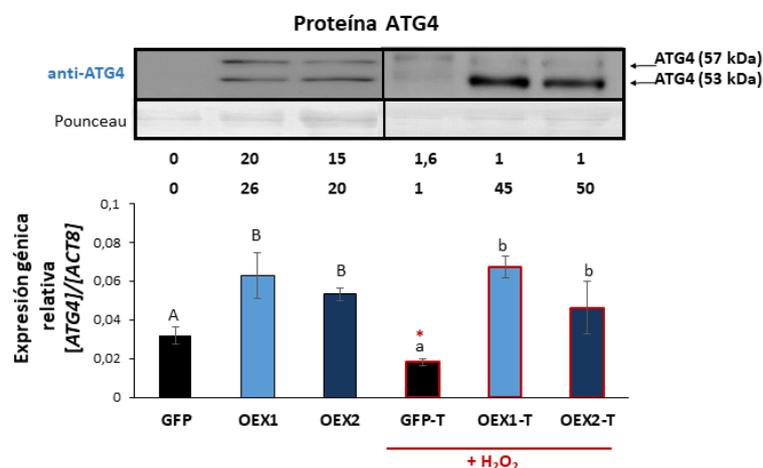


Figura 35. Expresión del gen y contenido en proteínas ATG4 en la línea TBY-2 no sobreexpresante GFP y dos líneas sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) en el día 6 de crecimiento (panel izquierdo) y 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ (células tratadas (-T), panel derecho). El nivel de ARNm se determinó mediante qPCR en tiempo real. Los valores se expresan como expresión relativa frente al gen *NtACTINA8* (*ACT8*). Las barras muestran medias \pm error estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas biológicas en cada una y tres réplicas técnicas. Las letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre genotipos en cada condición según la prueba de Tukey y el asterisco indica diferencia significativa del genotipo después del tratamiento con H₂O₂ en comparación con las células no tratadas, según lo determinado por la prueba t de *Student* ($P < 0,05$ (*)). *Western blot* representativo de las proteínas ATG4 (panel superior) de extractos celulares separados por SDS-PAGE y visualizados por quimioluminiscencia. Se utilizó tinción Ponceau de la membrana para corregir la carga. Los valores bajo la membrana son la media de tres experimentos cuantificados después de la densitometría (los números muestran el valor de cada isoforma detectada) y se refieren a la intensidad de banda más baja cuyo valor es 1.

Debido a que disponíamos del anticuerpo comercial anti-CrATG4 generado frente a *Chlamydomonas* (Cre12.g510100.t1.1), organismo cuya ATG4 presenta solo un 21% de similitud con la secuencia proteica completa de la ATG4 de tabaco, decidimos generar dos anticuerpos específicos frente a dos zonas diferentes de la secuencia proteica de

tabaco NtATG4 (anticuerpo 1 frente a ISSEPEPGPSSNIK; anticuerpo 2 frente a RKGFPPIGDSKYTS) para corroborar los resultados. El análisis *Western blot* de extractos celulares de tabaco con estos anticuerpos nos permitió detectar la banda mayoritaria de 53 kDa en el caso del anticuerpo 1 y las dos bandas proteicas de 53 y 57 kDa en el caso del anticuerpo 2, las mismas detectadas con el anticuerpo de *Chlamydomonas* (Fig. 36), quedando validados así los resultados obtenidos en los *Western blot* utilizando este último anticuerpo.

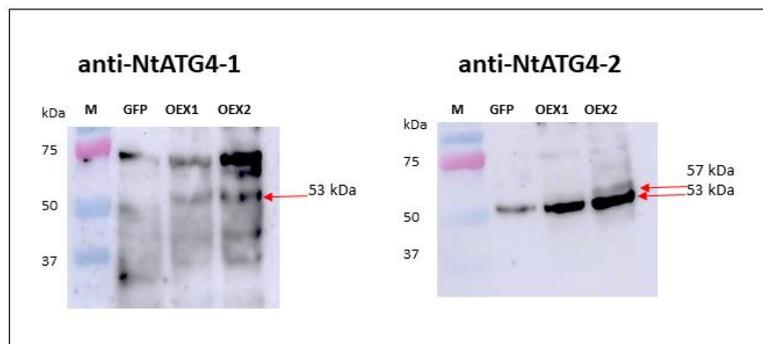


Figura 36. Contenido de proteínas ATG4. *Western blot* realizado en la línea TBY-2 no sobreexpresante GFP y dos líneas sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) en el día 6 de crecimiento utilizando dos anticuerpos frente a secuencias específicas de NtATG4.

El análisis más detallado de la secuencia aminoacídica comparativa (Programa CLUSTAL) entre las dos especies nos permitió delimitar una zona de 20-30 aa (desde 164-193 en la isoforma X1 de tabaco) que presenta una similitud de 65-75% con la de *Chlamydomonas* (en rojo Fig. 37). Más aún, acotando a 16 aa (164-179) la identidad es del 81%.

```

NtATG4  MRRIFGI-----NKTGIPNGSKSDIWLGLVCYKVVQDDDDPSIEPTQSEGFSAFVDDDFSSR  55
CrATG4b MSQALSRLKLSLSELMHGTTLSLQHTICLLGKSYGDAGTGDQ-SKALDAEAELEAMLGDFRSL  59
* : :: : * . * : * * * * . * . . * : ::*::*::* * *

NtATG4  ILVTYRKGFPPIGDSKYTSDVNWGCMLRSSQMLVAQALLHRLGRSWRKS LDKPHDQKYV  115
CrATG4b MWCTYRKDFPALGPSLLTSDVGVGCTLRSGQMLLAEAMMRVALGRDWQRCS DNLEAVR--  117
: * * * * . * * : * * * * * . * * * * . * * * * : * * . * * . * : . :

NtATG4  DILHLFGDSEESACSIHNL LQAGKTYGLSPGSWVGPYAMCRTWETLARKRE----ETGN  171
CrATG4b PVVAALLDCAEAPLSIHRICDAGGPAGIVPGRWLG PWMLCKGLEALFSQLAGAQQEPLGL  177
:: : * . * : * * * . : * * * : * * * * * : * : * * . *
    
```

Figura 37. Alineamiento de parte de las secuencias de NtATG4 y CrATG4B. En rojo se señala una zona de alta similitud.

Esta región, además, según modelización de la proteína realizada por el Profesor Javier López-Jaramillo (Universidad de Granada), está parcialmente expuesta (Fig. 38) y más aún en condiciones desnaturalizantes como es el caso del *Western blot*, por lo que se podría explicar el reconocimiento observado por el anti-CrATG4.

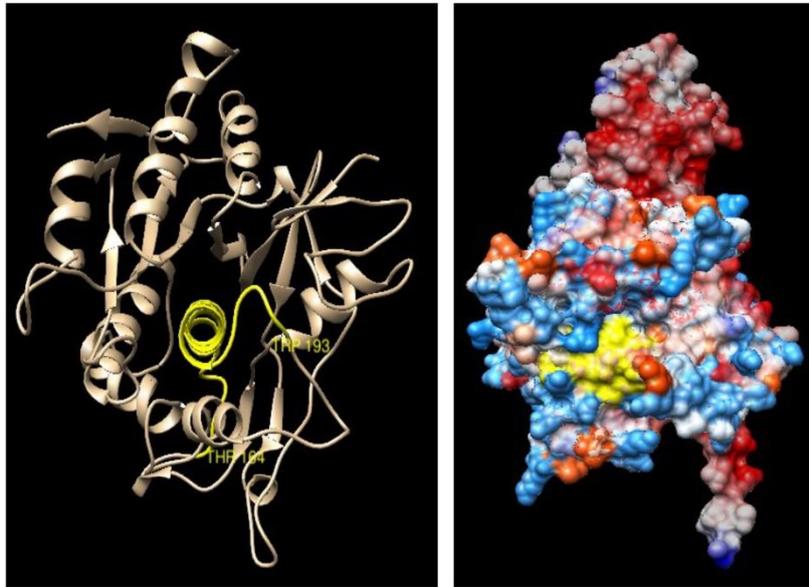


Figura 38. Modelado de la proteína ATG4 de tabaco. En amarillo se señala la zona de aminoácidos 164-193 con alta similitud con la secuencia de ATG4 de *Chlamydomonas*.

Para comprobar si los cambios en la expresión y los niveles de proteína se correlacionaban con los niveles de actividad, se ensayó la actividad de ATG4 endógena en las tres líneas celulares en presencia de DTT. En ausencia del tratamiento con H_2O_2 y en paralelo al contenido de proteína, la línea control presentó baja actividad ATG4, mientras que las células sobreexpresantes *Pstrxo1* mostraron alta actividad, como se evidencia por la presencia de un producto de escisión alrededor de 18 kDa (Fig. 39, panel izquierdo). Además, se midió la actividad de HsATG4 recombinante como control positivo. Después del tratamiento con H_2O_2 , de forma similar a lo encontrado para el contenido de proteínas, las líneas OEX mantuvieron una mayor actividad de ATG4, siendo aproximadamente el doble que la línea control, que mostró un aumento de 6 veces (Fig. 39 panel derecho).

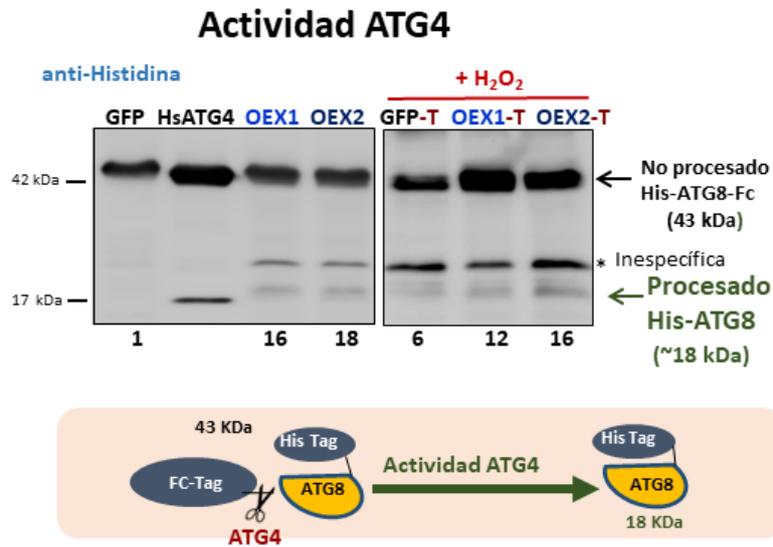


Figura 39. Actividad de procesamiento de ATG4 endógeno de la línea control GFP y dos líneas de *TBY-2* sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX). Las células se analizaron en el día 6 de crecimiento (panel izquierdo) y 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ (células tratadas (-T), panel derecho). Actividad ATG4 de extractos celulares en presencia de DTT, evidenciada siguiendo la escisión del sustrato His-ATG8-Fc quimérico recombinante de las formas sin procesar (His-ATG8-Fc) a las formas His-ATG8 procesadas (indicadas por la flecha) mediante análisis de transferencia *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-histidina. La actividad de HsATG4 recombinante se muestra como control positivo. El asterisco indica una banda no específica. Los valores son la media de tres experimentos cuantificados después de la densitometría de las bandas de 18 kDa detectadas (números bajo las membranas relacionadas con la señal en la línea de control de valor 1). En el panel inferior se presenta un esquema de la medida de la actividad.

La banda definida como inespecífica alrededor de 24 kDa que se presentaba con una mayor intensidad en las líneas de sobreexpresión (asterisco en Fig. 39 y Fig. 40), se comprobó que aparecía como resultado de la incubación de las células sin el sustrato ATG8-Fc (Fig. 39).

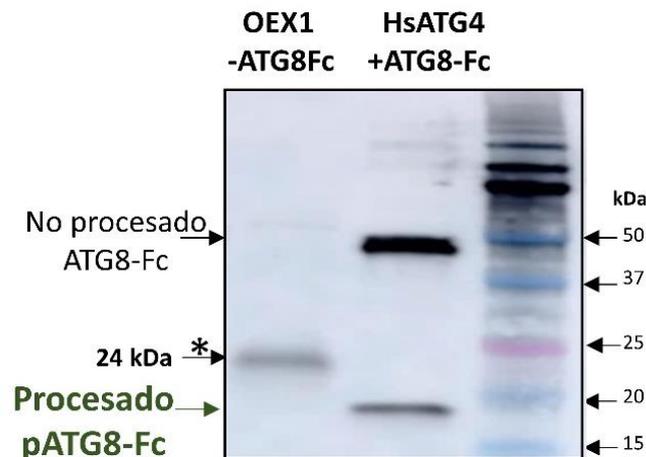


Figura 40. Experimento control para la actividad de procesamiento de ATG4 endógeno de la línea *Pstrxo1* (OEX1) 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂.

Todos estos resultados mostraron que la sobreexpresión de *PsTRXo1*, así como el propio tratamiento con H₂O₂, provocaron un aumento de los marcadores de autofagia ATG8 y ATG4, siendo las células OEX tratadas las que presentaron niveles más elevados comparados con los de las células no sobreexpresantes.

1.4. Estructuras autofágicas en líneas sobreexpresantes tras el tratamiento oxidativo

Para ampliar nuestro conocimiento del proceso de autofagia que tiene lugar en las células que sobreexpresan *PsTRXo1* bajo el tratamiento oxidativo con H₂O₂, decidimos observar la presencia de estructuras autofágicas. El proceso autofágico es muy rápido y lo que se denomina como flujo autofágico, que va desde la formación de las estructuras autofágicas hasta su degradación en vacuola, se mide con bloqueantes del proceso que permitan una acumulación de dichas estructuras, de forma que si este flujo existe, dichas estructuras se acumulan cuando se usan ciertos bloqueantes autofágicos. Por otro lado, dichas estructuras se pueden visualizar utilizando el colorante fluorescente acidotrópico *Lysotracker Deep Red* (LDR), que marca los autolisosomas en sistemas animales y las estructuras similares a autolisosomas en vegetales. E-64d es un inhibidor que bloquea la transferencia de autolisosomas a la vacuola permitiendo su acumulación, bloqueando así el flujo de autofagia por lo que las estructuras pueden ser teñidas con

LDR y visualizadas. Al igual que en los ensayos realizados anteriormente de viabilidad, el inhibidor 3-MA se usó para revertir el efecto del E-64d.

El análisis de la presencia de vesículas se realizó en las líneas control y una de las líneas sobreexpresantes OEX1 (Fig. 41 y Fig. 42, respectivamente) 24 horas después del tratamiento con H_2O_2 en presencia del inhibidor E-64d utilizando un microscopio de fluorescencia con óptica *Nomarski* (Microscopía de contraste de interferencia diferencial; DIC). En la línea control GFP apenas se visualizaron algunas vesículas principalmente en las células tratadas con el H_2O_2 tanto en DIC como tras tinción con LDR (señaladas por flechas en Fig. 41).

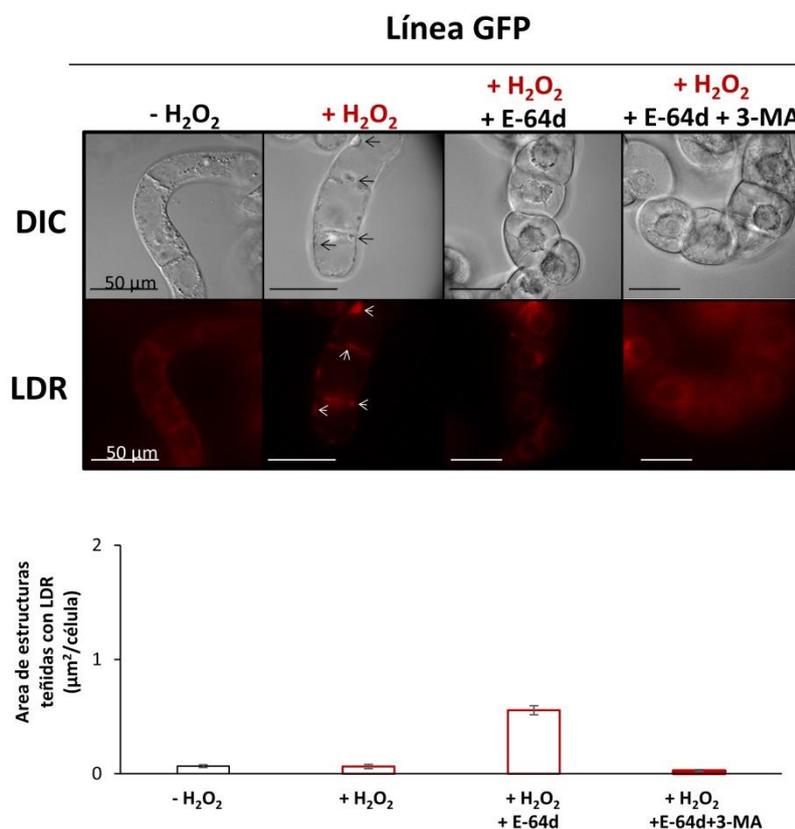


Figura 41. Visualización de la formación de estructuras similares a autolisosomas inducidas por H_2O_2 en células de tabaco BY-2 control GFP. Las imágenes de Microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y las imágenes de fluorescencia de estructuras teñidas con LDR son representativas de tres experimentos independientes. Se trataron células TBV-2 de cinco días de edad con 35 mM H_2O_2 solo o en combinación con E-64d o E-64d más 3-MA y se observaron después de 24 horas bajo un microscopio de fluorescencia equipado con una óptica *Nomarski*. Las flechas indican algunas señales de autolisosomas (teñidos en rojo). Barras de escala: 50 μm. En el panel de la derecha se presenta la cuantificación de dichas estructuras en LDR.

Sin embargo, se observó una acumulación de vesículas visualizadas tanto en células marcadas con DIC como con LDR, principalmente en células OEX1 en comparación con las células control después del tratamiento con H_2O_2 + E-64d (tercera columna en la Fig. 42). Además, señalar que algunas estructuras autofágicas se acumulaban constitutivamente en la línea OEX debido a la detección de señales LDR en células en ausencia o presencia de H_2O_2 sin el inhibidor (la primera y segunda columnas en la Fig. 42) o cuando el compuesto 3-MA estaba presente (última columna). Todos estos resultados indicaron que el inhibidor E-64d afectó principalmente a las células OEX1 bloqueando el proceso de autofagia e induciendo la acumulación de vesículas.

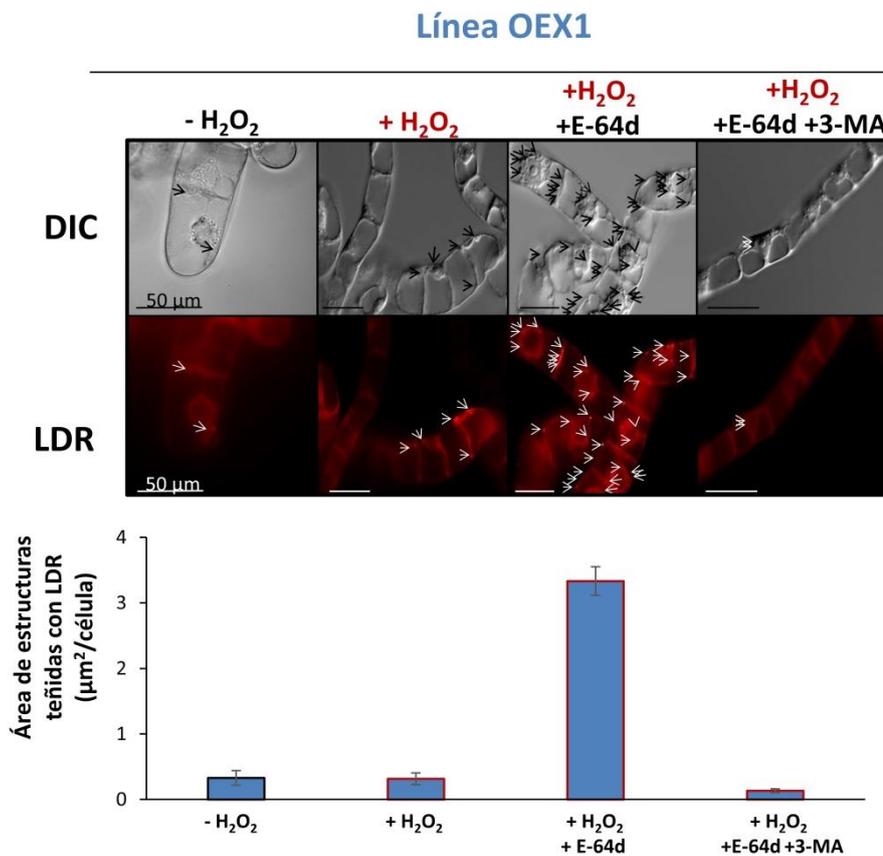


Figura 42. Visualización de la formación de estructuras similares a autolisomas inducidas por H_2O_2 en células sobreexpresantes (OEX1) *Pstrxo1*. Las imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) y las imágenes de fluorescencia de estructuras teñidas con LDR son representativas de tres experimentos independientes. Se trataron células TBY-2 de cinco días de edad con 35 mM H_2O_2 solo o en combinación con E-64d o E-64d más 3-MA y se observaron después de 24 horas bajo un microscopio de fluorescencia equipado con una óptica *Nomarski*. Las flechas indican algunas señales de autolisomas (teñidos en rojo). Barras de escala: 50 µm.

La acumulación se observó incluso 48 horas después de los tratamientos en células OEX1 (Fig. 43). Quedaba así demostrada la existencia de un flujo autofágico evidente por la acumulación de autolisosomas en las células transformadas con *PsTRXo1* sometidas al tratamiento con H_2O_2 .

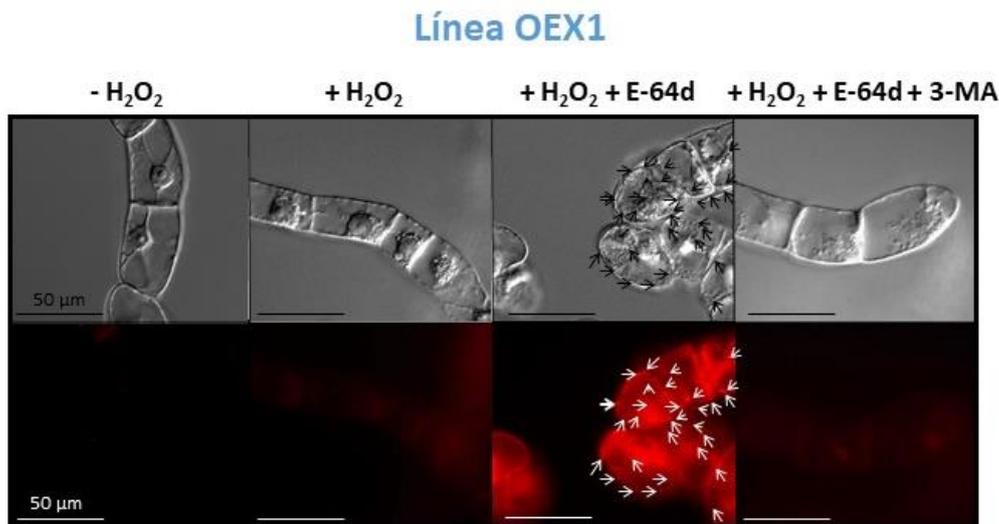


Figura 43. Visualización de la formación de estructuras similares a autolisosomas. La formación de estructuras líticas fue inducida por 35 mM H_2O_2 en células de tabaco BY-2 sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1) 48 horas después del tratamiento.

1.5. Detección de la proteína ATG8 por inmunofluorescencia

Con el fin de corroborar la existencia del flujo autofágico, se utilizó el anticuerpo anti-CrATG8 para examinar la presencia de esta proteína por inmunofluorescencia (IF) en la línea OEX1 tratada con H_2O_2 en ausencia y presencia de E-64d y en presencia de E-64d más 3-MA. Se detectó una señal de fluorescencia alta en las células tratadas con H_2O_2 más E-64d en comparación con la observada en las células tratadas con el oxidante en ausencia del inhibidor (Fig. 44), corroborando la existencia de estructuras autofágicas que contienen la proteína ATG8 en estas células tratadas con H_2O_2 . Esta acumulación de ATG8 se revirtió utilizando 3-MA en combinación con E-64d.

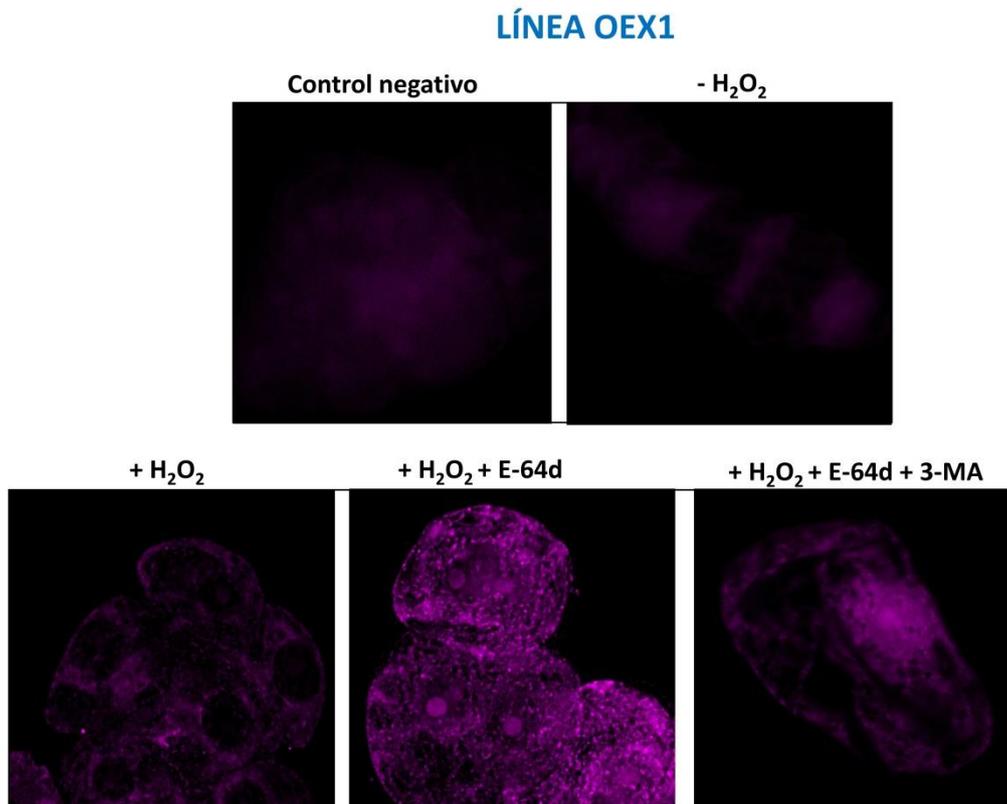


Figura 44. Inmunodetección de ATG8 en células TBY-2 sobreexpresantes *Pstrxo1* OEX1 tratadas con 35 mM H₂O₂. Se trataron las células OEX1 de cinco días de crecimiento en ausencia (-) y presencia (+) de 35 mM H₂O₂ solo o en combinación con E-64d y 3-MA y se recogieron y procesaron después de 24 horas para Microscopía de inmunofluorescencia, como se describe en Material y métodos. Las imágenes de fluorescencia de la señal reconocida por el anticuerpo anti-CrATG8 (punteados púrpuras) se muestran como representativas de tres experimentos independientes después de usar el software *Huygens Essential Microscopy Analysis*. También se presenta un control negativo sin incubación con el anticuerpo primario.

Las señales puntiformes de inmunofluorescencia ATG8 por célula se cuantificaron en las líneas no sobreexpresantes GFP y *Pstrxo1* OEX1 y los valores se presentan en la Figura 45. Después de analizar 20 células por genotipo y tratamiento, solo las líneas OEX presentaron una alta y significativa acumulación de ATG8 24 horas después del tratamiento con H₂O₂ + E-64d, siendo los valores tres veces más altos en estas líneas que en las células tratadas con H₂O₂.

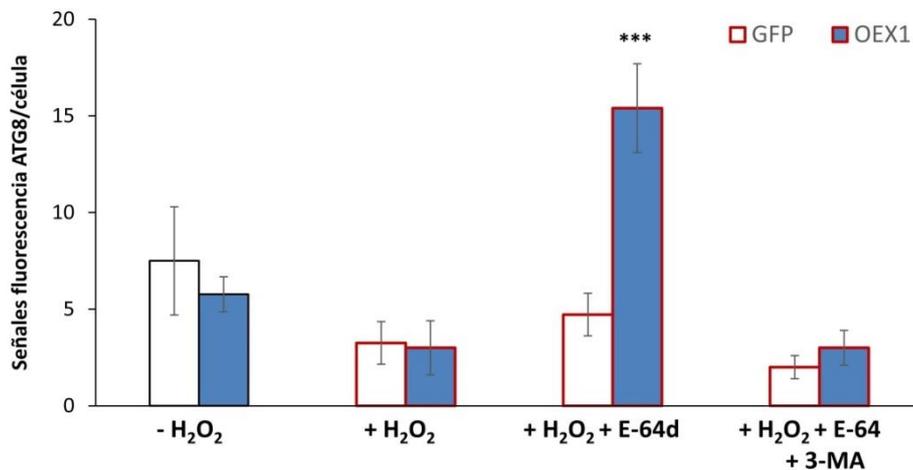


Figura 45. Cuantificación de ATG8 después del análisis de inmunofluorescencia. Número de señales puntiformes inmunofluorescentes por célula después de la inmunodetección de ATG8 en la línea no sobreexpresante GFP y *Pstrx01* OEX1 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ y en presencia de E-64d o E-64d más 3-MA, como se ha descrito en Materiales y Métodos. Se encontraron diferencias significativas entre los genotipos en comparación con las células tratadas con H₂O₂ (+ H₂O₂), como indica la prueba t de Student (P<0,001 (***)).

1.6. Viabilidad celular y estructuras autofágicas tras 14 horas del tratamiento oxidativo

Sobre la base de la baja viabilidad observada en la línea control no sobreexpresante GFP 24 horas después del tratamiento con H₂O₂ y con el fin de evaluar la posible aparición de un aumento de la autofagia como respuesta a corto plazo en esta línea, averiguamos el punto en que estas células presentaban una viabilidad similar a la observada en las líneas OEX 24 horas después del tratamiento oxidativo, eligiendo entonces 14 horas postratamiento con H₂O₂. En este tiempo, la línea control presentaba un 40% de viabilidad y las líneas OEX alrededor del 80% (Fig. 46A). Usando E-64d, no se observó ningún efecto significativo sobre la viabilidad celular en la línea GFP control mientras que en las líneas OEX, la viabilidad sí resultó afectada y disminuyó de nuevo significativamente al 60% (Fig. 46B). 3-MA no afectó la viabilidad en la línea de control después del tratamiento oxidativo, mientras que revirtió el efecto de E-64d en la línea OEX1. Se obtuvieron resultados similares en la línea OEX2.

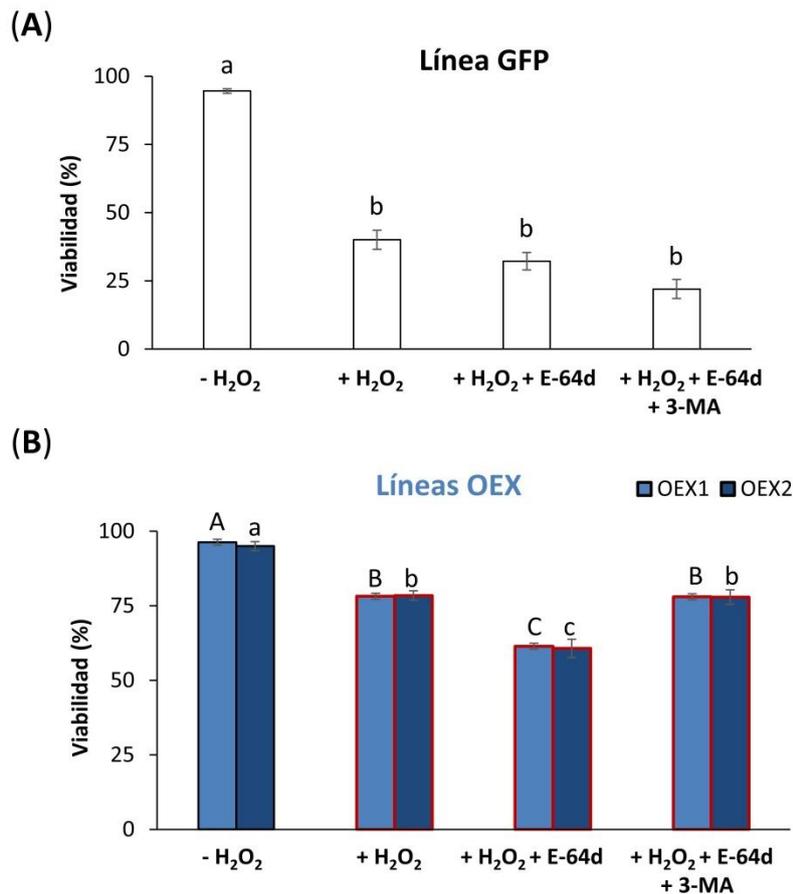


Figura 46. Viabilidad celular de la línea GFP control no sobreexpresante y las líneas sobreexpresante *Pstrxo1* TBV-2 OEX1 y OEX2. Las células se analizaron 14 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de los inhibidores de la autofagia E-64d y 3-MA. Se comprobó la viabilidad celular (porcentaje) de las células sin tratamiento (-) y después del tratamiento con H₂O₂, H₂O₂+E-64d y H₂O₂+E-64d+3-MA utilizando colorante azul de tripán 14 horas después del tratamiento oxidativo. Los valores representan la media ± error estándar de cuatro experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05) entre tratamientos (mayúsculas para OEX1 y minúsculas para OEX2) según la prueba de Tukey.

También comprobamos el efecto de los inhibidores 2 horas después del tratamiento con H₂O₂ y no encontramos cambios en la viabilidad celular en ninguna de las tres líneas (Fig. 47), verificando que la autofagia aún no se evidenciaba en este corto tiempo en las líneas sobreexpresantes tratadas.

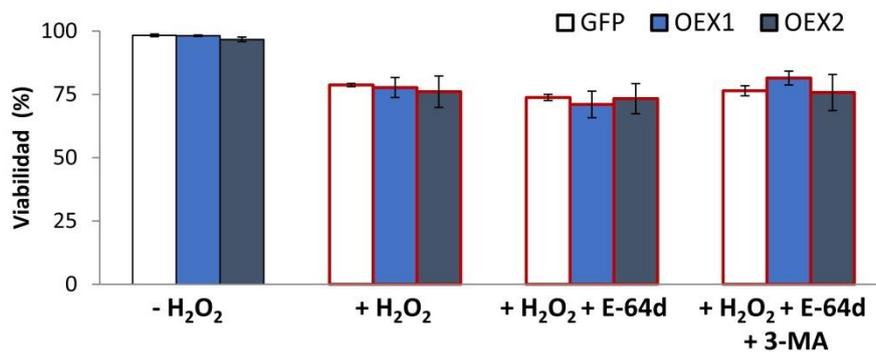


Figura 47. Viabilidad celular de la línea GFP control no sobreexpresante y las líneas sobreexpresante *Pstrxol* TBY-2 OEX1 y OEX2. Las células se analizaron tras 2 horas del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de los inhibidores de la autofagia E-64d y 3-MA. Se comprobó la viabilidad celular (porcentaje) de las células sin tratamiento (-) y después del tratamiento con H₂O₂, H₂O₂+E-64d y H₂O₂+E-64d+3-MA utilizando el colorante azul de tripán 2 horas después del tratamiento oxidativo. Los valores representan la media ± error estándar de cuatro experimentos independientes. No se encontraron diferencias significativas (P<0,05) entre el tratamiento con H₂O₂ y los tratamientos en presencia de inhibidores según la prueba de Tukey.

Estos resultados sugieren la ausencia de autofagia inducida en la línea control no sobreexpresante GFP en respuesta a la condición oxidativa tras las 14 horas. Para corroborarlo, analizamos la presencia de estructuras similares a autolisosomas 14 horas después del tratamiento con H₂O₂, en ausencia y presencia del inhibidor E-64d en una de las líneas OEX1 comparada con la línea GFP control. Similar a lo observado para el efecto de E-64d sobre la viabilidad celular, la fluorescencia de baja intensidad no se acompañó de acumulación de dichas estructuras en la línea control (Fig. 48A), mientras que sí se observó una mayor intensidad y estas estructuras se acumularon principalmente en las células tratadas con E-64d de la línea OEX1 14 horas después del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 48B).

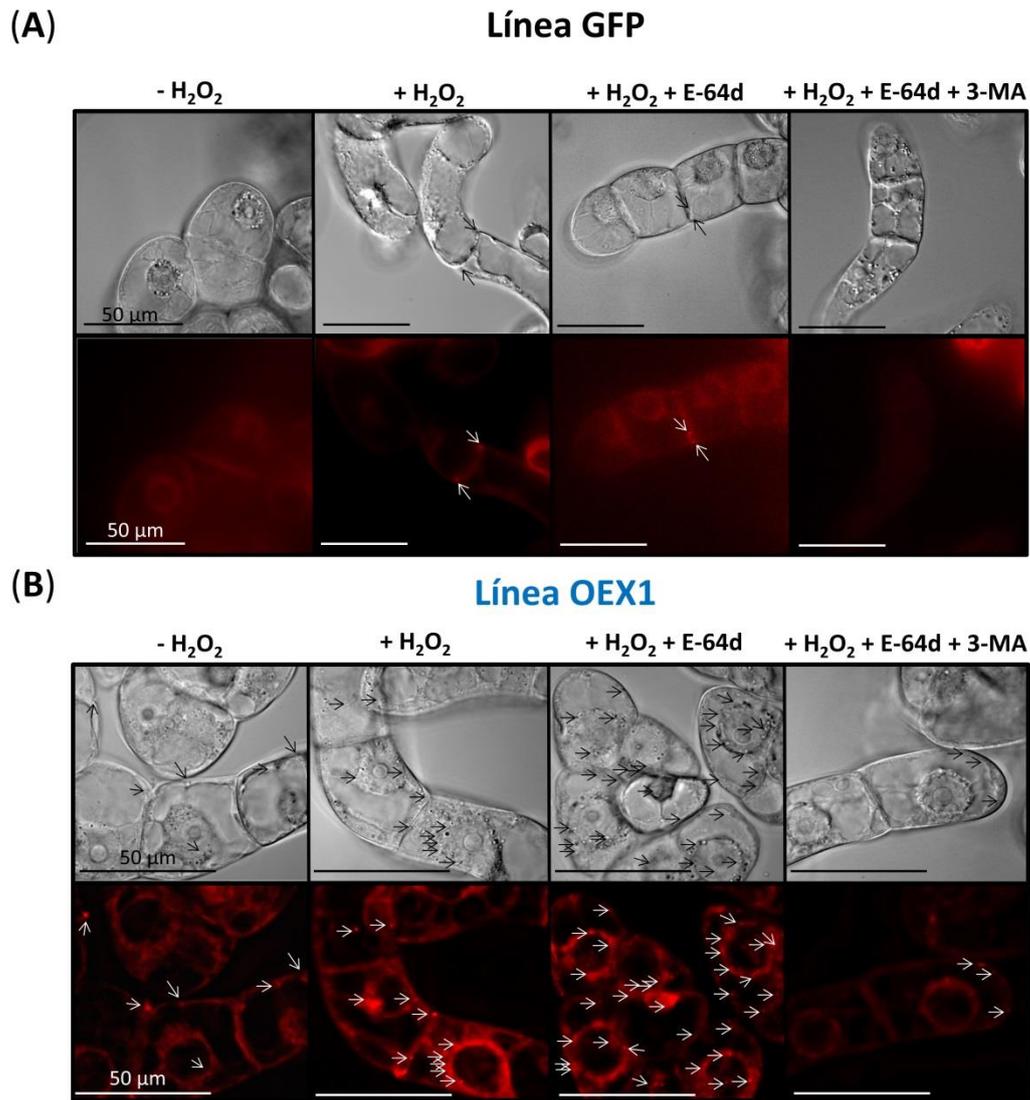


Figura 48. Visualización de la formación de autolisosomas inducida por H₂O₂ en células de tabaco BY-2 no sobreexpresantes GFP control (A) y sobreexpresantes *Pstrxol* (OEX1) (B). Las imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) y las imágenes de fluorescencia de estructuras teñidas con *Lysotracker Deep-Red* se muestran como representativas de tres experimentos independientes. Se trataron células TBY-2 de cinco días con 35 mM H₂O₂ solo o en combinación con E-64d o E-64d y 3-MA y se observaron después de 14 horas bajo un microscopio de fluorescencia equipado con una óptica *Nomarski*. Las puntas de flecha indican algunas señales puntuales de estructuras similares a autolisosomas (rojo). Barras de escala: 50 μm.

1.7. Interacción *in vitro* de ATG4 con TRXo1

Uno de los posibles mecanismos de control del proceso de autofagia puede ser la regulación redox por TRX de componentes de autofagia como ciertas proteínas ATG, tal y como se ha descrito para ATG4 en *Chlamydomonas* y levadura (desarrollado en la sección de introducción). Para determinar si la TRX también podría regular la proteína ATG4 en plantas, primero realizamos un experimento para analizar la posible interacción entre ambas proteínas utilizando PsTRXo1 de guisante recombinante y la proteína comercial HsATG4B humana. Tras estos experimentos, estudiaríamos la posible regulación redox *in vitro* de la actividad de escisión de ATG4 por parte del sistema NTR/TRXo1.

Para analizar la interacción física entre PsTRXo1 y HsATG4B, se llevó a cabo un experimento de transferencia puntual de proteínas (ensayo *Dot blot* trampa), depositando las proteínas en membranas de nitrocelulosa por separado para incubarlas posteriormente con la proteína a interactuar. Después de un lavado extenso de la membrana, la presencia de TRXo1 unida a ATG4 depositada en la membrana fue revelada con el anticuerpo anti-PsTRXo1 (Fig. 49, primera línea) y la presencia de ATG4 unida a TRXo1 depositada membrana fue revelada por el anticuerpo anti-CreATG4 (Fig. 49, segunda línea). Como controles positivos, la proteína recombinante PsTRXo1 fue depositada y revelada con anti-PsTRXo1 y HsATG4 fue depositada y revelada con anti-ATG4 (Fig. 49, primera línea, primer punto; segunda línea, segundo punto). La interacción pareció ser específica, ya que no se detectó ninguna señal en las posiciones correspondientes a cantidades equivalentes de albúmina BSA, señaladas como controles negativos (membranas en la última columna). Estos resultados confirman la interacción física *in vitro* de las proteínas PsTRXo1 y HsATG4B.

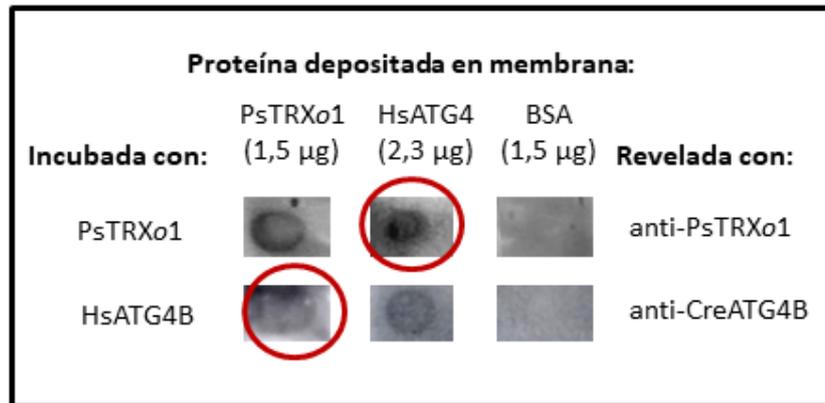


Figura 49. Análisis *Dot blot* representativo de la interacción entre las proteínas recombinantes PsTRXo1 y HsATG4. En las membranas, se depositaron PsTRXo1, HsATG4B y BSA (como control negativo) y se incubaron con tampón TBS-T que contenía las proteínas PsTRXo1 o HsATG4B recombinantes. La presencia de las proteínas se reveló utilizando anticuerpos anti-PsTRXo1 o anti-CreATG4B, respectivamente. En rojo se señalan las interacciones positivas.

Para corroborar el resultado obtenido en el ensayo trampa *Dot blot*, se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación (CoIP) de las proteínas recombinantes His-HsATG4B y PsTRXo1, seguida de un análisis *Western blot* de la presencia de ambas proteínas en el resultado del ensayo, utilizando microesferas magnéticas anti-histidina (*MACS Miltenyi Biotec*). El último lavado de las partículas magnéticas antes de la elución de la columna se cargó en la primera calle del gel (membrana de la izquierda en la Fig. 50) para verificar la ausencia de las proteínas no retenidas antes de la elución (fracción de lavado). La segunda calle contenía una fracción de la solución en la que se incubaron las proteínas antes de pasar por la columna (Entrada), que demostró la presencia de proteína His-HsATG4B monomérica y dimérica (según lo revelado por anti-histidina). La última calle contenía las proteínas eluidas de las micropartículas (CoIP), que revelaron principalmente la presencia de la proteína monomérica HsATG4B. Posteriormente, la misma membrana se sometió a una extracción suave y se incubó con anti-PsTRXo1, revelando la presencia de la forma monomérica (alrededor de 12,5 kDa) de esta proteína en la fracción Entrada y también en la última calle que contenía el resultado de la CoIP eluida de las micropartículas magnéticas (membrana de la derecha en la Fig. 50) junto con varias formas diméricas esperables de 24-25 kDa. La presencia de ambas proteínas en la fracción de CoIP eluida confirmó la interacción entre las proteínas HsATG4B y PsTRXo1. Debido a la baja cantidad de TRXo1 en la fracción

de CoIP eluida, la membrana se reveló con anti-PsTRX α 1 durante un período prolongado para la detección de la proteína, lo que también permitió la detección de la forma dimérica de HsATG4B en la fracción Entrada.

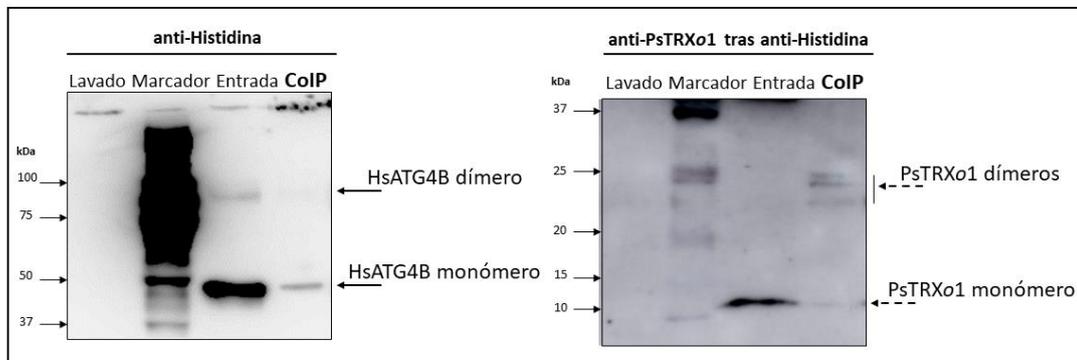


Figura 50. Transferencia *Western blot* de la co-inmunoprecipitación resultante entre las proteínas recombinantes His-HsATG4B y PsTRX α 1 reveladas con anti-histidina y anti-PsTRX α 1 después de una extracción suave. La primera calle contiene el último lavado antes de la elución de los complejos co-inmunoprecipitados (CoIP) de las micropartículas para comprobar la ausencia de cualquiera de las proteínas. La segunda calle contiene el Marcador de pesos moleculares con los números correspondientes en kDa. La calle Entrada corresponde a una fracción de ambas proteínas incubadas antes de pasar por la columna y la última calle contiene las proteínas CoIP que revelan la interacción entre HsATG4B y PsTRX α 1 en sus formas monomérica y dimérica.

Debido a la diferencia de señal de marcaje de las dos proteínas a la hora del revelado, y como complemento a la anterior figura, se presenta en la Figura 51 la membrana completa, ya que en la Figura 50 se ha presentado solo una parte de la membrana donde se revelaba cada una de las proteínas.

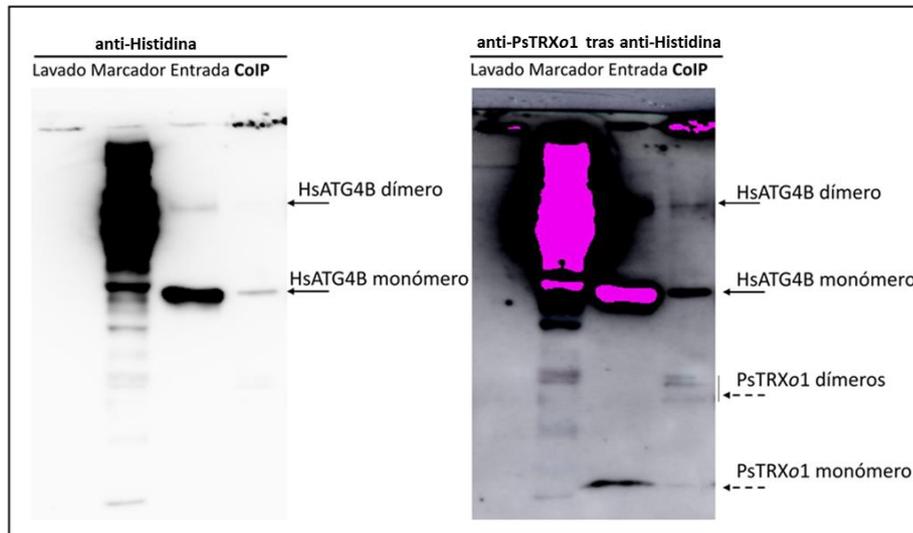


Figura 51. Western blot del resultado de la Co-IP entre las proteínas recombinantes His-HsATG4B y PsTRXo1. Se presenta el revelado anti-histidina y posteriormente, frente a anti-PsTRXo1 tras extracción suave de la membrana, mostrándose la membrana completa correspondiente a la Figura anterior.

1.8. Regulación redox de la actividad de ATG4

Después de confirmar la interacción entre las proteínas recombinantes HsATG4 y PsTRXo1 *in vitro*, intentamos determinar si la proteína HsATG4 podría estar regulada por óxido-reducción y además por PsTRXo1 mediante el seguimiento de la actividad de HsATG4B recombinante en presencia de reductores, incluida la proteína PsTRXo1. Para ello, en primer lugar, se analizó la regulación redox de la actividad de la proteína recombinante HsATG4 en presencia de tratamientos tanto oxidantes por H₂O₂ como reductores, en un principio DTT antes de analizar el sistema TRXo1. La actividad de la proteína recombinante (6xHis-HsATG4B de 47 kDa) fue demostrada por la aparición en el *Western blot* del péptido de alrededor de 17 kDa como resultado de la escisión del sustrato ATG8-Fc (Fig. 49A, calle 2) que confirma la funcionalidad de la proteína cuando se encuentra en forma reducida por el tratamiento con DTT. Para determinar si la actividad de ATG4 está influenciada por el entorno redox, la proteína se incubó en presencia de compuestos oxidantes (H₂O₂) o reductores (DTT). El pretratamiento de

HsATG4B con 1 y 3 mM de H₂O₂ (Fig. 52A, calles 3 y 4) disminuyó la actividad de procesamiento de ATG4 y resultó en la pérdida de la mayor parte del péptido procesado, mientras que el DTT restauró la actividad (Fig. 52A, calles 5 y 6). De hecho, el H₂O₂ indujo la oligomerización de la proteína, mientras que el DTT la interrumpió, permitiendo la monomerización, lo que implica que la ATG4 es inhibida por oxidación y activada por reducción, siendo ambos procesos completamente reversibles. Un experimento control incluyó la actividad de las proteínas recombinantes ATG4 y ATG8 etiquetadas con cola de histidina después del tratamiento con DTT (Fig. 52B). Estos resultados indican que la actividad está regulada por una modificación postraduccional redox, como se describió previamente para ATG4 de levadura y *Chlamydomonas*.

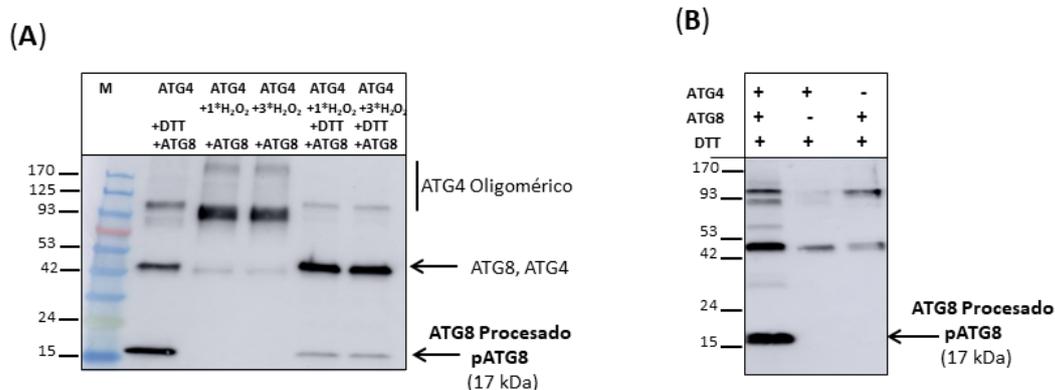


Figura 52. Regulación de la actividad de ATG4 por oxidación y reducción. La actividad de ATG4 se controló siguiendo la escisión del sustrato ATG8 de la etiqueta de histidina química recombinante de las formas ATG8 sin procesar (His-ATG8-Fc) a las procesadas pATG8 (His-ATG8, indicadas por flechas) mediante análisis de transferencia *Western blot* utilizando anticuerpo anti-histidina. **(A)** HsATG4B se incubó separadamente con DTT (calle 2), 1 mM H₂O₂ (calle 3) y 3 mM H₂O₂ (calle 4) y 1 mM H₂O₂ + DTT (calle 4) y 3 mM H₂O₂ + DTT antes de su incubación con el sustrato químico His-ATG8-Fc. Las proteínas marcadoras (M) se cargaron en la calle 1. **(B)** Experimento control para la actividad de la proteína recombinante His-HsATG4 en presencia del sustrato His-ATG8-Fc (calle 1) y controles negativos con solo His-HsATG4 o His-ATG8-Fc (calles 2 y 3, respectivamente) después del tratamiento con 15 μM DTT (sección Materiales y Métodos para obtener más detalles).

1.9. Regulación de la actividad de ATG4 por tiorredoxina o1 *in vitro*

Para probar la capacidad de reducción de ATG4 por el sistema TRX, incluyendo TRXo1, NADPH y NADPH-TR, usamos las proteínas recombinantes PsTRXo1 y AtNTRA, que fueron previamente clonadas, expresadas en *E. coli* y purificadas en nuestro grupo de investigación (Calderón y col., 2017a). La proteína HsATG4B

recombinante tratada con DTT presentó actividad de procesamiento tal y como revelaba la presencia del producto de escisión de 17 kDa (Fig. 53, calle 2). Esta actividad disminuyó cuando se trataba de HsATG4B previamente reducido por DTT y posteriormente oxidado con 1 mM H₂O₂ (calle 3), que fue responsable de la oligomerización como lo demostró la aparición de una señal de alto peso molecular en la Fig. 53. En ensayos paralelos, se utilizó el sistema TRX para reducir ATG4B previamente tratado de igual manera con H₂O₂. Como control se ensayó la actividad en presencia de NADPH/TR (sin TRXo1) (calle 4), si bien la actividad observada fue claramente mayor en presencia de TRXo1 junto a NADPH/TR (calle 5). Por otro lado, cuando se utilizó una proteína TRXo1 mutada en una de las Cys, concretamente en la Cys catalítica, TRXo1C37S (MutTRXo1), se observó una actividad de procesamiento de ATG8 por ATG4 muy baja, similar a la observada con NADPH/TR en ausencia de TRXo1 (calle 6). La actividad de ATG4 fue menor cuando se emplearon en el ensayo TRX + DTT o DTT solo como reductores (calles 7 y 8) en lugar de NADPH/TR. Todos estos resultados apuntan a la regulación dependiente de TRX de la actividad ATG4 posiblemente debido a la reducción de un enlace disulfuro regulador.

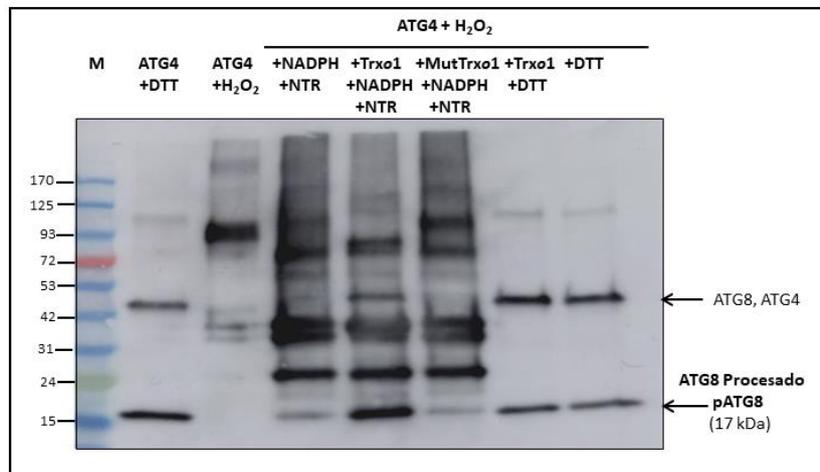


Figura 53. Regulación de la actividad de ATG4 por oxidación y reducción por el sistema TRXo1. La actividad de ATG4 se controló siguiendo la escisión del sustrato recombinante His-ATG8-Fc quimérico desde la forma ATG8 sin procesar a la procesada pATG8 (indicadas por flechas) mediante análisis de transferencia *Western blot* usando el anticuerpo anti-histidina. La proteína HsATG4B se incubó con 15 μ M DTT (calle 2) + 1 mM H₂O₂ (calle 3). Después de la oxidación con H₂O₂, la muestra se redujo mediante el sistema NADPH/TR/TRXo1 (calle 5) o NADPH/TR/ MutTRXo1 (variante mutada TRXo1C37S, calle 6). También, se realizaron controles en ausencia de TRXo1 (calle 4) y reducción por DTT en lugar del sistema TRX (calles 7 y 8) (consultar la sección de Materiales y Métodos para obtener más detalles). Se cargaron proteínas marcadoras (M) en la calle 1 para la posición del peso molecular.

2. Papel de la TRXo1 en la percepción de ABA

Con el objetivo de avanzar en el papel de la TRXo1 sobre la diana PYR1 y partiendo de los resultados obtenidos en el grupo demostrando la interacción entre ambas proteínas, se han realizado estudios de cambios en los patrones de oligomerización por reducción-oxidación y formación de puentes disulfuro (-S-S-), utilizando en un principio proteínas recombinantes. Posteriormente, analizaremos estos cambios *in vivo* en plantas de *Arabidopsis thaliana* tanto silvestres WT como mutantes KO y OEX *Attrxo1* cuando crecen en presencia de ABA.

2.1. Tratamiento redox de PYR1 recombinante

La proteína recombinante HisAtPYR1 se sometió a tratamientos reductores y oxidantes con DTT y H₂O₂, respectivamente, y el estado redox se analizó tras SDS-PAGE mediante *Western blot* utilizando anti-PYR1. La proteína recombinante sin ningún tratamiento mostró una fuerte señal de una banda monomérica en torno a 25 kDa, formas diméricas en torno a 50 kDa y una débil señal en torno a 100 kDa (señalada como oligómero) (Fig. 54, calle 1). Cuando la proteína se trató con 20 mM de DTT (Fig. 54, calle 2), las formas diméricas y oligoméricas disminuyeron y apenas se detectaron. La proteína tratada con H₂O₂ mostró mayores cantidades de formas diméricas y menores cantidades de banda monomérica. Cuando la proteína se redujo previamente antes de ser oxidada, la banda monomérica disminuyó mucho mientras que las bandas oligoméricas aumentaron (cuarta calle), apareciendo bandas de mayor peso molecular, por lo que decidimos en experimentos posteriores reducir siempre previamente a PYR1 antes de oxidar. Estos resultados apoyan una modulación redox reversible por DTT y H₂O₂ del estado oligomérico de la proteína PYR1, algo hasta ahora no descrito para ningún receptor de ABA.

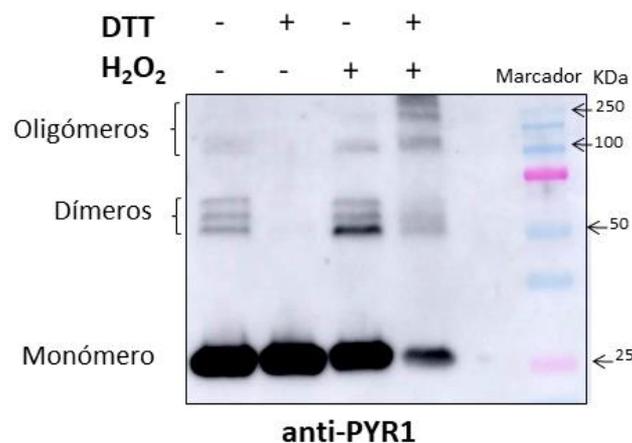


Figura 54. Tratamientos redox de PYR1. La proteína HisAtPYR1 recombinante se trató con DTT y H₂O₂ tal y como se describe en Materiales y Métodos. Las formas monomérica, dimérica y oligomérica se señalan a la izquierda y los marcadores de peso molecular a la derecha.

Para estudiar la capacidad del sistema fisiológico NTR/TRX_{o1} para reducir *in vitro* PYR1 en lugar de DTT, analizamos el patrón oligomérico de la proteína HisAtPYR1 recombinante previamente oxidada (PYR1_{ox}) tratada con el sistema NADPH/TRX_{o1}/NTRB. La proteína PYR1 previamente reducida con DTT se oxidó con un tratamiento con H₂O₂ que dio lugar a cantidades similares de las formas dimérica y monomérica de la proteína, pero se detectaron niveles bajos de oligómeros (Fig. 55). Cuando la proteína PYR1 oxidada se incubó con el sistema TRX, desaparecieron las formas oligoméricas, disminuyó la dimérica y aumentó la monomérica (Fig. 55). Los cambios en las formas oligoméricas, dimérica y monomérica del receptor dependían estrictamente de la reducción catalizada por la TRX_{o1}, ya que no se detectaron cambios significativos en el patrón de bandas en comparación con el presentado por PYR1 oxidado (PYR1_{ox}) en presencia de NADPH y NTR pero en ausencia de la TRX_{o1} (Fig. 55).

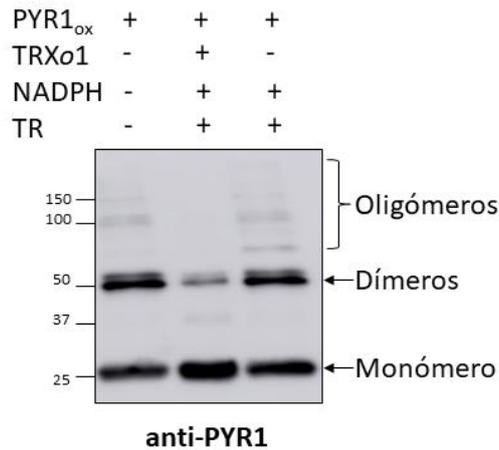


Figura 55. Reducción de PYR1 por el sistema tiorredoxina. La proteína HisAtPYR1 recombinante se redujo primero con DTT antes de ser oxidado con H₂O₂ (PYR_{ox}), tal y como se describe en Materiales y Métodos. Tras la oxidación, PYR_{ox} se trató con NADPH/NTR/TRXo1 con NADPH/NTR como control.

Para realizar un estudio de la identificación de puentes disulfuro (-S-S-) en la proteína PYR1, analizamos la secuencia aminoacídica de la misma. AtPYR1 (TAIR AT4G17870.1) contiene tres residuos de cisteína en su secuencia señalados en la Figura 56, que podrían formar puentes disulfuro intra o intermoleculares. De existir un puente intramolecular, éste podría formarse solo entre las C⁶⁵ y C⁷⁷ ya que son las únicas lo suficientemente cercanas al observar la estructura tridimensional.

30
65
 MPSELTPEER SELKNSIAEF HTYQLDPGS ■ SSLHAQRIHA PPELVWSIVR RFDKPQTYKH FIKS ■ SVEQN
 FEMRVG ■ TRD VIVISGLPAN TSTERLDI ■ D NSEDDTRMFA DTVVKLNLQK LATVAEAMAR NSGDGSGSQV T
77

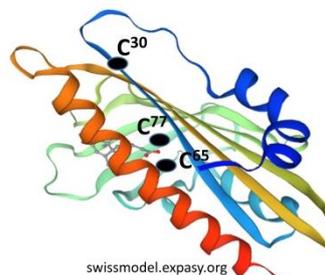


Figura 56. Secuencia aminoacídica de AtPYR1 y modelización de la estructura 3D. Se señalan en la secuencia (TAIR AT4G17870.1) y en la estructura 3D (usando swissmodel.expasy.org) los tres residuos de cisteína (C).

2.2. Identificación de puentes disulfuro

Para analizar la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) en la proteína recombinante AtPYR1 se realizó un análisis por Espectrometría de Masas (MS) de la misma tras tratarla con DTT, H₂O₂ y dimedona (DMD; marcador de grupos -SOH) más H₂O₂. Las proteínas se bloquearon inmediatamente tras los tratamientos con NEM, a fin de que su estado redox permaneciera invariable hasta su análisis por MS. Previo a dicho análisis por MS, se realizó un *Western blot* para verificar el patrón de oligomerización tras cada tratamiento (Fig. 57). Tanto la proteína no tratada como la tratada con 2 mM DTT (calles 1 y 2) presentaron una banda mayoritaria sobre los 25 kDa correspondiente a la forma monomérica y una señal menos intensa sobre los 50 kDa del dímero y señal débil correspondiente a oligómeros (membrana en panel izquierdo de Fig. 57). A fin de localizar mejor la señal de dichos oligómeros, la membrana se recortó por debajo de los dímeros a la hora del revelado, optimizando así la visualización de bandas minoritarias (membrana en panel derecho de Fig. 57). El tratamiento con 4 mM H₂O₂ tanto en ausencia como presencia de dimedona (calles 3 y 4, respectivamente) reveló la formación de distintas bandas de alto peso molecular correspondientes a los dímeros y oligómeros.

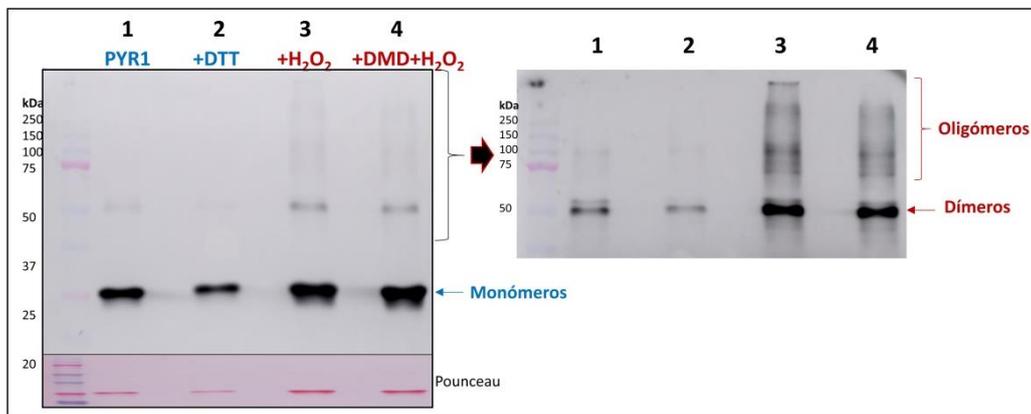


Figura 57. Tratamientos redox de la proteína HisAtPYR1 recombinante. *Western blot* usando anti-PYR1 de la proteína recombinante sin tratar (calle 1), tratada con DTT (calle 2), con H₂O₂ (calle 3) o con dimedona + H₂O₂ (calle 4), tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Las señales correspondientes a las formas monoméricas, diméricas y oligoméricas se revelaron en la membrana completa (panel izquierdo) y en la membrana recortada por debajo de los dímeros (panel derecho) a fin de optimizar la visualización de las bandas minoritarias. El marcador de peso molecular en kDa se presenta a la izquierda de la membrana.

El análisis de las muestras por Espectrometría de Masas reveló que la proteína no tratada presentaba un bajo número de coincidencias espectrales peptídicas (PSMs) correspondientes a puentes -S-S- entre Cys⁶⁵-Cys⁷⁶ mientras que no se detectaron -S-S- en la proteína tratada con DTT (Tabla 13).

Tabla 13. Análisis de la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) en la proteína recombinante HisAtPYR1 tras su tratamiento con el reductor DTT, el oxidante (H₂O₂) y el marcador de grupos sulfénicos dimedona+H₂O₂, identificando los residuos de cisteína (Cys) involucrados.

	Cys ³⁰ -Cys ³⁰	Cys ⁶⁵ -Cys ⁶⁵	Cys ³⁰ -Cys ⁶⁵	Cys ⁶⁵ -Cys ⁷⁷
	(PSMs)			
PYR1				Bajo número
PYR1+DTT	-	-	-	-
PYR1+H ₂ O ₂	4	89	13	1
PYR1+DMD+H ₂ O ₂	4	83	17	2

En las muestras tratadas con H₂O₂ y dimedona+H₂O₂ se detectaron diferentes puentes -S-S-, con el mayor número entre Cys⁶⁵-Cys⁶⁵ seguido de Cys³⁰-Cys⁶⁵, mientras que se detectó una baja cantidad de las combinaciones Cys³⁰-Cys³⁰ y Cys⁶⁵-Cys⁷⁷. Estos resultados apuntan a una mayor formación de enlaces disulfuro entre dos residuos Cys⁶⁵ de diferentes monómeros ligados a una homodimerización de la proteína. Además, es probable que la existencia de enlaces disulfuro Cys³⁰-Cys⁶⁵ sugiera que los oligómeros se forman por la adición de nuevos monómeros PYR1 a dímeros ya formados mediante la unión de los residuos Cys³⁰ libres de los dímeros a los residuos Cys⁶⁵ de los nuevos monómeros, aunque no se descartan otras formas de oligomerización. Algunos de los posibles puentes disulfuro en formación se presentan en la Fig. 58 tras la modelización de la estructura de un tetrámero.

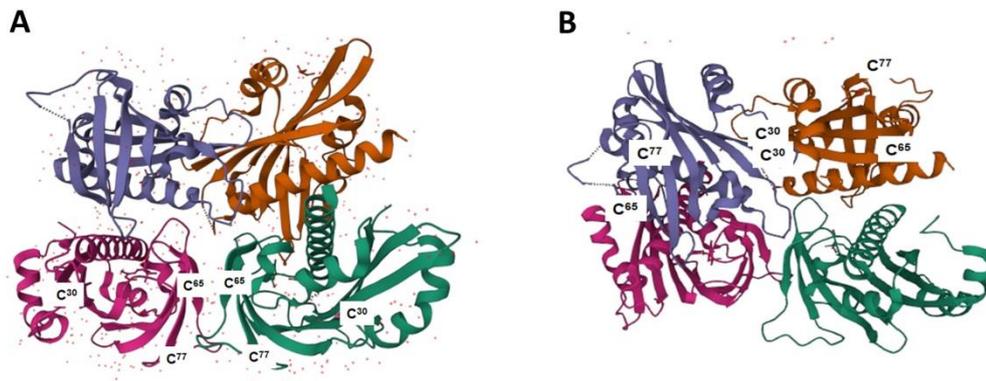


Figura 58. Modelo de la estructura 3D de PYR1. La estructura cristalina de PYR1 en complejo con ABA (estructura Experimental PDB 3K90) formada por dos dímeros organizados en una unidad cristalina tetramérica. Solo el monómero PYR1 de color magenta tiene una molécula de ABA unida al bolsillo de unión. Se indica la posición de los residuos de cisteína (C) en los distintos monómeros. Vista que muestra la proximidad de los residuos C⁶⁵ (A) y C³⁰ (B) en la diferente orientación de los monómeros en la estructura del tetrámero.

2.3. Identificación de cisteínas implicadas

Para profundizar en el papel de cada una de las tres cisteínas del PYR en la oligomerización de la proteína, generamos versiones de proteínas mutadas recombinantes HisAtPYR1C30S (C30S), HisAtPYR1C65S (C65S) e HisAtPYR1C77S (C77S) en las que la cisteína se sustituyó por serina (Ser) (Fig. 59).

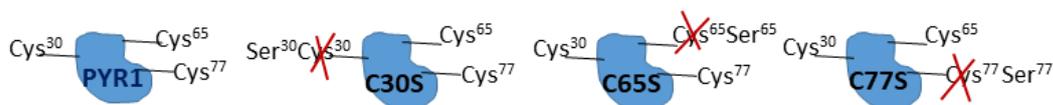


Figura 59. Producción de proteínas recombinantes HisAtPYR1 mutadas en distintas cisteínas. Se han producido en *E. coli* las proteínas recombinantes en las que cada una de las cisteínas (Cys) han sido sustituidas por serina (Ser).

Las proteínas mutadas en las distintas Cys se sometieron entonces a los mismos tratamientos reductores (DTT) y oxidantes (H₂O₂) descritos anteriormente, tratando de identificar alguna diferencia en los patrones de oligomerización por la falta de alguna de ellas, que podría ser indicio de la importancia de cada residuo. El análisis por *Western blot* usando anticuerpo frente a PYR1 reveló que todas las proteínas recombinantes (3 µg) presentaban un aumento de las bandas oligoméricas (más de 75 kDa) (las cuatro

últimas muestras comparadas con las cuatro primeras en la membrana de la izquierda de la Fig. 60) cuando se sometieron a un tratamiento oxidante, tal y como habíamos observado anteriormente para la proteína PYR1 recombinante de tipo silvestre (Fig. 57). Todas las proteínas mutadas presentaban más monómeros que la silvestre, pero diferían en las formas diméricas: mientras que C30S y C77S presentaban menos dímeros que PYR1 (0,3 y 0,6 veces, respectivamente), C65S tenía la mayor cantidad de dímeros (2,3 veces en comparación con PYR1). Todas ellas presentaban formas oligoméricas en menor abundancia, aunque con diferencias evidentes (panel izquierdo, Fig. 60), por lo que decidimos cargar mayor cantidad de proteína (5 μg) a fin de mejorar la visualización de estos oligómeros.

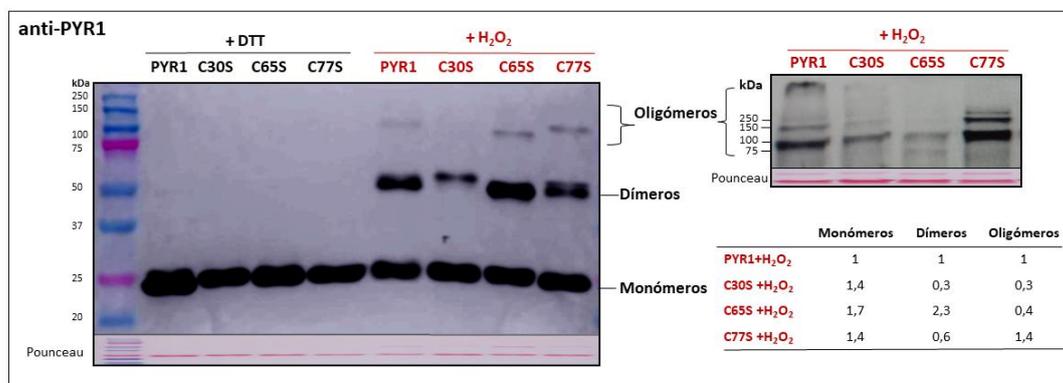


Figura 60. Tratamientos redox de las proteínas recombinantes HisAtPYR1 y las mutadas en las diferentes cisteínas. Western blot usando anti-PYR1 de las proteínas HisAtPYR1, HisAtPYR1C30S (C30S), HisAtPYR1C65S (C65S) e HisAtPYR1C77S (C77S) tratadas con DTT (calles 1-4 tras el marcador en panel izquierdo) o con H₂O₂ (calles 5-8 tras el marcador). En el panel derecho se presentan las mismas muestras tratadas con H₂O₂, pero cargando mayor cantidad de proteína y revelando con mayor tiempo de exposición. La tabla presenta la cuantificación de las bandas considerando valor 1 a lo cuantificado en la proteína silvestre PYR1.

Destacar que se detectó un oligómero de alta masa molecular de más de 250 kDa en la proteína silvestre PYR1 y en menor medida en las mutadas C30S, pero no estaba presente (al menos no se detectaba) en las mutadas en C65S o C77S (panel derecho, Fig. 60). La cantidad de oligómeros de la proteína C77S (cuantificando las señales y refiriéndolas a valor 1 de la proteína silvestre PYR1) fue similar a la de la proteína silvestre, aunque con un patrón de intensidad diferente. Por su parte, las proteínas C30S y C65S formaron muchos menos oligómeros que PYR1 (panel derecho, Fig. 60). Estos resultados sugieren que el proceso de oligomerización de PYR1 en respuesta a

condiciones oxidativas ocurre principalmente a través de la formación de enlaces disulfuro intermoleculares entre los residuos C³⁰ y C⁶⁵ de diferentes receptores PYR1.

2.4. Modulación de la actividad de PYR1 por TRX_o1

Una vez comprobado que el estado de oligomerización de PYR1 y la formación-eliminación de puentes disulfuro es dependiente de óxido-reducción, y que el sistema NTR/TRX_o1 es capaz de revertir dicha oligomerización, decidimos realizar un estudio sobre la actividad de PYR1 como inhibidor de fosfatasas PP2C, como HAB1. Para ello inicialmente medimos la actividad fosfatasa de HAB1 recombinante, purificada en presencia del reductor β-mercaptoetanol. Esta actividad necesita poder reductor, aunque su reductor fisiológico no se ha descrito. La actividad de partida de HAB1 fue considerada como 100% (1^a barra en Fig. 61). Como control, realizamos esa misma medida en presencia de PsTRX_o1 y comprobamos que se producía un aumento de actividad HAB1, probablemente debida a la reducción de la fracción oxidada de HAB1, lo que sugiere que esta fosfatasa podría también ser modulada por TRX_o1 (2^a barra). A continuación, analizamos si el estado redox de PYR1 influía en su efecto inhibidor sobre la actividad de HAB1. Para ello, medimos la actividad fosfatasa en presencia de ABA utilizando PYR1 reducido con DTT, así como oxidado con H₂O₂, en ausencia (barras 3 y 4, respectivamente) y presencia (barras 5 y 6) de TRX_o1 previamente reducida con DTT. Para cada reacción, se realizó un control interno en ausencia de ABA y se representa el valor de la diferencia.

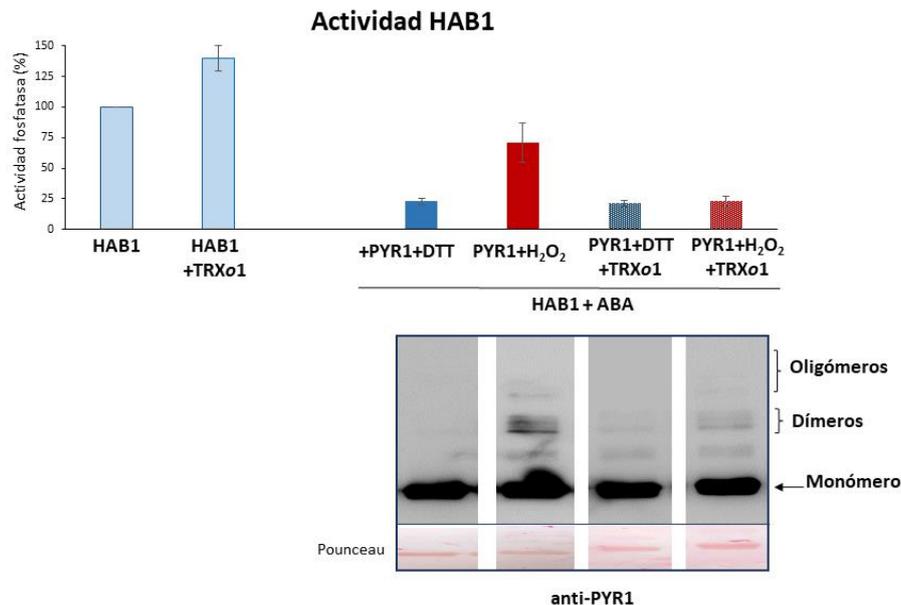


Figura 61. Actividad fosfatasa de HAB1. La actividad de HAB1 se midió en ausencia y presencia de TRX_o1. Posteriormente se midió HAB1 en presencia de PYR1 y ABA en condiciones reductoras (+DTT) y oxidantes (+H₂O₂) en ausencia y presencia de TRX_o1. Los valores representan el porcentaje de actividad fosfatasa en la reacción utilizando los diferentes componentes especificados en cada caso, en comparación con la actividad fosfatasa de HAB1 sola (control positivo como 100%). *Western blot* representativo usando el anticuerpo anti-PYR1 donde se muestran las formas monoméricas, diméricas y oligoméricas en las diferentes reacciones ensayadas para la medida de la actividad fosfatasa. Los valores son la media \pm SE de 3 réplicas experimentales.

Cuando PYR1 se redujo con DTT (PYR1+DTT) la actividad de HAB1 se inhibió, presentando alrededor de un 20% de la actividad respecto al control positivo (100%), lo que demuestra que PYR1 estaba activo inhibiendo a la fosfatasa. Sin embargo, cuando PYR1 fue oxidado (PYR1+H₂O₂), la actividad de HAB1 fue alrededor de 75%, inhibiendo por tanto solo un 25%, implicando que la actividad de PYR1 se afecta negativamente por oxidación. Para comprobar si un reductor fisiológico como TRX_o1 puede restaurar la actividad de PYR1 oxidado, realizamos el ensayo en presencia de PsTRX_o1_{red}. Interesantemente, cuando se incubó TRX_o1 reducida con PYR1_{ox} se observó una recuperación de la inhibición de HAB1 desencadenada por el receptor (última barra en Fig. 61), realizando una reacción control de PYR1 reducido incubado con TRX_o1 que no afectaba a la actividad (PYR1+DTT+TRX_o1). Analizamos entonces el patrón de oligomerización de PYR1 por *Western blot* en las diferentes reacciones de ensayo de fosfatasas mostradas anteriormente (membrana en Fig. 61). La presencia de

formas diméricas y oligoméricas de PYR1 detectadas en la reacción con PYR_{ox} disminuyó tras la incubación con TRXo1, probablemente debido a la reducción mediada por la misma y la consiguiente reversión a monómeros. Estos resultados revelaron que las funciones de HAB1 y PYR1 estaban reguladas de forma redox por TRXo1. Por lo tanto, la interacción TRXo1-PYR1 podría tener un papel fisiológico en la modulación de la actividad de PYR1 y, en consecuencia, en la señalización por ABA.

2.5. Analisis *in vivo* del estado oligomérico de PYR1

Una vez realizados los estudios *in vitro* nos propusimos realizar un estudio *in vivo* en plantas de *A. thaliana*. Inicialmente, examinamos en plantas silvestres WT el estado oligomérico de PYR1 por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. PYR1 se detectó en un extracto foliar obtenido en ausencia de agentes bloqueantes o alquilantes principalmente como una forma dimérica de alrededor de 50 kDa (al contrario que *in vitro* donde la mayoría estaba como monómero) y varias bandas de oligómeros y en mucha menor cantidad como monómero de 25 kDa (Fig. 62). Cuando se añadió 50 mM de DTT al extracto, se observó un aumento de señal de las formas dimérica y monomérica (calle 2 tras el marcador) junto con varias bandas intermedias, probablemente por la reducción de los puentes disulfuro de las formas oligoméricas. Tras la reducción, cuando PYR1 se oxidó con 4 mM de H₂O₂ se detectó una disminución del monómero pero un aumento de los complejos oligoméricos de alta masa molecular en comparación con la muestra tratada con DTT (última calle en Fig. 62), señalándose con un asterisco un supracomplejo tras el tratamiento oxidativo. Estos datos apoyan el hecho de que PYR1 pueda ser más estable como dímero que monómero, que los cambios redox *in vivo* de la proteína PYR1 se producen y que además son reversibles.

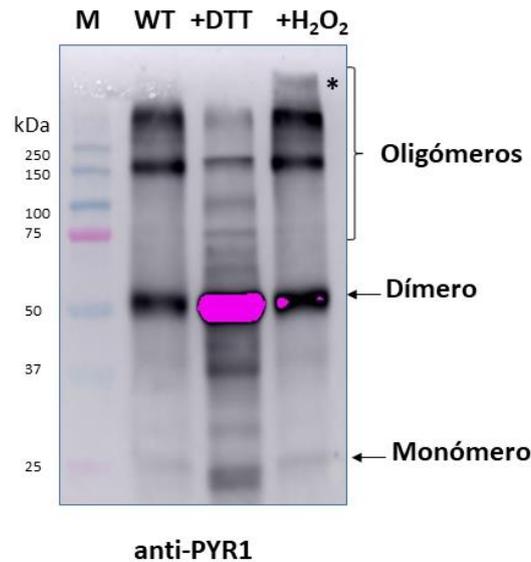


Figura 62. Análisis *Western blot* para la detección *in vivo* de PYR1 en condiciones reductoras y oxidantes. Se realizó un *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-PYR1 en extractos foliares de plantas de *Arabidopsis* WT tratados con 50 mM DTT ó 4 mM H₂O₂. El asterisco señala un supra-complejo. Las proteínas marcadoras (M) se usan para indicar el tamaño molecular.

2.6. Análisis *in vivo* de la existencia de puentes disulfuro en PYR1

Con el fin de analizar la presencia de puentes disulfuro en la proteína *in vivo*, realizamos ensayos de movilidad por desplazamiento redox en extractos proteicos de plantas WT de *Arabidopsis thaliana* utilizando NEM para bloquear los tioles reducidos y TCEP para reducir los posibles puentes disulfuro, marcando los tioles resultantes con MM(PEG)₂₄ que aumentan entonces de tamaño y se desplazan menos en SDS-PAGE. Se presentan dos cantidades de proteína a fin de visualizar mejor los cambios. Como resultado de los tratamientos, la banda de monómeros de PYR1 se desplazó a un peso molecular alrededor de 2 kDa mayor, los dímeros también cambiaron la movilidad alrededor de 6 kDa mayor e incluso los oligómeros aparecieron a mayor movilidad que la proteína sin los tratamientos alquilantes (Fig. 63). Se señala con interrogante una banda de alrededor de 37 kDa sin determinar que también tiene -S-S-, que podría ser un producto de degradación de PYR1 o la proteína unida en complejo con alguna otra.

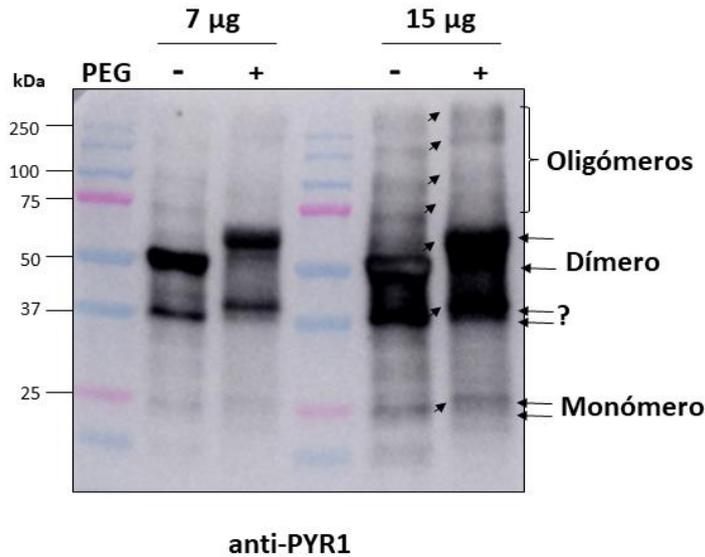


Figura 63. Ensayo de movilidad redox para la detección de puentes disulfuro en PYR1. *Western blot* frente a PYR1 extractos foliares tratados con el bloqueante NEM y el reductor TCEP en ausencia y presencia del alquilante MM(PEG)₂₄. Se presentan dos cantidades diferentes de proteínas para una mejor visualización de las diferentes bandas y se señalan el monómero, dímero y oligómeros así como una banda indeterminada intermedia entre el monómero y dímero (?). Las proteínas marcadoras (M) se cargaron para posicionar el peso molecular.

Los cambios en la movilidad de todas las bandas detectadas indicaban la existencia de puentes disulfuro en todas ellas. En cuanto al monómero, interesantemente el cambio de movilidad implica la existencia de un puente intramolecular, probablemente entre las cisteínas Cys⁶⁵ y Cys⁷⁷, que son los residuos de cisteína más cercanos en la estructura 3D modelizada (Fig. 64).

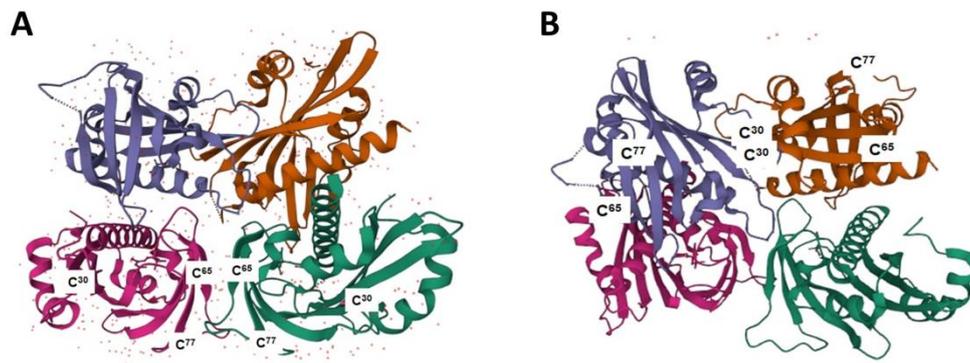


Figura 64. Modelo de la estructura 3D de PYR1. La estructura cristalizada de PYR1 en complejo con ABA (estructura PDB experimental 3K90) formada por dos dímeros organizados en una unidad tetramérica. Solo el monómero PYR1 de color magenta tiene una molécula de ABA unida al bolsillo de unión. Se indica la posición de los residuos de cisteína en los distintos monómeros. Vista que muestra la proximidad de los residuos C⁶⁵ (A) y C³⁰ (B) en distintas orientaciones de los monómeros en la estructura tetramérica.

2.7. Caracterización de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes *Attrxol*

Con objeto de profundizar en la función fisiológica de *TRXo1* en relación con la señalización por ABA decidimos examinar la respuesta a la hormona de dos mutantes KO *Attrxol* (líneas SALK) y dos líneas sobreexpresantes (OEX) obtenidas en nuestro laboratorio. Inicialmente para comprobar la sobreexpresión en estas últimas líneas realizamos un análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR, así como a nivel de proteína, mediante *Western blot* de mitocondrias aisladas y fracciones enriquecidas en núcleo de hojas de *A. thaliana*. Como se muestra en la Figura 65A, ambas líneas OEX transgénicas presentaron un alto nivel de transcripción de *AtTRXo1* en comparación con las plantas WT, siendo mayor en la línea OEX2. A nivel proteico, las líneas OEX mostraron una mayor cantidad de proteína *TRXo1* mitocondrial (principalmente monómero alrededor de 13,5 kDa como se ha descrito para la proteína madura de *A. thaliana* (Laloi y col., 2001) (Fig. 65B) y nuclear (monómero alrededor de 25 kDa y principalmente dímeros alrededor de 50 kDa) (Fig. 65C).

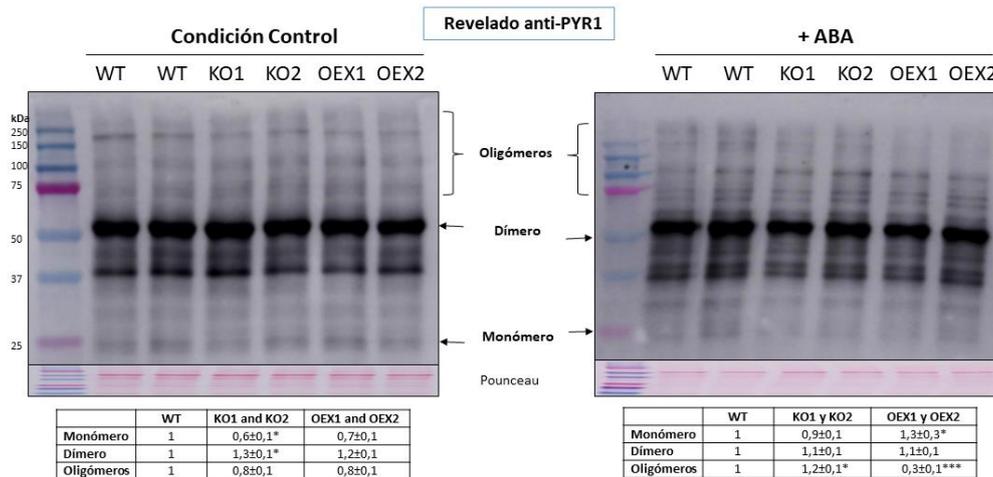


Figura 66. Análisis *Western blot* para la detección de PYR1 en extractos foliares. Se realizó *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-PYR1 en extractos foliares de plantas WT, mutantes KO y OEX *Attrxol1* crecidos en placa en ausencia y presencia de 10 μ M ABA (+ABA) durante 48 horas. Las proteínas marcadoras (M) se cargaron para posicionar el peso molecular y la tinción de Ponceau se muestra para comprobar la carga. Las tablas bajo las membranas presentan la cuantificación de bandas como media de tres experimentos independientes \pm SE y los asteriscos representan diferencias significativas con WT (valor 1) mediante la prueba *t-Student* ($P < 0,05$ (*), $P < 0,005$ (***)).

No se visualizaron diferencias aparentes en condición control en ausencia de ABA entre los genotipos en las diferentes formas de oligomerización de la proteína PYR1 (Fig. 66, membrana a la izquierda) aunque la cuantificación de las bandas de tres experimentos independientes reveló que los mutantes KO *Attrxol1* (media de valores en KO1 y KO2) presentaban una cantidad significativamente menor de monómero y mayor de dímero que el genotipo WT (tabla bajo membrana en la izquierda en Fig. 66). Cuando las plantas se crecieron durante 48 horas en presencia de ABA (Fig. 66, membrana de la derecha), las líneas KO presentaron una cantidad significativamente mayor de oligómeros (≥ 75 kDa) mientras que las plantas OEX (media de valores en OEX1 y OEX2) presentaron una señal visiblemente menor de estas formas de la proteína que las plantas WT, más evidente en las de mayor peso molecular (más de 250 kDa), confirmado por los valores de cuantificación (tabla bajo membrana de la derecha en la Fig. 66). La forma dimérica fue similar en todos los genotipos, mientras que la monomérica fue mayor en las plantas OEX. Debido a la elevada cantidad y señal de la forma dimérica de la proteína, realizamos un *Western blot* cargando menos cantidad de proteína para cuantificar mejor la señal (en la Fig. 67 se muestra un ejemplo).

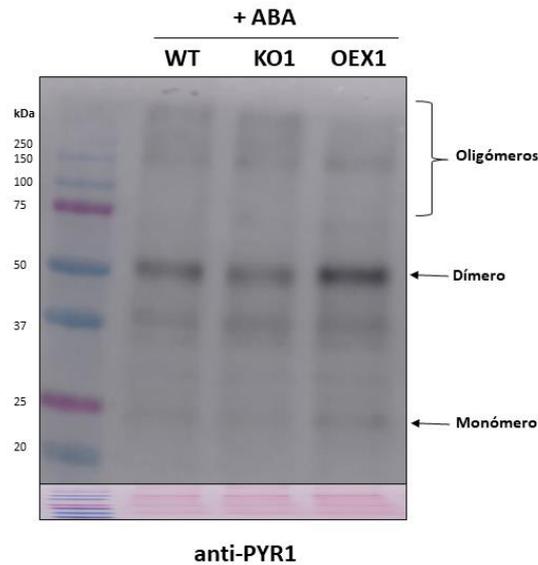


Figura 67. Análisis *Western blot* para la detección de PYR1 en extractos foliares. Se realizó un *Western blot* utilizando anticuerpo anti-PYR1 en extractos foliares de plantas WT, KO1 y OEX1 *Attrxo1* crecidas en presencia de 10 μ M ABA (+ABA) durante 48 horas cargando menos proteína que en la Figura 64. Las proteínas marcadoras (M) se usaron para posicionar el peso molecular y la tinción de Ponceau se realizó para comprobar la carga.

2.9. Papel de *TRXo1* en crecimiento radicular en respuesta a ABA

Con el fin de analizar los efectos fisiológicos de la falta y sobreexpresión de *AtTRXo1* en las plantas en algún proceso dependiente de ABA, estudiamos el crecimiento radicular de los diferentes genotipos en presencia de 10 μ M ABA. Inicialmente, comprobamos que en una condición control en ausencia de ABA no se observaban diferencias significativas en la longitud de las raíces de plantas mutantes y las de WT (Fig. 68). Sin embargo, el análisis de la inhibición de la elongación de la raíz primaria provocada por ABA, reveló que las raíces de los mutantes KO1 y KO2 y en menor medida la de los OEX1 y OEX2, eran menos sensibles a ABA que las raíces del genotipo silvestre WT (Fig. 68). Estos efectos se detectaron a los 4 días (Fig. 68 A y C) y se mantuvieron hasta los 18 días (Fig. 68 B y D) de crecimiento. Estos resultados indican que sobre todo la falta y algo menos la sobreexpresión de *AtTRXo1*, provoca una insensibilidad a ABA en relación a la elongación radicular.

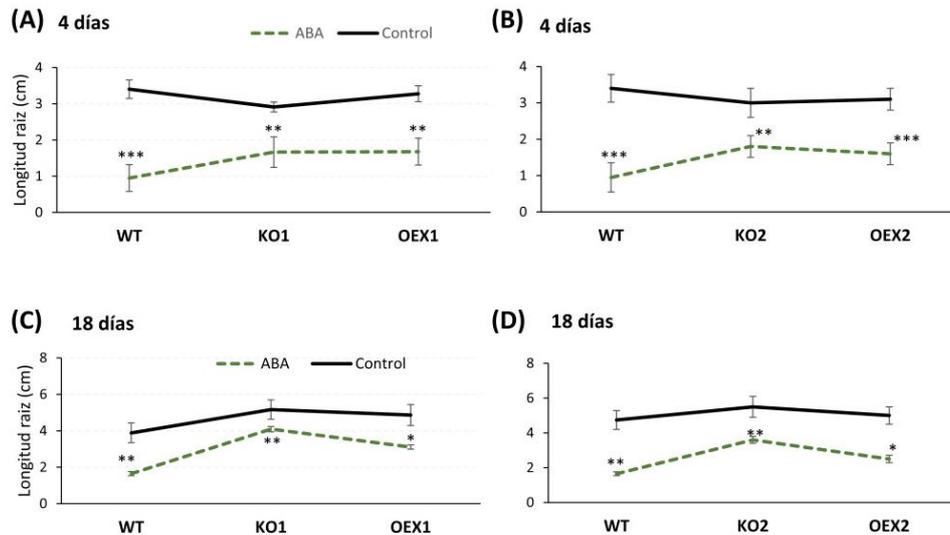


Figura 68. Crecimiento de la raíz en respuesta a ABA. La longitud de las raíces se midió en plantas crecidas en placas verticales en ausencia o presencia de 10 μM ABA después de 4 (A y B) y 18 (C y D) días en los genotipos WT, KO y OEX *Attrxo1*. Los datos son la media ± SE de tres experimentos independientes y los asteriscos representan diferencias significativas con WT en el mismo momento y tratamiento mediante la prueba *t-Student* ($P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**)) y $P < 0,001$ (***)).

2.10. Papel de *TRXo1* en cierre estomático en respuesta a ABA

Para comprobar si la falta y/o sobreexpresión de *TRXo1* afectaba a otro proceso dependiente de ABA, se analizó el comportamiento estomático de plantas WT, KO y OEX *Attrxo1* en respuesta al tratamiento con ABA. Para ello, la epidermis separada del envés de las hojas se incubaron con 10 μM ABA y se compararon con las de los controles no tratados. En ausencia de ABA, todos los genotipos presentaron un índice de apertura estomática similar (Fig. 69). En presencia de ABA, las plantas WT cerraron sus estomas en torno al 39%, mientras que las OEX solo lo hicieron en un 21% y la falta de *AtTRXo1* provocaba una insensibilidad a ABA ya que los mutantes KO1 y KO2 no cerraron sus estomas.

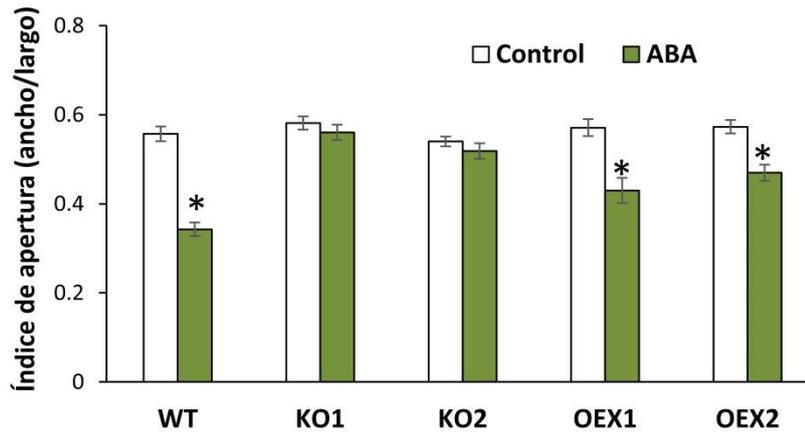


Figura 69. Respuesta estomática en ausencia y presencia de ABA. Índice de apertura medido en la epidermis abaxial de las hojas en *A. thaliana* tipo silvestre (WT) y dos líneas mutantes knock-out (KO) y dos sobreespresantes (OEX) *Attrxo1* tras incubación en una solución de apertura en ausencia (Control) y presencia de 10 μ M ABA. El índice de apertura representa la medida de la anchura/longitud del poro estomático. Los datos son la media \pm SE de tres experimentos independientes ($n > 900$ estomas por genotipo y tratamiento) y el asterisco indica una diferencia significativa entre el control y los tratamientos con ABA de cada genotipo mediante la prueba t-Student ($P < 0,05$ (*)).

3. Papel de TRXo1 en persulfuración en condiciones salinas

3.1. Efecto de la falta y sobreexpresión de TRXo1

Con el Objetivo de investigar sobre el posible papel que pudiera tener la proteína TRXo1 en procesos de persulfuración proteica en una situación de estrés salino, en una primera aproximación, se analizaron dos réplicas biológicas de extractos foliares de plantas de *Arabidopsis thaliana* genotipos silvestre WT (Col-0), una línea KO1 y una sobreespresante (OEX1) de *AtTRXo1*, crecidas en condición control y en condición salina (300 mM NaCl durante 7 días) (Fig. 70).

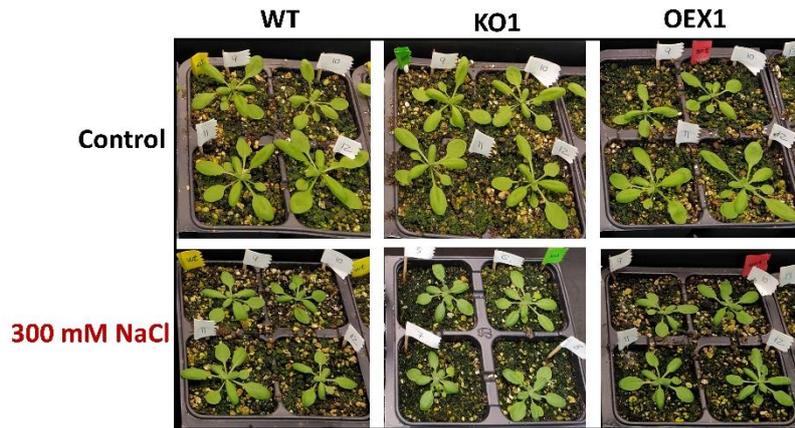


Figura 70. Plantas utilizadas para los ensayos de persulfuración. Los genotipos de *A. thaliana* WT, KO1 y OEX1 *Attrxo1* se crecieron durante 12 días y posteriormente se regaron en ausencia y presencia de 300 mM NaCl durante 7 días.

En un inicio, se marcaron los grupos persulfurados con Cl-NBF y las muestras se analizaron por SDS-PAGE visualizando las proteínas marcadas con DAz-2/Cy5-alquino (Cy5) (Fig. 71A) y usando la fluorescencia del Cl-NBF (verde en Fig. 71) para corregir la carga y poder cuantificar las muestras con el cociente Cy5/NBF (Fig. 71B).

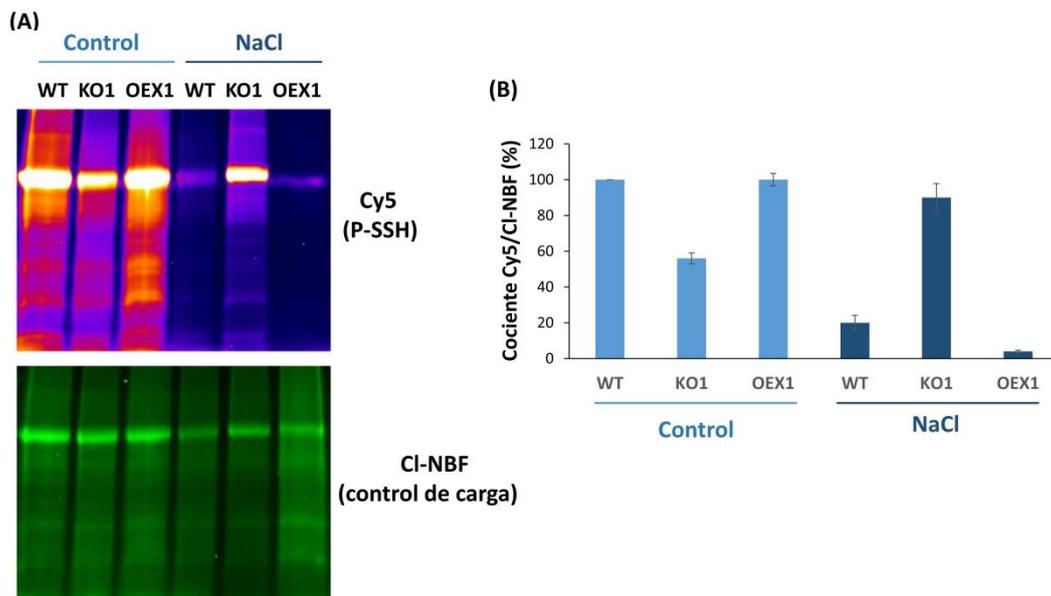


Figura 71. Detección de proteínas persulfuradas tras SDS-PAGE. (A) Los grupos persulfurados de extractos foliares de plantas de *A. thaliana* WT, KO1 y OEX1 *Attrxo1* crecidas en ausencia y presencia de 300 mM NaCl durante 7 días, se marcaron con DAz-2/Cy5 y se representan en pseudo-color para mejorar la visualización de la señal. La fluorescencia en verde representa la carga de la proteína total correspondiente al aducto Cl-NBF. (B) Cociente de la señal Cy5/Cl-NBF usado para la cuantificación.

Tras el análisis por MS de las proteínas persulfuradas y centrándonos en la condición salina para analizar las diferencias entre los genotipos, encontramos 2099 proteínas en las plantas WT (comunes en muestras S1 y S2), 1894 en el genotipo KO1 (muestras S3 y S4) y 2102 en el OEX1 (muestras S5 y S6) (Fig. 72). Comparando plantas WT y KO1, aparecían 1675 proteínas comunes a los dos genotipos, comparando WT y OEX1 eran 1790, mientras que 1626 eran comunes entre KO1 y OEX1.

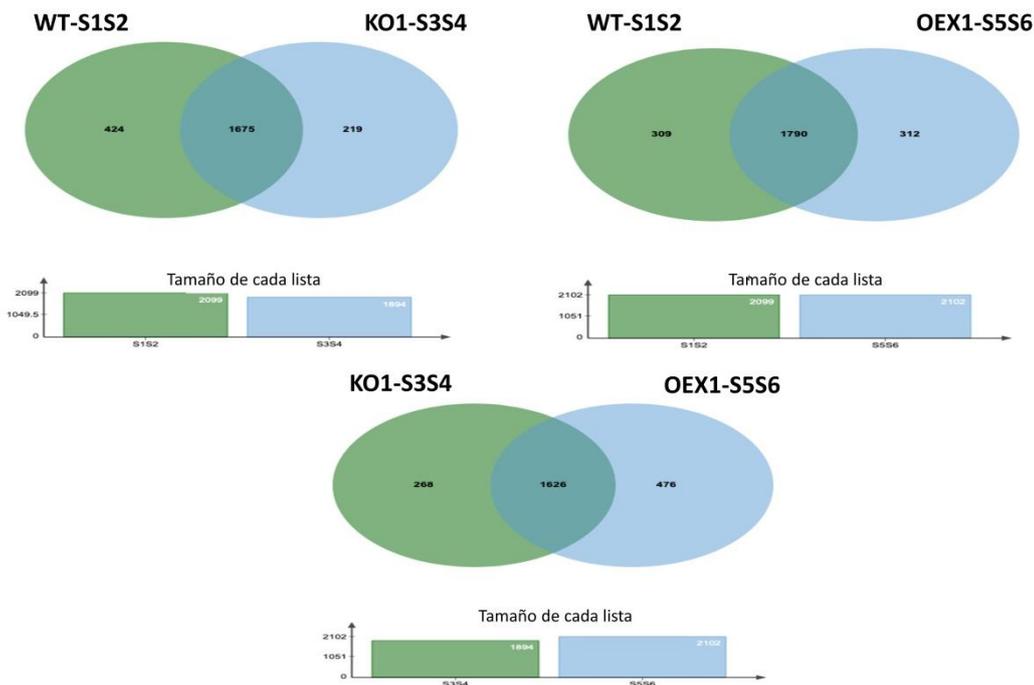


Figura 72. Número de proteínas persulfuradas en los distintos genotipos crecidos en condición salina. Diagramas de Venn del número de proteínas persulfuradas en extractos foliares de plantas de *A. thaliana* WT (S1 y S2), KO1 (S3 y S4) y OEX1 (S5 y S6) *Attrxol* crecidas en presencia de 300 mM de NaCl durante 7 días.

Para estudiar el papel regulador y las posibles funciones de la persulfuración en procesos biológicos específicos e identificar categorías funcionales sobrerrepresentadas, realizamos un análisis de enriquecimiento singular (SEA) de términos de Gene Ontology (GO) utilizando AgriGO (Du y col., 2010). SEA compara cada gen anotado con todos los genes expresados presentes en la base de datos. El análisis de enriquecimiento reveló un número significativo de proteínas persulfuradas implicadas en procesos celulares y metabólicos, respuesta a estímulos y regulación biológica (Fig. 73), además de diferentes procesos como desarrollo, reproducción, crecimiento, detoxificación o interacción inter-especies. Interesantemente, el número de proteínas

persulfuradas era menor en cada categoría en los mutantes KO que en los demás genotipos, mientras que en los OEX era parecido al del WT, en los distintos procesos identificados.

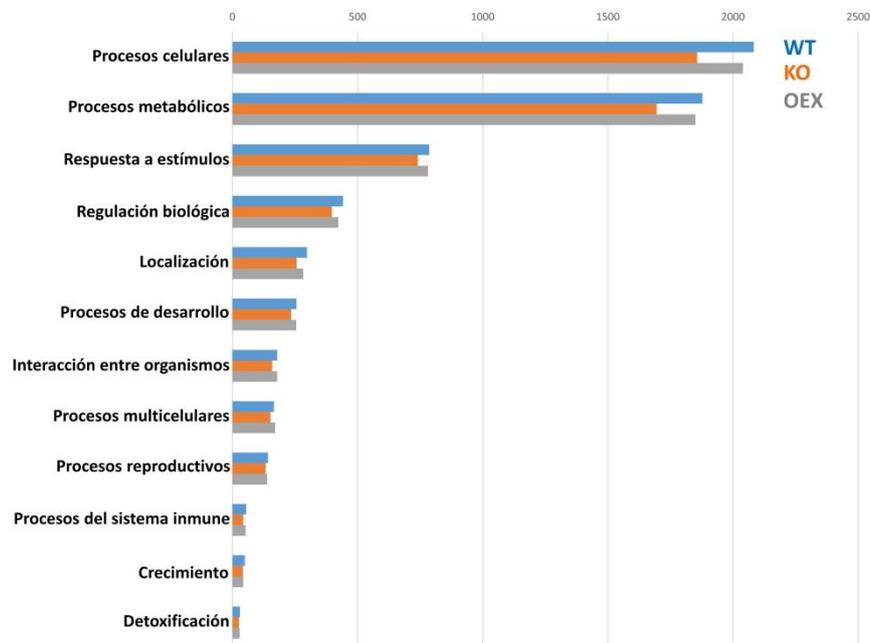


Figura 73. Clasificación funcional de proteínas persulfuradas. Clasificación funcional de ontologías génicas enriquecidas (Gene Ontology, GO) categorizadas por procesos biológicos realizada con AgriGO entre las proteínas persulfuradas de extractos foliares de plantas de *A. thaliana* WT, KO1 y OEX1 *Attrxo1* crecidas en presencia de 300 mM de NaCl durante 7 días.

3.2. Comparativa WT con KO1 y KO2

Debido a la alta cantidad de proteínas persulfuradas a analizar, y al resultado obtenido en los mutantes KO, decidimos realizar de nuevo el experimento restringiendo el análisis a plantas WT y dos líneas KO *Attrxo1*, realizando tres réplicas experimentales de cada genotipo crecido en condiciones iguales a las usadas anteriormente (ausencia y presencia de 300 mM de NaCl durante 7 días) (Fig. 74).

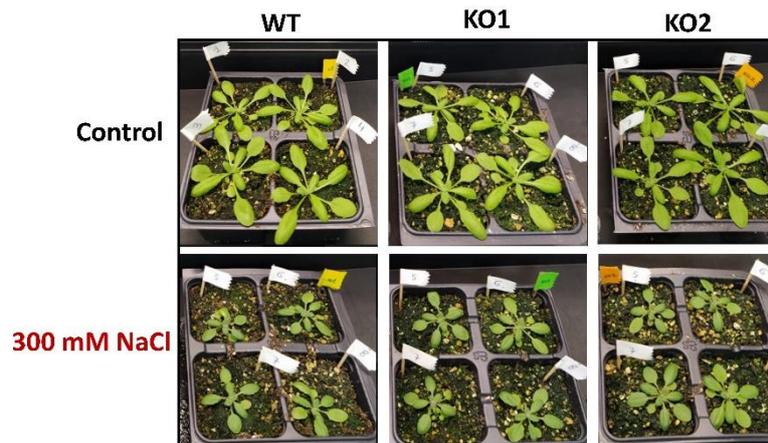


Figura 74. Plantas utilizadas en un segundo ensayo de persulfuración. Los genotipos de *A. thaliana* WT, KO1 y KO2 *Attrxo1* se crecieron durante 12 días y posteriormente se regaron en ausencia y presencia de 300 mM NaCl durante 7 días.

Los extractos fueron tratados con Cl-NBF y Cy5 y analizados por MS según se describió en la sección correspondiente de Materiales y Métodos. Tras la identificación de las proteínas considerando un valor de FDR $\leq 1\%$, realizamos comparativas entre genotipos en cada condición, considerando como persulfuradas en cada genotipo a las proteínas que estaban presentes en las tres réplicas biológicas, por lo que no descartamos que alguna de las que se identificaron en alguna y no todas las réplicas, también puedan ser susceptibles de persulfuración. Tras dicha comparativa, seleccionamos aquellas proteínas que presentaban una diferencia en el nivel de persulfuración con un $p < 0,05$ para ser consideradas en el análisis como diferentes entre los genotipos a comparar. Entre ellas, identificamos las proteínas mitocondriales y nucleares usando el programa DAVID 2021 (<https://david.ncifcrf.gov>) y seleccionando entre las opciones de GO, la localización subcelular.

Para ello, se han realizado tres estudios comparativos que incluyen:

- 1) Análisis de las diferencias entre los genotipos WT, *Attrxo1* KO1 y KO2, en ausencia de sal (control).
- 2) Efecto de la sal en el patrón de persulfuración en cada genotipo.
- 3) Diferencias entre los genotipos en presencia de sal.

3.2.1. Diferencias en ausencia de NaCl

Comparamos inicialmente las proteínas persulfuradas en una condición control, tratando de identificar diferencias entre los genotipos WT y KO. En la comparativa WT vs KO1 control (Tabla 14) destacamos algunas proteínas del sistema antioxidante como fumarasa (2,2 veces más persulfurada en WT), Fe-SOD (2 veces más en KO1), peroxidasa (2,7 más en KO1), ascorbato peroxidasa (1,8 más en KO1), peroxirredoxina IIF (3,6 más en KO1) y una tiorredoxina *h2* (5 más en WT). Además, aparecen varias proteínas descritas como posibles dianas de regulación por TRX como ATP sintasa, aconitasa, mercaptopiruvato sulfurotransferasa, succinato deshidrogenasa, entre otras. Como proteína nuclear, aparecía persulfurada una proteína nucleoredoxina.

Tabla 14. Proteínas persulfuradas diferencialmente en el genotipo KO1 respecto al WT en condición control, clasificadas como mitocondriales o nucleares. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (*Gene Ontology*, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos WT y KO1 de extractos foliares de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 19 días de edad crecidas en ausencia de NaCl. Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante.

Condición control: WTC vs KO1C

Mitocondriales

Q9XIE2 ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter protein(PEN3)
 PODH91 ADP-ribosylation factor 1(ARF1)
 P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q9FT52 ATP synthase D chain(ATPQ)
 Q9ZW85 Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase protein
 Q9S1Q9 Aldolase superfamily protein(FBA6)
 Q9ZU52 Aldolase superfamily protein(PDE345)
 O23247 Arginyl-tRNA synthetase, class Ic(emb1027)
 Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 Q9FI56 CLPC homologue 1(CLPC1)
 P25071 Calcium-binding EF hand family protein(TCH3)
 Q9SIF2 Chaperone protein htpG family protein(CR88)
 O48593 Class II aminoacyl-tRNA and biotin synthetase(NS1)
 Q8LB47 Co-chaperone GrpE family protein(AR192)
 Q9SKQ0 Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
 Q9FK55 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
 Q5M729 Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein
 Q9FLQ4 Dihydrolipoamide succinyltransferase
 Q9SVG4 FAD-binding Berberine family protein
 Q9SJ81 FASCICLIN-like arabinogalactan 7(FLA7)
Q9FI53 Fumarase 2(FUM2)
P21276 Fe superoxide dismutase 1(FSD1)
 O64883 Glycosyl hydrolase superfamily protein(PEN2)
 Q9SJ12 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1(MGP1)
 O22793 Multiple organellar RNA editing factor 2(MORF2)
 Q9ZW19 NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
 Q9FIJ2 NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit
 Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)
 Q56WK6 PATELLIN 1(PATL1)
 Q9M3A8 Pentatricopeptide repeat (PPR) protein
 O23614 Peptidase S41 family protein
Q96520 Peroxidase superfamily protein
 Q9SGC1 Phosphoglucosyltransferase/phosphomannosyltransferase PGM2)
 P50318 Phosphoglycerate kinase family
 O64730 Protein phosphatase 2C family PBCP)
 Q94CE5 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase(POP2)
 PODH91 Ras-related small GTP-binding family protein(ARFA1D)
 Q9SYL9 Ribosomal protein L13 family
 P46286 Ribosomal protein L2 family
 Q7Y208 SHV3-like 2(SVL2)
 Q9LW15 Rubredoxin-like superfamily
 Q9LJE4 TCP-1/cpn60 chaperonin family
 C02361 TCP-1/cpn60 chaperonin family protein(Cpn60beta3)
 Q9XGX9 Tim10/DDP family zinc finger protein(TIM9)
 Q38799 Transketolase family protein(MAB1)
 P45434 Translocon-associated protein (TRAP), alpha sub
 Q9ZVH7 Transmembrane proteins 14C
 Q42560 aconitase 1(ACO1)
 Q94A28 aconitase 2(ACO2)
 P53496 actin-11(ACT11)
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 Q93ZC5 allene oxide cyclase 4(AOC4)
 Q29Q26 ankyrin repeat-containing 2B(AKR2B)
 Q9SYT0 annexin 1(ANNAT1)
 Q9FN48 calcium sensing receptor(CaS)
 P29402 calnexin 1(CNX1)
 Q38858 calreticulin 1b(CRT1b)
 O49354 coenzyme Q 3(COQ3)
 Q9ZUX4 copper ion binding protein
 Q94JQ4 endoribonuclease L-PSP family protein
 O04921 ferrochelatase 2(FC2)

P48347 general regulatory factor 10(GRF10)
 Q01525 general regulatory factor 2(GRF2)
 P42644 general regulatory factor 3(GRF3)
 Q38946 glutamate dehydrogenase 2(GDH2)
 Q8L785 glycine-tRNA ligase(EDD1)
 O23627 glycyl-tRNA synthetase / glycine-tRNA ligase
 Q9C8L4 glyoxalase II 3(GLY3)
 F4I907 glyoxylate reductase 2(GLYR2)
 Q9FN41 haloacid dehalogenase-like hydrolase
 P29197 heat shock protein 60(HSP60)
 Q8L7B5 heat shock protein 81-2(HSP81-2)
 Q8H1E2 lactate/malate dehydrogenase
O64530 mercaptopyruvate sulfurtransferase 1(MST1)
 O64471 metaxin-like protein(AT2G19080)
 Q9LDZ0 mitochondrial HSO70 2(MTHSC70-2)
 Q8LDL0 multidrug resistance protein
 A4GSN8 nuclear pore anchor(NUA)
 P54150 peptide met sulfoxide reductase 4(PMSR4)
 Q9SL42 peptidylprolyl cis/trans isomerase (PIN1AT)
 Q9FMU6 phosphate transporter 3;1(PHT3;1)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 P16180 ribosomal protein S17(RPS17)
 Q38900 rotamase CYP 3(ROC3)
 O65686 small subunit ribosomal protein 16(SSR16)
 P94111 strictosidine synthase 2(SS2)
Q42592 stromal/mit ascorbate peroxidase(SAPX)
 Q9SX77 succinate dehydrogenase 5(SDH5)
 F4JIT9 tRNA synthetase class II (D, K and N) family protein(AT4G33760)
 Q38814 thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)(THI1)
Q38879 thioredoxin h2(TRX2)
 Q5XF75 translation elongation factor Ts (EF-Ts)(AT4G11120)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 Q9SII9 ubiquitin family protein(AT2G17190)
 Q9SII8 ubiquitin family protein(DSK2)
 Q9SJJ5 uncoupling protein 5(UCP5)
 Q56ZQ3 vacuolar sorting receptor 4(VSR4)
Membrana interna
 P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q94KT8 COBRA-like extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol(COB)
 Q9FK55 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
 Q9FIJ2 NADH-ubiquinone oxidoreductase B8 subunit(AT5G47890)
 O64471 metaxin-like protein(AT2G19080)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 Q9SJJ5 uncoupling protein 5(UCP5)
Matriz mitocondrial
 Q8H7F6 CAX-interacting protein 2(CXIP2)
 Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 Q5M729 Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 P29197 heat shock protein 60(HSP60)
 Q9LDZ0 mitochondrial HSO70 2(MTHSC70-2)
Q9M7T0 peroxiredoxin IIF(PRXIIF)
 Q5XF75 translation elongation factor Ts (EF-Ts)
Nucleares
O80763 Nucleoredoxin 1

En la comparativa WT vs KO2 en condición control (Tabla 15), además de Fe-SOD, APX y TRXh2 igual que en el KO1, aparecían persulfuradas una proteína deshidroascorbato reductasa (1,4 veces más en KO2) y Mn-SOD1 (1,9 más en KO2). Otra diana de TRXo1 que está persulfurada es serina hidroximetil transferasa en el KO2 (10 veces más persulfurada). Como nuclear aparecía una proteína del poro de este orgánulo.

Tabla 15. Proteínas persulfuradas diferencialmente en el genotipo KO2 respecto al WT en condición control (C), clasificadas como mitocondriales o nucleares. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (*Gene Ontology*, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos WT y KO1 de extractos foliares de plantas de *Arabidopsis* de 19 días de edad crecidas en ausencia de NaCl. Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante.

Condición control: WTC vs KO2C

Mitocondriales

Q9XIE2 ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family (PEN3)
 P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q9T0K7 ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family
 Q9SFH9 Aldolase superfamily protein(HEMB1)
 Q9ZU52 Aldolase superfamily protein(PDE345)
 O23247 Arginyl-tRNA synthetase, class Ic(emb1027)
 Q9LF68 BOLA-like family protein
 Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 Q9FI56 CLPC homologue 1(CLPC1)
 O48593 Class II aminoacyl-tRNA and biotin synthetases superfam(NS1)
 Q9SKQ0 Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family
 Q9FK55 Cytochrome C1 family
 Q9ZVA4 D-mannose binding lectin protein
 Q5M729 Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form protein
 P25696 Enolase(LOS2)
 Q9FGM0 FTSH protease 11(FTSH11)
P21276 Fe superoxide dismutase 1(FSD1)
Q9LU64 Fe superoxide dismutase 2(FSD2)
 O49313 GRIM-19 protein(AT2G33220)
 Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu family protein
 Q9S1J2 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1(MGP1)
 Q38858 calreticulin 1b(CRT1b)
 O65282 chaperonin 20(CPN20)
 P21238 chaperonin-60alpha(CPN60A)
Q9FWR4 dehydroascorbate reductase(DHAR1)
 O04921 ferrochelatase 2(FC2)
 Q01525 general regulatory factor 2(GRF2)
 Q38946 glutamate dehydrogenase 2(GDH2)
 O80988 glycine decarboxylase P-protein 2(GLDP2)
 P25855 glycine decarboxylase complex H(GDCH)
 O23627 glycyl-tRNA synthetase / glycine-tRNA ligase
 Q9C8L4 glyoxalase II 3(GLY3)
 O65398 glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenaseGLX1)
 Q9FN41 haloacid dehalogenase-like hydrolase family
 Q42525 hexokinase 1(HXK1)
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
 Q9SXP7 lipoyltransferase 2(LIP2)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)
 Q9FV50 methionine aminopeptidase 1D(MAP1D)
 Q9FNK4 ornithine-delta-aminotransferase(DELTA-OAT)
 P28493 pathogenesis-related protein 5(PR5)
 Q9FU22 peptide deformylase 1B(PDF1B)
 Q9SL42 peptidylprolyl cis/trans isomerase, NIMA-interacting 1(PIN1AT)
 Q9FMU6 phosphate transporter 3;1(PHT3;1)
 Q9FGI6 NADH-ubiquinone dehydrogenase(EMB1467)
 Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)
 Q9ZUG4 NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily
 Q56WK6 PATELLIN 1(PATL1)
 Q9SGC1 Phosphoglucosyltransferase/phosphomannomutase family(PGM2)
 Q94CE5 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase(POP2)
 Q9C9C5 Ribosomal protein L6 family protein(AT1G74050)
 Q6NPR7 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
 Q42546 SAL1 phosphatase-like protein(SAL1)
 Q7Y208 SHV3-like 2(SVL2)
 Q9LQL0 Single hybrid motif superfamily protein
 O82179 Single hybrid motif superfamily
 Q9LJE4 TCP-1/cpn60 chaperonin family (Cpn60beta2)
 C02361 TCP-1/cpn60 chaperonin family(Cpn60beta3)
Q8LBS4 Thioredoxin superfamily protein
 Q9XGX9 Tim10/DDP family zinc finger protein(TIM9)
 Q9ZVH7 Transmembrane proteins 14C)
 Q42560 aconitase 1(ACO1)

P53496 actin-11(ACT11)
 Q56YA5 alanine:glyoxylate aminotransferase(AGT)
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 Q96242 allene oxide synthase(AOS)
 Q9S7Y7 alpha-xylosidase 1(XYL1)
 Q9SYT0 annexin 1(ANNAT1)
 Q9FN48 calcium sensing receptor(CaS)
 P29402 calnexin 1(CNX1)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)
 P94111 strictosidine synthase 2(SS2)
Q42592 stromal/mitoc ascorbate peroxidase(SAPX)
 Q9SX77succinate dehydrogenase 5 (SDH5)
 Q38814 thiazole biosynthetic enzyme, chloroplast (ARA6) (THI1) (THI4)(THI1)
Q38879 thioredoxin 2(TRX2)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 P82874 translocase of outer membrane 20 kDa subunit 3(TOM20-3)
 Q9S1I8 ubiquitin family protein(DSK2)
Matriz mitocondrial
 Q8H7F6 CAX-interacting protein 2(CXIP2)
 Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 Q5M729 Dihydrolipoamide acetyltransferase, long form
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 O65282 chaperonin 20(CPN20)
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)
 Q9FNK4 ornithine-delta-aminotransferase(DELTA-OAT)
Membrana externa
 P25696 Enolase(LOS2)
 Q42525 hexokinase 1(HXK1)
 P82874 translocase of outer membrane 20 kDa subunit 3(TOM20-3)
Membrana interna
 P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q9FK55 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
 Q9FGM0 FTSH protease 11(FTSH11)
 O49313 GRIM-19 protein(AT2G33220)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 P82874 translocase of outer membrane 20 kDa sub 3(TOM20-3)
Complejo I mitocondrial
 O49313 GRIM-19 protein
 Q9FGI6 NADH-ubiquinone dehydrogenase
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)
Complejo piruvato DHAsa
 Q9C8P0 2-oxoacid dehydrogenases acyltransferase family
 Q5M729 Dihydrolipoamide acetyltransferase
Nucleares
 A4GSN8 nuclear pore anchor(NUA)

3.2.2. Efecto de la salinidad en cada genotipo

Como segunda aproximación realizamos un estudio del efecto de la salinidad en la persulfuración de proteínas en cada genotipo, y posteriormente, se analizaron las diferencias entre los genotipos en la condición salina. En las plantas silvestres WT, la salinidad provocó una mayor persulfuración de proteínas del sistema antioxidante mitocondrial como Mn-SOD (4,6 veces), MDHAR6 (5,5 veces), y algunas proteínas del metabolismo del S como D-CDES (13 veces) y mercaptopiruvato sulfotransferasa (4 veces). Además, se detectaron como más persulfuradas algunas dianas de TRX_{o1} como serina hidroximetil transferasa 1 y 2, y las proteínas P1 y P2 del complejo glicina descarboxilasa (2,3 y 6,3 veces, respectivamente). Por otro lado, entre las proteínas nucleares, aparecían más persulfuradas en salinidad el PCNA1 (6,8 veces) que es diana de TRX_{o1} también y una nucleoredoxina, concretamente la proteína NRX1 (13 veces) (Tablas 16A y 166B). Así mismo, algunas proteínas aparecían menos persulfuradas en salinidad, entre ellas DHAR1 (1,4 veces) y APX (2,3 veces) así como la diana de TRX, proteína T del complejo de la glicina descarboxilasa (1,7 veces).

Tabla 16 (A) y (B). Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales y nucleares en el genotipo WT. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (Gene Ontology, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos WTC y WTS de extractos foliares de plantas de *Arabidopsis thaliana* de 19 días de edad crecidas en ausencia (Control C) y presencia de NaCl durante 7 días (salinidad S). Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante y en azul algunas relacionadas con el metabolismo del azufre.

(A) Efecto de la salinidad: WTC vs WTS

Mitocondriales

Q9FFR3 6-phosphogluconate dehydrogenase
 P0DH91ADP-ribosylation factor 1(ARF1)
 P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 F4JML5 ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase
 Q9LF98 Aldolase superfamily protein (FBA8)
 Q9ZPF5 Arginase/deacetylase superfamily protein(ARGAH2)
 Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 Q9SIF2 Chaperone protein htpG family protein(CR88)
 P20115 Citrate synthase family protein(ATCS)
 O48593 Class II aminoacyl-tRNA and biotin synthetase(NS1)
 Q8LB47 Co-chaperone GrpE family protein(AR192)
 Q9SKQ0 Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
 Q9LEV3 Cystathionine beta-synthase (CBS) family protein(CBSX3)
 Q9FKS5 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
F4HYF3 D-cysteine desulfhydrase (D-CDES)
 Q9ZVA4D-mannose binding lectin protein(AT1G78850)
 Q5M729 Dihydroliipoamide acetyltransferase(AT1G54220)
 Q8RWN9 Dihydroliipoamide acetyltransferase(AT3G13930)
 P25696 Enolase(LOS2)
P21276 Fe superoxide dismutase 1(FSD1)
 O49313 GRIM-19 protein(AT2G33220)
 Q9ZT91 GTP binding Elongation factor Tu family protein(AT4G02930)
 O65396 Glycine cleavage T-protein family(AT1G11860)
 Q9M8M7 HOPW1-1-interacting 1(WIN1)
 Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase(mMDH1)
 Q9LKA3 Lactate/malate dehydrogenase(mMDH2)
 Q9SCK3 Mitochondrial import inner memb translocase Tim17/Tim22/Tim23
 Q9FLS8 Mitochondrial substrate carrier family protein(APC1)
 Q9FHX2 Mitochondrial substrate carrier family protein(Mf1)
 Q9ZW19 NAD(P)-binding Rossmann-fold (AT2G29360)
 Q9FJW4 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(FRO1)
 Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)
 Q9ZUG4 NagB/RpiA/CoA transferase-like protein(AT2G05830)
 Q9SGC1 Phosphoglucomutase/phosphomannomutase (PGM2)
 Q9LVQ8 Protein phosphatase 2C family protein(AT5G66720)
 Q94CE5 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase(POP2)
 P0DH91 Ras-related small GTP-binding protein(ARFA1D)
 Q9SFX3 Ribophorin I(AT1G76400)
 Q9SFX3 Ribophorin I(AT1G76400)
 Q9SYL9 Ribosomal protein L13 family protein(emb1473)
 P46286 Ribosomal protein L2 family(EMB2296)
 Q9FWS4 Ribosomal protein L31(emb2184)
 Q6NPR7 S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase
 Q42546 SAL1 phosphatase-like protein(SAL1)
 Q94AI6 SEC6(SEC6)
 Q9LQL0 Single hybrid motif superfamily protein(AT1G32470)
Q8LBS4 Thioredoxin superfamily protein(AT2G20270)
 Q9XGX9 Tim10/DDP family zinc finger protein(TIM9)
 P92959 Translation protein SH3-like family protein(RPL24)
 Q42560 aconitase 1(ACO1)
 Q9SIB9 aconitase 3(ACO3)
 P53496 actin-11(ACT11)
 F4I710 alanine aminotransferas(AlaAT1)
 Q940M2 alanine:glyoxylate aminotransferase 2(AGT2)
 Q56YA5 alanine:glyoxylate aminotransferase(AGT)
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 Q93ZC5 allene oxide cyclase 4(AOC4)
 P46637 arginase(ARGAH1)
Q42564 ascorbate peroxidase 3(APX3)
 P46645 aspartate aminotransferase 2(ASP2)
 Q9FYA6 branched-chain amino acid aminotransferase 5 (BCAT5)
 Q9FN48 calcium sensing receptor(CaS)
 O04151 calreticulin 1a(CRT1a)
 P48491 triosephosphate isomerase(TPI)
 Q9FJX3 voltage dependent anion channel 2(VDAC2)

P25819 catalase 2(CAT2)
Q42547 catalase 3(CAT3)
 P34893 chaperonin 10(CPN10)
 O65282 chaperonin 20(CPN20)
 P21238 chaperonin-60alpha(CPN60A)
 Q9ZUX4 copper ion binding protein(AT2G27730)
 Q9SRZ6 NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase(cICDH)
Q9FWR4 dehydroascorbate reductase(DHAR1)
 Q96251 delta subunit of Mt ATP synthase(ATP5)
 Q9C616 electron transfer flavoprotein alpha(ETFALPHA)
 Q94JQ4 endoribonuclease L-PSP family protein(AT3G20390)
 O04921 ferrochelatase 2(FC2)
 Q957E4 formate dehydrogenase(FDH)
 Q9SJU4 fructose-bisphosphate aldolase 1(FBA1)
 P48347 general regulatory factor 10(GRF10)
 Q01525 general regulatory factor 2(GRF2)
 P42644 general regulatory factor 3(GRF3)
 Q43314 glutamate dehydrogenase 1(GDH1)
 Q38946 glutamate dehydrogenase 2(GDH2)
 Q84WV9 glutaminyl cyclase(QC)
Q9ZRW8 glutathione S-transferase TAU 19(GSTU19)
 F4JTE7 glycerol-3-phosphatase 1(GPP1)
 Q94B78 glycine decarboxylase P-protein 1(GLDP1)
 O80988 glycine decarboxylase P-protein 2(GLDP2)
 Q8L785 glycine-tRNA ligase(EDD1)
 Q9C8L4 glyoxalase II 3(GLY3)
 O65398 glyoxalase/bleomycin resistance protein(GLX1)
 P29197 heat shock protein 60(HSP60)
 P55737 heat shock protein 81-2(HSP81-2)
 Q42525 hexokinase 1(HXK1)
 Q42553 isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl isomerase 2(IPP2)
 Q9M5K2 iron-sulfur cluster assembly protein 2(mtlPD2)
 Q9SXP7 lipoyltransferase 2(LIP2)
 Q23006 lysm domain GPI-anchored protein 2 precursor(LYM2)
 Q9SN86 malate dehydrogenase(MDH)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)
O64530 mercaptopyruvate sulfurtransferase 1(MST1)
 Q9FV50 methionine aminopeptidase 1D(MAP1D)
 Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtlLPD1)
P92947 monodehydroascorbate reductase 6(MDAR6)
 Q39161 nitrite reductase 1(NIR1)
 Q9SL42 peptidylprolyl cis/trans isomerase(PIN1AT)
 Q9FMU6 phosphate transporter 3;1(PHT3;1)
 Q9LD57 phosphoglycerate kinase 1(PGK1)
 O81845 plant uncoupling mitochondrial protein 1(PUMP1)
 Q9FK23 plastid transcriptionally active 15(PTAC15)
 Q8GZQ3 polyribonucleotide nucleotidyltransferase(RIF10)
 Q9LJL3 presequence protease 1(PREP1)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 P93732 proline iminopeptidase(PIP)
 O24457 pyruvate dehydrogenase E1 alpha(PDH-E1 ALPHA)
 P56793 ribosomal protein L16(rpl16)
 Q9FE65 ribosomal protein L34(RPL34)
 P16180 ribosomal protein S17(RPS17)
 Q9M1X0 ribosome recycling factor, chloroplast precursor(RRF)
 Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)
 Q9SZ15 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)
 O65686 small subunit ribosomal protein 16(SSR16)
 P94111 strictosidine synthase 2(SS2)
Q42592 stromal ascorbate peroxidase(SAPX)
Q9S850 sulfite oxidase(SOX)
 F4JJT9 tRNA synthetase class II (D, K and N) family protein(AT4G33760)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 Q9SJY5 uncoupling protein 5(UCP5)
 O23654 vacuolar ATP synthase subunit A(VHA-A)

(B) Efecto de la salinidad: WTC vs WTS

Membrana interna

P92549 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q9FK55 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
 O49313 GRIM-19 protein(AT2G33220)
 Q9FLS8 Mitochondrial substrate carrier family protein(APC1)
 Q9FHX2 Mitochondrial substrate carrier family protein(Mf1)
 O81845 plant uncoupling mitochondrial protein 1(PUMP1)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 Q9SJY5 uncoupling protein 5(UCP5)

Membrana externa

9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
 P25696 Enolase(LOS2)
 Q42525 hexokinase 1(HXK1)
 Q9FJX3 voltage dependent anion channel 2(VDAC2)
 9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
 P25696 Enolase(LOS2)
 O04499 Phosphoglycerate mutase(iPGAM1)
 5M729 Dihydropolipoamide acetyltransferase(AT1G54220)
 Q8RWN9 Dihydropolipoamide acetyltransferase(AT3G13930)

Matriz mitocondrial

Q9FK07 CLP protease regulatory subunit X(CLPX)
 P20115 Citrate synthase family protein(ATCS)
 Q5M729 Dihydropolipoamide acetyltransferase(AT1G54220)
 Q8RWN9 Dihydropolipoamide acetyltransferase(AT3G13930)
 Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase (MDH1)
 Q9LKA3 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH2)
 Q9SCL7 N-acetyl-L-glutamate kinase(NAGK)

Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q9SAK4 aldehyde dehydrogenase 5F1(ALDH5F1)
 P34893 chaperonin 10(CPN10)
 O65282 chaperonin 20(CPN20)
 Q9C616 electron transfer flavoprotein alpha(ETFALPHA)
 P29197 heat shock protein 60(HSP60)
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)
 Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
 Q9LJL3 presequence protease 1(PREP1)
 Q9SZJ5 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)

Complejo I mitocondrial

49313 GRIM-19 protein(AT2G33220)
 Q9FJW4 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(FRO1)
 Q9ZUX4 copper ion binding protein(AT2G27730)
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
 Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
 O04331 prohibitin 3(PHB3)
 Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)

Ruptura glicina

Q9LQL0 Single hybrid motif(AT1G32470)
 Q94B78 glycine decarboxylase P-protein 1(GLDP1)
 O80988 glycine decarboxylase P-protein 2(GLDP2)

Nucleares

O80763 Nucleoredoxin 1, NRX1 (AT1G60420)
 Q9M7Q7 Proliferating cellular nuclear antigen 1 PCNA1

En las plantas mutantes KO1 *Attrx1* la salinidad indujo una mayor persulfuración en las mismas proteínas mitocondriales, algunas con similar intensidad (proteínas P de GDC, SHMT y MDHAR6) y otras con diferente intensidad D-CDES (1,9 veces), MST1 (2,4), Mn-SOD1 (2,8) (Tablas 17A y 17B). Algunas proteínas similares que en el WT menos persulfuradas en salinidad fueron DHAR1 (2 veces menor) y APX (3,2 menos) mientras que otras diferentes aparecían menos persulfuradas en sal en este mutante como GRX4 (4,2 veces) y PRXIIF (5,9 veces). No se detectaron proteínas nucleares diferencialmente persulfuradas.

Tabla 17 (A) y (B). Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales en el genotipo mutante KO1 *Attrx1*. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (Gene Ontology, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos KO1C y KO1S de extractos foliares de plantas de *A. thaliana* de 19 días de edad crecidas en ausencia (Control C) y presencia de NaCl durante 7 días (salinidad S). Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante y en azul algunas relacionadas con el metabolismo del S.

(A) Efecto de la salinidad: KO1C vs KO1S

Mitocondriales

- Q9FLI7 2 iron, 2 sulfur cluster binding protein(NEET)
 O81153 20S proteasome beta subunit C2(PBC2)
 Q9FFR3 6-phosphogluconate dehydrogenase(AT5G41670)
 Q9SL67 AAA-type ATPase family protein(RPT2b)
 P56757 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
 Q9ZW85 Aconitase/3-isopropylmalate dehydratase protein(AT2G43090)
 P36428 Alanyl-tRNA synthetase(ALATS)
 Q9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
 Q9ZPF5 Arginase/deacetylase superfamily protein(ARGAH2)
 Q9FI56 CLPC homologue 1(CLPC1)
 P25071 Calcium-binding EF hand family protein(TCH3)
 Q9SIF2 Chaperone protein htpG family protein(CR88)
 Q9SW96Class II aminoacyl-tRNA and biotin synthetase(SYNC1)
 F4HTT6 Cyclophilin-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (AT1G74070)
 F4IPY2 CysteinyI-tRNA synthetase, class Ia family protein(SYCO ARATH)
 Q9FK55 Cytochrome C1 family(AT5G40810)
 O49485 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase(EDA9)
F4HYF3 D-cysteine desulfhydrase(D-CDES)
 F4K4Y5 DEK domain-containing chromatin associated prot(AT5G55660)
 P25696 Enolase(LOS2)
 Q9SVG4 FAD-binding Berberine family protein(AT4G20830)
 P83291 FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase(AT5G20080)
 Q9SJ81 FASCICLIN-like arabinogalactan 7(FLA7)
 Q9FGM0 FTSH protease 11(FTSH11)
P21276 Fe superoxide dismutase 1(FSD1)
 Q93ZE5 Fumarylacetoacetate (FAA) hydrolase (AT4G15940)
 Q9FV81 GLU-ADT subunit B(GATB)
 Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu(AT1G07920)
 Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu (AT1G07930)
 Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu (AT1G07940)
 Q9ZT91 GTP binding Elongation factor Tu (AT4G02930)
 Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu (AT5G60390)
 Q9SGZ5 Glycosyl hydrolase family protein(AT1G78060)
 O64883 Glycosyl hydrolase superfamily protein(PEN2)
 F4JFN3 HEAT SHOCK PROTEIN 89.1(Hsp89.1)
 Q9M8M7 HOPW1-1-interacting 1(WIN1)
 Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase (mMDH1)
 Q9LKA3 Lactate/malate dehydrogenase(mMDH2)
 Q9SJ12 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1(MGP1)
 Q9FLS8 Mitochondrial substrate carrier (APC1)
 Q9SK66 NAD(P)-binding Rossmann-fold (AT2G20360)
 Q1H537 NAD(P)-binding Rossmann-fold (PCB2)
 Q9FGI6 NADH-ubiquinone dehydrogenase(EMB1467)
 Q9FLX7 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(AT5G52840)
 Q9FJW4 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(FRO1)
Q39243 NADPH-dependent thioredoxin reductase B(NTRB)
 Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)
 Q9LIG6 NFU domain protein 4(NFU4)
 Q9C8J2 NFU domain protein 5(NFU5)
 Q8RXE9 Nucleotidyl transferase superfamily protein(OVA4)
 Q56WK6 PATELLIN 1(PATL1)
 Q9SRG3 PDI-like 1-2(PDIL1-2)
 Q9FF55 PDI-like 1-4(PDIL1-4)
 Q9SIU8 PP2C induced by AVRRPM1(PIA1)
 Q9M3A8 Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein(emb1796)
 Q96520 Peroxidase superfamily protein(AT1G71695)
 P50318 Phosphoglycerate kinase family protein(AT1G56190)
 Q9LVQ8 Protein phosphatase 2C family protein(AT5G66720)
 O64730 Protein phosphatase 2C family protein(PBCP)
 Q9LMG7 Purple acid phosphatases superfamily protein(PAP2)
Q8W485 Putative thiol-disulfide oxidoreductase DCC(AT5G50100)
 Q94CE5 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase(POP2)
 P49637 Ribosomal protein L18e/L15 (AT1G70600)
 Q9FWS4 S phase kinase-associated protein 1(SKP1)
 Q9SRH6 SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated (HIR2)
 Q9SIP1 Stress responsive alpha-beta barrel domain(AT2G31670)
 Q8H1Y0 Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding) (IAR4)
Q8LBS4 Thioredoxin superfamily protein(AT2G20270)
 P2901 pyruvate dehydrogenase complex E1 alpha subunit(E1 ALPHA)
 Q38799 Transketolase family protein(MAB1)
 Q9SI20 Translation elongation factor EF1B(AT2G18110)
 Q9SI75 Tropomyosin-like protein(PMD1)
 Q42560 aconitase 1(ACO1)
 Q9SIB9 aconitase 3(ACO3)
 P53492 actin 7(ACT7)
 F4I710 alanine aminotransferas(AlaAT1)
 Q940M2 alanine:glyoxylate aminotransferase 2(AGT2)
 Q56YA5 alanine:glyoxylate aminotransferase(AGT)
 Q9SU63 aldehyde dehydrogenase 2B4(ALDH2B4)
 Q93ZC5 allene oxide cyclase 4(AOC4)
 Q96242 allene oxide synthase(AOS)
 Q9SYT0 annexin 1(ANNAT1)
 P46645 aspartate aminotransferase 2(ASP2)
 Q67XN2 beta glucosidase 8(BGLU8)
 Q9FYA6 branched-chain amino acid aminotransferase 5 (BCAT5)
 Q9FLH0 branched-chain amino acid aminotransferase (LINC4)
 O04151 calreticulin 1a(CRT1a)
 Q38858 calreticulin 1b(CRT1b)
 O65282 chaperonin 20(CPN20)
 P21238 chaperonin-60alpha(CPN60A)
 Q9STW6 chloroplast heat shock protein 70-1(cpHsc70-1)
Q9FWR4 dehydroascorbate reductase(DHAR1)
 Q94JQ4 endoribonuclease L-PSP family protein(AT3G20390)
 Q9S7E4 formate dehydrogenase(FDH)
 Q9SIJ4 general regulatory factor 10(GRF10)
 Q01525 general regulatory factor 2(GRF2)
 P42644 general regulatory factor 3(GRF3)
 Q43314 glutamate dehydrogenase 1(GDH1)
 Q9ZNZ7 glutamate synthase 1(GLU1)
 Q43127 glutamine synthetase 2(GS2)
Q8LBK6 glutaredoxin 4(GRX4)
Q8L7C9 glutathione S-transferase TAU 20(GSTU20)
P42770 glutathione reductase(GR)
 P25858 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C1(GAPC1)
 Q9FX54 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C2(GAPC2)
 Q94B78 glycine decarboxylase P-protein 1(GLDP1)
 O80988 glycine decarboxylase P-protein 2(GLDP2)
 Q9SVM8 glycine-rich RNA-binding protein 2(GR-RBP2)
 Q8L785 glycine-tRNA ligase(EDD1)
 Q9C8L4 glyoxalase II 3(GLY3)
 O65398 glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase(GLX1)
 Q9FN41haloacid dehalogenase-like hydrolase (AT5G53850)
 P29197 heat shock protein 60(HSP60)
 Q42525 hexokinase 1(HXK1)
 Q8LG77 isocitrate dehydrogenase VI(1DH-VI)
 Q8H1E2 lactate/malate dehydrogenase family protein(AT5G58330)
 Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
 O23006 lysm domain GPI-anchored protein 2 precursor(LYM2)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)
O64530 mercaptopyruvate sulfurtransferase 1(MST1)
 Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
P92947 monodehydroascorbate reductase 6(MDAR6)
 Q39161 nitrite reductase 1(NIR1)
 Q8L831 nudix hydrolase homolog 3(NUDT3)
Q9M7T0 peroxiredoxin IIF(PRXIIF)
 Q9LD57 phosphoglycerate kinase 1(PGK1)
 Q9SAJ4 phosphoglycerate kinase(PGK)
 Q38882 phospholipase D alpha 1(PLDALPHA1)
 Q9S717 photosystem II light harvesting complex prot 2.2(LHCB2.2)
 Q9FLW9 plastidic pyruvate kinase beta subunit 1(PKP-BETA1)
 Q9LJL3 presequence protease 1(PREP1)
 Q8VY06 presequence protease 2(PREP2)
 Q42449 profilin 1(PRF1)
 O49460 prohibitin 1(PHB1)
 P93732 proline iminopeptidase(PIP)
 F4KE63 protein EMBRYO DEFECTIVE 2247(EMB2247)
 Q9M8D3 purine biosynthesis 4(PUR4)
 O04904 pyrimidin 4(PYR4)
 O24457 pyruvate dehydrogenase E1 alpha(PDH-E1 ALPHA)

(B) Efecto de la salinidad: KO1C vs KO1S

P56791 ribosomal protein L2(rpl2)	Membrana externa
Q9M1X0 ribosome recycling factor, chloroplast precursor(RRF)	Q9FLI7 2 iron, 2 sulfur cluster binding protein(NEET)
Q38900 rotamase CYP 3(ROC3)	Q9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)	P25696 Enolase(LOS2)
Q9SZJ5 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)	Q9LXR8 Tropomyosin-like protein(PMD1)
O48661 spermidine synthase 2(SPDS2)	Q42525 hexokinase 1(HXK1)
Q42592 stromal ascorbate peroxidase(SAPX)	Q9SP35 translocase inner membrane sub 17-2(TIM17-2)
Q9S850 sulfite oxidase(SOX)	Q9FNC9 translocase of outer membrane 22-V(TOM22-V)
Q9C9D0 sulfotransferase 16(SOT16)	Q9FJX3 voltage dependent anion channel 2(VDAC2)
D75FH9 suppressor of npr1-1 constitutive 4(SNC4)	Membrana interna
Q42403 thioredoxin 3(TRX3)	9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
O64764 thioredoxin O1(TO1)	P25696 Enolase(LOS2)
Q42593 ascorbate peroxidase(TAPX)	Q9LMG7 Purple acid phosphatases (PAP2)
Q5XF75 translation elongation factor Ts (EF-Ts)(AT4G11120)	P25858 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase C1(GAPC1)
Q9SP35 translocase inner membrane sub 17-2(TIM17-2)	NADPH DHAsa
Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)	Q84VQ4 Chaperone DnaJ-domain superfamily protein(NdhU)
Q9FNC9 translocase of outer membrane 22-V(TOM22-V)	Q9T0A4 NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit S(NdhS)
Q9SKP6 triosephosphate isomerase(TIM)	Q9FL87 chlororespiratory reduction 7(CRR7)
P48491 triosephosphate isomerase(TPI)	Q2V257 subunit NDH-M of NAD(P)H:plastoquinone DHase(NdhM)
Q9SI19 ubiquitin family protein(AT2G17190)	Complejo I mitocondrial
Q9SI18 ubiquitin family protein(DSK2)	P83483 ATP synthase alpha/beta protein(AT5G08670)
O23654 vacuolar ATP synthase subunit A(VHA-A)	P83483 ATP synthase alpha/beta protein(AT5G08690)
Q9FJX3 voltage dependent anion channel 2(VDAC2)	Q9SK66 NAD(P)-binding Rossmann-fold prot(AT2G20360)
Matriz mitocondrial	Q9FGI6 NADH-ubiquinone dehydrogenase(EMB1467)
Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH1)	Q9FLX7 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(AT5G52840)
Q9LKA3 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH2)	Q9FJW4 NADH-ubiquinone oxidoreductase-like protein(FRO1)
Q9SCL7 N-acetyl-l-glutamate kinase(NAGK)	Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
Q9SK66 NAD(P)-binding Rossmann-fold protein(AT2G20360)	Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
Q8H1Y0 Thiamin diphosphate-binding fold (THDP-binding)(IAR4)	O49460 prohibitin 1(PHB1)
Q9SU63 chaperonin 20(CPN20)	Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)
Q9ZNZ7 glutamate synthase 1(GLU1)	ATPasa
Q8LBK6 glutaredoxin 4(GRX4)	P19366 ATP synthase CF1 beta subunit(atpB)
P29197 heat shock protein 60(HSP60)	P83483 ATP synthase alpha/beta protein(AT5G08670)
Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)	P83483 ATP synthase alpha/beta protein(AT5G08690)
O81235 manganese superoxide dismutase 1(MSD1)	Q9SJ12 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1(MGP1)
Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)	
Q9M7T0 peroxiredoxin IIF(PRXIIF)	
Q9LJL3 presequence protease 1(PREP1)	
Q8VY06 presequence protease 2(PREP2)	
P52901 pyruvate dehydrogenase complex E1(E1 ALPHA)	
Q9SZJ5 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)	
O64764 thioredoxin O1(TO1)	
Q5XF75 translation elongation factor Ts (EF-Ts)(AT4G11120)	

En el mutante KO2 *Attrxol* aparecía más persulfurada en salinidad la proteína antioxidante MDHAR6 (2,8 veces), mientras que menos persulfuradas estaban DHAR1 (3 veces), APX (5,2) y la propia TRXo1 (4.2 veces) (Tabla 18). Tampoco aparecían proteínas nucleares diferencialmente persulfuradas por la salinidad.

Tabla 18. Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales en el genotipo mutante KO2 *Attrxol*. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (Gene Ontology, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos KO2C y KO2S de extractos foliares de plantas de *A. thaliana* de 19 días de edad crecidas en ausencia (Control C) y presencia de NaCl durante 7 días (salinidad S). Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante.

Condición salina: KO2C vs KO2S

Mitocondriales

Q9XIE2 ABC-2 and Plant PDR ABC-type transporter family protein(PEN3)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
Q9LF98 Aldolase superfamily protein(FBA8)
Q9ZPF5 Arginase/deacetylase superfamily protein(ARGAH2)
Q9SIF2 Chaperone protein htpG family protein(CR88)
Q9CA90 D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase(AT1G79870)
Q0WL80 EMS-MUTAGENIZED BRI1 SUPPRESSOR 1(EBS1)
Q9SJ81 FASCICLIN-like arabinogalactan 7(FLA7)
Q9LU64 Fe superoxide dismutase 2(FSD2)
Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH1)
Q9SJ12 MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 1(MGP1)
Q9C5M0 Mitochondrial substrate carrier family protein(AT5G19760)
Q9SLA8 NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein(MOD1)
Q8L7K9 NAD-dependent malic enzyme 2(NAD-ME2)
Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)
Q9ZUG4 NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily protein(AT2G05830)
Q9CAT7 Nascent polypeptide-associated complex NAC(AT1G73230)
Q56WK6 PATELLIN 1(PATL1)
Q9LMG7 Purple acid phosphatases superfamily protein(PAP2)
Q9SIM4 Ribosomal protein L14(AT2G20450)
P60040 Ribosomal protein L30/L7 family protein(AT2G01250)
Q9LW15 Rubredoxin-like superfamily protein(AT3G15640)
Q9SL48 Sec1/munc18-like (SM) proteins superfamily(ATSLY1)
P45434 Translocon-associated protein (TRAP), alpha subunit(AT2G21160)
Q9ZVH7 Transmembrane proteins 14C(AT2G38550)
Q9SIV0 Tyrosine transaminase family protein(SUR1)
Q9SIB9 aconitase 3(ACO3)
Q42564 ascorbate peroxidase 3(APX3)
P46645 aspartate aminotransferase 2(ASP2)
Q9FLH0 branched-chain amino acid aminotransferase 5 (BCAT5)(LINC4)
P29402calnexin 1(CNX1)
O04151 calreticulin 1a(CRT1a)
O65282 chaperonin 20(CPN20)
P21238 chaperonin-60alpha(CPN60A)
Q9FWR4Q96251 delta subunit of Mt ATP synthase(ATP5)
Q9C616 electron transfer flavoprotein alpha(ETFALPHA)
Q9S756 ferritin 4(FER4)
Q9SIU4 fructose-bisphosphate aldolase 1(FBA1)
P48347 general regulatory factor 10(GRF10)
Q01525 general regulatory factor 2(GRF2)
P42644 general regulatory factor 3(GRF3)
Q8L7C9 glutathione S-transferase TAU 20(GSTU20)
O23627 glycyl-tRNA synthetase / glycine-tRNA ligase(AT1G29880)
P29197 heat shock protein 60(HSP60)
A4GSN8 nuclear pore anchor(NUA)
Q949P3 pantothenate kinase(AT2G17340)
Q9LD57 phosphoglycerate kinase 1(PGK1)
Q9SAJ4 phosphoglycerate kinase(PGK)
Q9S7J7 photosystem II light harvesting complex protein 2.2(LHCB2.2)
Q9M1X0 ribosome recycling factor, chloroplast precursor(RRF)
Q9SZJ5 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)
Q9C9C0 signal peptide peptidase(SPPA)
Q42592 stromal ascorbate peroxidase(SAPX)
Q9SX77 succinate dehydrogenase 5(SDH5)
Q9SI9 ubiquitin family protein(AT2G17190)
Q9FJX3 voltage dependent anion channel 2(VDAC2)
Q8L7B5 heat shock protein 60-2(HSP60-2)
Q9C9W5 hydroxypyruvate reductase(HPR)
Q42553 isopentenyl pyrophosphate:dimethylallyl isomerase 2(IPP2)
Q8H1E2 lactate/malate dehydrogenase family protein(AT5G58330)
Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
O64517 metacaspase 4(MC4)
Q8GUM2 mitochondrial heat shock protein 70-1(mtHsc70-1)
Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
P92947 monodehydroascorbate reductase 6(MDAR6)
Matriz mitocondrial
Q9ZP06 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH1)
Q9SCL7 N-acetyl-l-glutamate kinase(NAGK)
O65282 chaperonin 20(CPN20)
Q9C616 electron transfer flavoprotein alpha(ETFALPHA)
P29197 heat shock protein 60(HSP60)
Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
Q8GUM2 mitochondrial heat shock protein 70-1(mtHsc70-1)
Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
Q9SZJ5 serine transhydroxymethyltransferase 1(SHM1)
O64764 thioredoxin O1(TO1)
Oxoglutarato DHasa
Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
Q9M5K3 mitochondrial lipoamide dehydrogenase 1(mtLPD1)
ATPase
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
Q96251 delta subunit of Mt ATP synthase(ATP5)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
Q96251 delta subunit of Mt ATP synthase(ATP5)

3.2.3. Diferencias en presencia de NaCl

Como tercera aproximación hicimos un análisis comparativo del patrón de proteínas persulfuradas en los distintos genotipos en la condición salina con el objeto de tener una perspectiva más detallada de las diferencias provocadas por la falta de TRXo1 en el nivel de persulfuración de proteínas mitocondriales o nucleares, cuando las plantas crecen en esta condición de estrés. En general se identificó un menor número de proteínas persulfuradas diferenciales entre genotipos que en la condición control (Tabla. 19). Del sistema antioxidante, y comparando WTS y KO1S destacamos Fe-SOD (1,2

veces más en KO1), deshidroascorbato reductasa (1,5 veces más en WT), una TRXh3 (1,3 veces más en KO1) y catalasa 3 (2,1 veces más en KO1) clasificada como mitocondrial. Del metabolismo de azufre, destacan MST1 (1,4 veces más en KO1S) y otra sulfotransferasa SOT16 (1,3 veces más en KO1S). Comparando WTS y KO2S destacamos a una proteína similar a ferredoxina (3 veces más en WTS), la propia TRXo1 (4 veces más en WT), su diana PCNA (6,6 más en WTS) y cisteína sintasa (1,3 veces más en WTS). Como más persulfurada en el KO2S que en el WTS se encontraba una proteína nuclear de unión a ARN (2,9 veces).

Tabla 19. Proteínas persulfuradas diferencialmente en los genotipos KO1/KO2 respecto al WT en condición salina, clasificadas como mitocondriales y nucleares. Clasificación de ontologías génicas enriquecidas (Gene Ontology, GO) categorizados por localización subcelular. Se presentan las proteínas con diferencias significativas $p < 0,05$ entre genotipos (A) WT vs KO1 y (B) WT vs KO2, de extractos foliares de plantas de *A. thaliana* de 19 días de edad crecidas en presencia de 300 mM NaCl durante 7 días. Se señalan en rojo proteínas del sistema antioxidante y en azul algunas relacionadas con el metabolismo del azufre.

(A) Condición salina: WTS vs KO1S

Mitocondriales

Q8LAH7 12-oxophytodienoate reductase 1(OPR1)	Q94B78 glycine decarboxylase P-protein 1(GLDP1)
P56757 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)	Q9C909 glycine-rich RNA-binding protein 5(GR-RBP5)
P8348 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)	Q8L785 glycine-tRNA ligase(EDD1)
P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)	Q42525 hexokinase 1(HXK1)
P36428 Alanyl-tRNA synthetase(ALATS)	Q8LFC0 isocitrate dehydrogenase 1(IDH1)
P20115 Citrate synthase family protein(ATCS)	Q9M5K2 lipoamide dehydrogenase 2(mtLPD2)
Q8LB47 Co-chaperone GrpE family protein(AR192)	Q9SXP7 lipoyltransferase 2(LIP2)
Q49485 D-3-phosphoglycerate dehydrogenase(EDA9)	Q64530 mercaptopyruvate sulfurtransferase 1(MST1)
Q9LU64 Fe superoxide dismutase 2(FSD2)	Q8GUM2 mitochondrial heat shock protein 70-1(mtHsc70-1)
Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu (AT1G07920)	Q39161 nitrite reductase 1(NIR1)
Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu(AT1G07930)	Q9LD57 phosphoglycerate kinase 1(PGK1)
Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu (AT1G07940)	P93732 proline iminopeptidase(PIP)
Q9ZT91 GTP binding Elongation factor Tu (AT4G02930)	Q9M8D3 purine biosynthesis 4(PUR4)
Q8W4H7 GTP binding Elongation factor Tu AT5G60390)	Q9FE65 ribosomal protein L34(RPL34)
O65396 Glycine cleavage T-protein family(AT1G11860)	P56799 ribosomal protein S4(rps4)
Q9M8M7HOPW1-1-interacting 1(WIN1)	Q0WPR4 serine carboxypeptidase-like 34(SCPL34)
Q9C5M0 Mitochondrial substrate carrier (AT5G19760)	Q94C74 serine hydroxymethyltransferase 2(SHM2)
Q9FHX2 Mitochondrial substrate carrier (Mfl1)	O65686 small subunit ribosomal protein 16(SSR16)
Q9FNH6 NDR1/HIN1-like 3(NHL3)	Q9C9D0 sulfotransferase 16(SOT16)
Q94CE5 Pyridoxal phosphate (PLP)-dependent transferase(POP2)	Q42403 thioredoxin h3(TRX3)
P17745 RAB GTPase homolog E1B(RABE1b)	Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
P49637 Ribosomal protein L18e/L15(AT1G70600)	P82874 translocase of outer membrane 20kDa subunit3(TOM20-3)
Q42560 aconitase 1(ACO1)	Q9SKP6 triosephosphate isomerase(TIM)
Q9SIB9 aconitase 3(ACO3)	P48491 triosephosphate isomerase(TPI)
Q67XN2 beta glucosidase 8(BGLU8)	
O04151 calreticulin 1a(CRT1a)	
Q42547 catalase 3(CAT3)	
Q9S757 cysteine synthase C1(CYSC1)	
Q9FWR4 dehydroascorbate reductase(DHAR1)	
Q9SJU4 fructose-bisphosphate aldolase 1(FBA1)	
Q43314 glutamate dehydrogenase 1(GDH1)	
P42760 glutathione S-transferase 6(GSTF6)	

(B)

WTS vs KO1S

ATPasa

P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
 Q01908 ATPase, F1 complex, gamma subunit protein(ATPC1)
 P56757 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)
 Q01908 ATPase, F1 complex, gamma subunit protein(ATPC1)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08670)
 P83483 ATP synthase alpha/beta family protein(AT5G08690)

Membrana interna

P56757 ATP synthase CF1 alpha subunit(atpA)
 Q9C5M0 Mitochondrial substrate carrier family protein(AT5G19760)
 Q9FHX2 Mitochondrial substrate carrier family protein(Mf1)
 Q38820 translocase inner membrane subunit 23-2(TIM23-2)
 P82874 translocase of outer membrane 20 kDa subunit 3(TOM20-3)

WTS vs KO2S

Mitocondriales

Q9LKA3 Lactate/malate dehydrogenase family protein(mMDH2)
 Q9C6I6 electron transfer flavoprotein alpha(ETFALPHA)
Q9M0V0 mitochondrial ferredoxin 1(MFDX1)
O64764 thioredoxin O1(TO1)
P47998 Cys synthase

Nucleares

Q9LVT8 RNA binding protein
 Q9M7Q7 PCNA

Como resumen de los resultados obtenidos en las comparativas de los genotipos en las dos condiciones y el propio efecto de la sal en cada genotipo, destacar que en una condición control, la falta o menor cantidad de TRX_{o1} provocaba niveles mayores de persulfuración en ciertas proteínas del sistema antioxidante y del metabolismo del S mientras que en la condición salina el número de proteínas diferencialmente persulfuradas en WT y KOs era parecido sobre todo en el KO1. La salinidad afecta a proteínas similares en el WT y KO1 siendo en general los niveles de persulfuración de las mismas iguales o menores en el mutante, excepto en el caso llamativo de la generadora de H₂S la proteína D-CDES que se encontraba mucho más persulfurada en planras WT en salinidad (WTS).

Los resultados obtenidos sobre la identificación de proteínas persulfuradas, en menor o mayor medida, en los mutantes KO *Attrxo1*, supone un punto de partida de futuras investigaciones en esta línea. De hecho, pretendemos en un futuro inmediato, estudiar el efecto que esta modificación pueda tener en la actividad de parte de las proteínas identificadas y la posible función de la TRX_{o1} en la persulfuración de las mismas, investigación que nos permitirá posiblemente extender el papel de la regulación redox y de TRX sobre esta modificación postraducciona proteica.

4. Obtención de dobles mutantes de *TRXo1* y *NTRB*

4.1. *Psntrb/trxo1* por VIGS

Cuando una planta es infectada por un virus, el mecanismo de defensa va dirigido específicamente contra el genoma viral, induciendo la síntesis de ARN de doble hebra que median el silenciamiento génico postranscripcional degradando los ARN virales. El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es una técnica que utiliza los mecanismos de defensa antivirales naturales que poseen las plantas mediados por ARN mensajeros (ARN_m) para la caracterización funcional de los genes. En esta técnica basada en el silenciamiento génico postranscripcional, los genomas víricos son modificados, eliminando los genes que inducen los síntomas víricos y clonando ADNc de los genomas víricos dentro de vectores binarios bajo el promotor CaMV35S con múltiples sitios de clonación para facilitar la inserción de fragmentos de genes diana a *knockear*. Mediante la realización de una Estancia Breve en el Grupo “Biología y Biotecnología del Desarrollo Reproductivo” del Departamento Desarrollo y Acción Hormonal en Plantas, Mecanismos Moleculares del Desarrollo y la Morfogénesis del IBMCP-UPV-CSIC de Valencia, bajo la dirección del Dr. Luis Cañas y de la Dra. Rim Hamza, se generaron construcciones para el silenciamiento a través de VIGS de los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1* de guisante.

La secuencia consenso para el gen *PsNTRB* con las secuencias proporcionadas por *Pulse Crop Database* (<https://www.pulsedb.org/organism/639>; Fig. 75) se realizó un alineamiento en Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>; Fig. 76) y para el gen *PsTRXo1* (Fig. 77; <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/AM235208>; GenBank/EMBL database; número de acceso AM235208) fue obtenida de la Tesis Doctoral de la Dra. María del Carmen Martí Ruiz (2010).

>BV165443.1-NTRB1 ID=BV165443.1-NTRB1 |Nombre=NTRB1 |Organismo=*Pisum sativum* |Tipo=gen |Longitud=467 pb

CACGCTTTGTTAATGTCTTTGTTGCCTGTCTGCATTTTAATTATATGTTTTTGTTCCTCGGGC
 TAAAAAGTGGATTATTTAATTCCATTGAAATTTTTGCAGTTAAGAAAAGTGCCAATGGTGTGGA
 CCTCCTTGCTTCACTATGCAACTTGTATAACTTTCAGAAGACGAGTTGAGGAAAACCATTGAG
 CAAGCCAACAACCTTAGTAGCAGATATATTGAAAAAGAAACCCTGTTTGGCATCTGAATGCGAAA
 CTGAAAACCTAGAGAATTTTGACCGAGGTTTGTTCCTTCAGCCATTATTATTTATGCATCACG
 ATCCAAATACAGGACTTTTTAACTGAAGTTTATATATCGTACTTCACAGATGGTTAACCTATTTT
 AAAGATCTGATGGAGGAATCATCTCTGCCGTCTAGTTTGAGTGTCTTGAAAATGATTACGATCA
 AATGACTCG

>BV165442.1-NTRB1 ID=BV165442.1-NTRB1 |Nombre=NTRB1 |Organismo=*Pisum sativum* |Tipo=gen |Longitud=433 pb

TCTTTGTTGCCTGTCTGCATTTTGATTATATTGTTTTTGTTCCTCGGGGCTTAAAAG
 TGGATTAATTCCATTGAAATTTTTGCAGTTAAGAAAAGTGCCAATGGTGTGGACCTC
 CTTGCTTCACTATGCAACTTGTATAACTTTCAGAAGACGAGTTGAGGAAAACCATT
 GAGCAAGCCAACAATTTAGTAGCAGATATATTGAAAAAGAAACCCTGTTTGGCATCT
 GAATGCGAAACTGAAAACCTAGAGAATTTGACCGAGGTTTGTTCCTTCAGCCAT
 TTATTATTTATGCATCACGATCCAAATACAGGACTTTTTAACTGAAGTTTATATATATC
 GTACTTCACAGATGGTTAACCTATTTAAAGATCTGATGGAGGAATCATCTCTGTCTG
 TCTAGTTTGAGTGTCTTGAAAATGATT

Figura 75. Secuencias para el gen *PsNTRB* proporcionadas en *Pulse Crop Database*.

	1				50
BV165443.1-NTRB1	CACGCTTTGT	TAATGTCTTT	GTTGCCTGTC	CTGCATTTTA	ATTATATTGT
BV165442.1-NTRB1TCTTT	GTTGCCTGTC	CTGCATTTTG	ATTATATTGT
ConsensusTCTTT	GTTGCCTGTC	CTGCATTTTa	ATTATATTGT
	51				100
BV165443.1-NTRB1	TTTTGTTCTC	CTGGGGCTTA	AAAGTGGATT	ATTTTAATTC	CATTGAAATT
BV165442.1-NTRB1	TTTTGTTCTC	CTGGGGCTTA	AAAGTGGATT	A.....ATTC	CATTGAAATT
Consensus	TTTTGTTCTC	CTGGGGCTTA	AAAGTGGATT	A.....ATTC	CATTGAAATT
	101				150
BV165443.1-NTRB1	TTTGCAAGTA	AGAAAAGTGC	CAATGGTGTG	GACCTCCTTG	CTTCACTATG
BV165442.1-NTRB1	TTTGCAAGTA	AGAAAAGTGC	CAATGGTGTG	GACCTCCTTG	CTTCACTATG
Consensus	TTTGCAAGTA	AGAAAAGTGC	CAATGGTGTG	GACCTCCTTG	CTTCACTATG
	151				200
BV165443.1-NTRB1	CAACTTGAT	AACACTTCAG	AAGACGAGTT	GAGGAAAACC	ATTGAGCAAG
BV165442.1-NTRB1	CAACTTGAT	AACACTTCAG	AAGACGAGTT	GAGGAAAACC	ATTGAGCAAG
Consensus	CAACTTGAT	AACACTTCAG	AAGACGAGTT	GAGGAAAACC	ATTGAGCAAG
	201				250
BV165443.1-NTRB1	CCAACAACCT	AGTAGCAGAT	ATATTGAAAA	AGAAACCCTG	TTTGGCATCT
BV165442.1-NTRB1	CCAACAATTT	AGTAGCAGAT	ATATTGAAAA	AGAAACCCTG	TTTGGCATCT
Consensus	CCAACAACcTT	AGTAGCAGAT	ATATTGAAAA	AGAAACCCTG	TTTGGCATCT
	251				300
BV165443.1-NTRB1	GAATGCGAAA	CTGAAAACCT	AGAGAATTTT	GACCGAGGTT	TGTTTTCCCT
BV165442.1-NTRB1	GAATGCGAAA	CTGAAAACCT	AGAGAATTTT	GACCGAGGTT	TGTTTTCCCT
Consensus	GAATGCGAAA	CTGAAAACCT	AGAGAATTTT	GACCGAGGTT	TGTTTTCCCT
	301				350
BV165443.1-NTRB1	CAGCCATTTA	TTATTTATGC	ATCACGATCC	AAATACAGGA	CTTTTTTAAC
BV165442.1-NTRB1	CAGCCATTTA	TTATTTATGC	ATCACGATCC	AAATACAGGA	CTTTTTTAAC
Consensus	CAGCCATTTA	TTATTTATGC	ATCACGATCC	AAATACAGGA	CTTTTTTAAC
	351				400
BV165443.1-NTRB1	TGAAGTTTAT	ATAT..CGTA	CTTCACAGAT	GGTTTAACCT	ATTTTAAAGA
BV165442.1-NTRB1	TGAAGTTTAT	ATATATCGTA	CTTCACAGAT	GGTTTAACCT	ATTTTAAAGA
Consensus	TGAAGTTTAT	ATAT..CGTA	CTTCACAGAT	GGTTTAACCT	ATTTTAAAGA
	401				450
BV165443.1-NTRB1	TCTGATGGAG	GAATCATCTC	TGCCGTCTAG	TTTGAGTGTG	TTGGAAAATG
BV165442.1-NTRB1	TCTGATGGAG	GAATCATCTC	TGTCGTCTAG	TTTGAGTGTG	TTGGAAAATG
Consensus	TCTGATGGAG	GAATCATCTC	TGcCGTCTAG	TTTGAGTGTG	TTGGAAAATG
	451		469		
BV165443.1-NTRB1	ATTACGATCA	AATGACTCG			
BV165442.1-NTRB1	ATT.....			
Consensus	ATT.....			

Figura 76. Secuencia consenso para *PsNTRB* tras alineamiento en Multalin de las secuencias obtenidas en *Pulse Crop Database*.

Secuencia de *PsTRXo1* (AM235208)

```

ATGGTTGGAACCAGAAATTTGATCGTTCGATCTTTGGCACTTCGTCATGCAATCAAG
AACACTGTTTCCTCTCTTAACCAACACCAACCTTCATTCACGAATTTCCAAATCG
TCTCTCTTCGCCGCCACACTCGCCTCTTCCTCCTACTCCTCCTCACCTCTCCCTCCACC
ATCCCGTTCCCTTTCTCCGCCTCAGCTTCTCCTGGCGTTATCCTTGTTAATTTCTGC
GGAAGAGTTCAATAAAATCCTTAGCAAAATTCAGATGACTCGTTGCACGCGATCTT
CTATTTACTGCTGTTTGGGTGGACCTTGCAGGTTTCATTTCTCCTATAGTTGGGGAG
CTCAGTAAGAAGTATCCTAATGTGGCAACTTATAAGATTGACATTGATCAGGAAGCA
ATTCAGGACACATTGAGCAGGTTGCAGATTACATCTGTGCCAACACTTCACTTCTTT
CAAAATGGGAAAAAGACCGATGAACCTATAGGTGCAGATGTTGCGCGATTGAATCA
TATTACGGAGAACTCTTCAAGAAGGACTAA
    
```

Figura 77. Secuencia consenso para el gen *PsTRXo1*. Número de acceso en GenBank/EMBL database: AM235208.

Para la construcción de los vectores, se partió de ADNc (síntesis mediante retrotranscripción como se describe en 3.5.5 de Materiales y Métodos) de *Pisum sativum* L. cv. Bonneville *wild type* para amplificar mediante PCR los fragmentos de los genes a clonarse en el vector pGem[®]T-Easy (*Promega*) utilizando dos *sets* de oligonucleótidos como punto de partida para el gen *PsNTRB*. Los fragmentos de ADNc utilizados para las construcciones oscilaban en torno a las 450 pb. Estos fragmentos se amplificaron utilizando oligonucleótidos específicos que añaden al inicio y al final del fragmento sitios de restricción que posteriormente permitieron clonar dichos fragmentos en el vector pCAPE2-*PDS*. Los fragmentos amplificados se purificaron y clonaron en pGEM[®]T-Easy, de donde posteriormente se escindieron mediante restricción doble con los enzimas correspondientes (Fig. 78).

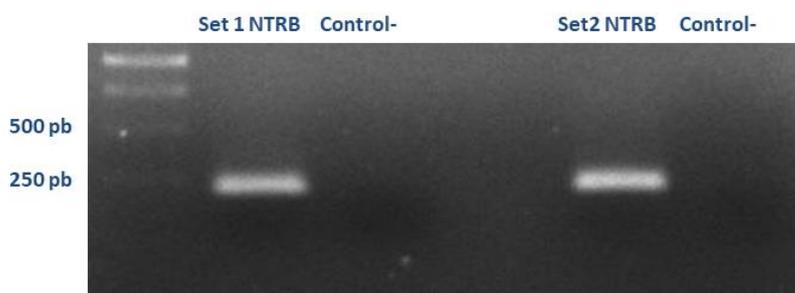


Figura 78. Electroforesis horizontal de los fragmentos de ADN amplificados por PCR (enzima Taq polimerasa de *Biotools*) con los dos sets de oligonucleótidos para NTRB junto a los controles negativos de PCR. Como molde se utilizó cDNA de guisante variedad Bonneville. Las bandas se recortaron para ser purificadas e insertadas en el vector pGEM[®]T-Easy. Migración en gel de agarosa 1% (p/v) a 110 V durante 30 minutos. Marcador GeneRuler 1kb DNA Ladder (*NZYTech*). Intercalante de ADN Green Safe (*NZYTech*).

Se diseñó también una construcción que permitiese el silenciamiento de *PsTRXo1* para posteriormente lograr la pérdida de función simultánea de ambos genes de *Pisum sativum*. Para generar dicha construcción, se utilizaron dos fragmentos, que se amplificaron utilizando oligonucleótidos específicos que añadieron al inicio y al final del fragmento sitios de restricción que posteriormente permitieron clonarlos en el vector pCAPE2-*PDS* en tándem. Así, se amplificaron los fragmentos NcoI-*PsNTRB*-XbaI y XbaI-*PsTRXo1*-PstI, que se clonaron de manera independiente en pGEM[®]T-Easy para confirmar mediante secuenciación la integración de los sitios de restricción (Fig. 79).

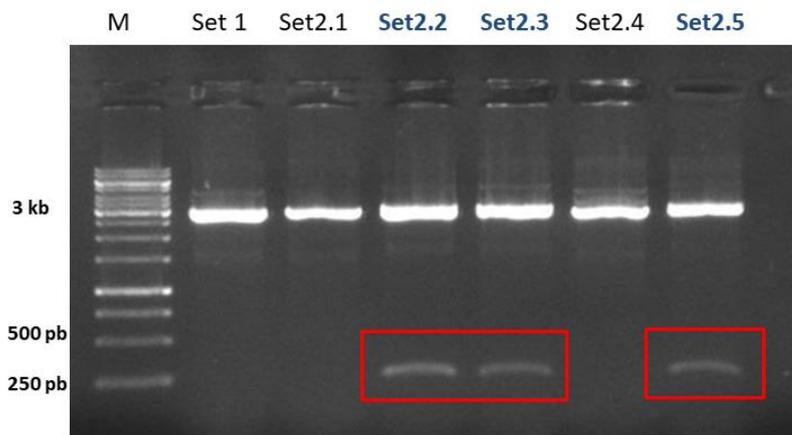
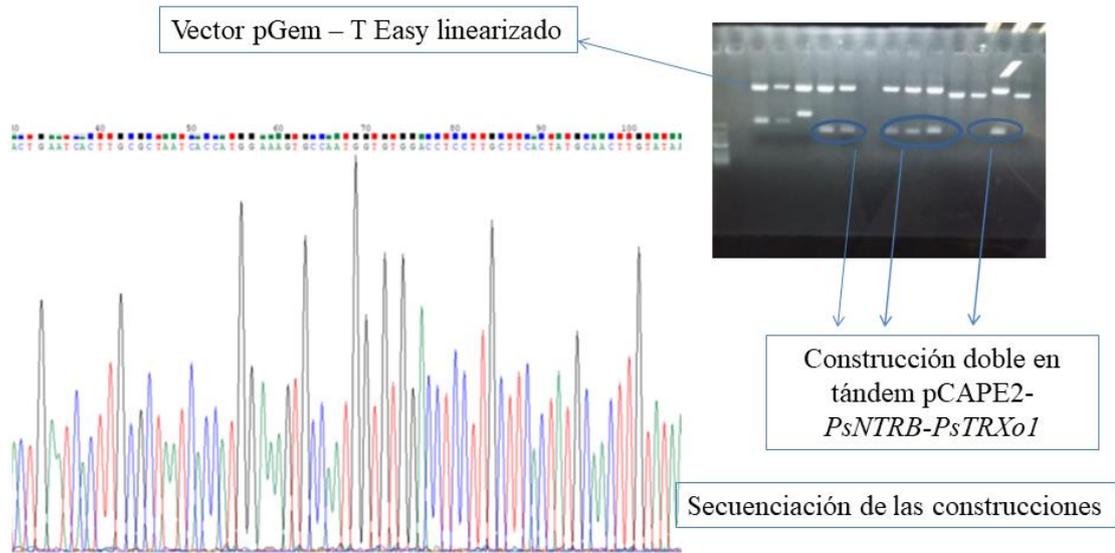


Figura 79. Migración en gel de agarosa 1% (p/v) de las digestiones de los plásmidos obtenidos de las colonias positivas para la transformación. Tres de las digestiones (Set2.2, Set2.3, Set2.5) fueron válidas, presentando el fragmento, en este caso, de 346 pb correspondientes a *NTRB*. Los fragmentos que se visualizan a 3 kb corresponden al vector pGem[®]T-Easy-T Easy linealizado.

Los fragmentos se escindieron y seguidamente el fragmento NcoI-*PsNTRB*-XbaI se clonó en pCAPE2-*PDS* linealizado con NcoI y XbaI. Finalmente, tras comprobar la inserción mediante restricción, el fragmento XbaI-*PsTRXo1*-PstI se subclonó a la construcción transitoria (pCAPE2-*PsNTRB*), linealizada con los enzimas XbaI y PstI para la clonación de los mismos. En todos los casos se comprobó la clonación de los fragmentos en pCAPE2 por restricciones dobles y por secuenciación (Fig. 80).



```

CTGAATCACTTGCGCTAATCACCATGGAAAGTGCCAATGGTGTGGACCTCCTTGCTTCACTATGCAACT
GTATAACACTTCAGAAGACGAGTTGAGGAAAACCAATTGAGCAAGCCAACAACCTAGTAGCAGATATAT
TGAAAAAGAAACCCTGTTTGGCATCTGAATGCGAAACTGAAAACCTAGAGAATTTTGACCGAGATGGT
TTAACCTATTTAAAGATCTGATGGAGGAATCATCTCTGCCCGCGGAATTCGATTTCTTGTAATTCT
GCGGAAGAGTTCAATAAAATCCTTACCAAAATCAAGATGACTCGTTGCACGCGATCTTCTATTTACTG
CTGTTTGGTGTGGACCTTGCAAGTTTCATTTCTCTATAGTTGGGGAGCTCAGTAAGAAGTATCCTAATG
TGGAACCTTATAAGATTGACATTGATCAGGAAGCAATTCAGGACACATTGAGCAGGTTGCAGATTACAT
CTGTGCCAACACTTCACTTCTTTCAAATGGGAAAAAGACCGATGAACCTATAGGTGCAGATGTTGCGC
GATTGAATCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTT
ACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGAGCAGCATCCCCCTTCGCC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA
ATGCTAGAGCAGCTTGAGCTTGATCAGATTGTCGTTTCCCGCCTTCAGTTAAACTATCAGTGTGTTGAC
AGGATATATTGGCGGTAAACCTAAGAGAAAAGAGCG
    
```

Figura 80. Digestión y migración en gel de las construcciones dobles pCAPE2-*PsNTRB-PsTRXo1* escindidas del vector pGEM[®]-T Easy (*Promega*) que posteriormente fueron comprobadas por secuenciación Sanger.

Estos fragmentos para ser comprobados, fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (Universidad Politécnica de Valencia-CSIC), utilizando como cebadores, los oligonucleótidos detallados en la Tabla 5 de Materiales y Métodos. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron alineadas en CLUSTAL Omega (*Multiple Sequence Alignment Omega*) (Fig. 81).

(A)

Alineamiento con la secuencia amplificada de *PsNTRB*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

PsNTRB-TRXo1	CTGAATCACTTGCCTAATCACCATGGAAGTGCCTGTTGGACCTCTTGCCTCAC	60
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	33
PsNTRB-TRXo1	TATGCAACTTGTATAACACTTCAGAAGCAGGTTGAGGAAAACCTTGAGCAAGCCAACA	120
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	93
PsNTRB-TRXo1	ACTTAGTAGCAGATATATTGAAAAAGAAACCTGTTGGCATCTGAAATGCGAACTGAAA	180
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	153
PsNTRB-TRXo1	ACCTAGAGAATTTGACCGAGATGGTTAACTATTTAAAGATCTGATGGAGGATCAT	240
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	213
PsNTRB-TRXo1	CTCTGCCCGGGGAATTCGATTTCTTGTAACTTGCAGGAAAGTCAATAAAATCCTT	300
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	273
PsNTRB-TRXo1	ACCAAAATCAAGATGACTGTTGCACGCGATCTCTATTACTGCTGTTGGTGTGGA	360
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	310
PsNTRB-TRXo1	CCTTGACGTTTCACTTCTCTATAGTTGGGAGCTCAGTAAGAATATCCTAATGTGCA	420
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	310
PsNTRB-TRXo1	ACTTATAAGATTGACATTGATCAGGAAGCAATTCAGACACATTGACAGGTTGACAGATT	480
PsNTRB	-----AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCAC	310

>NTRB Fragmento amplificado 310 pares de bases

AAAGTGCCAATGGTGGACCTCTTGCCTCACTATGCAACTGTATAACACTTCAGAAGCAGGTTGA
GGAAAACCTTGAGCAAGCCAACAACCTAGTAGCAGATATATTGAAAAAGAAACCTGTTGGCATCT
GAATGCGAACTGAAAACCTAGAGAATTTGACCGAGGTTGTTTCTTCAGCAATTTATTATATGC
ATCAGCATCAAATACAGGACTTTTTAACTGAAGTTTATATATATGACTTCACAGATGTTAACT
ATTTAAAGATCTGATGGAGGAATCATCTCTGC

Oligonucleótidos:
Set2-PsNtrb-fd: 5'-AAAGTGCCAATGGTGTGGA-3'
Set2-PsNtrb-rv: 5'-GCAGAGATGATTCCTCCATCAG-3'
Reverso complementario: 5'-CTGATGGAGGAATCATCTCTGC-3'

Fragmento: 310 pb

(B)

Alineamiento con la secuencia amplificada de la *PsTRXo1*

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

PsNTRB-TRXo1	CTGAATCACTTGCCTAATCACCATGGAAGTGCCTGTTGGACCTCTTGCCTCAC	60
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	0
PsNTRB-TRXo1	TATGCAACTTGTATAACACTTCAGAAGCAGGTTGAGGAAAACCTTGAGCAAGCCAACA	120
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	0
PsNTRB-TRXo1	ACTTAGTAGCAGATATATTGAAAAAGAAACCTGTTGGCATCTGAAATGCGAACTGAAA	180
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	0
PsNTRB-TRXo1	ACCTAGAGAATTTGACCGAGATGGTTAACTATTTAAAGATCTGATGGAGGATCAT	240
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	0
PsNTRB-TRXo1	CTCTGCCCGGGGAATTCGATTTCTTGTAACTTGCAGGAAAGTCAATAAAATCCTT	300
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	38
PsNTRB-TRXo1	ACCAAAATCAAGATGACTGTTGCACGCGATCTCTATTACTGCTGTTGGTGTGGA	360
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	98
PsNTRB-TRXo1	CCTTGACGTTTCACTTCTCTATAGTTGGGAGCTCAGTAAGAATATCCTAATGTGCA	420
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	158
PsNTRB-TRXo1	ACTTATAAGATTGACATTGATCAGGAAGCAATTCAGACACATTGACAGGTTGACAGATT	480
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	218
PsNTRB-TRXo1	ACATCTGTGCCAACACTTCACTTCTTCAAATGGGAAAAGACCGATGAATATAGTT	540
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	278
PsNTRB-TRXo1	GCAGATGTTGCCGATTGAATCAATCACTAGTGAATTCGCGCCGCTGCAGGATGCAA	600
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	300
PsNTRB-TRXo1	GCTTGGCACTGGCCGTTTCAACGCTGAGCTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC	660
PsTRXo1	-----TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'	300

> PsTRXo1 Fragmento amplificado 300 pares de bases

TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAGTTCAATAAAAATTCCTAGCAAAAATCAAGATGACTCGTTGCACGCA
TCCTTATTTACTGCTGTTGGTGGCACTTGCAGGTTCACTTCTCTATAGTTGGGAGCTCAGTAA
GAAGTATCCTAATGGGCAACTTATAAGATTGACATTGATCAGGAAGCAATTCAGGACACATTGAGCA
GTTGACAGATTACACTGTTGCCAACACTTCTTCAAATGGGAAAAGACCGATGAATATAGTT
GCTGAGATGTTGCCGATTGAATC

Oligonucleótidos:
Set2-PsTrxo1-fd: 5'-TCCTTGTAATTCTGCGGAAGAG-3'
Set2-PsTrxo1-rv: 5'-GATTCAATCGCGCAACACTG-3'
Reverso complementario: 5'-CAGATGTTGCGCGATTGAATC-3'

Fragmento: 300 pb

Figura 81. Alineamiento en CLUSTAL para comprobar la secuencia de la construcción doble *PsNTRB-TRXo1*. (A) Fragmento correspondiente al gen *PsNTRB* (310 pb). Se especifican los oligonucleótidos utilizados para amplificar mediante PCR a partir de ADNc de guisante, el fragmento que se utilizó para silenciar al gen *NTRB*. (B) Alineamiento del fragmento correspondiente a *PsTRXo1* (300 pb).

Una vez comprobadas las construcciones, se procedió a la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, para su posterior utilización en la agroinfiltración de *P. sativum* (Fig. 82).

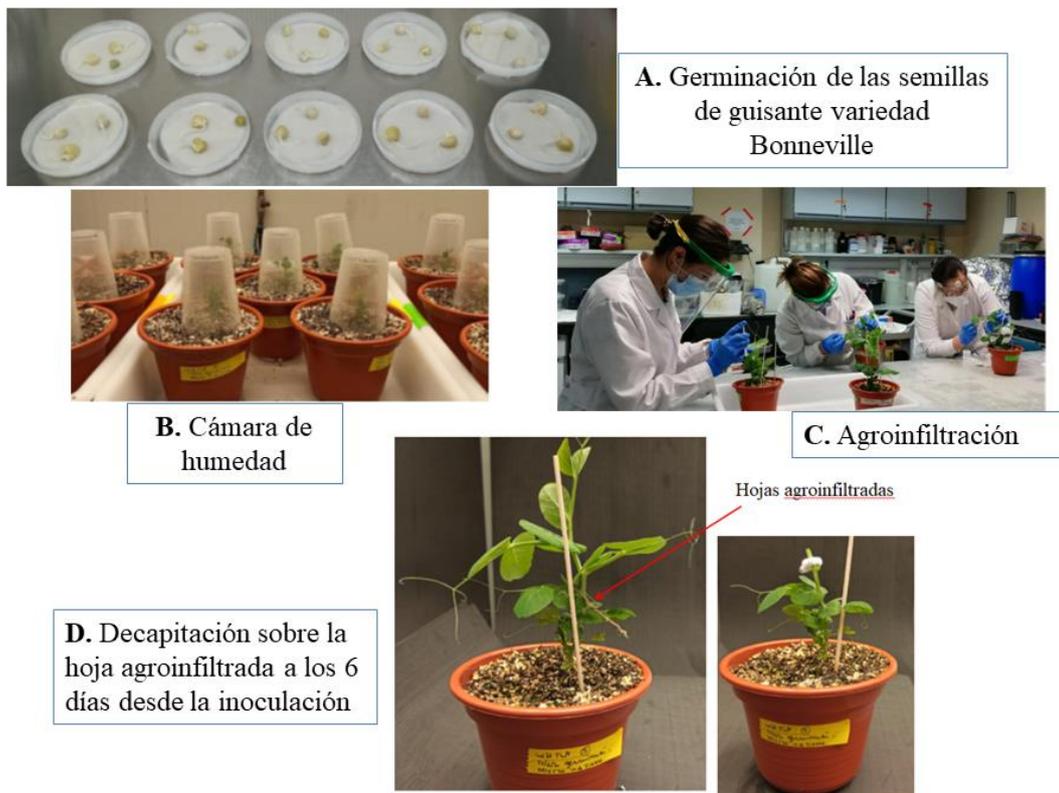


Figura 82. Agroinfiltración de plantas de guisante variedad Bonneville. Una vez obtenidas las construcciones para estudiar mediante silenciamiento génico transitorio inducido por virus los genes del sistema redox *PsTRXo1/PsNTRB*, se inocularon plantas de guisante de 12 días de edad.

Se agroinfiltraron plantas de 12 días de edad con la construcción doble pCAPE1:pCAPE2-*PsNTRB-PsTRXo1*; paralelamente, se agroinfiltró otro conjunto de plantas con el vector pCAPE1, utilizado como control de virulencia (control negativo), y otras con pCAPE1: pCAPE-*PDS* (control positivo), como se detalla en Materiales y Métodos (secciones 1.3.3 y 2.2.4). A los 6 días desde la inoculación, se decapitaron las plantas por encima de la hoja donde se habían agroinfiltrado y se esperó a obtener la decoloración en las plantas control pCAPE1:pCAPE2-*PDS* (Fig. 83).



Figura 83. Control positivo con la construcción pCAPE2-PDS indicativo del inicio de la virulencia de la cepa. Este control se utilizó como referencia para poder iniciar los estudios de fenotipado en las plantas de interés con la construcción doble pCAPE2-*PsNTRB*-*PsTRXo1*.

Una vez que se evidenció el comienzo de la virulencia, se inició la caracterización de las plantas con la construcción para silenciar ambos genes (*PsNTRB* y *PsTRXo1*), comparándose a su vez, con el control negativo, agroinfiltrado únicamente con el vector de la virulencia pCAPE1, sin hallarse un fenotipo evidente, requisito indispensable en esta técnica para poder seleccionar el material vegetal a estudiar. Se repitió la experiencia cuatro veces, obteniéndose los mismos resultados. Aún así, se analizó el material foliar con distintas estrategias de recolección para comprobar si se había inducido el silenciamiento génico aunque no se obtuviese un fenotipo evidente. Los resultados fueron incongruentes y difíciles de considerar teniendo en cuenta que esta técnica puede generar en una misma planta quimeras e incluso en una misma hoja, diferencias de expresión, inhabilitando el poder llevar a cabo ensayos fisiológicos o bioquímicos replicativos.

4.2. *Attrxo1/ntrb* por cruzamiento

Con el objetivo de obtener un doble mutante *Attrxo1/ntrb*, se cruzaron los mutantes simples de inserción de ADN-T en homocigosis KO1 *Attrxo1* (línea SALK_143294C; semillas N659590) y *Atntrb* (línea SALK_027935; semillas N654570) de forma manual. Para ello, se crecieron plantas de ambos genotipos hasta su fase adulta reproductiva que se utilizaron tanto de donadoras como de receptoras de polen (generación parental; F₀), a fin de tener más posibilidades de éxito. El inserto de ADN-T contiene una secuencia de ADN conocida que permite utilizar oligonucleótidos diseñados a partir del borde izquierdo (BP; *T-DNA Border Primer*; en nuestro caso, fue utilizado LBb1.3, como se detalla en la Tabla 3 en Materiales y Métodos). Las semillas resultantes del cruzamiento se emplearon para obtener la primera generación filial (F₁), generación que será heterocigota para ambas mutaciones y que fue genotipada (10 semillas de 7 plantas) para comprobar la presencia de la inserción de ADN-T en ambos genes (Fig. 84, fragmento en torno a 653 pb en geles A y B para *TRXo1* y *NTRB*, respectivamente), así como la heterocigosis por la presencia de un fragmento de ambos genes *TRXo1* y *NTRB* (fragmentos de 1.113 y 1.052 pb en geles C y D, respectivamente, como se describe en la Sección 1.2.5. de Materiales y Métodos). Se usó un control positivo y otro negativo en cada caso utilizando 2 plantas WT (líneas WT-10 y WT-11), 2 plantas KO1 *Attrxo1* (líneas 19 y 20) y 2 plantas KO *Atntrb* (líneas 46 y 47). Se seleccionaron 2 plantas (n° 4 y 5 en rojo en Fig. 84) heterocigóticas que se crecieron y se dejaron autofecundar para obtener la F₂.

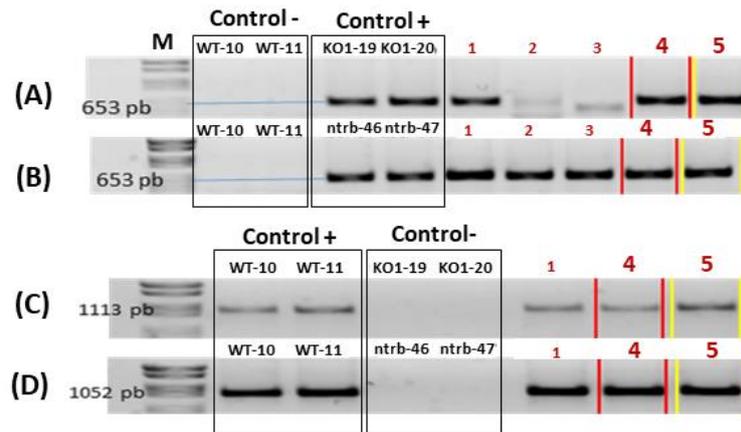


Figura 84. Genotipado por PCR de la generación F₁ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*. Amplificación del inserto de ADN-T de la mutación en *AtTRXo1* y *AtNTRB* (A y B, respectivamente) y de los fragmentos de los genes *AtTRXo1* y *AtNTRB* (C y D) usando los oligonucleótidos correspondientes en cada caso, a partir de ADN genómico obtenido de hojas de roseta de plantas Col-0 (WT) y mutantes de *A. thaliana trxo1* (KO1) y *ntrb*. Se señalan las pares de bases del fragmento de interés amplificado en cada caso en el marcador (M) cargado en cada gel. En el caso de las bandas para ambas líneas mutantes, los fragmentos se encuentran en torno a 653 pb. Se utilizaron como controles positivos de reacción para la inserción de ADN-T, mutantes simples en homocigosis provenientes de los mismos lotes de semillas que se utilizaron como F₀ para los cruces, siendo KO1 el mutante *trxo1*.

Se utilizaron 20 semillas de cada planta (4 y 5) con el fin de obtener material vegetal para un nuevo genotipado, para detectar tanto para la presencia de ADN-T como para la ausencia o presencia aún de los genes silvestres (Fig. 85).

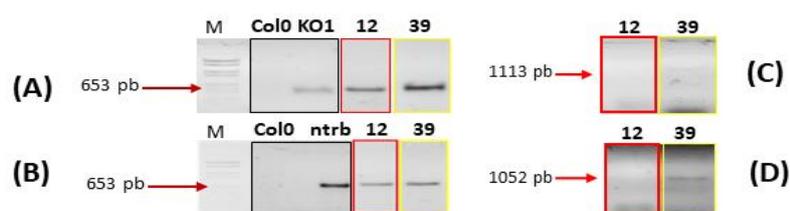


Figura 85. Genotipado por PCR de la generación F₂ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*. Amplificación del inserto de ADN-T de la mutación en *AtTRXo1* y *AtNTRB* (A y B, respectivamente) y de los fragmentos de los genes *AtTRXo1* y *AtNTRB* (C y D) usando los oligonucleótidos correspondientes, a partir de ADN genómico obtenido de hojas de roseta de plantas Col-0 (WT) y mutantes de *A. thaliana trxo1* (KO1) y *ntrb*. Se señalan las pares de bases de los fragmentos de interés amplificados en cada caso en el marcador (M) cargado en cada gel. Las líneas 12 y 39 presentan en ambos casos las bandas en torno a los 653 pb con los oligonucleótidos para amplificar el segmento que indica la presencia del ADN-T, pero puede observarse a su vez, que se encuentran en heterocigosis al presentar además, las bandas correspondientes a la presencia del alelo WT. Al encontrarse las líneas aún segregando, fue necesario repetir el proceso más generaciones.

En esta fase, se seleccionaron las plantas 12 y 39 como mutantes en ambos genes aún en heterocigosis (Fig. 86).

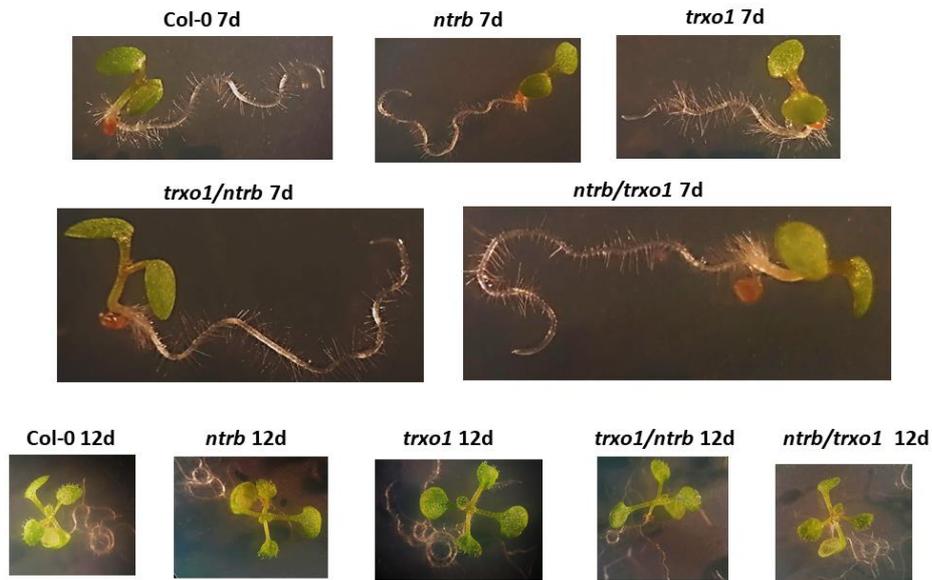


Figura 86. Plantas de la generación F₂ crecidas en cultivo *in vitro*. Imágenes captadas con lupa de aumentos para comprobar si se observaba algún fenotipo visible en plantas de 7 y 12 días, respectivamente, sin hallarse diferencias significativas.

Posteriormente, se crecieron 20 plantas de las previamente seleccionadas, obteniéndose la F₃. Se genotiparon dichas plantas y se seleccionaron dos: plantas 11 y 39 (Fig. 87; generación F₄). La planta 39 proveniente de una estirpe que tuvo como planta donadora de polen la línea mutante *Atntrb*, presentó ambas mutaciones en homocigosis. Se comprobó que la planta 11 (planta donadora de polen la línea mutante KO1 *Attrxo1*) era homocigótica para la mutación *Attrxo1* pero aún no lo era para *Atntrb*, que sigue en segregación (heterocigótica). Actualmente, se encuentra el proceso de obtención de las dos líneas dobles mutantes *Attrxo1/ntrb* seleccionadas, en el rastreo de la homocigosis para la pérdida de función de ambos genes.

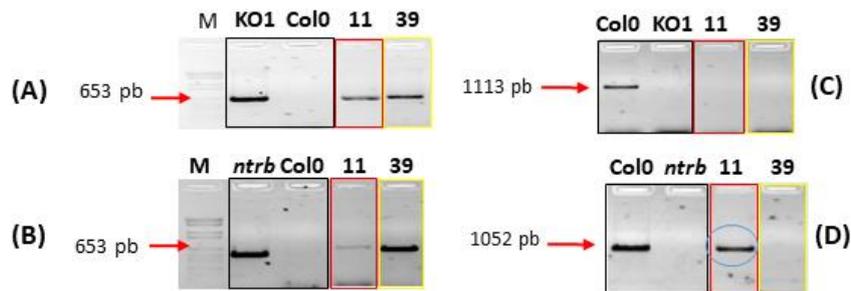


Figura 87. Genotipado por PCR de la generación F₃ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*. Amplificación del inserto de ADN-T de la mutación en *AtTRXo1* y *AtNTRB* (A y B, respectivamente) y de los fragmentos de los genes *AtTRXo1* y *AtNTRB* (C y D) usando los oligonucleótidos especificados en cada gel, a partir de ADN genómico obtenido de hojas de roseta de plantas Col-0 (WT) y mutantes de *A. thaliana trxo1* (KO1) y *ntrb*. En esta generación, puede observarse que las líneas 11 y 39 presentan el fragmento correspondiente a la presencia de la mutación en ambos genes. Al corroborar si aún están las líneas en segregación por la presencia también de la banda WT del alelo no interrumpido, se observó en la línea 11 dicha amplificación para el gen *AtNTRB* (en heterocigosis) pero no en la línea 39.

El número de generaciones necesarias para obtener un doble mutante homocigótico KO por cruzamiento en *Arabidopsis thaliana* puede variar dependiendo de la genética de las líneas parentales y del tipo de mutación. Una vez que se obtenga la generación en homocigosis para la mutación en ambos genes, se comprobará por secuenciación la posición de la inserción del ADN-T y se analizará por qPCR la expresión génica relativa de los genes *AtTRXo1* y *AtNTRB* para corroborar que dichas mutaciones *knockearon* a ambos genes. Si se logra obtener la pérdida de función, se caracterizarán las líneas mutantes como paso previo a su empleo en los estudios que nos permitan un avance en determinar las funciones del sistema redox NADPH/NTRB/TRXo1 en plantas ante situaciones de estrés abiótico y en procesos de desarrollo.

DISCUSIÓN

1. ATG4 como diana de TRXo1 y su implicación en autofagia inducida por estrés oxidativo

La regulación de la autofagia ha adquirido un interés notable en investigación en plantas debido a que el establecimiento de este proceso provoca una respuesta favorable a diferentes condiciones de estrés, incluido el estrés oxidativo, el estrés del retículo endoplásmico, la privación de nutrientes, el tratamiento con cadmio, la sequía, la salinidad, la maduración de frutos y la respuesta a patógenos (Liu y *col.*, 2009; Pérez-Pérez y *col.*, 2010; Calero-Muñoz y *col.*, 2019; López-Vidal y *col.*, 2020; Su y *col.*, 2020; Aroca y *col.*, 2021a). En el presente trabajo de Tesis Doctoral, el hecho de la existencia de una mayor expresión del gen *ATG4* y un mayor contenido proteico de los marcadores de autofagia *ATG4*, *ATG8* y proteínas *ATG8-PE* lipidadas, así como una alta actividad enzimática de la proteína *ATG4*, apoyan la participación del proceso de autofagia en la respuesta de las células de tabaco BY-2 sometidas a un tratamiento oxidativo por H_2O_2 cuando se sobreexpresa *PsTRXo1* (células OEX). En esta situación oxidativa, estos cambios en las células sobreexpresantes pueden ser importantes como efecto de preactivación (*priming*), probablemente influyendo en la respuesta a una condición de estrés oxidativo posterior. La existencia de un proceso autofágico bajo estas condiciones se sustenta también por la acumulación observada de estructuras similares a autolisosomas y la inmunolocalización de *ATG8* en estas células OEX. Curiosamente, este proceso se correlaciona con una mayor viabilidad demostrada en respuesta a la sobreexpresión de *PsTRXo1* en estas células TBY-2. Estudios recientes en *A. thaliana*, han demostrado que las modificaciones postraduccionales de algunas proteínas *ATG* son capaces de controlar su actividad, como la *S*-nitrosilación, la fosforilación de *ATG4b* y *ATG1* (Pengo y *col.*, 2017; Shivaraj y *col.*, 2020) o la persulfuración de *ATG4* y *ATG18a* (Laureano-Marín y *col.*, 2020; Aroca y *col.*, 2021a). En nuestro trabajo hemos explorado el papel que puede desempeñar la proteína *PsTRXo1* en el proceso de autofagia mediante la regulación redox de la proteína *ATG4* involucrada. En las siguientes secciones, discutiremos los principales hallazgos que evidencian el papel de la propia autofagia en respuesta al estrés oxidativo y su participación en la viabilidad celular, así como el de la regulación redox, incluido el sistema TRX, como moduladora de la actividad de las proteínas diana que son componentes clave del proceso de autofagia. La evidencia discutida ayudará a respaldar

nuestros hallazgos sobre la relación entre la autofagia, la viabilidad celular y la señalización redox a través de TRX en células vegetales.

1.1. Autofagia, estrés oxidativo y TRX

En sistemas animales, la autofagia se activa ligeramente a nivel basal, por ejemplo, para mantener la homeostasis celular humana normal, así como en varias condiciones patológicas en las que se induce este proceso degradativo y de reciclaje celular (Scherz-Shouval y Elazar, 2011). En las plantas, también existe un nivel basal de mantenimiento en condiciones favorables para eliminar las estructuras o componentes celulares dañados que se generan continuamente (Bassham y *col.*, 2006; Yano y *col.*, 2007). Es en condiciones de estrés cuando los fenotipos de autofagia son evidentes y el crecimiento puede verse seriamente comprometido (Xiong y *col.*, 2005). Por lo tanto, estudiar la autofagia en estas condiciones estresantes puede proporcionar algunas pistas sobre la relevancia del proceso en la respuesta de la planta a situaciones adversas. Diversas condiciones de estrés desencadenan la acumulación de ROS, que pueden inducir eventos de señalización involucrados en la respuesta de la planta, y se ha descrito un papel clave para la autofagia en la eliminación por ejemplo de proteínas oxidadas (Xiong y *col.*, 2007). En este sentido, los mutantes de *A. thaliana* en proteínas autofágicas *atg2* y *atg7* contenían más proteínas oxidadas y eran hipersensibles tanto a una condición salina como al estrés osmótico (Luo y *col.*, 2017). Otros ejemplos del vínculo entre ROS y autofagia son la inducción descrita de este proceso por estrés salino y falta de nutrientes, que pueden ser bloqueados por inhibidores de la enzima NADPH oxidasa generadora de O_2^- (Liu y *col.*, 2009). Además, la señalización por ROS dependiente de la enzima mitocondrial AOX es un evento clave que desencadena la autofagia, como lo demuestran los experimentos en los que la eliminación de H_2O_2 en mutantes *aox19* indujo la acumulación de autofagosomas bajo estrés por sequía (Zhu y *col.*, 2018a).

El análisis de los marcadores de autofagia en nuestros ensayos con las células TBY-2 en respuesta a H_2O_2 nos reveló que la expresión del gen *ATG4* se regulaba negativamente en las células control no sobreexpresantes, mientras que se mantuvo sin cambios en las células OEX tratadas, lo que apunta al posible establecimiento del proceso de autofagia en estas últimas como resultado de la sobreexpresión. En este

contexto, existe escasa información sobre la regulación de la expresión del gen *ATG4* por componentes redox a través de los factores de transcripción implicados. Por lo tanto, la razón del efecto observado de la sobreexpresión de *TRXo1* sobre el aumento de la expresión del gen *ATG4* no está clara, aunque no se puede descartar la modulación redox. Además, en nuestro estudio, el contenido de proteína ATG4 alto y mantenido fue paralelo a una actividad ATG4 alta también mantenida en las células OEX tratadas con H₂O₂, lo que indica que en un principio la actividad era suficiente para mantener la autofagia. En este sentido, se ha descrito que en condiciones patológicas, el paso de procesamiento de ATG4 es muy rápido y solo una pequeña cantidad de ATG4B es suficiente para mantener la actividad en células de levadura y mamíferos (Scherz-Shouval y col., 2007). Por otro lado, un aumento en la abundancia de los niveles de proteína ATG8 o ATG8-PE, como el que encontramos en nuestras células sobreexpresantes, puede no reflejar un mayor flujo autofágico debido a que el bloqueo de la formación de autofagosomas también puede resultar en la acumulación de estos marcadores (Klionsky y col., 2016), por lo que son necesarios otros ensayos para estimar este flujo y así ratificar la ocurrencia del proceso autofágico. En relación con esto, y con el fin de observar más detalladamente la existencia de este proceso en nuestras células, analizamos la acumulación de estructuras similares a autolisosomas y autofagosomas usando LysoTracker y un anticuerpo anti-ATG8 como marcadores para la visualización de la autofagia (Liu y col., 2005; Couso y col., 2018). En nuestro estudio, la acumulación de vesículas líticas se visualizó 24 horas después del tratamiento oxidativo en las células OEX tratadas con el inhibidor E-64d, efecto que se revirtió en presencia de 3-MA, un inhibidor que se ha demostrado que bloquea la autofagia inducida por inanición en las células BY-2 evitando así la formación del autofagosoma (Takatsuka y col., 2004; 2011). La adición de 3-MA inhibió claramente el número de señales puntiformes, sugiriendo la presencia de estructuras autofágicas en estas células OEX y no en las células no sobreexpresantes, que no mostraron tal acumulación en ninguno de los momentos analizados. Estos resultados corroboran el efecto temprano ya descrito del inhibidor E-64d en las células del tabaco, que se observó que acumulaban autolisosomas fuera de la vacuola central (Bassham, 2007). De hecho, el modo de acción de ambos inhibidores es diferente: se ha descrito que el 3-MA es un inhibidor selectivo de las primeras etapas de la autofagia al inhibir la actividad de la quinasa fosfatidil inositol-3 (PI3K), que es necesaria para la nucleación y, por tanto, la formación del autofagosoma, mientras que E-64d inhibe la autofagia en la etapa

posterior principalmente por inhibición de las proteasas de Cys similares a la papaína que bloquean la vía endocítica (Takatsuka *y col.*, 2004; Goto-Yamada *y col.*, 2019). De esta manera, la presencia de 3-MA en combinación con E-64d provoca una menor formación de autofagosomas a los que el E-64d pueda inhibir, y el resultado es una falta de efecto del E-64d. Paralelamente, nuestro estudio de inmunolocalización también sostuvo la existencia de estructuras autofágicas debido al aumento observado en el contenido de ATG8 en las células OEX tratadas con H₂O₂ en presencia del inhibidor E-64d. Entre las proteínas ATG, se ha considerado a la ATG8 como un marcador ideal para determinar la actividad de la autofagia debido a que se incorpora a las membranas de los autofagosomas antes de dirigirse al compartimento lítico para degradarse junto con la carga (Klionsky *y col.*, 2016). Todos los resultados mencionados anteriormente apuntan a una relación interesante entre el estrés oxidativo y la autofagia ligada a la sobreexpresión de *TRXo1*. Además, esta situación va acompañada de un efecto positivo sobre la supervivencia celular, como se comenta en la siguiente sección.

1.2. Autofagia, supervivencia celular y TRX

El uso de inhibidores del proceso autofágico nos ha permitido evidenciar el vínculo entre la autofagia, el estrés oxidativo y la viabilidad celular cuando se sobreexpresa *PsTRXo1*. En nuestras células TBY-2 tratadas con H₂O₂, la autofagia no fue evidente en las primeras 2 horas, al menos considerando la respuesta al inhibidor E-64d, que no afectó significativamente la viabilidad de ninguna de las líneas. Sin embargo, en una situación oxidativa lo suficientemente grave como para provocar la muerte de la mayoría de las células de la línea control 24 horas después del tratamiento con H₂O₂ (solo alrededor del 20% de las células sobrevivieron), sobrevivió alrededor del 65% de la línea OEX1. El hecho de que el inhibidor de la autofagia E-64d indujera una disminución en la viabilidad de la línea OEX1 hasta en un 33% en este momento (24h), en paralelo al mantenimiento de la expresión del gen *ATG4* presentado por estas células, puede sustentar la existencia de un proceso autofágico, con un papel vital muy interesante en la supervivencia celular. Este efecto aún se observó 48 horas después del tratamiento oxidativo en las células OEX cuando la viabilidad se mantuvo al 54% y disminuyó al 33% en presencia del inhibidor, siendo nuevamente revertidas las disminuciones por 3-MA. Además, en un tiempo más corto después del tratamiento

oxidativo, a las 14 horas, cuando la línea control presentó mayor viabilidad que a las 24 horas, el inhibidor de la autofagia E-64d nuevamente no afectó la viabilidad celular, sugiriendo que, en ese momento la autofagia basal debía ser mínima en las células que no expresan en exceso *PsTRXo1*, una situación paralela a la inducción previamente descrita de un proceso de muerte celular programada en estas mismas células (Ortiz-Espín y col., 2015). Relacionado con el efecto del 3-MA sobre la viabilidad y similar al encontrado en nuestras células, Takatsuka y col. (2004) demostraron que inhibía la autofagia en las células TBY-2 aunque no provocaba la muerte celular durante al menos 2 días a concentraciones de 5 mM o 10 mM, por lo que la muerte celular no pudo explicar el efecto del 3-MA en autofagia. Además, confirmaron que la presencia tanto de E-64c como de 3-MA en los medios de cultivo no afectó a la muerte celular como también hemos encontrado en nuestras células. Además, Voitsekhovskaja y col. (2014), utilizando células TBY-2, observaron una falta de efecto del 3-MA sobre la viabilidad, aunque fue capaz de revertir el efecto de la concanamicina en la degradación de peroxisomas por autofagia. Estos autores describieron el efecto del 3-MA sobre la viabilidad en períodos más prolongados después de inducir la autofagia (después de 7 días), considerando que en los primeros 6 días, o la degradación de peroxisomas inducida por inanición se bloqueó de forma incompleta, o bien que la ausencia de efecto sobre la viabilidad se debió a otro mecanismo diferente de autofagia. Recientemente, se confirmó la contribución de la autofagia a la supervivencia celular en plantas de *Aponogeton madagascariensis* (L.), donde se observó una disminución en la tasa de muerte celular cuando se mejoró la autofagia con rampamicina, mientras que la inhibición de la formación de autofagosomas o el bloqueo del proceso de degradación de la carga, tuvo el efecto contrario (Dauphinee y col., 2019). En este escenario, la autofagia mediada por TRX podría actuar como un mecanismo pro-supervivencia en nuestras células, como se ha descrito en situaciones donde el reciclaje de componentes celulares es necesario, no solo para el desarrollo sino principalmente en situaciones de estrés (Galluzzi y col., 2008).

La regulación de ROS junto con la autofagia, pueden actuar como mecanismos cooperativos en la respuesta de las plantas al estrés ambiental para permitir la supervivencia de las plantas. Entre los actores de la regulación de ROS, la TRX parece ser una proteína clave en la regulación del proceso de autofagia, extendiendo su papel hacia la modulación de la supervivencia celular similar a la descrita en animales. Las

vías de señalización para la activación del proceso de autofagia y cómo su función cambia entre la supervivencia celular y la muerte celular, apenas comienzan a dilucidarse, con varias preguntas aún por resolver. Se ha identificado la relación entre la autofagia y la supervivencia celular y la implicación de la desregulación de la señalización redox en sistemas animales. Por ejemplo, el aumento de la autofagia mediante la mejora de la expresión de *ATG8a* en las neuronas de *Drosophila* aumentó la esperanza de vida (Simonsen y col., 2008), y la sobreexpresión ubicua de peroxiredoxina *dPrx5* en moscas sometidas a estrés oxidativo también extendió la supervivencia (Radyuk y col., 2009), mientras que la caída combinada de *dPrx5* y *dPrx3* disminuyó los niveles de tiol proteico y el estado redox del glutatión (GSH), que provoca eventos proapoptóticos y acorta la vida útil (Radyuk y col., 2010). En las plantas, donde el proceso ha sido menos estudiado, se ha descrito una asociación de autofagia y longevidad cuando los mutantes de autofagia muestran un fenotipo de senescencia de la hoja temprana (Phillips y col., 2008). Sin embargo, el papel exacto de la autofagia como pro-muerte o pro-supervivencia no está claro (Doherty y Baehrecke, 2018). Relacionado con esto, en nuestro sistema, la sobreexpresión de *PsTRXo1* en células TBY-2 sometidas a tratamiento con H_2O_2 permitió el mantenimiento del peso fresco de los cultivos en paralelo a una alta viabilidad celular y la aparición de autofagia. En estas células tratadas con H_2O_2 , observamos previamente un aumento de la actividad catalasa y una disminución del contenido de H_2O_2 y NO en paralelo al mantenimiento del estado redox de GSH, así como al nivel de PrxIIF. Todos estos cambios contribuyeron a un retraso observado en la muerte celular, en comparación con las células de control que no sobreexpresan *PsTRXo1* (Ortiz-Espín y col., 2015). También es interesante señalar la participación adicional de *TRXo1* en la progresión del ciclo celular de las células TBY-2, posiblemente a través de su vínculo con el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y GSH, descrito por nuestro grupo. De hecho, las células sobreexpresantes *Pstrxo1* presentaron una mayor tasa de proliferación celular que las células no transformadas, coincidiendo con la regulación positiva de la proteína diana PCNA y un efecto sobre el contenido y la localización celular de GSH (Calderón y col., 2017a). La interacción descrita entre PCNA y *TRXo1* en cierta medida podría estar contribuyendo a una mayor viabilidad en estas células. Ahora, el presente trabajo de Tesis Doctoral describe la participación de la autofagia en la respuesta al tratamiento oxidativo en las células *Pstrxo1* sobreexpresantes, especialmente en su mayor viabilidad y mantenimiento del peso fresco indicativo de la proliferación celular. Curiosamente, de

forma similar a lo descrito en nuestro trabajo, se ha descrito una relación entre TRX, autofagia y supervivencia celular en células epiteliales del cristalino humano sometidas a tratamiento oxidativo con H₂O₂. En esta situación, la sobreexpresión de la proteína de unión a tiorredoxina 2 (TBP-2), que regula negativamente la función antioxidante de la tiorredoxina, promovió la lesión celular y la autofagia, lo que empeoró la viabilidad celular (Zhou y *col.*, 2016), y la TRX desempeñó un papel clave como mecanismo de pro-supervivencia. De hecho, el papel de TRX puede ser coordinar la respuesta al estrés oxidativo, probablemente a través de la regulación redox de componentes clave del proceso de autofagia, un aspecto que se analiza en la siguiente sección.

1.3. Regulación redox dependiente de TRX de proteínas diana de autofagia

HsATG4B es una proteína diana de PsTRX α 1, como hemos demostrado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación y de interacción *Dot blot* utilizando proteínas recombinantes, existiendo una regulación redox de la actividad de esta ATG4. De hecho, PsTRX α 1, pero no su versión mutada, junto con NADPH y NTRA, eran capaces de recuperar la actividad de procesamiento perdida por oxidación de ATG4 sobre su sustrato quimérico de ATG8, como se muestra en los ensayos de actividad. La proteína ATG8 fue procesada no solo por HsATG4B recombinante (descrito como la isoforma de mayor procesamiento en animales) (Li y Vierstra, 2012), sino también por nuestros extractos de células TBY-2, que contenían la proteína ATG4 endógena. Estos resultados confirman la regulación redox de la actividad de ATG4 por el sistema TRX de la planta como resultado de la reducción de un enlace disulfuro regulador. Curiosamente, la participación de TRX en la autofagia, particularmente en la regulación de ATG4, solo se ha demostrado en *Chlamydomonas* y *Sacharomyces* (Pérez-Pérez y *col.*, 2014; 2016), donde TRX h y Trx1, respectivamente, redujeron de manera eficiente un enlace disulfuro entre dos Cys con bajo potencial redox, corroborando la regulación redox de ATG4 por TRX. La autofagia debe ser regulada con precisión por el entorno celular y la modificación postraduccional de las proteínas diana está emergiendo como un mecanismo clave de control. La regulación redox del proceso de autofagia se ha descrito en sistemas de animales, levaduras y plantas como se comentó anteriormente, pero la información sobre las dianas específicas y los efectos de esta regulación es escasa. Entre

las ATG, el interés creciente se centra en la regulación de ATG4 en sistemas animales debido a su implicación en múltiples enfermedades patológicas, y en consecuencia, recientemente se ha propuesto como una posible diana anticancerígena (Hu y col., 2023). La ATG4 es la única proteasa entre las proteínas que regulan la autofagia, que ejerce su función a través de un primer paso de procesamiento muy rápido y eficiente necesitándose solo una pequeña cantidad de ATG4 (Scherz-Shouval y col., 2007), y un segundo paso de desconjugación en su sustrato ATG8. Esta última actividad se utiliza para reciclar ATG8 necesario para la siguiente ronda de conjugación, pero también es necesaria para promover el paso de elongación del autofagosoma y su fusión a lisosomas como se observa en levaduras (Yu y col., 2012). En nuestros ensayos, las células OEX *Psttrxol* presentaron un mayor contenido de proteína ATG4 que las células control después del tratamiento con H₂O₂, pero este aumento no se acompañó por un incremento similar en la actividad de procesamiento de la proteína. Esta discrepancia puede explicarse por una posible alta actividad de deslipidación de la proteína (que no ha sido medida en nuestro trabajo) o por la existencia de una modificación postraduccional reguladora como la reducción/oxidación que afecte la actividad de procesamiento, como hemos demostrado. En las células animales, durante la inanición, la autofagia se regula mediante la producción de superóxido, mientras que la actividad de ATG4a y ATG4b en *A. thaliana* se inhibe de forma reversible por oxidación (Woo y col., 2014). En levaduras, las ROS regulan directamente la proteína ATG4, activando así la autofagia e inhibiendo su actividad de procesamiento (Pérez-Pérez y col., 2014), lo que implica que la regulación de residuos críticos de Cys en ATG4 puede desempeñar un papel importante en su funcionalidad. Recientemente se ha descrito en *Drosophila* que la oxidación de un residuo clave de cisteína regulada de forma redox en Atg4a aumentó la autofagia y, de manera interesante, extendió la vida útil de las moscas (Cochemé y col., 2019), aunque los autores describieron la regulación redox solo para la actividad de deslipidación de la proteína ATG4, propuesta entonces como una diana potencial a favor de la longevidad. Además, se ha descrito recientemente que la persulfuración de ATG4a en *A. thaliana* regula la actividad proteolítica de esta proteasa (Laureano-Marín y col., 2020), lo que indica una regulación negativa de la autofagia por sulfuro. Por lo tanto, un vínculo entre ROS y la inducción de autofagia puede ser ATG4, aunque no parece ser la única proteína en el proceso que se someta a la regulación oxidativa, ya que la diana de la rapamicina (mTOR) implicada en desarrollo e inhibidora de autofagia, se regula de forma redox por Trx1 en el corazón

(Oka y col., 2017). También se ha demostrado recientemente que ATG3 y ATG7 están reguladas de forma redox en células de riñón embrionario humano (Frudd y col., 2018). Interesantemente y de forma similar a lo encontrado en nuestro trabajo, estos últimos autores describieron que se requiere un sistema reductor celular activo para mantener la autofagia funcional, en este caso, a través de la regulación redox de ATG3 y ATG7, manteniendo los tioles activos en un nivel bajo para poder interactuar con el sustrato de ATG4. En esta escena, la inhibición de TRX por la sobreexpresión de su proteína inhibidora TXNIP redujo la lipidación de LC3 al mejorar la oxidación catalítica inhibitoria del tiol de ATG3 y ATG7, lo que nuevamente apunta al papel clave del entorno redox y de TRX en la regulación de la autofagia, tal y como hemos evidenciado en este trabajo de Tesis Doctoral.

Como **conclusión** de esta parte, comentar que el hecho de que la transformación con *PsTRXo1* proteja a las células TBY-2 de un tratamiento oxidativo por H_2O_2 exógeno, mostrando las células OEX una mayor viabilidad que las células no sobreexpresantes, parece deberse en parte al establecimiento de una autofagia con actividad protectora. El aumento de las proteínas ATG4 y ATG8, así como la existencia de un flujo de autofagia revelado por las estructuras líticas autofágicas y la acumulación de ATG8 utilizando un inhibidor de la autofagia en células OEX tratadas con H_2O_2 , apuntan a un proceso de autofagia pro-supervivencia que ocurre como respuesta a la situación oxidativa. La alta actividad de ATG4 en las células OEX *Pstrxo1*, junto con la interacción *in vitro* demostrada entre las proteínas ATG4 y *TRXo1*, evidencian un posible papel de TRX en el control redox de la proteína ATG4. En este sentido, TRX puede ser un componente del proceso de autofagia que ocurre durante la respuesta de las células TBY-2 a una situación oxidativa, cuando probablemente colabora con otros sistemas de defensa en el aumento de la tasa de supervivencia celular de las células que la sobreexpresan.

Los resultados obtenidos en este trabajo han sido publicados en la revista *Antioxidants* en el año 2021 (De Brasi y col., 2021) y han supuesto el inicio de una nueva línea de investigación en nuestro grupo, enfocada hacia la profundización de los mecanismos involucrados en la regulación redox del proceso de autofagia en plantas en situaciones de estrés.

2. PYR1 como diana de TRXo1 y su implicación en señalización por ABA

Tras la demostración en nuestro grupo de investigación de la interacción de las proteínas PYR1 receptor de ABA y TRXo1 por diferentes técnicas *in vitro* e *in vivo* en el núcleo de plantas de guisante y *A. thaliana*, en esta Tesis Doctoral hemos avanzado en el mecanismo por el cual la TRXo1 regula el estado de óxido-reducción de PYR1 y las implicaciones que esto pueda tener en la percepción y señalización de la fitohormona ABA. Aunque el sistema TRX se describió en el cloroplasto y la mayoría de los trabajos sobre estas proteínas se han centrado en su papel en este orgánulo, en las últimas décadas la implicación de las TRXs se ha extendido hacia su función en la mitocondria, el citoplasma y en menor medida al núcleo (Buchanan y Balmer, 2005; Geigenberger y Fernie, 2014; Delorme-Hinoux y col., 2016). Específicamente en el núcleo, nuestro grupo describió previamente la presencia en él de TRXo1, tanto en plantas de guisante como en cultivos celulares de tabaco BY-2, junto con una localización mitocondrial (Martí y col., 2009; Calderón y col., 2017a), mientras que en plantas de *A. thaliana*, AtTRXo1 se había localizado solo en mitocondrias (Laloi y col., 2001). En este contexto, los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en colaboración con el del Dr. José León en el IBMCP de Valencia, sobre la interacción de las proteínas AtTRXo1 y AtPYR1 por técnicas de complementación por bifluorescencia, también mostraron que esta interacción proteína-proteína se producía en el núcleo, lo que corroboró la localización dual de este tipo de TRXo1 en plantas de *A. thaliana*. En esta Tesis Doctoral, nuestro estudio en mitocondrias aisladas y fracciones enriquecidas nucleares de hojas de mutantes OEX *Attrxo1* ha corroborado de nuevo la presencia de TRXo1 en ambos compartimentos celulares, siendo la isoforma mitocondrial más corta (alrededor de 13,5 kDa), como se describió previamente (Laloi y col., 2001). Sin embargo, la forma nuclear presenta una mayor masa molecular (alrededor de 25 kDa), correspondiendo a la forma madura de la proteína (incluyendo el péptido señal mitocondrial que no se procesa), aunque como se ha comentado, esta forma no se había localizado previamente de forma específica en el núcleo. Comentar que en relación con la función de TRXo1 en núcleo, los datos son muy escasos. Hace unos años se identificó en nuestro laboratorio a la proteína PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) como una nueva diana de TRXo1 (Calderón y col., 2017a), extendiendo la función de esta TRX hacia la regulación de la replicación del ADN y la

proliferación celular. Aparte de estas evidencias, se ha demostrado la presencia de otros sistemas redox en el núcleo como la 1-Cys PRX y la NTRA (Pulido y *col.*, 2009; Marchal y *col.*, 2014), junto con la TRX h y la NTR en células de aleurona y escultento de trigo, en una situación de estrés oxidativo como la que se asocia a la germinación, translocándose desde el citoplasma al núcleo (Serrato y *col.*, 2001; Serrato y Cejudo, 2003), por lo que el sistema completo redox puede ejercer su función en este último orgánulo. Así mismo, se ha descrito a la TRX $h5$ localizada tanto en el citoplasma como en el núcleo en *A. thaliana*, en plantas sometidas a estrés oxidativo moderado en concordancia con el movimiento de su sustrato nucleo-citoplasmático NPR1 al que regula en su estado de oligomerización (Tada y *col.*, 2008). En este escenario y como hemos comentado, apenas se conoce el alcance de la función de la TRX $o1$ en el núcleo, por lo que los resultados previos a esta Tesis Doctoral comprobando la interacción con PYR1 el receptor de ABA, así como los obtenidos en la presente Tesis sobre el efecto que esta interacción tiene en la actividad de este sensor y su estado de oligomerización, suponen un importante avance en el estudio de la vía de señalización de ABA y el papel de la TRX en el núcleo, teniendo en cuenta que no se ha descrito la regulación redox de los receptores de esta fitohormona.

Se han descrito distintas evidencias que señalan al estado de oligomerización de los receptores de ABA como un evento clave para su funcionamiento. PYR1 junto con otros receptores como PYL1 y PYL2 se han identificado como proteínas diméricas, mientras que otros miembros de PYL son monoméricos. En estudios iniciales, se describió que en ausencia de ABA, PYR1 recombinante forma homodímeros en solución, aunque la cristalización de la proteína solo tuvo éxito en presencia de la hormona, formando una unidad asimétrica de una subunidad unida a ABA y otra libre de ABA (Nishimura y *col.*, 2009). Incluso para las formas diméricas de los receptores, estudios cristalográficos mostraron una estequiometría 1:1:1 de los complejos receptor-ABA-fosfatasa, lo que implicaba la existencia de un paso de disociación del dímero necesario para la activación y señalización del receptor (Nishimura y *col.*, 2009; Santiago y *col.*, 2009). Tras la transformación transitoria de plantas de *Nicotiana benthamiana* L., estos trabajos describieron que PYR1 formaba un dímero *in vivo*, tanto en presencia como en ausencia de ABA aplicado exógenamente. Además, a pesar de la baja actividad basal descrita de los receptores diméricos para provocar la inhibición de las fosfatasas PP2C en comparación con los monoméricos, un mutante cuádruple *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* mostró aspectos comprometidos de la señalización de ABA,

evidenciando la importancia de los receptores diméricos en los procesos relacionados con esta fitohormona (Park *y col.*, 2009). De hecho, más recientemente, un estudio en profundidad de las diferencias entre receptores monoméricos y diméricos ha demostrado que en las formas diméricas, el ABA actúa como un promotor alostérico para el cierre de la compuerta en su estructura necesario para su actividad, lo que conduce a la disociación de las dos subunidades permitiendo la interacción e inhibición de PP2Cs (Yang *y col.*, 2021). En nuestras plantas, el hecho de que PYR1 esté presente principalmente como dímero con menor abundancia en forma monomérica y oligoméricas, concuerda con la función clave propuesta de la dimerización en receptores como PYR1 y PYL1 para evitar interacciones basales con PP2Cs en ausencia de ABA (Dupeux *y col.*, 2011). Interesantemente, estos últimos autores realizaron los experimentos en presencia de reductores como β -mercaptoetanol, aspecto que puede implicar una posible modulación del estado tiol del receptor. De hecho, PYR1 de *A. thaliana* contiene tres residuos Cys en su secuencia de aminoácidos, aunque no se ha descrito su modulación redox. En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado mediante análisis *Western blot* que la proteína PYR1 recombinante está regulada de forma redox por H_2O_2 y reductores como DTT, pero como más interesante, también por el sistema NTR/TRXo1 *in vitro*, y además se han identificado los residuos de cisteína implicados en su oligomerización. Por otro lado, el estado oligomérico está regulado por oxidación-reducción y la actividad del receptor sobre la fosfatasa HAB1 en presencia de ABA también está modulada por la TRXo1, lo que implica un nuevo papel para la propia regulación redox y para reductores *in vivo* como el sistema TRX, incluyendo a la TRXo1, en la percepción de ABA mediada por PYR1. También es interesante el hecho de que la proteína PYR1 *in vivo* mostró un patrón oligomérico diferente cuando los extractos de hoja se sometieron a tratamientos reductores y oxidativos. En consecuencia, el hecho de que las plantas OEX *Attrxo1* presentaran menos oligómeros y más monómeros cuando crecían en presencia de ABA, nos indica y sustenta que la TRXo1 tiene un papel en el estado oligomérico del receptor, facilitando la conformación de una proteína PYR1 funcional con una posible consecuencia positiva en los procesos relacionados con ABA. Además, curiosamente, los dímeros eran predominantes en todos los genotipos (WT, KO y OEX), por lo que la reducción de formas oligoméricas a dímeros parece ser más importante que la de dímeros a monómeros, de acuerdo con lo descrito sobre la estabilización de los dímeros como un evento clave en la función *in vivo* del receptor. En relación con esto, se ha demostrado

que apo-PYL3 y (+)-ABA-bound-PYL3 se encuentran principalmente en conformación de dímero en solución y que la conformación de monómero es necesaria para el efecto inhibitor del receptor sobre HAB1 (Zhang y *col.*, 2012). Simulaciones computacionales más recientes han revelado que, dado que la superficie de dimerización también interviene en la unión con las fosfatasa PP2C, es imposible que éstas interactúen directamente con receptores diméricos, por lo que la interacción requiere que el dímero se disocie (Yang y *col.*, 2021). En cuanto al papel de TRX en el núcleo y en la estructura de los oligómeros, recientemente se ha descrito que la TRXh2 se transloca a este orgánulo bajo estrés por frío para interactuar con todas las formas inactivas oxidadas de CBFs (*C-repeat Binding Factors*) incluyendo oligómeros y monómeros. Los monómeros activos reducidos son entonces capaces de activar la expresión génica regulada por el frío (Lee y *col.*, 2021) confirmando tolerancia al mismo. Considerando la refinada estrategia de las plantas frente a olas de frío, es interesante extender a otras situaciones de estrés la idea descrita de que los oligómeros de CBFs presentes en condiciones control, podrían ser considerados como un repositorio que existe en las plantas para protegerlas de caídas bruscas de temperatura. En este sentido, aparte de la oxidación de Cys, otras modificaciones en este residuo como la *S*-nitrosilación, la *S*-glutathionilación o la *S*-persulfuración, o sobre otros residuos como nitración de residuos de tirosina en proteínas diana, están emergiendo como reguladores clave de la transducción de señales que permiten la respuesta celular bajo un desequilibrio de la homeostasis redox. De esta forma, proteínas reguladas implicadas en diferentes rutas metabólicas son capaces de “sentir” y transmitir el desequilibrio que se produce en respuesta a estreses bióticos y abióticos (Lozano-Juste y *col.*, 2011, 2023; Lázaro y *col.*, 2013; Castillo y *col.*, 2015; Sevilla y *col.*, 2015b, 2020; Calderón y *col.*, 2017b, 2018b; Costa-Broseta y *col.*, 2020, 2021; León, 2022). Relacionado con las modificaciones inducidas por ROS, tal y como describimos en la Introducción, un estrés oxidativo leve provoca la oxidación de residuos de cisteínas en proteínas para generar formas sulfénicas o puentes disulfuro, ambos reducidos a -SH por diferentes reductores celulares. Dada la naturaleza eminentemente reductora de la TRXo1 y su interacción comprobada con PYR1 en el núcleo, el estudio de la regulación redox de este receptor nos ha permitido comprobar que la oxidación reducía fuertemente su actividad y que la TRXo1 era capaz de reactivarla mediante reducción. Los procesos relacionados con la regulación redox en PYR1 constituyen entonces una nueva vía de regulación postraduccional para este receptor. Concerniente a esto, si bien, la información relativa

a la regulación redox de PYR1 es más bien escasa, se ha descrito que la nitración de residuos clave de tirosina de PYR1, así como de otros receptores de la familia, inactiva rápidamente la función de estos sensores y promueve su poli-ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma (Castillo y *col.*, 2015; Chen y *col.*, 2018; Li y *col.*, 2018; Wang y *col.*, 2018). En relación con la *S*-nitrosilación, esta modificación postraduccional se describió que no afectaba a la inhibición de PP2C por el receptor y no se inhibía la señalización del ABA (Castillo y *col.*, 2015). Hasta donde sabemos, no se ha informado de la modulación redox de la percepción de esta fitohormona. Por otra parte, PYR1 fue identificado por Waszczak y *col.* (2014) entre las proteínas persulfuradas en el sulfenoma (proteínas con al menos una cisteína oxidada a ácido sulfénico) del cultivo en suspensión de células de *A. thaliana*, aunque el efecto de este PTM no se ha analizado. De hecho, recientemente se ha demostrado una conexión entre el H₂S y el ABA en plantas bajo condiciones de estrés en las que se desencadena la persulfuración de proteínas, y estudios proteómicos han revelado la persulfuración de varias proteínas en *A. thaliana* implicadas en la señalización del ABA, incluyendo a PYR1, PYL y a las proteínas quinasas SnRK2.2 y OST1 así como a las fosfatasa HAB2 y ABI4 (Aroca y *col.*, 2017, 2021b; Zhang y *col.*, 2021). Dada la conexión entre oxidación y persulfuración, todas estas evidencias apuntan a la modulación redox de Cys como clave en la percepción y señalización de la fitohormona, con las posibles consecuencias sobre los procesos fisiológicos regulados por la misma, tal y como se discute a continuación.

2.1. Crecimiento radicular en respuesta al ABA

El estudio *in vivo* de un proceso regulado por el ABA como es el crecimiento radicular, analizando el comportamiento de mutantes KO y OEX *Attrxo1* comparados con el de plantas silvestres WT, ha evidenciado el papel que puede tener esta *TRXo1* en la percepción de la hormona en este proceso. Las raíces son capaces de percibir y responder direccionalmente a estímulos químicos y físicos, por separado y en combinación. Es sabido que las fitohormonas, incluida el ABA, son esenciales en el tropismo radicular para modular el crecimiento de las raíces en condiciones normales y de estrés, junto con segundos mensajeros como el Ca²⁺, las oscilaciones del pH y las ROS (Joo y *col.*, 2001; Ponce y *col.*, 2017). En general, tanto en condiciones de riego suficiente como de déficit hídrico, el ABA aumenta e inhibe el crecimiento de brotes y

raíces (Sharp y LeNoble, 2002; Rowe y col., 2016), aunque se ha descrito un comportamiento bifásico cuando se añadía exógenamente, inhibiendo o estimulando el crecimiento radicular a alta o baja concentración, respectivamente (Xu y col., 2013; Li y col., 2017). Como se ha comentado, las ROS son importantes reguladoras de la elongación diferencial durante las respuestas gravitrópica e hidrotópica en raíces (Krieger y col., 2016), y la regulación redox a través de las tiorredoxinas también participa en estos procesos. Al menos TRX_o junto con varias TRX_h, están específicamente implicadas en el tigmotropismo radicular de *A. thaliana*, presentando los mutantes KO raíces más onduladas que el genotipo de tipo silvestre (Ponce y col., 2017). Relacionado con la elongación radicular, los resultados que hemos obtenido con los mutantes *Attrxo1* con un efecto alterado del ABA sobre la elongación radicular, más acusado en los mutantes KO, evidencian que un cambio redox en estas plantas provocado por la falta o sobreexpresión de *AtTRXo1* está afectando a la respuesta al ABA, un hecho que estaría de acuerdo con un posible cambio en la percepción de la fitohormona. También es interesante lo descrito sobre el estado redox en las diferentes zonas de la raíz implicadas en el crecimiento como el meristemo apical o la zona de elongación, que juega un papel importante, con alteraciones que provocan fenotipos radiculares. Como ejemplo, un estado más oxidado en la zona de elongación resultó en la inhibición de la elongación de la raíz (Mabuchi y col., 2018), lo que implica que la modulación del estado redox puede ser un evento clave. De hecho, los antioxidantes como el ascorbato y el glutatión son moléculas reconocidas que participan en el crecimiento de la raíz como parte del mecanismo general de organización del meristemo apical y del centro quiescente (Olmos y col., 2006, De Tullio y col., 2010). El GSH ha sido identificado como un factor necesario para activar y mantener el ciclo de división celular en las células apicales de la raíz (Vanstraelen y Benková, 2012). Interesantemente, se ha descrito redundancia en las funciones del GSH y la tiorredoxina en el desarrollo del meristemo apical de la raíz y el brote, utilizando mutantes deficientes en GSH y NTR incapaces de regenerar TRXs citosólicas (Reichheld y col., 2007). La regulación redox del crecimiento radicular también se ha evidenciado recientemente con la proteína similar a TRX tetratricopéptido tiorredoxina-like 1 (TTL1) implicada en la orientación de la expansión celular durante el crecimiento radicular necesaria para la adaptación al estrés osmótico (Cuadrado-Pedetti y col., 2021). Así mismo, NTR participa en el crecimiento de la raíz, ya que el mutante *ntra/ntrb* muestra una reducción en comparación con las plantas silvestres Col 0

(Reichheld y *col.*, 2007), lo mismo que PRXIIF mitocondrial cuyos mutantes KO mostraban una reducción en el crecimiento de la raíz principalmente bajo condiciones de estrés como Cd o inhibidores de la respiración como ácido salicilhidroxámico o antimicina (Finkemeier y *col.*, 2005). También es importante el papel que se ha descrito para la tiol peroxidasa mitocondrial AtGPX3 en el desarrollo de raíces y brotes (Passaia y *col.*, 2013), así como en la activación del cierre estomático a través de su interacción con ABI1 y ABI2. Teniendo en cuenta que las GPXs vegetales utilizan TRXs como reductor preferente (Herbette y *col.*, 2007), la falta o sobreexpresión de TRX en los mutantes puede tener un impacto en el funcionamiento de dianas como GPXs implicadas en estos procesos, un aspecto interesante a estudiar en el futuro. Además, comentar que en una Tesis anterior a la presente (Dr. Sánchez Guerrero) se evidenció en estos mismos mutantes *Attrxol* tratados con ABA una respuesta de cierta insensibilidad a la fitohormona en el proceso de germinación sobre todo en los mutantes KO, mientras que los OEX también la presentaban, pero en menor medida, pareciéndose más a las plantas WT. Estos resultados también apuntan a un papel de TRX α 1 en la percepción del ABA que afecta a estos procesos dependientes de la fitohormona.

2.2. Cierre estomático en respuesta a ABA

Los estomas son poros en la superficie de la hoja rodeados por dos células guarda encargadas de optimizar el intercambio gaseoso y la pérdida de agua (Lawson y Vialet-Chabrand, 2019). Están abiertos en la luz para permitir la entrada de CO₂ necesario para la fotosíntesis, mientras que en la oscuridad, una disminución de la humedad relativa del aire, una alta concentración de CO₂ o un aumento del contenido de ABA, todos ellos provocan el cierre estomático, un proceso que suele durar alrededor de 20-30 min (Engineer y *col.* 2016). Entender cómo los estomas se aclimatan a un entorno cambiante, se presenta como un interesante reto para mejorar el rendimiento de los cultivos en un entorno de cambio climático. Así, los receptores del ABA son buenos candidatos para la modificación por ingeniería genética que pudiera permitir una mayor aclimatación estomática (Dittrich y *col.*, 2019). En relación con su función, el ABA es capaz de inhibir la apertura estomática inducida por la luz, así como de inducir el cierre estomático. De hecho, se ha descrito que ambos efectos están severamente deteriorados en el mutante cuádruple *pyr1/pyl1/pyl2/pyl4* (Nishimura y *col.*, 2010), lo que supone la implicación de los receptores en la función del ABA sobre el movimiento estomático.

Normalmente, el ABA induce un aumento de la producción de ROS en diferentes localizaciones subcelulares de las células guarda, incluyendo el núcleo, impulsando el cierre estomático (revisado por Postiglione y Muday, 2020). Por otro lado, algunas PP2Cs como HAB1, ABI1 y ABI2, así como algunas MAPKs implicadas en el cierre estomático son dianas de oxidación, aunque no se ha descrito la implicación de las TRXs en su regulación redox (Meinhard y Grill, 2001; Sridharamurthy y col., 2014). En trabajos anteriores de nuestro grupo, hemos descrito algunas diferencias fenotípicas en la densidad y apertura estomática en mutantes KO *Attrxo1* cuando crecían en condiciones control, presentando mayor densidad estomática pero menor tamaño de poro junto con menor pérdida de agua y menor apertura estomática bajo salinidad que las plantas WT (Calderón y col., 2018a). Al crecer en condiciones de mayor luminosidad ($300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiación fotosintética activa en lugar de $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y fotoperiodo corto, la falta de *AtTRXo1* afectó al desarrollo y apertura estomática y los mutantes presentaron una mayor conductancia estomática acompañada de un menor número de estomas maduros, aunque de mayor tamaño (Sánchez-Guerrero y col., 2021). Todas estas diferencias sugerían la implicación de la *TRXo1* en el desarrollo estomático, probablemente relacionada con una alteración del estado redox celular en condiciones no estresantes. Otros autores han descrito el aumento de la conductancia estomática tras la recuperación de la sequía de estos mutantes *Attrxo1*, apuntando también a una regulación redox de la función estomática por la *TRXo1* (Da Fonseca-Pereira y col., 2019). Bajo condiciones de estrés como la salinidad, las líneas mutantes *Attrxo1* cultivadas bajo fotoperiodo de día corto mostraron un mayor número de estomas totales que las plantas WT y la salinidad provocó una reducción significativa en la apertura estomática. Curiosamente, estos mutantes presentaron un mayor aumento en los niveles de ABA bajo salinidad que las plantas WT, lo que podría indicar que el desequilibrio redox fue percibido en esta situación de estrés, afectando así al contenido de la hormona. Todos estos cambios apuntan a una posible disminución en la detección de ABA en estas plantas por la falta de la *TRXo1*. En este sentido, la *TRXo1* podría estar implicada en el desarrollo y apertura estomática tanto en condiciones normales como salinas, probablemente a través de la regulación redox de proteínas diana clave implicadas en el proceso, como hemos demostrado para el receptor PYR1. De hecho, la implicación de la regulación redox en la apertura estomática aún permanece relativamente inexplorada, aunque algunas evidencias experimentales indican la existencia de un control redox por H_2O_2 a través de su acción sobre canales iónicos y

quinasas tipo receptor ricas en residuos de Cys (CRKs) (Bourdais y col., 2015) implicadas en la apertura basal y la respuesta a estímulos. También, ASPG1 (proteasa aspártica en la célula guarda) implicada en la respuesta ABA bajo estrés por sequía, se ha descrito como una diana potencial de la TRXh en *Brassica napus* (Zhang y col., 2016). Otro ejemplo de regulación redox de la señalización de ABA vinculada a TRX es la ejercida por la enzima glutatión peroxidasa 3 (GPX3), que la relaciona con el H₂O₂ en el cierre estomático en *A. thaliana* (Miao y col., 2006), proponiendo al complejo GPX3 no solo como un eliminador sino también como un sensor de ROS. Interesantemente se ha descrito que es la TRX y no el GSH el donante electrónico fisiológico de la familia de GPXs en *A. thaliana* (Iqbal y col., 2006), lo que encajaría con el papel que proponemos para la TRXo1 en la regulación del movimiento estomático. También recientemente, se han descrito numerosas tiol reductasas en células guarda en estudios tanto transcriptómicos como proteómicos, como implicadas en las vías de señalización que gobiernan los movimientos estomáticos (Montillet y col., 2021). A nivel transcriptómico, *NTRA* citosólico y varios genes miembros de la familia *TRX*, incluyendo *TRXo1*, mostraron una mayor expresión en las células del mesófilo, y a nivel proteico, las NTRs/TRXh3 citosólicas y GRXs/2-Cys PRX plastidiales se encontraron con contenidos muy elevados en las células guarda, participando en la respuesta estomática al ABA. Sin embargo, en condiciones de crecimiento estándar de día corto, no se observaron cambios en la diferenciación y desarrollo estomático en mutantes KO de las NTRs citosólicas, TRXs h3 o TRXo. Así, todas estas evidencias junto a las obtenidas en esta Tesis Doctoral apuntan a la regulación redox a través de las TRXs entre otros actores, como un evento clave en determinados procesos del desarrollo y crecimiento de plantas, no solo bajo control sino interesantemente bajo situaciones de estrés.

Como **conclusión** de este apartado de la Tesis Doctoral, comentar que los resultados obtenidos apoyan la participación de la regulación redox como un evento clave que modula la función de receptores de ABA como PYR1. Al menos *in vitro*, la TRXo1 es capaz de rescatar la actividad perdida por oxidación de este sensor y, por tanto, la interacción TRXo1-PYR1 puede tener una función fisiológica en la modulación redox de la señalización por ABA. La estructura oligomérica del receptor está modulada por el sistema TRX para que éste pueda ejercer su función sobre las PP2Cs y permitir la respuesta celular al ABA, estando principalmente dos de las tres Cys de PYR1 implicadas en su oligomerización. Los resultados obtenidos en este trabajo han sido

recientemente aceptados para su publicación en la revista *Redox Biology* en Mayo de 2023 (De Brasi *y col.*, 2023) y apuntan a la existencia de una nueva regulación redox sobre las vías de señalización desencadenadas por ABA, que puede afectar a procesos tan importantes como la germinación de las semillas, el crecimiento de las plantas y el comportamiento estomático, determinante para su respuesta a situaciones de estrés. La investigación en esta línea permitirá avanzar en el conocimiento de las rutas de señalización del ABA con el fin de mejorar la respuesta de las plantas frente a situaciones adversas cada vez más agresivas a las que se enfrenta hoy en día la producción vegetal, como son el déficit hídrico o la salinidad.

3. TRXo1 en procesos de persulfuración bajo estrés salino

El estrés abiótico que sufren las plantas por inundaciones, sequías prolongadas, elevada intensidad luminosa y olas de calor o frío, provoca grandes pérdidas en la producción agrícola y amenaza la seguridad alimentaria mundial, una situación agravada en los últimos años por el aumento de la frecuencia y la intensidad de dichos estreses como resultado del calentamiento global y el cambio climático. Esto pone de manifiesto la importancia que tiene el comprender los mecanismos que aumentan la resiliencia de las plantas frente a los mismos. La salinidad está considerada como uno de los mayores estreses abióticos, ya que afecta a un 50% de la tierra cultivada de regadío (revisado por Ullah *y col.*, 2021). En plantas, la salinidad provoca tensión osmótica, citotoxicidad, desequilibrio nutricional y estrés oxidativo (Hernández *y col.*, 2001; Petrov *y col.*, 2015; Hasanuzzaman y Fujita, 2022), influenciando diversos procesos como germinación, crecimiento, fotosíntesis, respiración... a través de la puesta en marcha de cascadas de señalización integradas por sensores, transductores y efectores. La generación de ROS es un componente intrínseco de situaciones de estrés tanto biótico (provocados por agentes biológicos como las plagas) como abiótico (Hernández *y col.*, 1993, 1995; Olmos *y col.*, 2003; Lázaro *y col.*, 2013; Sevilla *y col.*, 2015b). Así, la atención en este campo se ha derivado a la identificación de los sensores de ROS y las vías regulatorias que conectan la señalización con vías de respuesta, incluyendo las modificaciones postraduccionales de proteína y las vías hormonales.

En nuestro grupo de investigación del CEBAS, se ha venido trabajando en las últimas décadas en el campo del estrés oxidativo en plantas en situaciones de estrés ambiental (salinidad, altas temperaturas...) y en el papel de la regulación redox como

moduladora de la respuesta. Junto a la identificación de componentes del sistema antioxidante (SOD y ciclo ASC-GSH) en orgánulos como mitocondrias y peroxisomas, se ha descrito y caracterizado las proteínas del sistema redox compuesto por TRX_{o1}, PRXIII, SRX en mitocondrias y en el caso de TRX_{o1} también su localización en núcleo, como se ha comentado anteriormente en la introducción de esta Tesis Doctoral (Jiménez y col., 1997, 1998; Barranco-Medina y col., 2007, 2008b; Martí y col., 2009; Iglesias-Baena y col., 2010, 2011; Calderón y col., 2017a). Concretamente, hemos descrito que la TRX_{o1} mitocondrial y nuclear, juega un papel en respuesta a salinidad, estando implicada en procesos de germinación, desarrollo y apertura estomáica, metabolismo respiratorio y fotosintético, regulación del metabolismo carbonado... (Calderón y col., 2018b; Martí y col., 2009, 2011; Ortiz-Espín y col., 2017; Sánchez-Guerrero y col., 2019, 2021). En este escenario, y en relación al estudio de las modificaciones postraduccionales, recientemente junto a las modificaciones como sulfenilación, S-nitrosilación, S-glutationilación, nitración, fosforilación..., surge un interés creciente en una nueva modificación de cisteínas oxidadas, concretamente la persulfuración producida por sulfuro de hidrógeno (H₂S), que participaría también en modular la oxidación proteica que se produce en situaciones de estrés. El sulfuro de hidrógeno es un gas soluble en agua y bastante permeable que difunde fácilmente a través de membranas, provocando persulfuración de grupos oxidados de proteínas. Esta modificación postraducciona l está emergiendo como un proceso de protección frente a la oxidación irreversible que afecta negativamente a la estructura y función proteica. En sistemas animales se ha demostrado que, efectivamente, la persulfuración protege a proteínas clave del metabolismo y de la señalización celular, atribuyendo además al sistema TRX un papel en el proceso por su efecto eliminador de la persulfuración (Doka y col., 2020). Además de los efectos nocivos propuestos inicialmente para H₂S en animales y vegetales, existen múltiples ejemplos en la literatura sobre la mejora que la aplicación de H₂S produce en plantas sometidas a condiciones ambientales adversas incluyendo salinidad, extendiéndose sus beneficios a diversos aspectos del desarrollo (Zhang y col., 2021). Específicamente en estrés salino, la aplicación exógena de H₂S influencia el sistema de transporte de membrana plasmática Na⁺/H⁺ en raíz, dependiente de H₂O₂, provocando una reducción de Na⁺ intracelular que influye en la tolerancia a la sal (Li y col., 2014). También se ha descrito que H₂S reduce la absorción de Na⁺ en trigo regulando los canales no selectivos de cationes (NSCCs) y la vía SOS1 (*Salt Overlay Sensitive 1*) (Deng y col., 2016). Por otro lado, H₂S juega un papel protector

frente al estrés oxidativo generado por la salinidad, ya que la aplicación de H₂S incrementa la acción de los sistemas antioxidantes (Guo *y col.*, 2016), manteniendo alto el estado redox de ascorbato y glutatión por ejemplo en fresa (Christou *y col.*, 2013) y las actividades enzimáticas elevadas de SOD, catalasa (CAT), APX y GR en pimiento y pepino (Lisjak *y col.*, 2013; Yu *y col.*, 2013) o las de SOD, APX, POD y CAT en arroz (Zhu *y col.*, 2018b) (revisado por Dar *y col.*, 2021). Por otro lado, se ha descrito que el NaCl provoca un aumento de H₂S en planta, similar al incremento de NO. Como ejemplos, citar que en raíces de alfalfa crecidas en concentraciones crecientes de NaCl, H₂S incrementa debido a la actividad de la enzima l-cisteína desulfhidrasa (l-DES) (Lai *y col.*, 2014). En un estudio más reciente en plantas de tabaco, no solo esta enzima de la ruta biosintética de H₂S sino también las enzimas como cianoalanine sintasa y cisteína sintasa se encuentran aumentadas en respuesta a tratamientos salinos (da Silva *y col.*, 2017).

Recientemente, se ha descrito el mecanismo por el que H₂S modula la actividad de ciertas enzimas antioxidantes a través de la persulfuración (Li *y col.*, 2020), lo que lleva a proponer su funcionalidad y participación como una nueva vía de señalización en respuesta a estrés. Así, se ha demostrado que la persulfuración inhibe la actividad de enzimas antioxidantes como catalasa, pero incrementa la de APX1, gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa y glutamina sintetasa en *A. thaliana* (Aroca *y col.*, 2015). Interesantemente, condiciones reductoras eliminan el efecto de la persulfuración, implicando a la regulación redox en el proceso, y se ha sugerido que las TRXs en plantas podrían jugar un papel en el mismo, tal y como se ha demostrado en sistemas animales (Espínosa *y col.*, 2019; Wang *y col.*, 2021). De hecho, se ha descrito un efecto activador de H₂S sobre la actividad de TRX (Mao *y col.*, 2019), siendo TRX una de las principales biomoléculas implicadas en el inicio y desarrollo de procesos cancerígenos, y por tanto señalada como diana en procesos terapéuticos (Mao *y col.*, 2020). El efecto activador del H₂S podría ser a través de la ruptura de puentes disulfuro como ya se ha descrito para varias proteínas en sistemas animales (Huang *y col.*, 2018; Mao *y col.*, 2019) incluyendo a componentes del sistema antioxidante tales como glutatión, SOD y CAT (Lu *y col.*, 2008; Wang *y col.*, 2010).

A pesar del interés creciente en esta modificación postraducciona, en plantas existe menos información sobre el efecto de la persulfuración proteica que en sistema animales, si bien como ejemplos relacionados con los análisis de la respuesta de las

mismas al tratamiento con H₂S, estudios *in vitro* con proteínas recombinantes antioxidantes de tomate como SlCAT1, SlcAPX1 y SlPOD5 tratadas con el agente persulfurante NaHS mostraron algunas de sus cisteínas persulfuradas, mientras que para SOD no se ha identificado el sitio de persulfuración (Li y *col.*, 2020). En este contexto, indicar que la información relativa al efecto de la salinidad sobre la persulfuración de proteínas es muy reducida, por lo que los resultados preliminares obtenidos en esta Tesis Doctoral, amplían esta información y son el punto de partida de una investigación en este campo, que pueda incluir a la TRX y por tanto a la regulación redox del propio proceso de persulfuración en respuesta a estrés. Así, los resultados iniciales obtenidos de patrones de persulfuración bajo salinidad comparando plantas silvestres con mutantes KO y OEX *Attrxo1* llevan a describir que diferentes componentes del metabolismo celular podrían estar regulados por esta PTM en estas plantas. El hecho de que la cantidad de proteínas persulfuradas sea menor en la plantas KO en las diferentes categorías GO analizadas, apunta a un papel de TRX_{o1} en el proceso. Analizando, entonces, más detalladamente la respuesta de dos líneas mutantes KO *Attrxo1* crecidas tanto en condiciones control como salinas, y centrándonos en sistemas antioxidantes mitocondriales, se pone de manifiesto que parte de este sistema de defensa podría estar regulado por persulfuración y que la TRX_{o1} podría jugar un papel en la misma. Así, encontramos, además de a la propia TRX_{o1} y TRX_{h2} inicialmente descrita en mitocondrias, a enzimas como APX, deshidroascorbato reductasa (DHAR), Mn-SOD, peroxidasa (POD) y PRXIIF. Como se ha comentado anteriormente, la mayoría han sido descritas como persulfuradas en condiciones de estrés, si bien en nuestro estudio también aparecen en condiciones control sin tratamiento salino. En términos generales en una condición control hay un mayor número de proteínas persulfuradas mitocondriales en los mutantes KO *Attrxo1* y con un mayor nivel de persulfuración que en los WT. Esto parece indicar que la falta de TRX_{o1} lleva emparejada una mayor persulfuración proteica, al menos en estas enzimas del sistema antioxidante y en varias dianas de TRX_{o1} en el orgánulo. Esto implicaría que TRX_{o1} podría tener un doble papel sobre estas dianas: el de un reductor de grupos tiol y el de un posible eliminador de persulfuración, hipótesis que estamos interesadas en confirmar próximamente. De esta manera la TRX y el control redox podrían modular las modificaciones postraduccionales oxidativas que sufren los residuos de Cys, al igual que para otras modificaciones como la S-glutationilación por glutatión o la S-nitrosilación provocada por NO, que afectan entre otras, a enzimas del sistema antioxidante y redox

mitocondriales en condiciones tanto control, como en estrés abiótico como el de la salinidad (Camejo y col., 2013, 2015; Martí y col., 2013; Calderón y col., 2017b). Indicar que la presencia de TRX_{o1} en el KO2 (es *knock down*) como proteína persulfurada puede deberse a que estos mutantes no son KO completamente, sino que presentan un nivel muy bajo pero detectable de expresión génica en comparación con plantas WT, según lo describimos previamente (Ortiz-Espín y col., 2017), junto al hecho de que TRX_{o1} es diana de persulfuración. Resaltar que entre las proteínas persulfuradas se encuentra la diana de TRX_{o1} implicada en la generación de H₂S mercaptopiruvato sulfotransferasa (MST1) (2,7 veces más persulfurada en KO1 que en WT en condición control y 1,3 veces más en salinidad). Se ha descrito recientemente que esta proteína en *A. thaliana* usa 3-mercaptopiruvato como donador de sulfuro mientras que TRX, GSH y GRX sirven como aceptores de sulfuro con muy alta afinidad (Moseler y col., 2021). De hecho, las dos proteínas MST descritas en *A. thaliana* son sensibles a la sobreoxidación, pero están protegidas de la inactivación irreversible a través de la persulfuración, siendo reactivadas por TRXs y GSH.

Paralelamente, la identificación como persulfuradas de proteínas nucleares como nucleoredoxina de la familia de TRXs (16 veces más persulfurada en el KO1 que en WT) o PCNA2 (2 veces más en KO1 que en KO2), diana de TRX_{o1}, abre el campo de la regulación postraduccional de la persulfuración hacia el metabolismo de este orgánulo y la intervención de TRX_{o1} en el mismo. Las nucleoredoxinas (NRXs) son proteínas oxidoreductasas localizadas en núcleo y citoplasma que poseen tres dominios TRX (Marchal y col., 2014) cuyas Cys están implicadas en oligomerización (Kang y col., 2020). Interesantemente, se ha descrito que las NRXs de *A. thaliana* interaccionan entre otras, con enzimas del sistema antioxidante como APX, MDHAR, DHAR y CAT (Kneeshaw y col., 2017). La regulación por persulfuración de NRXs podría protegerlas de sobreoxidación para poder ejercer su función protectora modulando la actividad de estos antioxidantes celulares.

El estudio que hemos realizado en condiciones salinas ha revelado que esta situación induce persulfuración de proteínas mitocondriales en mayor medida en plantas silvestres, siendo una de las más persulfuradas la enzima de síntesis de H₂S, D-CDES (13 veces más que en plantas en condiciones control). Este hecho podría reflejar una situación “persulfurante” tal y como se evidencia por el mayor número de proteínas persulfuradas en plantas crecidas en salinidad. Llama la atención el nivel de

persulfuración de nucleoredoxina (NRX1), que aparece 19 veces más persulfurada en plantas WT estresadas. También se han identificado con un mayor nivel de persulfuración, varias dianas de TRX α 1 en la mitocondria y núcleo como son SHMT, proteína P de GDH o MST1, así como PCNA. En esta situación, la medida de los niveles de H $_2$ S será útil y se plantea como Objetivo futuro para comprender mejor los efectos de la salinidad en estas plantas silvestres y mutantes de tiorredoxina. La falta de TRX α 1 en los KO tiene un efecto sobre el nivel de persulfuración, ya que, si bien la mayoría de las proteínas del sistema antioxidante más persulfuradas en salinidad en el WT también presentan este nivel de persulfuración en el KO1S (KO1 en salinidad), hay otras proteínas que disminuyen su nivel de persulfuración en este mutante: concretamente esto ocurre en las proteínas DHAR1, GRX4, APX y PRXIIF, mientras que en el otro genotipo mutante KO2S, solo DHAR1 y APX aparecen diferencialmente menos persulfuradas. Esto implicaría que la persulfuración no es algo general sino dependiente del genotipo y de la condición de estrés a la que esté sometido.

Realizando la comparación del comportamiento de los distintos genotipos en salinidad, encontramos que el número de proteínas persulfuradas diferencialmente en plantas WT y mutantes KO *Attrxo1* es mucho menor que en condiciones control, siendo la mayoría de proteínas diana de TRX α 1 y no proteínas del sistema antioxidante. Esto podría indicarnos que la TRX α 1 en una condición de salinidad sería quizás menos efectiva como eliminador de persulfuración, o que los mutantes KO *Attrxo1* presentan otros mecanismos compensatorios en la situación de estrés. De hecho, se ha descrito que el mecanismo de sulfenilación y el de persulfuración tienen muchas proteínas diana en común, principalmente relacionadas con respuesta a estrés, oxidación-reducción, ciclo de ácidos tricarbóxicos y glicólisis (Aroca y col., 2017; Huang y col., 2019). Entre las enzimas antioxidantes descritas como dianas comunes en estos estudios, están las que hemos identificado en esta Tesis Doctoral, por lo que podríamos añadir a la TRX α 1 como un nuevo componente del proceso de persulfuración al menos de proteínas relacionadas con el metabolismo mitocondrial. Esta modificación postraduccional proteica se ha señalado como un mecanismo eficiente para la recuperación de la actividad antioxidante eliminando oxidación, lo que contribuiría a aumentar la capacidad de defensa de la planta en situaciones de estrés oxidativo.

Los resultados que hemos obtenido hasta ahora en esta Tesis Doctoral suponen el inicio de un estudio más en profundidad que se pretende llevar a cabo en el laboratorio,

analizando el efecto de la persulfuración en la actividad de las proteínas del sistema antioxidante y redox mitocondriales que se han detectado como persulfuradas, así como de aquellas implicadas en el metabolismo del S, estudiando además el posible papel de *TRXo1* sobre la persulfuración de las mismas. Toda la investigación que se dirija hacia el estudio de la sensibilidad y respuesta junto a los mecanismos implicados en ello, y las funciones biológicas de las dianas específicas de persulfuración, nos permitirá ampliar y avanzar en el conocimiento sobre el papel regulador de H₂S en plantas, principalmente interesante en situaciones de estrés ambiental al que con cada vez más frecuencia e intensidad se enfrentan nuestras cosechas.

4. Obtención de dobles mutantes

4.1. *Psntrb/trxo1* por VIGS

El silenciamiento génico inducido por virus es una técnica que tiene como ventaja que no requiere del establecimiento de líneas mutantes. A pesar de ello, este silenciamiento es transitorio, teniendo un efecto en la planta unas tres semanas aproximadamente, una vez que se ha transformado con las construcciones que contienen los genes a silenciar. Otra característica importante es que para poder seleccionar el material vegetal que ha sido eficazmente transformado, se debe poder reconocer un fenotipo visible para su recolección. Además, las plantas transformadas con la técnica VIGS son quimeras y, por tanto, hay que tener en cuenta que se espera obtener una variedad de fenotipos entre fuerte, leve o ninguno, y además considerar que no todas las hojas van a presentarlo e incluso no toda la superficie de la hoja por igual. Así, esta técnica es muy útil solo cuando se presenta un fenotipo claro, sea de hoja o de otra parte de la planta. Por ello, es importante trabajar con un gran número de plantas para asegurar que se pueda observar un fenotipo con claridad. Tal y como se ha comentado anteriormente, una vez que las plantas control positivo portadoras de las construcciones pCAPE1: pCAPE2-*PDS* empezaron a blanquear sus hojas, indicio de que se ha activado el virus, se comenzaron a analizar las plantas objeto de interés. Se contó con controles de transformación, infiltrando a las hojas solo con el vector pCAPE1 para estudiar si el efecto de la virulencia por si sola generaba cambios en las plantas comparándolas con plantas sin transformar (WT) pero no fue hallada ninguna diferencia visible. En nuestro

estudio, las plantas transformadas con la construcción doble pCAPE1:pCAPE2-*PsTRXo1-PsNTRB* para silenciar a ambos genes del sistema *TRXo1/NTRB* de guisante, no presentaron un fenotipo que pudiera ser reconocido como mutante. Aún así, se intentó muestrear el material foliar para hacer comprobaciones, tratando de hallar un patrón de silenciamiento. Se intentaron varias estrategias de muestreo para comprobar el nivel de expresión génica: tomando solo hojas basales (pegadas al tallo principal), hojas abaxiales (salen de las ramas laterales) y mezclando tanto hojas basales como abaxiales, así como la repetición de los ensayos, pero los resultados no fueron concluyentes.

4.2. *Attrxo1/ntrb* por cruzamiento

La obtención de dobles mutantes por cruzamiento de líneas KO simples es un proceso largo y tedioso que no garantiza el éxito hasta que no se corrobora que la presencia de dicha inserción de ADN transferido que se observa en las sucesivas generaciones filiales es verdaderamente un interruptor del gen a silenciar. Las líneas parentales (F_0) han de encontrarse en homocigosis para la mutación, siendo líneas bien caracterizadas y establecidas. Se debe comprobar por secuenciación la posición del inserto de ADN-T, teniéndose una estimación de la misma en la plataforma SALK, obteniéndose mayor tasa de éxito de silenciamiento si la interrupción del ADN_g se produce en un exón, evitándose los ORF, que podrían dar lugar al efecto contrario, una sobreexpresión del gen. Además, estas líneas no deben contener polimorfismos para otros genes, algo que podría acarrear malinterpretaciones en los posteriores ensayos de interés para los que han sido seleccionadas. Una vez que se llega al paso en el que las líneas mutantes simples se encuentran en homocigosis, se deben diseñar oligonucleótidos para estudiar la expresión génica relativa (qPCR) a un gen de referencia, habitualmente, *AtACTINA8* (*AtATC8*) y verificar si se produjo el silenciamiento génico (KO). Es importante corroborar las sucesivas generaciones de líneas que se van obteniendo para garantizar el genotipo de las mismas.

Una vez establecidas las líneas mutantes simples, se realizan los cruzamientos por polinización manual efectuando los cruces con los gametos femeninos y masculinos alternando los genotipos (óvulo *Attrxo1* x polen *Atntrb*; óvulo *Atntrb* x polen *Attrxo1*), para la obtención de un doble mutante de pérdida de función de ambos genes, como se ha explicado anteriormente. El ciclo de vida de *A. thaliana* es corto pero la maduración de semillas implica que la obtención de las sucesivas líneas filiales hasta la obtención de la homocigosis se demore y más cuando se trata de dos mutaciones en la misma línea,

sin mencionar el tiempo requerido para el crecimiento de las plantas, la extracción de ADNg de al menos 16 plantas de cada una de las líneas a comprobar, más los controles WT y mutantes simples, además de las comprobaciones por PCR con las cuatro combinaciones de parejas de oligonucleótidos.

Actualmente, se están llevando a homocigosis dos líneas mutantes con los genotipos de los gametos parentales contrarios. Una vez alcanzada la misma, se caracterizará a ambas líneas fenotípica y bioquímicamente para estudiar el efecto que genera la carencia del sistema redox AtTRXo1/NTRB en mitocondrias y núcleo, tanto en una situación normal de crecimiento, como bajo un estrés abiótico. Estos mutantes constituirán una nueva y valiosa herramienta biológica para el estudio de la función de la regulación redox proteica en procesos de desarrollo y respuesta y adaptación de plantas a condiciones adversas.

CONCLUSIONES

1. La regulación redox de la autofagia está mediada por TRX. La sobreexpresión de *PsTRXo1* protege a las células de tabaco BY-2 frente a un tratamiento oxidativo exógeno por H₂O₂, favoreciendo el desarrollo de un proceso de autofagia, que colabora en la respuesta ante el estrés facilitando la supervivencia celular. La sobreexpresión de *PsTRXo1* genera en estas células un aumento de las proteínas autofágicas ATG4 y ATG8, así como del flujo autofágico, revelado por un incremento en la formación de estructuras líticas similares a los autolisosomas. Estos hechos apuntan al establecimiento de este proceso degradativo y de reciclaje celular, en su vertiente pro-supervivencia, como respuesta a la situación oxidativa.
2. La elevada actividad de ATG4 en las células OEX sometidas al tratamiento oxidativo, junto con la demostrada interacción *in vitro* entre las proteínas ATG4 y TRXo1, sugieren un papel para esta tiorredoxina en el control redox de la proteína ATG4 *in vivo*. En este sentido, la TRXo1 se postula como un componente clave en el proceso de autofagia que tiene lugar en la respuesta de las células TBV-2 a la situación oxidativa, colaborando en el aumento de la tasa de supervivencia celular que presentan las células sobreexpresantes.
3. En lo concerniente a la investigación sobre TRXo1 y el receptor de la fitohormona ABA, PYR1, los estudios *in vitro* con la proteína recombinante PYR1 mutada y sin mutar en sus cisteínas y sometida a oxidación-reducción, han demostrado una regulación redox de este receptor que provoca cambios en su estado oligomérico, estando dos de sus tres cisteínas, concretamente Cys³⁰ y Cys⁶⁵, implicadas en el mismo. A su vez, el sistema TRXo1/tiorredoxina reductasa es capaz de rescatar la pérdida por oxidación de la actividad de PYR1, y de esta forma su capacidad para inhibir a fosfatasas implicadas en la señalización por ABA, como es la proteína HAB1.
4. Los estudios *in vivo* han corroborado que la oligomerización de PYR1 es dependiente del estado redox, encontrándose además un patrón diferencial en la oligomerización del receptor en plantas KO y sobreexpresantes *Attrxo1* crecidas en presencia de ABA, comparadas con el patrón presentado por el genotipo silvestre. Todo ello permite describir por vez primera, la implicación del proceso de regulación redox por TRXo1 sobre el receptor PYR1, que puede ser un evento clave para favorecer la

señalización por ABA, siendo esta tiorredoxina una buena candidata como reductor fisiológico *in vivo* de estos receptores en el núcleo.

5. Se presenta por primera vez un estudio sobre patrones de persulfuración proteica producida por sulfuro de hidrógeno (H₂S) en plantas de *A. thaliana* en condiciones de salinidad, en el que algunas dianas de TRXo1 en mitocondrias y núcleo, así como proteínas del sistema antioxidante y del metabolismo del H₂S entre otras, se encuentran diferencialmente persulfuradas en mutantes KO *Attrxo1*. Este patrón sugiere que TRXo1 puede ejercer un papel como posible moduladora del proceso de persulfuración en estas condiciones de estrés abiótico, aspecto interesante en el que se ahondará próximamente.

6. Se han obtenido dos líneas dobles mutantes de *A. thaliana* en tiorredoxina/tiorredoxina reductasa *Attrxo1/ntrb*, por cruces de mutantes simples KO en cada uno de los genes. Se ha iniciado la caracterización de los mismos como paso previo a su empleo en los estudios dirigidos a profundizar en la participación de la regulación redox ejercida por este sistema, en la respuesta de plantas a situaciones de estrés abiótico, donde la TRXo1 tiene un papel que se evidencia cada vez más, como relevante.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, C., García, I., Moreno, I., Pérez-Pérez, M. E., Crespo, J. L., Romero, L. C., & Gotor, C. (2012). Cysteine-generated sulfide in the cytosol negatively regulates autophagy and modulates the transcriptional profile in arabidopsis. *Plant Cell*, 24(11), 4621–4634. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.105403>
- Ancín, M., Fernández-Irigoyen, J., Santamaría, E., Larraya, L., Fern, A., Veramendi, J., & Farran, I. (2022). New *in vivo* approach to broaden the thioredoxin family interactome in chloroplasts. *Antioxidants*, 11(10), 1979; <https://doi.org/10.3390/antiox11101979>
- Ashtamker, C., Kiss, V., Moshe S., Davydov, O. & Fluhr, R. (2007). Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiology*, 143, 1817-1826. [10.1104/pp.106.090902](https://doi.org/10.1104/pp.106.090902)
- Aroca, A., Benito, J. M., Gotor, C., & Romero, L. C. (2017). Persulfidation proteome reveals the regulation of protein function by hydrogen sulfide in diverse biological processes in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 68(17), 4915–4927. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx294>
- Aroca, A., & Gotor, C. (2022). Hydrogen sulfide action in the regulation of plant autophagy. *FEBS Letters*, 596(17), 2186–2197. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14433>
- Aroca, A., Gotor, C., Bassham, D. C., & Romero, L. C. (2020). Hydrogen sulfide: From a toxic molecule to a key molecule of cell life. *Antioxidants*, 9(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox9070621>
- Aroca, A., Gotor, C., & Romero, L. C. (2018). Hydrogen sulfide signaling in plants : emerging roles of protein persulfidation. *Frontiers in Plant Science* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01369>
- Aroca, Á., Serna, A., Gotor, C., & Romero, L. C. (2015). S-sulfhydration: A cysteine posttranslational modification in plant systems. *Plant Physiology*, 168(1), 334–342. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00009>
- Aroca, A., Yruela, I., Gotor, C., & Bassham, D. C. (2021a). Persulfidation of ATG18a regulates autophagy under ER stress in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.2023604118>
- Aroca, A., Zhang, J., Xie, Y., & Romero, L. C. (2021b). Hydrogen sulfide signaling in plant adaptations to adverse conditions: molecular mechanisms. *Journal of Experimental Botany* 72(16), 5893–5904. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab239>
- Avin-Wittenberg, T. (2019). Autophagy and its role in plant abiotic stress management. *Plant Cell and Environment*, 42(3), 1045–1053. <https://doi.org/10.1111/pce.13404>
- Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Droux, M., Buchanan, B. B., Jacquot, J., Manieri, W., & Schu, P. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (8) 2642-2647. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308583101>
- Balsera, M., & Buchanan, B. B. (2019). Evolution of the thioredoxin system as a step

- enabling adaptation to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, *140*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.003>
- Bárány, I., Berenguer, E., Solís, M. T., Pérez-Pérez, Y., Santamaría, M. E., Crespo, J. L., Risueño, M. C., Díaz, I., & Testillano, P. S. (2018). Autophagy is activated and involved in cell death with participation of cathepsins during stress-induced microspore embryogenesis in barley. *Journal of Experimental Botany*, *69*(6), 1387–1402. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx455>
- Barranco-Medina, S., Kakorin, S., & Jose, J. (2008a). Thermodynamics of the dimer - decamer transition of reduced human and plant peroxiredoxin. *Biochemistry* *47*(27), 7196–7204. <https://doi.org/10.1021/bi8002956>
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Bernier-Villamor, L., Sevilla, F., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2008b). Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxIIIF and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *Journal of Experimental Botany*, *59*(12), 3259–3269. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern177>
- Barranco-Medina, S., Krell, T., Finkemeier, I., Sevilla, F., Lázaro, J. J., & Dietz, K. J. (2007). Biochemical and molecular characterization of the mitochondrial peroxiredoxin PsPrxII F from *Pisum sativum*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *45*(10–11), 729–739. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.07.017>
- Bassham, D. C. (2007). Plant autophagy-more than a starvation response. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(6), 587–593. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.06.006>
- Bassham, D. C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Ohsumi, Y., Olsen, L. J., & Yoshimoto, K. (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy*, *2*(1), 2–11. <https://doi.org/10.4161/auto.2092>
- Beer, S. M., Taylor, E. R., Brown, S. E., Dahm, C. C., Costa, N. J., Runswick, M. J., & Murphy, M. P. (2004). Glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(46), 47939–47951. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408011200>
- Bheri, M., & Pandey, G. K. (2019). Protein phosphatases meet reactive oxygen species in plant signaling. *Environmental and Experimental Botany*, *161*, 26–40. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.10.032>
- Bourdais, G., Burdiak, P., Gauthier, A., Nitsch, L., Salojärvi, J., Rayapuram, C., Idänheimo, N., Hunter, K., Kimura, S., Merilo, E., *et al.* (2015). Large-scale phenomics identifies primary and fine-tuning roles for CRKs in responses related to oxidative stress. *PLoS Genetics*, *11*(7), 1–36. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005373>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandes, N., Schmitt, S., & Jakob, U. (2009). Thiol-based redox switches in eukaryotic proteins. *Antioxidants & Redox Signaling* *11*(5): 997-1014. doi: 10.1089/ars.2008.2285

- Bréhélin, C., Laloi, C., Setterdahl, A. T., Knaff, D. B., & Meyer, Y. (2004). Cytosolic, mitochondrial thioredoxins and thioredoxin reductases in *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*, 79(3), 295–304. <https://doi.org/10.1023/B:PRES.0000017165.55488.ca>
- Buchanan, B. B., & Balmer, Y. (2005). Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 187–220. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144246>
- Buchanan, B. B., Holmgren, A., Jacquot, J., & Scheibe, R. (2012). Fifty years in the thioredoxin field and a bountiful harvest. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820(11), 1822–1829. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.07.006>
- Butaye, K. M. J., Goderis, I. J. W. M., Wouters, P. F. J., Pues, J. M. T. G., Delauré, S. L., Broekaert, W. F., Depicker, A., Cammue, B. P. A., & De Bolle, M. F. C. (2004). Stable high-level transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using gene silencing mutants and matrix attachment regions. *Plant Journal*, 39(3), 440–449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02144.x>
- Calderón, A. (2017). Participación de las proteínas redox tioredoxina (Trx α 1) y peroxirredoxinas (PrxIII, 2-Cys Prx) de guisante y *Arabidopsis* en ciclo celular, estrés salino y glutationalización. Tesis doctoral, Universidad de Murcia. <http://hdl.handle.net/10201/53721>
- Calderón, A., Lázaro-Payo, A., Iglesias-Baena, I., Camejo, D., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017b). Glutathionylation of pea chloroplast 2-cys Prx and mitochondrial Prx IIF affects their structure and peroxidase activity and sulfiredoxin deglutathionylates only the 2-cys Prx. *Frontiers in Plant Science*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00118>
- Calderón, A., Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., Pallardó, F. V., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017a). Thioredoxin (Trx α 1) interacts with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and its overexpression affects the growth of tobacco cell culture. *Redox Biology*, 11, 688–700. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.01.018>
- Calderón, A., Sánchez-Guerrero, A., Ortiz-Espín, A., Martínez-Alcalá, I., Camejo, D., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2018a). Lack of mitochondrial thioredoxin α 1 is compensated by antioxidant components under salinity in *Arabidopsis thaliana* plants. *Physiologia Plantarum*, 164(3), 251–267. <https://doi.org/10.1111/ppl.12708>
- Calderón, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2018b). Redox protein thioredoxins: function under salinity, drought and extreme temperature conditions. In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*, Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J., Eds., Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 132–162. doi:10.1007/978-3-319-75088-0
- Calero-Muñoz, N., Expósito-Rodríguez, M., Collado-Arenal, A. M., Rodríguez-Serrano, M., Laureano-Marín, A. M., Santamaría, M. E., Gotor, C., Díaz, I., Mullineaux, P. M., Romero-Puertas, M. C., et al. (2019). Cadmium induces reactive oxygen species-dependent pexophagy in *Arabidopsis* leaves. *Plant Cell and Environment*, 42(9), 2696–2714. <https://doi.org/10.1111/pce.13597>
- Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Lázaro, J. J., Romero-Puertas, M. C., Lázaro-Payo, A.,

- Sevilla, F., & Jiménez, A. (2015). Functional and structural changes in plant mitochondrial PrxII F caused by NO. *Journal of Proteomics*, *119*, 112–125. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.022>
- Camejo, D., Romero-Puertas, M. del C., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L. M., Lázaro, J. J., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2013). Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics*, *79*, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.003>
- Cao, J. J., Liu, C. X., Shao, S. J., & Zhou, J. (2021). Molecular Mechanisms of Autophagy Regulation in Plants and Their Applications in Agriculture. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.618944>
- Castillo, M. C., Lozano-Juste, J., González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Rodríguez, P. L., & León, J. (2015). Inactivation of PYR/PYL/RCAR ABA receptors by tyrosine nitration may enable rapid inhibition of ABA signaling by nitric oxide in plants. *Science Signaling*, *8*(392). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaa7981>
- Cejudo, F. J., Ojeda, V., Delgado-Requerey, V., González, M., & Pérez-Ruiz, J. M. (2019). Chloroplast redox regulatory mechanisms in plant adaptation to light and darkness. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00380>
- Chen, H. H., Qu, L., Xu, Z. H., Zhu, J. K., & Xue, H. W. (2018). EL1-like casein kinases suppress ABA signaling and responses by phosphorylating and destabilizing the ABA receptors PYR/PYLs in Arabidopsis. *Molecular Plant*, *11*(5), 706–719. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2018.02.012>
- Choudhary, A. K., Singh, S., Khatri, N., & Gupta, R. (2022). Hydrogen sulphide: an emerging regulator of plant defence signalling. *Plant Biology*, *24*(4), 532–539. <https://doi.org/10.1111/plb.13376>
- Christou, A., Manganaris, G. A., Papadopoulos, I., & Fotopoulos, V. (2013). Hydrogen sulfide induces systemic tolerance to salinity and non-ionic osmotic stress in strawberry plants through modification of reactive species biosynthesis and transcriptional regulation of multiple defence pathways. *Journal of Experimental Botany*, *64*(7), 1953–1966. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert055>
- Ciofi-Baffoni, S., Nasta, V., & Banci, L. (2018). Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics*, *10*(1), 49–72. <https://doi.org/10.1039/c7mt00269f>
- Cobley, J. N., & Husi, H. (2020). Immunological techniques to assess protein thiol redox state: Opportunities, challenges and solutions. *Antioxidants*, *9*(4), 1–25. <https://doi.org/10.3390/antiox9040315>
- Cochemé, H. M., Bjedov, I., Grönke, S., Menger, K. E., James, A. M., Quan, J. I. C., Foley, A., Lennicke, C., Buricova, M., Adcott, J., *et al.* (2019). Enhancing autophagy by redox regulation extends lifespan in Drosophila. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/790378>
- Considine, M. J., & Foyer, C. H. (2021). Stress effects on the reactive oxygen species-dependent regulation of plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, *72*(16), 5795–5806. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab265>

- Constantin, G. D., Krath, B. N., Macfarlane, S. A., Nicolaisen, M., Johansen, I. E., & Lund, O. S. (2004). Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. *Plant Journal*, 622–631. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02233.x>
- Costa-Broseta, Á., Castillo, M., & León, J. (2020). Nitrite reductase 1 is a target of nitric oxide-mediated post-translational modifications and controls nitrogen flux and growth in arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms21197270>
- Costa-Broseta, Á., Castillo, M., & León, J. (2021). Post-translational modifications of nitrate reductases autoregulates nitric oxide biosynthesis in arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms22020549>
- Couso, I., Pérez-Pérez, M. E., Martínez-Force, E., Kim, H. S., He, Y., Umen, J. G., & Crespo, J. L. (2018). Autophagic flux is required for the synthesis of triacylglycerols and ribosomal protein turnover in *Chlamydomonas*. *Journal of Experimental Botany*, 69(6), 1355–1367. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx372>
- Couturier, J., Chibani, K., Jacquot, J., & Rouhier, N. (2013). Cysteine-based redox regulation and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science* 4, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00105>
- Cuadrado-Pedetti, M. B., Rauschert, I., Sainz, M. M., Amorim-Silva, V., Botella, M. A., Borsani, O., & Sotelo-Silveira, M. (2021). The Arabidopsis TETRATRICOPEPTIDE THIOREDOXIN-LIKE 1 gene is involved in anisotropic root growth during osmotic stress adaptation. *Genes* 12(2), 236. doi: 10.3390/genes12020236.
- Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid : emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651-679. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112122>
- Da Fonseca-Pereira, P., Daloso, D. M., Gago, J., De Oliveira Silva, F. M., Condori-Apfata, J. A., Florez-Sarasa, I., Tohge, T., Reichheld, J. P., Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R., & Arajo, W. L. (2019). The mitochondrial thioredoxin system contributes to the metabolic responses under drought episodes in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 60(1), 213–229. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy194>
- da Silva, C. J., Batista Fontes, E. P., & Modolo, L. V. (2017). Salinity-induced accumulation of endogenous H₂S and NO is associated with modulation of the antioxidant and redox defense systems in *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana. *Plant Science*, 256, 148–159. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.12.011>
- Daloso, D. M., Müller, K., Obata, T., Florian, A., Tohge, T., & Bottcher, A. (2015). Thioredoxin , a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (11) E1392-E1400. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424840112>
- Dar, O. I., Singh, K., Aslam, J., Sharma, S., Kaur, A., Bhardwaj, R., & Sharma, A. (2021). Regulation of salinity stress by hydrogen sulfide in plants. In *Hydrogen Sulfide in Plant Biology: Past and Present*. INC. <https://doi.org/10.1016/B978-0->

323-85862-5.00001-4

- Dauphinee, A. N., Denbigh, G. L., Rollini, A., Fraser, M., Lacroix, C. R., & Gunawardena, A. H. L. A. N. (2019). The Function of Autophagy in Lace Plant Programmed Cell Death. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01198>
- De Brasi-Velasco, S.; Sánchez-Guerrero, A.; Castillo, M.C.; Vertimmen, D.; León, J.; Sevilla, F.; & Jiménez, A. (2023). Thioredoxin TRXo1 is involved in ABA perception via PYR1 redox regulation. *Redox Biology*, *63*. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102750>
- De Brasi-Velasco, S., López-vidal, O., Martí, M. C., Ortiz-Espín, A., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2021). Autophagy is involved in the viability of overexpressing thioredoxin o1 tobacco by-2 cells under oxidative conditions. *Antioxidants*, *10*(12), 1–24. <https://doi.org/10.3390/antiox10121884>
- De Tullio, M. C., Jiang, K., & Feldman, L. J. (2010). Redox regulation of root apical meristem organization: Connecting root development to its environment. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(5), 328–336. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.11.005>
- Delorme-Hinoux, V., Bangash, S. A. K., Meyer, A. J., & Reichheld, J. P. (2016). Nuclear thiol redox systems in plants. *Plant Science*, *243*, 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.12.002>
- Deng, Y. Q., Bao, J., Yuan, F., Liang, X., Feng, Z. T., & Wang, B. S. (2016). Exogenous hydrogen sulfide alleviates salt stress in wheat seedlings by decreasing Na⁺ content. *Plant Growth Regulation*, *79*(3), 391–399. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0143-x>
- Dietz, K. (2011). Peroxiredoxins in plants and cyanobacteria. *Antioxidants & Redox Signaling*, *15*(4), 1129–1159. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3657>
- Dikic, I. (2017). Proteasomal and autophagic degradation systems. *Annual Review of Biochemistry*, *86*, 193–224. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>
- Dittrich, M., Mueller, H. M., Bauer, H., Peirats-Llobet, M., Rodríguez, P. L., Geilfus, C. M., Carpentier, S. C., Al Rasheid, K. A. S., Kollist, H., Merilo, E., *et al.* (2019). The role of Arabidopsis ABA receptors from the PYR/PYL/RCAR family in stomatal acclimation and closure signal integration. *Nature Plants*, *5*(9), 1002–1011. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0490-0>
- Dobrenel, T., Mancera-Martínez, E., Forzani, C., Azzopardi, M., Davanture, M., Moreau, M., Schepetilnikov, M., Chicher, J., Langella, O., Zivy, *et al.* (2016). The arabidopsis TOR kinase specifically regulates the expression of nuclear genes coding for plastidic ribosomal proteins and the phosphorylation of the cytosolic ribosomal protein S6. *Frontiers in Plant Science*, *7*, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01611>
- Dodson, M., Darley-Usmar, V., & Zhang, J. (2013). Cellular metabolic and autophagic pathways: Traffic control by redox signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, *63*, 207–221. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.014>

- Doelling, J. H., Walker, J. M., Friedman, E. M., Thompson, A. R., & Vierstra, R. D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33105–33114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204630200>
- Doherty, J., & Baehrecke, E. H. (2022). The complex roles and regulation of autophagy during cell death. *Nature Cell Biology*, 20(10), 1110–1117. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0201-5>.
- Dóka, E., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N. C., Balog, N., Takata, T., Espinosa, B., Nishimura, A., Cheng, Q., *et al.* (2020). Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Science Advances*, 6(1). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax8358>
- Dooley, F. D., Nair, S. P., & Ward, P. D. (2013). Increased growth and germination success in plants following hydrogen sulfide administration. *PLoS One*, 8(4), 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062048>
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., & Su, Z. (2010). agriGO: A GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research*, 38(2), 64–70. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq310>
- Dupeux, F., Antoni, R., Betz, K., Santiago, J., González-Guzmán, M., Rodríguez, L., Rubio, S., Park, S. Y., Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., & Márquez, J. A. (2011). Modulation of abscisic acid signaling *in vivo* by an engineered receptor-insensitive protein phosphatase type 2C allele. *Plant Physiology*, 156(1), 106–116. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170894>
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349. doi: 10.1093/nar/19.6.1349.
- Eisele, J. F., Fäßler, F., Bürgel, P. F., & Chaban C. (2016). A Rapid and simple method for microscopy-based stomata analyses. *PLoS One*, 11(10), e0164576. doi: 10.1371/journal.pone.0164576.
- Engineer, C. B., Hashimoto-Sugimoto, M., Negi, J., Israelsson-Nordström, M., Azoulay-Shemer, T., Rappel, W. J., Iba, K., & Schroeder, J. I. (2016). CO₂ Sensing and CO₂ regulation of stomatal conductance: advances and open questions. *Trends in Plant Science*, 21(1), 16-30. doi: 10.1016/j.tplants.2015.08.014
- Espinosa, B., & Arnér, E. S. J. (2019). Thioredoxin-related protein of 14 kDa as a modulator of redox signalling pathways. *British Journal of Pharmacology*, 176(4), 544–553. <https://doi.org/10.1111/bph.14479>
- Fernández-García, N., Martí, M. C., Jimenez, A., Sevilla, F., & Olmos, E. (2009). Sub-cellular distribution of glutathione in an *Arabidopsis* mutant (*vtc1*) deficient in ascorbate. *Journal of Plant Physiology*, 166(18), 2004–2012. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2009.06.006>
- Fernández-Trijueque, J., Serrato, A. J., & Sahrawy, M. (2019). Proteomic analyses of thioredoxins f and m *Arabidopsis thaliana* mutants indicate specific functions for these proteins in plants. *Antioxidants*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/antiox8030054>
- Filipovic, M. R., & Jovanovi, V. M. (2017). More than just an intermediate : hydrogen

- sulfide signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 68(17), 4733-4736. doi: 10.1093/jxb/erx352.1-4
- Finkelstein, R. R., & Gibson, S. I. (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Current Opinion in Plant Biology*, 5(1), 26-32. doi: 10.1016/s1369-5266(01)00225-4.
- Finkemeier, I., Goodman, M., Lamkemeyer, P., Kandlbinder, A., Sweetlove, L. J., & Dietz, K. J. (2005). The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(13), 12168-12180. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413189200>
- Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Schwahn, K., Nikoloski, Z., Fernie, A. R., & Flexas, J. (2016). Unravelling the *in vivo* regulation and metabolic role of the alternative oxidase pathway in C3 species under photoinhibitory conditions. *New Phytologist*, 212, 66-79. <https://doi.org/10.1111/nph.14030>
- Florez-Sarasa, I., Obata, T., Fernández Del-Saz, N., Reichheld J-P., Meyer, E. H., Rodríguez-Concepción, M., Ribas-Carbó, M., & Fernie, A. R. (2019). The lack of mitochondrial thioredoxin TRXo1 affects *in vivo* alternative oxidase activity and carbon metabolism under different light conditions. *Plant & Cell Physiology*, 60(11), 2369-2381. doi: 10.1093/pcp/pcz123.
- Fonseca-Pereira, P. Da, Gago, J., & Nunes-nesi, A. (2019). On the role of the plant mitochondrial thioredoxin system during abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior*, 14(6), 1-5. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1592536>
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: what 's in pROspect? *Plant Cell & Environment*, 39(5), 951-964. <https://doi.org/10.1111/pce.12621>
- Foyer, C. H., Ruban, A. V., & Noctor, G. (2017). Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. *Biochemical Journal*, 474(6), 877-883. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160814>
- Frudd, K., Burgoyne, T., & Burgoyne, J. R. (2018). Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. *Nature Communications*, 9(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02352-z>
- Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I., & Schweighofer, A. (2013). Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS Journal*, 280, 681-693. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x>
- Fujii, H., Chinnusamy, V., Rodrigues, A., Rubio, S., Antoni, R., Park, S. Y., Cutler, S. R., Sheen, J., Rodriguez, P. L., & Zhu, J. K. (2009). *In vitro* reconstitution of an abscisic acid signalling pathway. *Nature* 462, 660-664. doi: 10.1038/nature08599
- Galluzzi, L., Vicencio, J. M., Kepp, O., Tasmemir, E., Maiuri, M. C., & Kroemer, G. (2008). To die or not to die: that is the autophagic question. *Current Molecular Medicine*, 8(2), 78-91. doi: 10.2174/156652408783769616
- García, I., Romero, L. C., & Gotor, C. (2015). Cysteine homeostasis. In *Amino Acids in Higher Plants*, J.P.F. D'Mello. Ed. CABI Publishing, Chapter 12, 219-233. <https://doi.org/10.1079/9781780642635.0219>

- Garfin, D. E. (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, 182, 425-441. doi: 10.1016/0076-6879(90)82035-z
- Geigenberger, P., & Fernie, A. R. (2014). Metabolic control of redox and redox control of metabolism in plants. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(9), 1389–1421. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6018>
- Geigenberger, P., Thormählen, I., Daloso, D. M., & Fernie, A. R. (2017). The unprecedented versatility of the plant thioredoxin system. *Trends in Plant Science*, 22(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.008>
- Gelhaye E., Rouhier N. & Jacquot J. P. (2004). The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 42(4), 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.03.002>
- Gómez, J. M., Jiménez, A., Olmos, E., & Sevilla, F. (2004). Location and effects of long-term NaCl stress on superoxide dismutase and ascorbate peroxidase isoenzymes of pea (*Pisum sativum* cv. Puget) chloroplasts. *Journal of Experimental Botany*, 55(394), 119–130. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh013>
- Goto-Yamada, S., Oikawa, K., Bizan, J., Shigenobu, S., Yamaguchi, K., Mano, S., Hayashi, M., Ueda, H., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., & Yamada, K. (2019). Sucrose starvation induces microautophagy in plant root cells. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01604>
- Guex, N., Peitsch, M.C., (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*. 10.1002/elps.1150181505
- Guo, H., Xiao, T., Zhou, H., Xie, Y., & Shen, W. (2016). Hydrogen sulfide: a versatile regulator of environmental stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s11738-015-2038-x>
- Hasanuzzaman, M., & Fujita, M. (2022). Plant responses and tolerance to salt stress: physiological and molecular interventions. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 1–6. <https://doi.org/10.3390/ijms23094810>
- Heeg, C., Kruse, C., Jost, R., Gutensohn, M., Ruppert, T., & Wirtz, M. (2008). Analysis of the arabidopsis *o*-acetylserine (thiol) lyase gene family demonstrates compartment-specific differences in the regulation of cysteine synthesis. *FEBS Journal*, 20, 168–185. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056747>
- Herbette, S., Roeckel-Drevet, P., & Drevet, J. R. (2007). Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal*, 274(9), 2163–2180. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x>
- Hernández, J. A., Corpas, F. J., Gómez, M., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1993). Salt-induced oxidative stress mediated by activated oxygen species in pea leaf mitochondria. *Physiologia Plantarum*, 89(1), 103–110. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01792.x>
- Hernández, J. A., Olmos, E., Corpas, F. J., Sevilla, F., & del Río, L. A. (1995). Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science*, 105(2), 151-167. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(94\)04047-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(94)04047-8)
- Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., & Sevilla, F. (2001).

- Antioxidant systems and $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, *127*(3), 817–831. <https://doi.org/10.1104/pp.010188>
- Hewitt, E.J. (1966). Sand and water culture methods used in study of plant nutrition. 2nd Edition England, Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, England.
- Holmgren, A. (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure*, *2*, 1–5.
- Hou, L., Lehmann, M., & Geigenberger, P. (2021). Thioredoxin h 2 and o 1 how different subcellular localizations and redox-active functions, and are extrachloroplastic factors influencing photosynthetic performance in fluctuating light. *Antioxidants*, *10*(5), 705. doi: 10.3390/antiox10050705.
- Hu, W. H., Liu, T. T., Liu, P. F., Morgan, P., Lin, I-L., Tsa, W-L., Cheng, Y-Y., Hsieh, . T., Hu, T-H., & Shu, C-W. (2023). ATG4B and pS383/392-ATG4B serve as potential biomarkers and therapeutic targets of colorectal cancer. *Cancer Cell International*, *23*, 63. <https://doi.org/10.1186/s12935-023-02909-7>
- Huang, J., Willems, P., Wei, B., Tian, C., Ferreira, R. B., Bodra, N., Martínez Gache, S. A., Wahni, K., Liu, K., Vertommen, D., *et al.* (2019). Mining for protein S-sulfenylation in Arabidopsis uncovers redox-sensitive sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(42), 20256–20261. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906768116>
- Huang, Y., Zhang, Z., Huang, Y., Mao, Z., Yang, X., Nakamura, Y., Sawada, N., Mitsui, T., Takeda, M., & Yao, J. (2018). Induction of inactive TGF- β 1 monomer formation by hydrogen sulfide contributes to its suppressive effects on Ang II- and TGF- β 1-induced EMT in renal tubular epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *501*(2), 534–540. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.032>
- Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Lázaro-Payo, A., López-Jaramillo, F. J., Sevilla, F., & Lázaro, J. J. (2010). Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Experimental Botany*, *61*(5), 1509–1521. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq016>
- Iglesias-Baena, I., Barranco-Medina, S., Sevilla, F., & Lázaro, J. J. (2011). The dual-targeted plant sulfiredoxin retroreduces the sulfinic form of atypical mitochondrial peroxiredoxin. *Plant Physiology*, *155*(2), 944–955. <https://doi.org/10.1104/pp.110.166504>
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., & Moriyasu, Y. (2006). AtATG genes, homologs of yeast autophagy genes, are involved in constitutive autophagy in Arabidopsis root tip cells. *Plant and Cell Physiology*, *47*(12), 1641–1652. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcl031>
- Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., & Shigeoka, S. (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of Arabidopsis thaliana. *FEBS Journal*, *273*(24), 5589–5597. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05548.x>
- Jacquot, J., Eklund, H., Rouhier, N., & Schu, P. (2009). Structural and evolutionary

- aspects of thioredoxin reductases in photosynthetic organisms. *Trends in Plant Science*, 14(6), 336-343. doi: 10.1016/j.tplants.2009.03.005. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.03.005>
- Jacquot, J., P., Lancelin, J. M., & Meyer, Y. (1997). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *The New Phytologist* 136(4), 543-570. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00784.x>
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Río, L. A., & Sevilla, F. (1997). Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. 114(1), 275-284. doi: 10.1104/pp.114.1.275.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., Ros Barceló, A., Sandalio, L. M., Del Río, L. A. & Sevilla, F. (1998). Characterization of mitochondrial and peroxisomal ascorbate peroxidase of pea leaves. *Physiologia Plantarum* 104, 687-692. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1998.1040424.x>
- Jin, Z., Wang, Z., Ma, Q., Sun, L., & Zhang, L. (2017). Hydrogen sulfide mediates ion fluxes inducing stomatal closure in response to drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Soil* 419, 141–152. <https://doi.org/10.1007/s11104-017-3335-5>
- Joo, J. H., Bae, Y. S., & Lee, J. S. (2001). Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology*, 126(3), 1055–1060. <https://doi.org/10.1104/pp.126.3.1055>
- Kang, C. H., Park, J. H., Lee, E. S., Paeng, S. K., Chae, H. B., Hong, J. C., & Lee, S. Y. (2020). Redox-dependent structural modification of nucleoredoxin triggers defense responses against *alternaria brassicicola* in *arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21239196>
- Kellner, R., De la Concepcion, J. C., Maqbool, A., Kamoun, S., & Dagdas, Y. F. (2017). ATG8 expansion: a driver of selective autophagy diversification? *Trends in Plant Science*, 22(3), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.015>
- Klionsky, D. J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M. J., Abeliovich, H., Arozena, A. A., Adachi, H., Adams, C. M., Adams, P. D., Adeli, K., *et al.* (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1–222. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356>
- Kneeshaw, S., Keyani, R., Delorme-Hinoux, V., Imrie, L., Loake, G. J., Le Bihan, T., Reichheld, J. P., & Spoel, S. H. (2017). Nucleoredoxin guards against oxidative stress by protecting antioxidant enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(31), 8414–8419. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703344114>
- Koncz, C., & Schell, J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204, 383–396 (1986). <https://doi.org/10.1007/BF00331014>
- Krieger, G., Shkolnik, D., Miller, G., & Fromm, H. (2016). Reactive oxygen species tune root tropic responses. *Plant Physiology*, 172(2), 1209–1220. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00660>
- Lai, D., Mao, Y., Zhou, H., Li, F., Wu, M., Zhang, J., He, Z., Cui, W., & Xie, Y.

- (2014). Endogenous hydrogen sulfide enhances salt tolerance by coupling the reestablishment of redox homeostasis and preventing salt-induced K⁺ loss in seedlings of *Medicago sativa*. *Plant Science*, 225, 117–129. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.06.006>
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J., & Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), 14144–14149. doi: 10.1073/pnas.241340898 <https://doi.org/10.1073/pnas.241340898>
- Laureano-Marín, A. M., Aroca, Á., Pérez-Pérez, M. E., Yruela, I., Jurado-Flores, A., Moreno, I., Crespo, J. L., Romero, L. C., & Gotor, C. (2020). Abscisic acid-triggered persulfidation of the cys protease ATG4 mediates regulation of autophagy by sulfide. *Plant Cell*, 32(12), 3902–3920. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00766>
- Lawson, T., & Vialet-Chabrand, S. (2019). Speedy stomata, photosynthesis and plant water use efficiency. *New Phytologist*, 221(1), 93–98. <https://doi.org/10.1111/nph.15330>
- Lázaro, J. J., Jiménez, A., Camejo, D., Iglesias-Baena, I., Martí, M. del C., Lázaro-Payo, A., Barranco-Medina, S., & Sevilla, F. (2013). Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00460>
- Lee, E. S., Park, J. H., Wi, S. D., Kang, C. H., Chi, Y. H., Chae, H. B., Paeng, S. K., Ji, M. G., Kim, W. Y., Kim, M. G., Yun, D. J., Stacey, G., & Lee, S. Y. (2021). Redox-dependent structural switch and CBF activation confer freezing tolerance in plants. *Nature Plants*, 7(7), 914–922. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00944-8>
- Lenz, H. D., Haller, E., Melzer, E., Gust, A. A., & Nürnberger, T. (2011). Autophagy controls plant basal immunity in a pathogenic lifestyle-dependent manner. *Autophagy*, 7(7), 773–774. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.15535>
- León, J. (2022). Protein tyrosine nitration in plant nitric oxide signaling. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.859374>
- Li, D., Zhang, L., Li, X., Kong, X., Wang, X., Li, Y., Liu, Z., Wang, J., Li, X., & Yang, Y. (2018). AtRAE1 is involved in degradation of ABA receptor RCAR1 and negatively regulates ABA signalling in Arabidopsis. *Plant Cell & Environment*, 41(1), 231–244. <https://doi.org/10.1111/pce.13086>
- Li, F., & Vierstra, R. D. (2012). Autophagy: A multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science*, 17(9), 526–537. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.05.006>
- Li, J., Jia, H., Wang, J., Cao, Q., & Wen, Z. (2014). Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress Arabidopsis thaliana root. *Protoplasma*, 251(4), 899–912. <https://doi.org/10.1007/s00709-013-0592-x>
- Li, J., Shi, C., Wang, X., Liu, C., Ding, X., Ma, P., Wang, X., & Jia, H. (2020).

- Hydrogen sulfide regulates the activity of antioxidant enzymes through persulfidation and improves the resistance of tomato seedling to copper oxide nanoparticles (CuO NPs)-induced oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 156, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.09.020>
- Li, X., Chen, L., Forde, B. G., & Davies, W. J. (2017). The biphasic root growth response to abscisic acid in arabidopsis involves interaction with ethylene and auxin signalling pathways. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01493>
- Lillig, C. H., & Holmgren, A. (2007). Thioredoxin and related molecules – from biology to health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 9(1), 25–47. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.25>
- Lindahl, M., Mata-Cabana, A., & Kieselbach, T. (2011). The disulfide proteome and other reactive cysteine proteomes: analysis and functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling*, 14(12), 2581–2642.
- Lisjak, M., Teklic, T., Wilson, I., Wood, M. E., Whiteman, M., Špoljarević, M., & Hancock, J. T. (2013). The role of H₂S in pepper leaves under salt stress conditions. *Nitric Oxide*, 31, S24. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.06.042>
- Liu W.C., Carnsdagger H.R. (1961). Isolation of abscisin, an abscission accelerating substance. *Science* 134(3476), 384–385. doi: 10.1126/science.134.3476.384
- Liu, P., Tsai, K., Hsu, C., Tsai, W., Cheng, J., & Chang, H. (2018). Drug repurposing screening identifies tioconazole as an ATG4 inhibitor that suppresses autophagy and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *Theranostics* 8(3). <https://doi.org/10.7150/thno.22012>
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Tallóczy, Z., Levine, B., & Dinesh-Kumar, S. P. (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell*, 121(4), 567–577. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.007>
- Liu, Y., Xiong, Y., & Bassham, D. C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*, 5(7), 954–963. <https://doi.org/10.4161/auto.5.7.9290>
- Locato, V., Cimini, S., & Gara, L. De. (2018). ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. *Journal of Experimental Botany* 69(14), 3373–3391. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery168>
- López-Vidal, O., Olmedilla, A., Sandalio, L. M., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2020). Is Autophagy Involved in Pepper Fruit Ripening? *Cells*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/cells9010106>
- Lozano-Juste, J., Colom-Moreno, R., & León, J. (2011). *In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3501–3517. <https://doi.org/10.1093/jxb/err042>
- Lozano-Juste, J., Infantes, L., García-Maquilon, I., Ruiz-Partida, R., Merilo, E., Benavente, J. L., Velazquez-Campoy, A., Coego, A., Bono, M., Forment, J., *et al.* (2023). Structure-guided engineering of a receptor-agonist pair for inducible

- activation of the ABA adaptive response to drought. *Science Advances*, 9(10), 1–18. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade9948>
- Lozano-Juste, J., & León, J. (2010). Nitric oxide modulates sensitivity to ABA. *Plant Signaling and Behavior*, 5(3), 314–316. <https://doi.org/10.4161/psb.5.3.11235>
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. PMID: 14907713.
- Lu, M., Hu, L. F., Hu, G., & Bian, J. S. (2008). Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(12), 1705–1713. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.014>
- Lu, R., Martin-Hernandez, A. M., Peart, J. R., Malcuit, I., & Baulcombe, D. C. (2003). Virus-induced gene silencing in plants. *Methods*, 30(4), 296–303. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00037-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00037-9)
- Luo, L., Zhang, P., Zhu, R., Fu, J., Su, J., Zheng, J., Wang, Z., Wang, D., & Gong, Q. (2017). Autophagy is rapidly induced by salt stress and is required for salt tolerance in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01459>
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, I., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324(5930):1064–8. <https://doi.org/10.1126/science.1172408>
- Mabuchi, K., Maki, H., Itaya, T., Suzuki, T., Nomoto, M., Sakaoka, S., Morikami, A., Higashiyama, T., Tada, Y., Busch, W., & Tsukagoshi, H. (2018). MYB30 links ROS signaling, root cell elongation, and plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(20), E4710–E4719. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804233115>
- Mailloux, R. J., Xuan, J. Y., McBride, S., Maharsy, W., Thorn, S., Holterman, C. E., Kennedy, C. R. J., Rippstein, P., Silva, J., Nemer, M., *et al.* (2014). Glutaredoxin-2 is required to control oxidative phosphorylation in cardiac muscle by mediating deglutathionylation reactions. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), 14812–14828. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.550574>
- Mao, Z., Huang, Y., Zhang, Z., Yang, X., Zhang, X., Huang, Y., Sawada, N., Mitsui, T., Takeda, M., & Yao, J. (2019). Pharmacological levels of hydrogen sulfide inhibit oxidative cell injury through regulating the redox state of thioredoxin. *Free Radical Biology and Medicine*, 134, 190–199. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.009>
- Mao, Z., Yang, X., Mizutani, S., Huang, Y., Zhang, Z., Shinmori, H., Gao, K., & Yao, J. (2020). Hydrogen sulfide mediates tumor cell resistance to thioredoxin inhibitor. *Frontiers in Oncology*, 10, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00252>
- Marchal, C., Delorme-hinoux, V., Bariat, L., Siala, W., & Belin, C. (2014). NTR / NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Molecular Plant*, 7(1), 30–44. <https://doi.org/10.1093/mp/sst162>

- Marion, J., Le Bars, R., Besse, L., Batoko, H., & Satiat-Jeunemaitre, B. (2018). Multiscale and multimodal approaches to study autophagy in model plants. *Cells*, 7(1), 1–17. <https://doi.org/10.3390/cells7010005>
- Marshall, R. S., & Vierstra, R. D. (2018). Autophagy: The master of bulk and selective recycling. *Annual Review of Plant Biology*, 69, 173–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040606>
- Martens, S., & Fracchiolla, D. (2020). Activation and targeting of ATG8 protein lipidation. *Cell Discovery*, 6(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0155-1>
- Martí, M. C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Pallol, B., Ortiz, A., Ribas-Carbó, M., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2013). Response of mitochondrial antioxidant system and respiratory pathways to reactive nitrogen species in pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 147(2), 194–206. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2012.01654.x>
- Martí, M. C., Florez-Sarasa, I., Camejo, D., Ribas-Carbó, M., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2011). Response of mitochondrial thioredoxin PsTrx01, antioxidant enzymes, and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3863–3874. <https://doi.org/10.1093/jxb/err076>
- Martí, M. C., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2020). Thioredoxin network in plant mitochondria: cysteine s-posttranslational modifications and stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, 11(September), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.571288>
- Martí, M. C., Olmos, E., Calvete, J. J., Díaz, I., Barranco-Medina, S., Whelan, J., Lázaro, J. J., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2009). Mitochondrial and nuclear localization of a novel pea thioredoxin: identification of its mitochondrial target proteins. *Plant Physiology*, 150(2), 646–657. <https://doi.org/10.1104/pp.109.138073>
- Martins, L., Trujillo-Hernández, J. A., & Reichheld, J. (2018). Thiol based redox signaling in plant nucleus. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00705>
- Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q., & Havé, M. (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.05.001>
- Matsui, R., Shao, D., & Han, J. (2019). Redox Regulation via glutaredoxin-1 and protein S-glutathionylation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 32(10): 677–700. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7963>
- Meinhard, M., & Grill, E. (2001). Hydrogen peroxide is a regulator of ABI1, a protein phosphatase 2C from Arabidopsis. *FEBS Letters*, 508(3), 443–446. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03106-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03106-4)
- Meinhard, M., Rodríguez, P. L., & Grill, E. (2002). The sensitivity of ABI2 to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signalling. *Planta*, 214(5), 775–782. doi: 10.1007/s00425-001-0675-3
- Melcher, K., Ng, L., Zhou, X. E., Soon, F., Xu, Y., Suino-Powell, K. M., Park, S., Weiner, J. J., Fujii, H., Chinnusamy, V., et al. (2009). A gate – latch – lock

- mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature*. 462. <https://doi.org/10.1038/nature08613>
- Meyer, Y., Belin, C., Reichheld, J., & Riondet, C. (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants : molecular mechanisms , crosstalks , and functional significance. *Antioxidants & Redox Signalling*. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4327>
- Mhamdi, A., & Van Breusegem, F. (2018). Reactive oxygen species in plant development. *Development*. 145(15), dev164376. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>
- Miao, Y., Lv, D., Wang, P., Wang, X. C., Chen, J., Miao, C., & Song, C. P. (2006). An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell*, 18(10), 2749–2766. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.044230>
- Millar, A. H., Whelan, J., Millar, A. H., Whelan, J., Soole, K. L., & Day, D. A. (2011). Organization and Regulation of Mitochondrial Respiration in Plants. *Annual Review of Plant Biology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103857>
- Mishanina, T. V., Libiad, M., & Banerjee, R. (2015). Biogenesis of reactive sulfur species for signaling by hydrogen sulfide oxidation pathways. *Nature Chemical Biology* 11(7), 457-464. doi: 10.1038/nchembio.1834.
- Montillet, J. L., Rondet, D., Brugière, S., Henri, P., Rumeau, D., Reichheld, J. P., Couté, Y., Leonhardt, N., & Rey, P. (2021). Plastidial and cytosolic thiol reductases participate in the control of stomatal functioning. *Plant Cell and Environment*, 44(5), 1417–1435. <https://doi.org/10.1111/pce.14013>
- Montrichard, F., Alkhalfioui, F., Yano, H., Vensel, W. H., Hurkman, W. J., & Buchanan, B. B. (2009). Thioredoxin targets in plants : The first 30 years. *Journal of Proteomics*, 72(3), 452-474. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2008.12.002>
- Moseler, A., Dhalleine, T., Rouhier, N., & Couturier, J. (2021). *Arabidopsis thaliana* 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases interact with and are protected by reducing systems. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100429. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100429>
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nagakannan, P., Iqbal, M. A., Yeung, A., Thliveris, J. A., Rastegar, M., Ghavami, S., & Eftekharpour, E. (2016). Perturbation of redox balance after thioredoxin reductase deficiency interrupts autophagy-lysosomal degradation pathway and enhances cell death in nutritionally stressed SH-SY5Y cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 101, 53–70. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.09.026>
- Nakamura, S., & Yoshimori, T. (2018). Autophagy and longevity. *Molecules and Cells*, 41(1), 65–72. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2333>
- Netto, L. E. S., De Oliveira, M. A., Tairum, C. A., & da Silva Netto, J. F. (2016). Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Free Radical Research*, 50(2), 206–245. <https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1120864>

- Nishimura, N., Hitomi, K., Arvai, A. S., Rambo, R. P., Hitomi, C., Cutler, S. R., Schroeder, J. I., & Getzoff, E. D. (2009). Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. *Science*, *326*(5958), 1373–1379. <https://doi.org/10.1126/science.1181829>.
- Nishimura, N., Sarkeshik, A., Nito, K., Park, S. Y., Wang, A., Carvalho, P. C., Lee, S., Caddell, D. F., Cutler, S. R., Chory, J., Yates, J. R., & Schroeder, J. I. (2010). PYR/PYL/RCAR family members are major *in-vivo* ABI1 protein phosphatase 2C-interacting proteins in Arabidopsis. *Plant Journal*, *61*(2), 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04054.x>
- Noctor, G., Reichheld, J., & Foyer, C. H. (2018). Seminars in Cell & Developmental Biology ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, *80*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.013>
- Ojeda, V., Pérez-Ruiz, J. M., González, M., Nájera, V. A., Sahrawy, M., Serrato, A. J., Geigenberger, P., & Cejudo, F. J. (2017). NADPH thioredoxin reductase C and thioredoxins act concertedly in seedling development. *Plant Physiology*, *174*(3), 1436–1448. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00481>
- Oka, S., Hirata, T., Suzuki, W., Naito, D., Chen, Y., Chin, A., Yaginuma, H., Saito, T., Nagarajan, N., Zhai, P., *et al.* (2017). Thioredoxin-1 maintains mechanistic target of rapamycin (mTOR) function during oxidative stress in cardiomyocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *292*, 18988–19000. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.807735>
- Olmos, E., Kiddle, G., Pellny, T. K., Kumar, S., & Foyer, C. H. (2006). Modulation of plant morphology, root architecture, and cell structure by low vitamin C in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *57*(8), 1645–1655. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl010>
- Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Piqueras, A., & Hellín, E. (2003). Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *Journal of Experimental Botany*, *54*(381), 291–301. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg028>
- Ortiz-Espín, A., Iglesias-Fernández, R., Calderón, A., Carbonero, P., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2017). Mitochondrial AtTrxo1 is transcriptionally regulated by AtbZIP9 and AtAZF2 and affects seed germination under saline conditions. *Journal of Experimental Botany*, *68*(5), 1025–1038. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx012>
- Ortiz-Espín, A., Locato, V., Camejo, D., Schiermeyer, A., De Gara, L., Sevilla, F., & Jiménez, A. (2015). Over-expression of Trxo1 increases the viability of tobacco BY-2 cells under H₂O₂ treatment. *Annals of Botany*, *116*(4), 571–582. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv076>
- Pantaleo, R., Scuffi, D., & García-Mata, C. (2021). Hydrogen sulphide as a guard cell network regulator. *New Phytologist*, *230*(2), 451–456. <https://doi.org/10.1111/nph.17113>
- Park, S., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Alfred, S. E., Bonetta, D., *et al.* (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*.

- 324(5930), 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/science.1173041>
- Passaia, G., Queval, G., Bai, J., Margis-Pinheiro, M., & Foyer, C. H. (2014). The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *65*(5), 1403–1413. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert486>
- Paulsen, C. E., & Carroll, K. S. (2013). Cysteine-mediated redox signaling : chemistry , biology , and tools for discovery. *Chemical. Reviews*, *113*(7), 4633–4679. [dx.doi.org/10.1021/cr300163e](https://doi.org/10.1021/cr300163e)
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniow, J., Alvarez, M. E., & Foyer, C. H. (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *139*(3), 1291–1303. <https://doi.org/10.1104/pp.105.067686>
- Pengo, N., Agrotis, A., Prak, K., Jones, J., & Ketteler, R. (2017). A reversible phospho-switch mediated by ULK1 regulates the activity of autophagy protease ATG4B. *Nature Communications*, *8*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00303-2>
- Pérez-Pérez, M. E., Florencio, F. J., & Crespo, J. L. (2010). Inhibition of target of rapamycin signaling and stress activate autophagy in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, *152*(4), 1874–1888. <https://doi.org/10.1104/pp.109.152520>
- Pérez-Pérez, M. E., Lemaire, S. D., & Crespo, J. L. (2016). Control of autophagy in *Chlamydomonas* is mediated through redox-dependent inactivation of the ATG4 protease. *Plant Physiology*, *172*(4), 2219–2234. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01582>
- Pérez-Pérez, M. E., Zaffagnini, M., Marchand, C. H., Crespo, J. L., & Lemaire, S. D. (2014). The yeast autophagy protease Atg4 is regulated by thioredoxin. *Autophagy*, *10*(11), 1953–1964. <https://doi.org/10.4161/auto.34396>
- Pérez-Ruiz, J. M., Spínola M. C., Kirchsteiger, K., Moreno, J., Sahrawy, M., Pe, J. M., & Cejudo, F. J. (2006). Rice NTRC Is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *The Plant Cell*, *18*(9), 2356–2368. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041541>
- Petrov, V., Hille, J., Mueller-Roeber, B., & Gechev, T. S. (2015). ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in Plant Science*, *6*(FEB), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00069>
- Phillips, A. R., Suttangkakul, A., & Vierstra, R. D. (2008). The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, *178*(3), 1339–1353. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086199>
- Picazo, C., Matallana, E., & Aranda, A. (2018). Yeast thioredoxin reductase Trr1p controls TORC1-regulated processes. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34908-4>
- Ponce, G., Corkidi, G., Eapen, D., Lledías, F., Cárdenas, L., & Cassab, G. (2017). Root hydrotropism and thigmotropism in *Arabidopsis thaliana* are differentially controlled by redox status. *Plant Signaling and Behavior*, *12*(4), 1–13. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1305536>

- Postiglione, A. E., & Muday, G. K. (2020). The role of ROS homeostasis in ABA-induced guard cell signaling. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00968>
- Pulido, P., Cazalis, R., & Cejudo, F. J. (2009). An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *Plant Journal*, *57*(1), 132–145. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03675.x>
- Pulido, P., Spinola, M. C., Kirchsteiger, K., Guinea, M., Pascual, M. B., Sahrawy, M., Sandalio, L. M., Dietz, K. F., González, M. C., & Cejudo, F. J. (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* *61*(14), 4043–4054. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq218>
- Radyuk, S. N., Michalak, K., Klichko, V. I., Benes, J., Rebrin, I., Sohal, R. S., Orr, W. C. (2009). Peroxiredoxin 5 confers protection against oxidative stress and apoptosis and also promotes longevity in *Drosophila*. *The Biochemical Journal*, *419*(2), 437–445. doi: 10.1042/BJ20082003
- Radyuk, S. N., Rebrin, I., Klichko, V. I., Sohal, B. H., Michalak, K., Benes, J., Sohal, R. S., & Orr, W. C. (2010). Mitochondrial peroxiredoxins are critical for the maintenance of redox state and the survival of adult *Drosophila*. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(12), 1892–1902. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.014>
- Reichheld, J., Bashandy, T., Siala, W., Riondet, C., Delorme, V., Meyer, A., & Meyer, Y. (2009). Redundancy and crosstalk within the thioredoxin and glutathione pathways: a new development in plants. *Advances in Botanical Research*, *52*, 2009, Pages 253–276 [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(10\)52009-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(10)52009-3)
- Reichheld, J. P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G., & Meyer, Y. (2007). Inactivation of thioredoxin reductases reveals a complex interplay between thioredoxin and glutathione pathways in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, *19*(6), 1851–1865. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050849>
- Reinholdt, O., Bauwe, H., Hagemann, M., & Timm, S. (2019). Redox-regulation of mitochondrial metabolism through thioredoxin *o1* facilitates light induction of photosynthesis. *Plant Signaling and Behavior*, *14*(12), 1–4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1674607>
- Reinholdt, O., Schwab, S., Zhang, Y., Reichheld, J., & Fernie, A. R. (2019). Redox-regulation of photorespiration through mitochondrial thioredoxin *o1*. *Plant Physiology*, *181*, 442–457. <https://doi.org/10.1104/pp.19.00559>
- Richter, A. S., Cejudo, F. J., Grimm, B., & Juan, M. P. (2018). Redox-control of chlorophyll biosynthesis mainly depends on thioredoxins. *FEBS Letters*, *592*, 3111–3115. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13216>
- Rose, T. L., Bonneau, L., Der, C., Marty-Mazars, D., & Marty, F. (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. *Biology of the Cell*, *98*(1), 53–67. doi: 10.1042/BC20040516.
- Rowe, J. H., Topping, J. F., Liu, J., & Lindsey, K. (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist*, *211*(1), 225–239.

<https://doi.org/10.1111/nph.13882>

- Rubio, S., Rodrigues, A., Saez, A., Dizon, M. B., Galle, A., Kim, T. H., Santiago, J., Flexas, J., Schroeder, J.I., Rodríguez, P. L. (2009). Triple loss of function of protein phosphatases type 2C leads to partial constitutive response to endogenous abscisic acid. *Plant Physiology*, *150*(3), 1345-1355. doi: 10.1104/pp.109.137174
- Sahrawy, M., Fernández-Trijueque, J., Vargas, P., & Serrato, A. J. (2022). Comprehensive expression analyses of plastidial thioredoxins of *Arabidopsis thaliana* indicate a main role of thioredoxin *m2* in roots. *Antioxidants*, *11*(7). <https://doi.org/10.3390/antiox11071365>
- Sánchez-Guerrero, A., Fernández, N., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Fernie, A. R., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2019). Coordinated responses of mitochondrial antioxidative enzymes , respiratory pathways and metabolism in *Arabidopsis thaliana* thioredoxin *trxo1* mutants under salinity. *Environmental and Experimental Botany*, *162*, 212–222. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.02.026>
- Sánchez-Guerrero, A., Nadal, M., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Vallarino, J. G., De Brasi-Velasco, S., Fernie, A. R., Flexas, J., Jiménez A., & Sevilla, F. (2021). Decreased levels of thioredoxin *o1* influences stomatal development and aperture but not photosynthesis under non-stress and saline conditions. *International Journal of Molecular Science*, 1–22.
- Sánchez-Guerrero, A., Nadal, M., Florez-Sarasa, I., Ribas-Carbó, M., Vallarino, J. G., De Brasi-Velasco, S., Fernie, A. R., Flexas, J., Jiménez, A., & Sevilla, F. (2021). Decreased levels of thioredoxin *o1* influences stomatal development and aperture but not photosynthesis under non-stress and saline conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(3), 1063. <https://doi.org/10.3390/ijms22031063>
- Santiago, J., Dupeux, F., Round, A., Antoni, R., Park, S. Y., Jamin, M., Cutler, S. R., Rodríguez, P. L., & Márquez, J. A. (2009). The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature*, *462*(7273), 665–668. <https://doi.org/10.1038/nature08591>
- Scherz-Shouval, R., & Elazar, Z. (2011). Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. *Trends in Biochemical Sciences*, *36*(1), 30–38. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.007>
- Scherz-shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., & Elazar, Z. (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO Journal*, *26*(7), 1749–1760. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601623>
- Schwarzländer, M., Fricker, M. D., & Sweetlove, L. J. (2009). Monitoring the in vivo redox state of plant mitochondria : Effect of respiratory inhibitors , abiotic stress and assessment of recovery from oxidative challenge. *Biochimica et Biophysica Acta* *1787*, 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.020>
- Scuffi, D., Álvarez, C., Laspina, N., Gotor, C., Lamattina, L., & García-Mata, C. (2014). Hydrogen sulfide generated by L-cysteine desulphydrase acts upstream of nitric oxide to modulate abscisic acid-dependent stomatal closure. *Plant Physiology*, *166*(4), 2065–2076. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245373>
- Seo, E., Woo, J., Park, E., Bertolani, S. J., Justin, B., Choi, D., Dinesh-Kumar, S. P.,

- Seo, E., Woo, J., Park, E., & Bertolani, S. J. (2016). Comparative analyses of ubiquitin-like ATG8 and cysteine protease ATG4 autophagy genes in the plant lineage and cross-kingdom processing of ATG8 by ATG4. *Autophagy*, *12*(11), 2054–2068. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1217373>
- Serrato, A. J., & Cejudo, F. J. (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, *217*(3), 392–399. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1009-4>
- Serrato, A. J., Crespo, J. L., Florencio, F. J., & Cejudo, F. J. (2001). Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Molecular Biology*, *46*(3), 361–371. <https://doi.org/10.1023/A:1010697331184>
- Serrato, A. J., Fernández-Trijueque, J., Barajas-López, J. de D., Chueca, A., & Sahrawy, M. (2013). Plastid thioredoxins: A ‘one-for-all’ redox-signaling system in plants. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00463>
- Serrato, A. J., Pérez-Ruiz, J. M., Spínola, M. C., & Cejudo, F. J. (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localised in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(42), 43821–43827. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404696200>
- Serrato, A. J., Rojas-González, J. A., Torres-Romero, D., Vargas, P., Mérida, Á., & Sahrawy, M. (2021). Thioredoxins m are major players in the multifaceted light-adaptive response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *108*(1), 120–133. <https://doi.org/10.1111/tpj.15429>
- Sevilla, F., Camejo, D., Ortiz-Espín, A., Calderón, A., Lázaro, J. J., & Jiménez, A. (2015a). The thioredoxin/peroxiredoxin/sulfiredoxin system: Current overview on its redox function in plants and regulation by reactive oxygen and nitrogen species. *Journal of Experimental Botany*, *66*(10), 2945–2955. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv146>
- Sevilla, F., Jiménez, A., & Lázaro J. J. (2015b). What do the plant mitochondrial antioxidant and redox systems have to say under salinity , drought , and extreme temperature ? In *Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress*, Gupta DK, Palma JM, Corpas FJ (Eds): pp. 23-55, Springer , <https://doi.org/10.1007/978-3-319-20421-5>
- Sevilla, F., López-Gorgé, J., & del Río, L. A. (1982). Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum* . *Plant Physiology*, *70*(5), 1321–1326. <https://doi.org/10.1104/pp.70.5.1321>
- Sevilla, F., Martí, C., & Jiménez, A. (2020). Thioredoxin network in plant mitochondria : cysteine S- posttranslational modifications and stress conditions. *Frontiers in Plant Science*, *11*, 1-20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.571288>
- Shaikhali, J., & Wingsle, G. (2017). Redox-regulated transcription in plants: Emerging concepts. *AIMS Molecular Science*, *4*(3), 301–338. <https://doi.org/10.3934/molsci.2017.3.301>
- Shao, F. Y., Du, Z. Y., Ma, D. L., Chen, W. B., Fu, W. Y., Ruan, B. B., Rui, W., Zhang, J. X., Wang, S., Wong, N. S., *et al.* (2015). B5, a thioredoxin reductase inhibitor,

- induces apoptosis in human cervical cancer cells by suppressing the thioredoxin system, disrupting mitochondrion-dependent pathways and triggering autophagy. *Oncotarget*, 6(31), 30939–30956. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5132>
- Sharp, R. E., & LeNoble, M. E. (2002). ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. *Journal of Experimental Botany*, 53(366), 33-37. PMID: 11741038
- Sherman, B. T., Hao, M., Qiu, J., Jiao, X., Baseler, M. W., Lane, H. C., Imamichi, T., & Chang, W. (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W216–W221. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac194>
- Shibata, N., Kagiya, M., Nakagawa, M., Hirano, Y., & Hakoshima, T. (2010). Crystallization of the plant hormone receptors PYL9/RCAR1, PYL5/RCAR8 and PYR1/RCAR11 in the presence of (+)-abscisic acid. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 66(4), 456–459. <https://doi.org/10.1107/S1744309110007037>
- Shivaraj, S. M., Vats, S., Bhat, J. A., Dhakte, P., Goyal, V., Khatri, P., Kumawat, S., Singh, A., Prasad, M., Sonah, H., Sharma, T. R., & Deshmukh, R. (2020). Nitric oxide and hydrogen sulfide crosstalk during heavy metal stress in plants. *Physiologia Plantarum*, 168(2), 437–455. <https://doi.org/10.1111/pp1.13028>
- Simonsen, A., Cumming, R. C., Brech, A., Isakson, P., Schubert, D. R., & Finley, K. D. (2008). Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy*, 4(2), 176–184. <https://doi.org/10.4161/auto.5269>
- Singh, A., Yadav, A. K., Kaur, K., Sanyal, S. K., Jha, S. K., Fernandes, J. L., Sharma, P., Tokas, I., Pandey, A., Luan, S., & Pandey, G. K. (2018). A protein phosphatase 2C, AP2C1, interacts with and negatively regulates the function of CIPK9 under potassium-deficient conditions in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69(16), 4003–4015. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery182>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1), 76-85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Sridharamurthy, M., Kovach, A., Zhao, Y., Zhu, J. K., Xu, H. E., Swaminathan, K., & Melcher, K. (2014). H₂O₂ inhibits ABA-signaling protein phosphatase HAB1. *PLoS ONE*, 9(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113643>
- Su, T., Li, X., Yang, M., Shao, Q., Zhao, Y., Ma, C., & Wang, P. (2020). Autophagy: An Intracellular Degradation Pathway Regulating Plant Survival and Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00164>
- Subramani, J., Kundumani-Sridharan, V., Hilgers, R. H. P., Owens, C., & Das, K. C. (2016). Thioredoxin uses a GSH-independent route to deglutathionylate endothelial nitric-oxide synthase and protect against myocardial infarction. *Journal of Biological Chemistry*, 291(45), 23374–23389. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.745034>

- Tada Y, Spoel SH, Pajeroska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, & Dong X. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science*, 321(5891), 952-956. doi: 10.1126/science.1156970
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Higuchi, T., Hillmer, S., Robinson, D. G., & Moriyasu, Y. (2011). Autophagy in tobacco BY-2 cells cultured under sucrose starvation conditions: Isolation of the autolysosome and its characterization. *Plant and Cell Physiology*, 52(12), 2074–2087. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcr137>
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K., & Moriyasu, Y. (2004). 3-Methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant and Cell Physiology*, 45(3), 265–274. <https://doi.org/10.1093/pcp/pch031>
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *Journal of Cell Biology*, 119(2), 301–312. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.2.301>
- Tang, J., & Bassham, D. C. (2018). Autophagy in crop plants: What's new beyond Arabidopsis? *Open Biology*, 8(12). <https://doi.org/10.1098/rsob.180162>
- Tovar-Méndez, A., Matamoros, M. A., Bustos-Sanmamed, P., Dietz, K. J., Cejudo, F. J., Rouhier, N., Sato, S., Tabata, S., & Becana, M. (2011). Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume lotus japonicus. *Plant Physiology*, 156(3), 1535–1547. <https://doi.org/10.1104/pp.111.177196>
- Traverso, J. A., Vignols, F., Cazalis, R., Serrato, A. J., Pulido, P., Sahrawy, M., Meyer, Y., Cejudo, F. J., & Chueca, A. (2008). Immunocytochemical localization of Pisum sativum TRXs f and m in non-photosynthetic tissues. *Journal of Experimental Botany*, 59(6), 1267–1277. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern037>
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Ullah, A., Bano, A., & Khan, N. (2021). Climate change and salinity effects on crops and chemical communication between plants and plant growth-promoting microorganisms under stress. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5(June), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.618092>
- Üstün, S., Hafrén, A., & Hofius, D. (2017). Autophagy as a mediator of life and death in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 40, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.08.011>
- Vanstraelen, M., & Benkov, E. (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 28, 463–487. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741>
- Voitsekhovskaja, O. V., Schiermeyer, A., & Reumann, S. (2014). Plant peroxisomes are degraded by starvation-induced and constitutive autophagy in tobacco BY-2 suspension-cultured cells. *Frontiers in Plant Science*, 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00629>
- Wang, P., Fang, H., Gao, R., & Liao, W. (2021). Protein persulfidation in plants: Function and mechanism. *Antioxidants*, 10(10), 1–18.

<https://doi.org/10.3390/antiox10101631>

- Wang, P., Zhao, Y., Li, Z., Hsu, C. C., Liu, X., Fu, L., Hou, Y. J., Du, Y., Xie, S., Zhang, C., *et al.* (2018). Reciprocal regulation of the TOR kinase and ABA receptor balances plant growth and stress response. *Molecular Cell*, *69*(1), 100–112.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002>
- Wang, Q., Wang, X. L., Liu, H. R., Rose, P., & Zhu, Y. Z. (2010). Protective effects of cysteine analogues on acute myocardial ischemia: Novel modulators of endogenous H₂S production. *Antioxidants and Redox Signaling*, *12*(10), 1155–1165. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2947>
- Waszczak, C., Akter, S., Eeckhout, D., Persiau, G., Wahni, K., Bodra, N., Van Molle, I., De Smet, B., Vertommen, D., Gevaert, K., *et al.*, (2014). Sulfenome mining in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(31), 11545–11550. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411607111>
- Waszczak, C., & Carmody, M. (2018). Reactive oxygen species in plant signaling. *Annual Review of Plant Biology*. *69*:209-236. [10.1146/annurev-arplant-042817-040322](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040322)
- Wedmann, R., Onderka, C., Wei, S., Szi­jártó, I. A., Miljkovic, J., Femic, A., Lange, M., Savitsky, S., Kumar, P., Torregrossa, R., *et al.* (2016). *Chemical Science*, *7*(5), 1–35. doi: 10.1039/C5SC04818D.
- Woo, J., Park, E., & Dinesh-Kumar, S. P. (2014). Differential processing of Arabidopsis ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(2), 863–868. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318207111>
- Wurzinger, B., Mair, A., Fischer-Schrader, K., Nukarinen, E., Roustan, V., Weckwerth, W., & Teige, M. (2017). Redox state-dependent modulation of plant SnRK1 kinase activity differs from AMPK regulation in animals. *FEBS Letters*, *591*(21), 3625–3636. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12852>
- Xiong, Y., Contento, A. L., & Bassham, D. C. (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, *42*(4), 535–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02397.x>
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., & Bassham, D. C. (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in arabidopsis. *Plant Physiology*, *143*(1), 291–299. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092106>
- Xu, W., Jia, L., Shi, W., Liang, J., Zhou, F., Li, Q., & Zhang, J. (2013). Abscisic acid accumulation modulates auxin transport in the root tip to enhance proton secretion for maintaining root growth under moderate water stress. *New Phytologist*, *197*(1), 139–150. <https://doi.org/10.1111/nph.12004>
- Yadav P., K., Vitvitsky, V., Carballal, ., Seravalli, J., & Banerjee, R. (2020). Thioredoxin regulates human mercaptopyruvate sulfurtransferase at physiologically-relevant concentrations. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(10), 6299–6311. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012616>

- Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 781-803. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>
- Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., & Hisabori, T. (2004). *Target Proteins of the Cytosolic Thioredoxins in Arabidopsis thaliana*. 45(1), 18–27.
- Yang, J. F., Chen, M. X., Zhang, J., Hao, G. F., & Yang, G. F. (2021). Structural dynamics and determinants of abscisic acid-receptor binding preference in different aggregation states. *Journal of Experimental Botany*, 72(13), 5051–5065. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab178>
- Yang, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nature Cell Biology*, 12(9), 814–822. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-814>
- Yano, K., Suzuki, T., & Moriyasu, Y. (2007). Constitutive autophagy in plant root cells. *Autophagy*, 3(4), 360–362. <https://doi.org/10.4161/auto.4158>
- Yoshida, K., Hara, A., Sugiura, K., Fukaya, Y., & Hisabori, T. (2018). Thioredoxin-like2/2-Cys peroxiredoxin redox cascade supports oxidative thiol modulation in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(35), E8296-E8304. <https://doi.org/10.1073/pnas.1808284115>
- Yoshida, K., & Hisabori, T. (2016). Two distinct redox cascades cooperatively regulate chloroplast functions and sustain plant viability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27), E3967-E3976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604101113>
- Yoshida, K., Noguchi, K., Motohashi, K., & Hisabori, T. (2013). Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant & Cell Physiology*, 54(6), 875–892. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct037>
- Yoshimoto, K., & Ohsumi, Y. (2018). Unveiling the molecular mechanisms of plant autophagy-from autophagosomes to vacuoles in plants. *Plant and Cell Physiology*, 59(7), 1337–1344. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy112>
- Yu, L-X., Zhang, C-J., Shang, H-Q., Wang, X-F., Wei, M., Yang, F-J., & Shi, Q-H. (2013). Exogenous hydrogen sulfide enhanced antioxidant capacity, amylase activities and salt tolerance of cucumber hypocotyls and radicles. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(3), 445–456. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(13\)60245-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(13)60245-2)
- Yu, Z. Q., Ni, T., Hong, B., Wang, H. Y., Jiang, F. J., Zou, S., Chen, Y., Zheng, X. L., Klionsky, D. J., Liang, Y., & Xie, Z. (2012). Dual roles of Atg8 - PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy*, 8(6), 883–892. <https://doi.org/10.4161/auto.19652>
- Zannini, F., Roret, T., Przybyla-Toscano, J., Dhalleine, T., Rouhier, N., & Couturier, J. (2018). Mitochondrial *Arabidopsis thaliana* TRXo isoforms bind an iron-sulfur cluster and reduce NFU proteins in vitro. *Antioxidants*, 7(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/antiox7100142>
- Zechmann, B. (2014). Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 5, 566.

- <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00566>
- Zhang, J. (2013). Autophagy and mitophagy in cellular damage control. *Redox Biology*, 1(1), 19-23. doi: 10.1016/j.redox.2012.11.008.
- Zhang, J. (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- Mechanisms and experimental approaches. *Redox Biology*, 4, 242–259. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.003>
- Zhang, H., Tang, J., Liu, X-P., Wang, Y., Yu, W., Peng, W-P., Fang, F., Ma, D-F., Wei, Z-J., & Hu, L-Y. (2009). Hydrogen sulfide treatment promotes root organogenesis in *Ipomoea batatas*, *Salix matsudana* and *Glycine max*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 51(12), 1086-1094. doi: 10.1111/j.1744-7909.2009.00885.x.
- Zhang, J., Zhou, M., Zhou, H., Zhao, D., Gotor, C., Romero, L. C., Shen, J., Ge, Z., Zhang, Z., Shen, W., Yuan, X., & Xie, Y. (2021). Hydrogen sulfide, a signaling molecule in plant stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 146–160. <https://doi.org/10.1111/jipb.13022>
- Zhang, T., Zhu, M., Zhu, N., Strul, J. M., Dufresne, C. P., Schneider, J. D., Harmon, A. C., & Chen, S. (2016). Identification of thioredoxin targets in guard cell enriched epidermal peels using cystTMT proteomics. *Journal of Proteomics*, 133, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.12.008>
- Zhang, X., Zhang, Q., Xin, Q., Yu, L., Wang, Z., Wu, W., Jiang, L., Wang, G., Tian, W., Deng, Z., *et al.* (2012). Complex structures of the abscisic acid receptor PYL3 / RCAR13 reveal a unique regulatory mechanism. *Structure*, 20(5), 780–790. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.02.019>
- Zhao, Y., Zhang, Z., Gao, J., Tao, W. A., Bressan, R. A., Zhu, J., Zhao, Y., Zhang, Z., Gao, J., Wang, P., *et al.* (2018). Arabidopsis duodecuple mutant of PYL ABA receptors reveals PYL repression of ABA-independent SnRK2 activity. *Cell Reports*, 23(11), 3340-3351. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.044>
- Zhou, H., Chen, Y., Zhai, F., Zhang, J., Zhang, F., Yuan, X., & Xie, Y. (2020). Hydrogen sulfide promotes rice drought tolerance via reestablishing redox homeostasis and activation of ABA biosynthesis and signaling. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 213–220. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.07.038>
- Zhou, J., Yao, K., Zhang, Y., Chen, G., Lai, K., Yin, H., & Yu, Y. (2016). Thioredoxin binding protein-2 regulates autophagy of human lens epithelial cells under oxidative stress via inhibition of Akt phosphorylation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 4856431. <https://doi.org/10.1155/2016/4856431>
- Zhou, X. M., Zhao, P., Wang, W., Zou, J., Cheng, T. H., Peng, X. B., & Sun, M. X. (2015). A comprehensive, genome-wide analysis of autophagy-related genes identified in tobacco suggests a central role of autophagy in plant response to various environmental cues. *DNA Research*, 22(4), 245–257. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv012>
- Zhu, C. Q., Zhang, J. H., Sun, L. M., Zhu, L. F., Abliz, B., Hu, W. J., Zhong, C., Bai, Z. G., Sajid, H., Cao, X. C., & Jin, Q. Y. (2018b). Hydrogen sulfide alleviates aluminum toxicity via decreasing apoplast and symplast al contents in rice. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00294>

Zhu, T., Zou, L., Li, Y., Yao, X., Xu, F., Deng, X., Zhang, D., & Lin, H. (2018a). Mitochondrial alternative oxidase-dependent autophagy involved in ethylene-mediated drought tolerance in *Solanum lycopersicum*. *Plant Biotechnology Journal*, *16*(12), 2063–2076. <https://doi.org/10.1111/pbi.12939>

ANEXO

1. ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Página 54
Líneas de *A. thaliana* utilizadas en esta Tesis.
- **Tabla 2.** Página 55
Solución Hoagland completa.
- **Tabla 3.** Página 58
Oligonucleótidos usados para el genotipado.
- **Tabla 4.** Página 61
Composición de la solución nutritiva para guisantes Boneville.
- **Tabla 5.** Página 76
Parejas de oligonucleótidos utilizadas para amplificar por PCR los fragmentos de los genes *PsNTRB* y *PsTRXo1* a partir de ADNc de guisante Bonneville *wild type* para clonarlos dentro del vector pGem[®]T-Easy. Pág. 76
- **Tabla 6.** Página 78
Oligonucleótidos diseñados para la generación de construcciones modificadas de la proteína PYR1 etiquetadas con cola de polihistidina y cambios de Cys a Ser mediante PCR y mutagénesis dirigida para la posterior transformación de *E. coli* con las construcciones mutagenizadas (C30S, C65S, C77S) y expresión de las proteínas recombinantes que luego fueron purificadas mediante Cromatografía de afinidad en matrices de Níquel.
- **Tabla 7.** Página 81
Plásmidos utilizados en VIGS. Pág. 81
- **Tabla 8.** Página 87
Oligonucleótidos utilizado en la expresión génica en células de *N. tabacum*.
- **Tabla 9.** Página 88
Oligonucleótidos utilizados en la expresión génica en *A. thaliana*.
- **Tabla 10.** Página 89
Oligonucleótidos utilizados para cuantificar la expresión génica relativa en las muestras de las plantas de *P. sativum* transformadas mediante VIGS.
- **Tabla 11.** Página 95
Anticuerpos primarios empleados.
- **Tabla 12.** Página 96
Anticuerpos secundarios empleados conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) o Alexa-Fluor 568.

- **Tabla 13.** Página 145
Análisis de la presencia de puentes disulfuro (-S-S-) en la proteína recombinante HisAtPYR1 tras su tratamiento con el reductor DTT, el oxidante (H₂O₂) y el marcador de grupos sulfénicos dimedona + H₂O₂, identificando los residuos de cisteína (Cys) involucrados. Pág. 145
- **Tabla 14.** Páginas 163 y 164
Proteínas persulfuradas diferencialmente en el genotipo KO1 respecto al WT en condición control, clasificadas como mitocondriales o nucleares.
- **Tabla 15.** Páginas 165 y 166
Proteínas persulfuradas diferencialmente en el genotipo KO2 respecto al WT en condición control, clasificadas como mitocondriales o nucleares.
- **Tabla 16.** Páginas 167-169
Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales y nucleares en el genotipo WT.
- **Tabla 17.** Páginas 169-172
Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales en el genotipo mutante KO1 Attrxo1.
- **Tabla 18.** Página 171 y 172
Efecto de la salinidad en las proteínas persulfuradas clasificadas como mitocondriales en el genotipo mutante KO2 Attrxo1. Pág.
- **Tabla 19.** Páginas 173 y 174
Proteínas persulfuradas diferencialmente en los genotipos KO1/KO2 respecto al WT en condición salina, clasificadas como mitocondriales y nucleares.

2. ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** (Página 12)
Producción de ROS durante la reducción del oxígeno a agua.
- **Figura 2.** (Página 13)
Efecto del estrés abiótico en plantas.
- **Figura 3.** (Página 14)
Sistemas de generación de ROS en plantas.
- **Figura 4.** (Página 15)
Sistemas de control de ROS en plantas.
- **Figura 5.** (Página 16)
Control de la respuesta de plantas a estreses bióticos y abióticos.
- **Figura 6.** (Página 17)
Rutas de generación y eliminación de H₂S en plantas.
- **Figura 7.** (Página 19)
Estados de oxidación de residuos de cisteína.
- **Figura 8.** (Página 20)
Estados de *S*-glutacionilación y *S*-nitrosilación de residuos de cisteína.
- **Figura 9.** (Página 20)
Estados de persulfuración de residuos de cisteína.
- **Figura 10.** (Página 22)
Estructura tridimensional de TRX.
- **Figura 11.** (Página 23)
Mecanismo acción y regeneración de TRX.
- **Figura 12.** (Página 24)
Familia génica TRX en plantas.
- **Figura 13.** (Página 29)
Iniciación y progreso de la autofagia en plantas.
- **Figura 14.** (Página 32)
Efecto del tratamiento oxidativo en células TBY-2.
- **Figura 15.** (Página 33)
Proceso autofágico en células TBY-2 en respuesta a un tratamiento oxidativo, su posible relación con viabilidad celular e implicación de TRX₀₁ en el mismo a través de la regulación de ATG4.

- **Figura 16.** (Página 34)
Ruta de señalización de ABA.
- **Figura 17.** (Página 37)
Regulación redox de PYR1 mediada por *TRXo1* y su implicación en procesos dependientes de ABA como son el crecimiento de raíz y el cierre estomático, analizados en mutantes KO y sobreexpresantes (OEX) *Attrxo1*.
- **Figura 18.** (Página 39)
Persulfuración proteica y su posible papel protector en sobreoxidación.
- **Figura 19.** (Página 40)
Estudio de patrones de persulfuración proteica en mutantes KO y sobreexpresantes OEX *Attrxo1* crecidos en condiciones de salinidad.
- **Figura 20.** (Página 41)
Obtención de dobles mutantes *Psntnb/trxo1* y *Attrxo1/ntrb* por técnicas VIGS y cruzamiento de mutantes simples.
- **Figura 21.** (Página 58)
Esquema general de la inserción de ADN-T en el genoma, interrumpiendo la lectura correcta del gen.
- **Figura 22.** (Página 59)
Imágenes tomadas en la realización de los cruces *Attrxo1 x Atntrb* para la obtención de dobles mutantes de pérdida de función mediante líneas SALK con inserción de ADN-T.
- **Figura 23.** (Página 77)
Estructura en 3D de PYR1 en su forma tetramérica.
- **Figura 24.** (Página 78)
Vector pETM11 utilizado para generar construcciones para transformar células BL21.
- **Figura 25.** (Página 79)
Vector pGem[®]T-Easy utilizado para el primer paso de clonación en *E. coli* cepa DH10B.
- **Figura 26.** (Página 81)
Descripción de los vectores pCAPE1, pCAPE2 y pCAMBIA-1300.
- **Figura 27.** (Página 111)
Esquema resumen del tratamiento de las muestras para analizar la persulfuración (P-SSH).
- **Figura 28.** (Página 115)
Comprobación de la transformación GFP/*PsTRXo1* en células TBY-2.

- **Figura 29.** (Página 116)
Viabilidad celular de la línea TBY-2 no sobreexpresante (GFP control) y dos líneas sobreexpresantes *PsTRXo1* (OEX1 y OEX2) sin tratar y tratadas con 35 mM H₂O₂.
- **Figura 30.** (Página 117)
Peso fresco del cultivo de la línea TBY-2 no sobreexpresante (GFP control) y dos líneas sobreexpresantes *PsTRXo1* (OEX1 y OEX2) en ausencia y tras el tratamiento con 35 mM H₂O₂.
- **Figura 31.** (Página 118)
Viabilidad celular de las líneas TBY-2 control no sobreexpresante (GFP) y sobreexpresantes de *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de los inhibidores de autofagia E-64d y 3-MA.
- **Figura 32.** (Página 119)
Viabilidad celular de las líneas TBY-2 transformadas *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) 48 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia de los inhibidores de la autofagia E-64d y E-64 más 3-MA.
- **Figura 33.** (Página 120)
Viabilidad celular de la línea TBY-2 transformada con *PsTRXo1* (OEX1) 24 horas y 48 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂ en ausencia y presencia del inhibidor de la autofagia 3-MA.
- **Figura 34.** (Página 121)
Expresión del gen *ATG8a* y contenido en proteínas ATG8 en la línea TBY-2 no sobreexpresante GFP y dos líneas sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) en el día 6 de crecimiento y 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂.
- **Figura 35.** Página 122
Expresión del gen y contenido en proteínas ATG4 en la línea TBY-2 no sobreexpresante GFP y dos líneas sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1 y OEX2) en el día 6 de crecimiento y 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂
- **Figura 36.** Página 123
Contenido de proteínas ATG4.
- **Figura 37.** Página 123
Alineamiento de parte de las secuencias de NtATG4 y CrATG4B.
- **Figura 38.** Página 124
Modelado de la proteína ATG4 de tabaco.
- **Figura 39.** Página 125
Actividad de procesamiento de ATG4 endógeno de la línea control GFP y dos líneas de TBY-2 sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX).

- **Figura 40.** Página 126
Experimento control para la actividad de procesamiento de ATG4 endógeno de la línea *Pstrxo1* (OEX1) 24 horas después del tratamiento con 35 mM H₂O₂.
- **Figura 41.** Página 127
Visualización de la formación de estructuras similares a autolisosomas inducidas por H₂O₂ en células de tabaco BY-2 control GFP.
- **Figura 42.** Página 128
Visualización de la formación de estructuras similares a autolisosomas inducidas por H₂O₂ en células sobreexpresantes (OEX1) *Pstrxo1*.
- **Figura 43.** Página 129
Visualización de la formación de estructuras similares a autolisosomas.
- **Figura 44.** Página 130
Inmunodetección de ATG8 en células TBV-2 sobreexpresantes *Pstrxo1* OEX1 tratadas con 35 mM H₂O₂.
- **Figura 45.** Página 131
Cuantificación de ATG8 después del análisis de inmunofluorescencia.
- **Figura 46.** Página 132
Viabilidad celular de la línea GFP control no sobreexpresante y las líneas sobreexpresante *Pstrxo1* TBV-2 OEX1 y OEX2.
- **Figura 47.** Página 133
Viabilidad celular de la línea GFP control no sobreexpresante y las líneas sobreexpresante *Pstrxo1* TBV-2 OEX1 y OEX2.
- **Figura 48.** Página 134
Visualización de la formación de autolisosomas inducida por H₂O₂ en células de tabaco BY-2 no sobreexpresantes GFP control y sobreexpresantes *Pstrxo1* (OEX1).
- **Figura 49.** Página 136
Análisis *Dot blot* representativo de la interacción entre las proteínas recombinantes PsTRXo1 y HsATG4.
- **Figura 50.** Página 137
Transferencia *Western blot* de la co-inmunoprecipitación resultante entre las proteínas recombinantes His-HsATG4B y PsTRXo1 reveladas con anti-histidina y anti-PsTRXo1 después de una extracción suave.
- **Figura 51.** Página 138
Western blot del resultado de la Co-IP entre las proteínas recombinantes His-HsATG4B y PsTRXo1.

- **Figura 52.** Página 139
Regulación de la actividad de ATG4 por oxidación y reducción.
- **Figura 53.** Página 140
Regulación de la actividad de ATG4 por oxidación y reducción por el sistema TRXo1.
- **Figura 54.** Página 142
Tratamientos redox de PYR1.
- **Figura 55.** Página 143
Reducción de PYR1 por el sistema tiorredoxina.
- **Figura 56.** Página 143
Secuencia aminoacídica de AtPYR1 y modelización de la estructura 3D.
- **Figura 57.** Página 144
Tratamientos redox de la proteína HisAtPYR1 recombinante.
- **Figura 58.** Página 146
Modelo de la estructura 3D de PYR1.
- **Figura 59.** Página 146
Producción de proteínas recombinantes HisAtPYR1 mutadas en distintas cisteínas.
- **Figura 60.** Página 147
Tratamientos redox de las proteínas recombinantes HisAtPYR1 y las mutadas en las diferentes cisteínas.
- **Figura 61.** Página 149
Actividad fosfatasa de HAB1.
- **Figura 62.** Página 151
Análisis *Western blot* para la detección *in vivo* de PYR1 en condiciones reductoras y oxidantes.
- **Figura 63.** Página 152
Ensayo de movilidad redox para la detección de puentes disulfuro en PYR1.
- **Figura 64.** Página 153
Modelo de la estructura 3D de PYR1.
- **Figura 65.** Página 154
Análisis de la sobreexpresión génica y de proteína AtTRXo1.
- **Figura 66.** Página 155
Análisis *Western blot* para la detección de PYR1 en extractos foliares.

- **Figura 67.** Página 156
Análisis *Western blot* para la detección de PYR1 en extractos foliares.
- **Figura 68.** Página 157
Crecimiento de la raíz en respuesta a ABA.
- **Figura 69.** Página 158
Respuesta estomática en ausencia y presencia de ABA.
- **Figura 70.** Página 159
Plantas utilizadas para los ensayos de persulfuración.
- **Figura 71.** Página 159
Detección de proteínas persulfuradas tras SDS-PAGE.
- **Figura 72.** Página 160
Número de proteínas persulfuradas en los distintos genotipos crecidos en condición salina.
- **Figura 73.** Página 161
Clasificación funcional de proteínas persulfuradas.
- **Figura 74.** Página 162
Plantas utilizadas en un segundo ensayo de persulfuración.
- **Figura 75.** Página 176
Secuencias para el gen *PsNTRB* proporcionadas en *Pulse Crop Database*.
- **Figura 76.** Página 177
Secuencia consenso para *PsNTRB* tras alineamiento en Multalin de las secuencias obtenidas en *Pulse Crop Database*.
- **Figura 77.** Página 178
Secuencia consenso para el gen *PsTRXo1*.
- **Figura 78.** Página 178
Electroforesis horizontal de los fragmentos de ADN amplificados por PCR con los dos sets de oligonucleótidos para NTRB junto a los controles negativos de PCR.
- **Figura 79.** Página 179
Migración en gel de agarosa 1% (p/v) de las digestiones de los plásmidos obtenidos de las colonias positivas para la transformación.
- **Figura 80.** Página 180
Digestión y migración en gel de las construcciones dobles pCAPE2-*PsNTRB*-*PsTRXo1* escindidas del vector pGEM[®]-T Easy que posteriormente fueron comprobadas por secuenciación Sanger.

- **Figura 81.** Página 181
Alineamiento en CLUSTAL para comprobar la secuencia de la construcción doble *PsNTRB-TRXo1*.
- **Figura 82.** Página 182
Agroinfiltración de plantas de guisante variedad Bonneville.
- **Figura 83.** Página 183
Control positivo con la construcción pCAPE2-*PDS* indicativo del inicio de la virulencia de la cepa.
- **Figura 84.** Página 185
Genotipado por PCR de la generación F₁ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*.
- **Figura 85.** Página 185
Genotipado por PCR de la generación F₂ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*.
- **Figura 86.** Página 186
Plantas de la generación F₂ crecidas en cultivo *in vitro*.
- **Figura 87.** Página 187
Genotipado por PCR de la generación F₃ de las líneas dobles mutantes de *A. thaliana trxo1/ntrb*.

