



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE BIOLOGÍA

Caracterización Funcional de la Tiorredoxina Trx01 de  
*Pisum Sativum* y *Arabidopsis Thaliana*.  
Estudio en Germinación y bajo Condiciones Inductoras  
de Estrés Oxidativo

**Dña. Ana María Ortiz Espín**  
**2015**





“Caracterización funcional de la tiorredoxina Trxo1 de  
*Pisum sativum* y *Arabidopsis thaliana*.  
Estudio en germinación y bajo condiciones inductoras  
de estrés oxidativo”

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

Ana María Ortiz Espín

Directoras:

Dra. Francisca Sevilla Valenzuela

Dra. Ana María Jiménez Hurtado

Dra. Daymi Mercedes Camejo López



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

- Análisis y caracterización funcional de nuevos sistemas de regulación redox cloroplastídicos, mitocondriales y nucleares y su implicación en el estrés oxidativo y nitrosativo. Entidad financiadora: MICINN-FEDER (Ref: BFU 2008-00745). IP: Francisca Sevilla.
- Identificación de procesos biológicos determinantes de la tolerancia a estreses abióticos y de la calidad final del fruto de especies de interés agronómico. Entidad financiadora: Fundación Séneca (Ayuda a Grupos de Excelencia de la Región de Murcia) (Ref: 07743/GERM/07) IP: Francisca Sevilla.
- Papel del sistema tiorredoxina/peroxirredoxina/sulfirredoxina de cloroplastos, mitocondrias y núcleo en procesos de S-nitrosilación, S-glutationalización y señalización redox. Entidad financiadora: MICINN (Ref: BFU2011-28716). IP: Ana Jiménez Hurtado.

La firmante del presente trabajo de Tesis ha disfrutado de una beca predoctoral del Programa de Formación del Personal Investigador (FPI) (Ministerio de Economía y Competitividad).

Este trabajo ha sido presentado en los siguientes congresos:

- **Ortiz-Espín A**, Iglesias-Fernández R, Calderón A, Martínez-Alcalá I, Camejo D, Sevilla F, Carbonero P, Jiménez A. (2013). *Cis-*, *trans-*, transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* gene *AtTrxo1* and its response upon germination and to salt stress. VIII Reunión del Grupo de Investigación en Radicales Libres (GEIRLI). Valencia. Presentado en comunicación oral.
- **Ortiz-Espín A**, Iglesias-Fernández R, Calderón A, Martínez-Alcalá I, Camejo D, Sevilla F, Carbonero P, Jiménez A. (2013). *Cis-*, *trans-*, transcriptional regulation of the *Arabidopsis thaliana* gene *AtTrxo1* and its response upon germination and to salt stress. XI Congreso internacional del POG (Plant Oxygen Group): especies reactivas del oxígeno y el nitrógeno en vegetales, Varsovia, Polonia (2013). Obtención del 1º premio al mejor Póster de científico joven.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones:

- **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 TBX-2 cells under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. *Annals of Botany* (Aceptado).
- Sevilla F, Camejo D, **Ortiz-Espín A**, Calderón A, Lázaro JJ, Jiménez A (2015). Thioredoxin/Peroxiredoxin/Sulfiredoxin system: current overview on its redox function in plants and regulation by ROS and RNS. *Journal of Experimental Botany*. (Aceptado)

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a todas las personas que me han acompañado, ayudado y facilitado el trabajo durante la realización de esta tesis doctoral, porque sin ellos este camino hubiera sido mucho más arduo. Cada uno de ellos me ha aportado algo nuevo y diferente que merece la pena ser destacado.

Primeramente, me gustaría agradecer a mis directoras de tesis, a la Dra. Fca. Sevilla y Dra. Ana Jiménez por haberme permitido realizar la tesis doctoral en su departamento y haberme dirigido y asesorado durante esta larga etapa. Por haber velado porque tuviera una tesis multidisciplinar y haberme permitido adquirir diversos conocimientos científicos en distintos laboratorios y congresos. Además, me gustaría valorar también sus cualidades científicas como, su rigor, coherencia y amplios conocimientos que me han ayudado a realizar esta investigación. También me gustaría agradecer a mi codirectora, la Dra. Daymi Camejo por su apoyo científico durante esta etapa.

A los principales colaboradores de mis estancias, el laboratorio de Laura de Gara en Roma y Pilar Carbonero en Madrid, gracias por vuestra hospitalidad y vuestra ayuda científica que sin lugar a dudas han contribuido a la realización de esta tesis. Particularmente a la Dr. Vitoria Locato y Dr. Valentina Pascualetti por su ayuda en el laboratorio durante mi estancia en Roma y a Raquel Iglesias por su entrega, consejo y apoyo durante mi estancia en Madrid.

A mis compañeros de laboratorio, a Sandrica, por su talante, su comprensión y su saber hacer, a Aingeru por su importante ayuda en el laboratorio y su ingenio para arreglar cualquier cosa y al ex-compañero Omar, por esa gracia de mejicano que tan agradables hacía los momentos en el labo. A los Alfocea's lab. A Lala por su asesoramiento científico, a las Cristinas y a la Puerto por esa chispa y a Ascen porque es una *Mari Fé de Triana* auténtica y valiente y una amiga excepcional y concluyendo a todos ellos, porque con su expresividad y buena onda son capaces de alegrarle el día a cualquiera. A mis compañeros de las otras plantas, principalmente a Felix y Vito que hicieron que esas despedidas en barbacoa montañera pasaran a la posteridad. A los compañeros que han sido coetáneos de doctorado:

Mari Jose, Carmen, Irene y Pepa por esos momentos “comedor”. A las limpiadoras Mari e Irene, por esos cafes con dulces y ese “cómo te va?” de cada día. Saber que al menos estaban ellas cuando el CEBAS ya estaba vacío me reconfortaba gratamente. Además, me gustaría valorar especialmente a Irene por compartir conmigo su maravilloso mundo artístico y por hacerme ver que la ciencia y el arte pueden estar estrechamente unidas.

A mis amigos, a Carmen por estar siempre al otro lado, a Antoñico, Willy, Sonia y Agus por esas salidas de copas y *fitness* tan divertidas. A mi amigo Juanma, por saber condensar tantos meses de sabiduría en unas pocas visitas. A mi amigo Jose por esas conversaciones *cabalescas*. A mi buen amigo Cebrián por su importante apoyo logístico y moral en los últimos meses de la tesis. A todos ellos gracias por haberme hecho todos estos momentos más agradables.

A mi hermanico y a Cristina por esas comiditas *low cost* de tres estrellas Michelin, por esa presteza en la resolución de cualquier problema o inconveniencia y esa facilidad para hacer las cosas fáciles. Y por supuesto a mis padres, pilar fundamental de mi carrera sin cuyo apoyo, entrega, cariño y ayuda jamás hubiera llegado hasta aquí.

*"I think it's human nature to want to explore.*

*Find your line and go beyond it.*

*The only limit is the one you set yourself."*

***A mis padres,***

***Margarita y Pedro***



## Abreviaturas

**1HYB:** one-hybrid

**3-AT:** 3-amino-1,2,4-triazol

**ABRE:** ABA-responsive element

**AD:** Activation domain

**AL-PCD:** Apoptosis-like programmed cell death

**APX:** Ascorbato peroxidasa

**AR:** After-Ripening

**ARE:** Antioxidant responsive element

**ASC:** Ascorbato reducido

**ATP:** Adenosín trifosfato

**AZF2:** Arabidopsis zinc finger transcription factor

**Bax:** Bcl-2 member of TF

**BD:** Binding domain

**BHLH:** Basic helix-loop-helix TF

**BLAST:** Basic local Alingment

**BZIP:** Basic Leucine Zipper Domain TF

**C2C2:** DNA binding 1 finger TF

**C2H2:** Cysteine2-Histidine2 zinc finger

**CAD:** Cistenil-Aspartate specific DNase

**Cat:** Catalasa

**CaVm:** Virus del Mosaico de la coliflor

**CCA1:** Circadian clock associated1 TF

**Cdk:** Cyclin dependent kinase

**Citc:** Citocromo c

**CTE:** Cadena de transporte electrónico

**DAF:** Diamino-fluoresceína

**Dapi:** 4',6-diamidino-2-phenylindole

**DEPC:** Dietilpirocarbonato

**DHA:** Deshidroascorbato

**DHAR:** Deshidroascorbato reductasa

**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DOB:** Base drop-out  
**DOF7:** DOF domain zinc finger TF  
**DRE:** Dehydration-responsive element  
**Ee:** Evening element  
**ERF:** Factor de respuesta a etileno  
**FLP:** Fructokinase-like protein  
**GFP:** Green fluorescent protein  
**GR:** Glutathión reductasa  
**Grx:** Glutarredoxina  
**GSH:** Glutathión reducido  
**GSSG:** Glutathión oxidado  
**GUS:** Glucuronidase  
**HSP:** proteína de choque térmico  
**IPTG:** Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido  
**KO:** Mutante Knock Out  
**MAPK:** Mitogen-activated protein kinase  
**MDA:** Malondialdeído  
**MDHA:** Monodeshidroascorbato  
**MDHAR:** Monodeshidroascorbato reductasa  
**MES:** Tampón ácido 2-(N-morpholino)ethanesulfónico  
**MSMO:** Murashige Skoog Minimal Organics  
**MYB:** Mieloblastosis transcription factor  
**NAC:** NAC domain  
**NAD/NADH:** Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada/reducida  
**NADP/NADPH:** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada/reducida  
**Nf- $\kappa$ B:** Factor nuclear kappa  $\beta$   
**NIB:** Nuclear Isolation Buffer  
**Nrx:** Nucleorredoxinas  
**Prx:** Peroxirredoxina  
**PCD:** Programmed cell death  
**PDI:** Disulfuro isomerasa

**PEG:** Polietilenglicol

**PP2C:** Protein Phosphatase 2C

**ROS:** Reactive oxygen species

**RP-LP:** right border/left border primers

**RTqPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

**SAUR:** RNA “Small Auxin-up”

**SnRK2:** Kinase related to sugar cane

**SOD:** Superóxido dismutasa

**STZ:** ZPT2-related protein

**TAE:** tampón Tris-Acetato EDTA

**TBST:** Tampón Tris salino y Tween

**TBY-2:** Tobacco Bright Yellow-2

**TCP:** Teosinte branched1-Cycloidea proliferating factor

**TDX:** Dominio tetratricopétido de repetición

**TF:** Factor de transcripción

**TOC1:** Pseudoresponse regulator 1

**Trx:** Tiorredoxina

**UQ:** Ubiquinona

**VIP3:** Vernalization Independent TF

**WRKY:** Factor de transcripción tipo WRKY

**Wt:** Wild type, genotipo silvestre



# ÍNDICE



<b>Abreviaturas.....</b>	<b>i</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. Las especies reactivas del oxígeno .....</b>	<b>1</b>
1.1. Producción de ROS en plantas .....	3
1.2. Las mitocondrias en la producción de ROS.....	3
1.3. Niveles de ROS en plantas .....	6
1.4. El efecto dual de los ROS .....	7
<b>2. Sistemas antioxidantes.....</b>	<b>12</b>
2.1. Sistemas antioxidantes mitocondriales .....	13
2.1.1. Oxidasa alternativa.....	13
2.1.2. Superóxido dismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1) .....	15
2.1.3. Ciclo ascorbato-glutatión (ASC-GSH) .....	16
2.2. Sistemas redox mitocondriales.....	19
2.2.1. Tiorredoxinas.....	22
2.2.1.1. Generalidades.....	22
2.2.1.2. Mecanismo de acción .....	23
2.2.1.3. Presencia de tiorredoxinas en plantas .....	25
2.2.1.4. Funcionalidad de las tiorredoxinas.....	30
2.2.1.4.1. Papel de las Trxs en el estrés abiótico .....	30
2.2.1.5. Función de las Trxs mitocondriales .....	31
2.2.1.5.1. Función de las tiorredoxinas nucleares .....	32
2.2.2. Peroxirredoxinas .....	36
2.2.3. Glutarredoxinas.....	38
2.2.4. Sulfirredoxinas.....	39
2.3. Señalización organelar .....	40
<b>3. Muerte celular programada.....</b>	<b>42</b>
3.1. PCD en animales <i>versus</i> plantas.....	43

3.2. Señalización por PCD: papel del metabolismo antioxidante .....	46
<b>4. La germinación en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>47</b>
4.1. La semilla .....	47
4.2. Ciclo de vida de la semilla .....	49
4.3. Función del metabolismo antioxidante y redox durante la germinación .....	51
<b>5. Estrés salino .....</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>57</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>59</b>
<b>1. Material vegetal.....</b>	<b>59</b>
1.1. Pisum sativum .....	59
1.1.1. Condiciones de cultivo .....	59
1.1.2. Aislamiento de núcleos.....	59
1.2. Arabidopsis thaliana .....	60
1.2.1. Condiciones de cultivo.....	60
1.2.2. Cepas empleadas.....	61
1.2.3. Manipulación de las semillas .....	61
1.2.4. Transformación de plantas por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> para generación de líneas estables de Arabidopsis.....	62
1.2.5. Selección de transformantes .....	63
1.2.6. Test de segregación y búsqueda de líneas homocigóticas.....	64
1.2.7. Ensayos de germinación .....	64
1.3. Plantas de tabaco ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ).....	65
1.3.1. Condiciones de cultivo.....	65
1.3.2. Transformación transitoria de plantas por <i>A. tumefaciens</i> .....	65
1.4. Células de tabaco TBY-2 ( <i>Tobacco Bright Yellow</i> ) .....	66
1.4.1. Condiciones de cultivo.....	66
1.4.2. Transformación de plantas de <i>Nicotiana tabacum</i> por <i>A. tumefaciens</i> .....	66
1.4.3. Obtención de callos celulares .....	67
1.4.4. Parámetros de crecimiento .....	68

1.4.4.1. Curvas de crecimiento .....	68
1.4.4.2. Medidas de viabilidad celular .....	68
1.4.5. Tratamiento de estrés y preparación de las muestras .....	69
<b>2. Bacterias.....</b>	<b>69</b>
2.1. Escherichia coli.....	69
2.1.1. Condiciones de cultivo .....	69
2.1.2. Cepas empleadas.....	69
2.1.3. Preparación de células químicamente competentes.....	70
2.1.4. Transformación de células .....	71
2.2. Agrobacterium tumefaciens .....	72
2.2.1. Condiciones de cultivo .....	72
2.2.2. Cepas empleadas.....	72
2.2.3. Preparación de electro-competentes .....	72
2.2.4. Transformación .....	73
<b>3. Levaduras .....</b>	<b>73</b>
3.1. Condiciones de cultivo .....	73
3.2. Cepas empleadas .....	73
3.3. Transformación de levaduras .....	73
3.4. Ensayo de un híbrido .....	74
3.5. ADN .....	77
3.5.1. Extracción de ADN genómico (ADNg) .....	77
3.5.2. Extracción de ADN plasmídico .....	77
3.5.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	78
3.5.4. Extracción de ADN de geles de agarosa .....	79
3.5.5. Cuantificación de ADN en solución .....	79
3.5.6. PCR .....	80
3.5.6.1. Otros tipos de PCR .....	81
3.5.6.1.1. PCR de colonia .....	81
3.5.6.1.2. PCR anidada .....	81

3.5.7. Manipulación enzimática del ADN .....	82
3.5.8. Estrategias de clonación .....	83
3.5.8.1. Clonación convencional .....	83
3.5.8.2. Clonación en pGEM®-T easy .....	83
3.5.8.3. Sistema de clonación GATEWAY .....	84
3.5.9. Secuenciación .....	86
3.6. ARN .....	86
3.6.1. Tratamiento del material.....	86
3.6.2. Métodos de extracción .....	86
3.6.3. Electroforesis ARN .....	87
3.6.4. Cuantificación de ARN en solución .....	88
3.6.5. PCR cuantitativa a tiempo real .....	88
<b>4. Proteómica.....</b>	<b>90</b>
4.1. Extracción de proteínas.....	90
4.1.1. Plantas .....	90
4.1.2. Núcleos de <i>Pisum sativum</i> .....	91
4.1.3. Cultivos de células de tabaco BY2 .....	91
4.1.4. Callos de células TBY-2.....	91
4.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	92
4.2.1. Expresión de proteínas en <i>E. coli</i> .....	92
4.2.2. Purificación de la proteína madura recombinante His(n)-PsTrxo1 .....	92
4.3. Electroforesis de proteínas .....	93
4.3.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes: SDS-PAGE .....	93
4.3.2. Electroforesis bidimensional .....	94
4.4. Tinción de proteínas.....	95
4.4.1. Tinción con Coomassie .....	95
4.4.2. Tinción con PageBlue™ .....	96
4.5. Medida de concentración de proteínas .....	96
4.6. Técnicas de concentración de proteínas.....	96

4.7. Identificación de proteínas diana nucleares de PsTrxo1 .....	97
4.8. Secuenciación por masas .....	99
4.8.1. Digestión de proteínas en gel.....	99
4.8.2. MALDI-MS/MS y búsqueda en bases de datos .....	99
4.9. Ensayos de expresión de <i>PsTrxo1</i> mediante la enzima $\beta$ -glucuronidasa (GUS).....	100
4.9.1. Ensayo de expresión transitoria.....	100
4.9.2. Ensayo de expresión estable .....	102
4.10. Determinaciones enzimáticas.....	102
4.10.1. Enzimas del ciclo ASC-GSH .....	103
4.10.1.1. Ascórbico peróxidasa (APX, EC 1.11.1.11).....	104
4.10.1.2. Deshidroascrobato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1).....	104
4.10.1.3. Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR, EC 1.6.5.4).....	105
4.10.1.4. Glutación reductasa (GR, EC.1.6.4.2).....	105
4.10.1.5. Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6).....	105
<b>5. Técnicas inmunológicas .....</b>	<b>106</b>
5.1. Transferencia a membrana para inmunodetección (Western blot).....	106
5.1.1. Anticuerpos empleados en los Western blots .....	107
<b>6. Metabolitos.....</b>	<b>108</b>
6.1. Determinación de ASC y GSH.....	108
6.2. Determinación de peróxidos lipídicos .....	109
6.3. Determinación de proteínas oxidadas.....	110
6.4. Determinación de peróxido de hidrógeno. ....	111
6.4.1. Células TBY-2 .....	111
6.4.2. Semillas de <i>A. thaliana</i> .....	111
6.5. Determinación de óxido nítrico .....	112
<b>7. Análisis bioinformático .....</b>	<b>112</b>
7.1. Diseño de oligonucleótidos.....	112
7.2. Dendrograma y sombreado filogenético .....	113

<b>8. Tratamiento Estadístico .....</b>	<b>114</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>115</b>
<b>1. Proteínas nucleares diana de Tiorredoxina o1 de <i>Pisum sativum</i>.....</b>	<b>115</b>
<b>2. Estudio del papel de <i>AtTrxo1</i> durante la germinación .....</b>	<b>123</b>
2.1. Análisis global de la expresión de <i>AtTrxo1</i> en distintos órganos de <i>A. thaliana</i> .....	123
2.1.1. Estudios de expresión <i>in silico</i> .....	123
2.1.2. Estudios de expresión por RTqPCR y ensayos de expresión estable.....	125
2.2. Análisis global de la expresión de <i>AtTrxo1</i> durante la maduración de la silicua y la germinación de la semilla.....	127
2.3. Estudio de la germinación en semillas de Arabidopsis Wt y KO <i>AtTrxo1</i> en condiciones control y salinas.....	131
2.3.1. Caracterización de líneas mutantes.....	131
2.3.2. Análisis de la germinación .....	133
2.3.3. Medida de marcadores de estrés oxidativo .....	134
2.3.4. Medida de enzimas antioxidantes.....	137
2.3.4.1. Análisis de actividad y expresión catalasa .....	137
2.3.4.2. Medida de expresión <i>AtPrxIIIF</i> y <i>AtSrx</i> .....	139
<b>3. Estudio de la regulación transcripcional de <i>AtTrxo1</i> .....</b>	<b>141</b>
3.1. Caracterización funcional del promotor de <i>AtTrxo1</i> .....	142
3.1.1. La subfamilia génica <i>Trxo</i> de <i>A. thaliana</i> y <i>P. sativum</i> .....	142
3.1.2. Búsqueda de elementos conservados en <i>cis</i> en el promotor de <i>AtTrxo1</i> .....	146
3.1.3. Ensayos de expresión transitoria.....	148
3.1.4. Ensayos de expresión estable .....	149
3.2. Búsqueda de posibles reguladores en <i>trans</i> del gen <i>AtTrxo1</i> .....	151
3.2.1. Cribado de una genoteca de TFs de <i>A. thaliana</i> mediante ensayo de un híbrido en levadura .....	151
3.2.2. Validación y selección de los factores de transcripción obtenidos.....	154
3.2.3. Análisis de la expresión de los genes AZF2, y bZIP9 en los procesos de germinación de la semilla de Arabidopsis .....	158

<b>4. Estudio funcional de PsTrx01 en cultivos celulares de tabaco (<i>Tobacco Bright Yellow, TBY-2</i>) sobre expresantes .....</b>	<b>160</b>
4.1. Caracterización del sistema .....	160
4.1.1. Selección de líneas sobre-expresantes de la proteína PsTrx01 en células TBY2 ..	160
4.1.2. Efecto de la sobre-expresión de PsTrx01 en el crecimiento celular .....	162
4.2. Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de los cultivos celulares TBY-2.....	163
4.3. Estudio de PsTrx01 bajo condiciones de tratamiento con 15 mM de peróxido de hidrógeno.....	166
4.3.1. Marcadores citológicos de PCD.....	166
4.3.1.1. Constricción del citoplasma y condensación de la cromatina .....	166
4.3.1.2. Fragmentación de ADN .....	168
4.3.2. Marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo.....	169
4.3.2.1. Carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y peróxido de hidrógeno	169
4.3.3. Metabolismo redox .....	171
4.3.3.1. Medida de ascorbato y glutatión .....	171
4.3.3.2. Medida de la actividad catalasa y de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión .....	173
4.4. Estudio de PsTrx01 bajo una condición de 35 mM de peróxido de hidrógeno.....	176
4.4.1. Viabilidad celular .....	176
4.4.2. Marcadores citológicos de PCD.....	176
4.4.2.1. Constricción citoplasmática.....	176
4.4.2.2. Fragmentación de ADN .....	177
4.4.2.3. Condensación de cromatina.....	178
4.4.3. Marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo.....	179
4.4.3.1. Carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y peróxido de hidrógeno	179
4.4.3.2. Óxido nítrico y nitrosoglutatión .....	181
4.4.4. Metabolismo redox .....	183
4.4.4.1. Medida de metabolitos ascorbato y glutatión .....	183

4.4.4.2. Enzimas eliminadoras de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	186
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>189</b>
<b>1. Estudio de las proteínas diana nucleares de PsTrxo1.....</b>	<b>189</b>
1.1. El Antígeno de Proliferación nuclear (PCNA) .....	192
1.2. El receptor nuclear de ABA: PYR1 .....	198
<b>2. Papel de AtTrxo1 durante la germinación.....</b>	<b>200</b>
2.1. Análisis de expresión del gen <i>AtTrxo1</i> durante la germinación en condiciones control .....	200
2.2. Análisis de expresión del gen <i>AtTrxo1</i> durante la germinación en condiciones de salinidad.....	208
<b>3. Regulación transcripcional de <i>AtTrxo1</i> .....</b>	<b>213</b>
3.1. Regulación transcripcional de <i>AtTrxo1</i> durante la germinación en condiciones control .....	215
3.2. Regulación transcripcional de <i>AtTrxo1</i> durante la germinación en condiciones 100mM NaCl .....	217
<b>4. Papel de PsTrxo1 en la respuesta al estrés oxidativo y PCD generado por distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....</b>	<b>222</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>233</b>
<b>SUMMARY AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>235</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>243</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>251</b>

# **INTRODUCCIÓN**



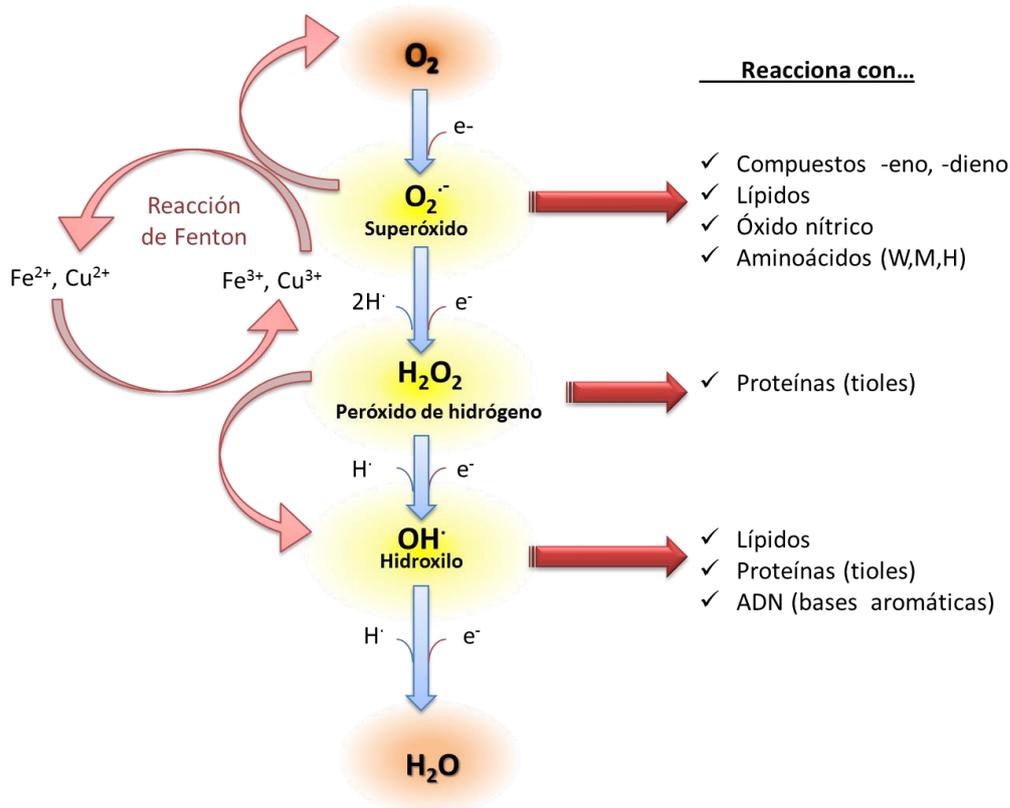
## 1. Las especies reactivas del oxígeno

La aparición del metabolismo aerobio supuso un gran salto en la evolución biológica. El uso del oxígeno facilitó la producción de mayor cantidad de energía y con ello el mantenimiento de estructuras biológicas cada vez más complejas. Sin embargo, su utilización para este fin, conllevó un proceso de transformación o reducción del mismo que supuso la aparición de intermedios de oxígeno parcialmente reducidos, también llamados especies de oxígeno activado (ROS: Reactive Oxygen Species) (Halliwell, 2006). Estos intermedios tienen una alta y diversa reactividad, debido a la presencia de electrones desapareados en su capa de valencia, son menos estables que el  $O_2$  o el agua (Foyer y Noctor, 2000) y tienen gran capacidad para desestabilizar las moléculas biológicas como el ADN, los lípidos o las proteínas por lo que su producción y eliminación debe estar estrictamente controlada (Foyer y Noctor, 2005; Mittler *y col.*, 2011).

El proceso de transformación del oxígeno molecular a agua se divide en cuatro etapas (Fig. 1). Inicialmente, un aporte de energía externa permite que el oxígeno se desestabilice para formar el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), un intermedio muy reactivo y con una vida media relativamente corta (2-4  $\mu s$ ) (Smirnoff, 1993). Este radical puede generar de forma espontánea peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y/o reaccionar con metales de transición como el hierro (Fe) o el cobre (Cu) presentes en ciertas moléculas, a través de reacciones del tipo Haber-Weiss o Fenton, para formar radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) (Halliwell y Gutteridge, 2007). El  $H_2O_2$ , es un estado activado intermedio que a diferencia del resto, tiene una vida media superior (1 ms) y es capaz de difundir desde su lugar de producción (Willekens *y col.*, 1997), se reduce también a radical  $OH^{\cdot}$ . Este radical es considerado uno de los oxidantes más poderosos que se conocen, ya que la célula no posee mecanismos enzimáticos para eliminar esta especie reactiva y su exceso suele conducir a una muerte celular. Finalmente, el radical  $OH^{\cdot}$  se reduce de forma espontánea para formar una molécula estable como es el agua ( $H_2O$ ).

De forma alternativa, el  $O_2$  puede aceptar el exceso de energía de la fotooxidación para formar oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) (Gill y Tuteja, 2010), un estado intermedio muy inestable y cuya producción se restringe al cloroplasto.

Muchos de estas formas reactivas oxidadas son capaces de inactivar enzimas al oxidar sus grupos tiólicos o producir cambios redox en los metales de sus centros activos, también causan rupturas y mutaciones en el ADN, al reducir los compuestos aromáticos de esta molécula y alteran la funcionalidad de las membranas lipídicas al reaccionar con los lípidos para formar hidroperóxidos (Dat y col., 2000).



**Figura 1: Generación de ROS en la célula.** Reducción del oxígeno molecular a agua. Los principales ROS: superóxido, peróxido de hidrógeno e hidroxilo son capaces de reaccionar con distintas macromoléculas orgánicas formando hidroperóxidos, peróxidos lipídicos o peroxinitrito. El oxígeno singlete es el primer estado de oxidación del  $O_2$  y es un ROS inusual ya que no está relacionado con la transferencia de electrones al  $O_2$  y su presencia suele estar limitada al proceso fotosintético (Gill y Tuteja, 2010).

## 1.1. Producción de ROS en plantas

Los ROS son productos normales del metabolismo y son generados en los compartimentos celulares como un subproducto de una variedad de procesos como la fotosíntesis en cloroplastos, la fotorrespiración y beta oxidación de ácidos grasos (AG) en peroxisomas y glioxisomas (del Río y *col.*, 2002; de Pinto y *col.*, 2006), la respiración en la mitocondria (Moller, 2001) o la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^{\cdot-}$  por peroxidasas (Bolwell y *col.*, 1995) y NADPH oxidoreductasas de la pared (Marino y *col.*, 2012) y membrana celular, respectivamente (Tabla 1) (Mittler y *col.*, 2004; del Río y *col.*, 2009)

**Tabla 1: Principales fuentes de producción de especies reactivas del oxígeno, lugar de producción y especie mayoritaria producida durante dichos procesos.** Abreviaturas: AG: Ácidos grasos; TE: transporte de electrones; FSI; fotosistema I y II; CI y III: complejo I y III respiratorio.

LOCALIZACIÓN	PRODUCCIÓN	ROS MAYORITARIO
CLOROPLASTOS	TE fotosíntesis FSI y II	$O_2^{\cdot-}$
	Clorofila excitada	$^1O_2$
MITOCONDRIAS	TE fotorrespiración CI y III	$O_2^{\cdot-}$
PEROXISOMAS	Xantina oxidasa	$O_2^{\cdot-}$
	Glicolato oxidasa	$H_2O_2$
	$\beta$ -oxidación de AG	$H_2O_2$
APOPLASTO	Oxalato y amina oxidasa	$H_2O_2$
MEMBRANA PLASMÁTICA	NADPH oxidasa	$O_2^{\cdot-}$
PARED CELULAR	Peroxidasas, $Mn^{2+}$ y NADH	$H_2O_2 / O_2^{\cdot-}$

## 1.2. Las mitocondrias en la producción de ROS

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos y metabólicamente activos, que se encuentran presentes en todas células eucariotas, ya que son las encargadas de suministrar la mayor cantidad de energía a las células a través del proceso de respiración celular. Este proceso es posible gracias a la oxidación de glucosa y ácidos grasos a través del ciclo de Krebs y la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, respectivamente. Además, las mitocondrias están implicadas en la proliferación celular, el crecimiento vegetal, el desarrollo y la muerte celular (Millar y *col.*, 2011; Lázaro y *col.*, 2013).

Estructuralmente son orgánulos rodeados de dos membranas claramente diferenciadas en sus funciones y actividades enzimáticas y que separan tres espacios: el citoplasma, el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial. Mientras que la membrana externa es poco selectiva y funcional, la membrana interna es altamente selectiva y se invagina formando pliegues o crestas, lo que aumenta su superficie. Además, en su composición hay un 80% de proteínas exclusivas de este orgánulo como la cadena de transporte de electrones (CTE), la ATP sintasa, las proteínas transportadoras que permiten el paso de iones y moléculas orgánicas y las traslocasas de fosfato y de nucleótido adenina, que mantienen los niveles de ADP en la matriz mitocondrial.

La CTE vegetal consiste en cuatro complejos principales: el complejo I o NADH deshidrogenasa y complejo II o succinato deshidrogenasa que ceden los electrones al coenzima Q o ubiquinona, complejo III o citocromo bc1 que cede los electrones al citocromo c y el complejo IV o citocromo oxidasa que cede los electrones al oxígeno para producir dos moléculas de agua (Fig. 2). Algunas de estas proteínas están organizadas en supracomplejos, por ejemplo: el 50% del complejo I está asociado con dos copias del complejo III (Dudkina y *col.*, 2006). Las moléculas NADH y FADH<sub>2</sub> producidas durante el ciclo de Krebs y la oxidación de ácidos grasos ceden sus electrones a través de la CTE, separándose de los protones, hasta que se reúnen de nuevo con estos y el oxígeno para formar el agua. El paso de electrones a través de la CTE genera un potencial electroquímico en la membrana que favorece la síntesis de ATP a partir de ADP+Pi gracias a la actividad del complejo ATP sintasa.

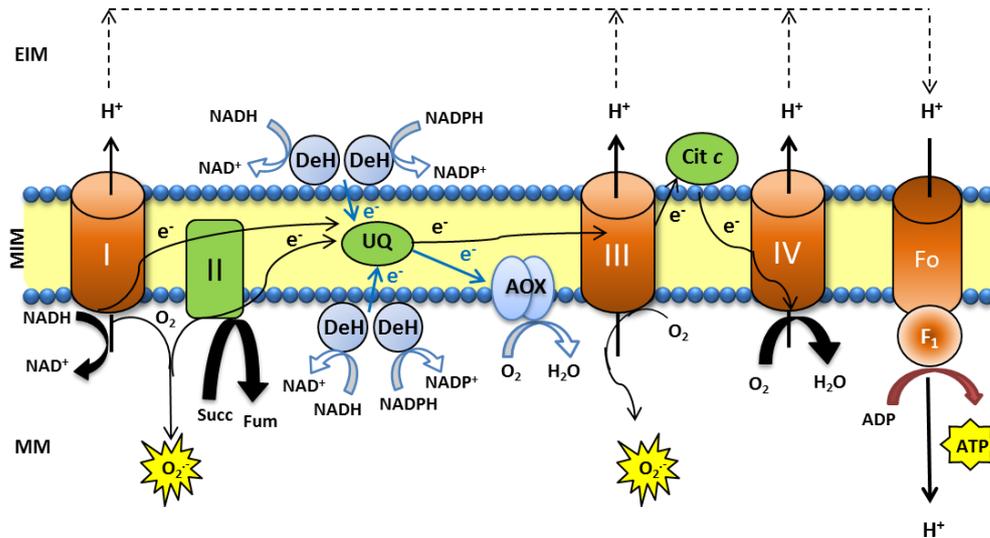
Además de estos sistemas enzimáticos, en la CTE de vegetales existe una particularidad con respecto a la de animales y es la presencia de enzimas complementarias que no contribuyen al gradiente de protones y por tanto no dan lugar a la producción de ATP. Estas vías, podrían funcionar como "válvulas de seguridad" para limitar la producción de ROS, manteniendo la cadena de transporte relativamente oxidada (Møller y Sweetlove, 2010; Rasmusson y Wallstrom, 2010; Millar y *col.*, 2011). De esta forma, las enzimas deshidrogenasas de NADP (H) evitan que los complejos I y II cedan los electrones a la ubiquinona, mientras otras enzimas como la oxidasa alternativa (AOX, Alternative Oxidase) acoplan la oxidación del ubiquinol con la reducción de oxígeno a agua, disipando la energía

en forma de calor y disminuyendo la proporción ADP/O<sub>2</sub>. La derivación de electrones a través de esta vía es importante en el metabolismo primario y secundario, así como en la oxidación de un exceso de hidratos de carbono (Rasmusson y Wallstrom, 2010).

Aunque los cloroplastos son los principales productores de especies reactivas del oxígeno en las células vegetales fotosintéticas (Foyer y Noctor, 2008), el metabolismo mitocondrial aporta una cifra significativa a la generación total de ROS en forma de radical superóxido (Noctor y *col.*, 2007), siendo el complejo I y el complejo III los principales lugares de producción en este orgánulo (Noctor y *col.*, 2007) (Tabla 1 y Fig. 2) si bien, bajo condiciones específicas, pueden producirse también a nivel del complejo II, en el curso del transporte electrónico reverso (Turrens, 2003).

La producción de ROS en la mitocondria depende en gran medida del potencial electroquímico de la membrana interna. Una alta proporción de NADH/NAD<sup>+</sup> y/o ADP/ATP pueden aumentar el transporte electrónico contribuyendo a un alto potencial de membrana, que se correlaciona positivamente con una alta reducción de los componentes de la CTE, aumentando la probabilidad de fuga de electrones al oxígeno y generación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. El superóxido generado puede a su vez actuar como sustrato para la generación de ROS secundarios tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y OH<sup>·</sup>. La fosforilación oxidativa y la actividad de los sistemas de disipación de energía también contribuyen a la modulación de este potencial de membrana. De esta forma, cuando el ADP se fosforila activamente, el potencial de membrana y la generación de ROS son menores que cuando el ADP es limitante. Si una célula consume mucho ATP, sube el nivel de ADP y como resultado se acelera el transporte de electrones con el consiguiente consumo de oxígeno y producción de ATP.

La acumulación de ROS en la mitocondria también puede estar influenciada por la modificación post-traducciona l de los complejos respiratorios (Taylor y *col.*, 2003; Beer y *col.*, 2004), la actividad de las NADPH deshidrogenasas alternativas (Rasmusson y Wallstrom, 2010), la modificación de los sistemas antioxidantes y la concentración de oxígeno (Jiménez y *col.*, 1998). La importancia relativa de los diferentes factores se ha descrito que podría ser específica de cada tejido (Noctor y *col.*, 2007).

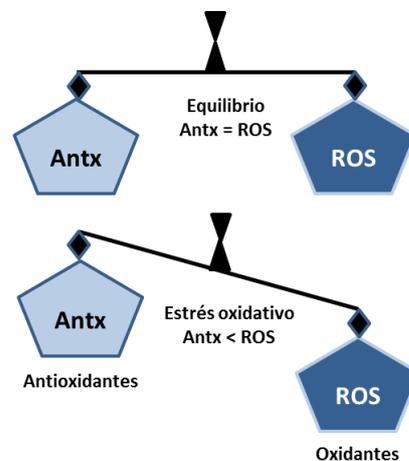


**Figura 2: Producción de ROS en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.** Abreviaturas: DeH: deshidrogenasa.  $e^-$ : electrones. AOX: oxidasa alternativa. Cit c: citocromo c. Succ.: succinato. Fum.: fumarato. UQ: ubiquinona, complejo  $F_1-F_0$ : ATPasa. I, II, II, IV: complejos respiratorios mitocondriales. EIM: espacio intermembrana mitocondrial. MIM: membrana interna mitocondrial. MM: matriz mitocondrial. En marrón oscuro los complejos respiratorios anclados a la membrana, en verde los donadores de electrones móviles, en azul los sistemas alternativos de derivación de electrones. Modificado de De Gara y col. (2010)

### 1.3. Niveles de ROS en plantas

En condiciones normales de crecimiento la producción de ROS celular es baja ( $240 \mu\text{M s}^{-1} \text{O}_2^-$  y un nivel de  $0,5 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  en cloroplastos) (Polle, 2001), lo que implica que en condiciones basales la célula tiene, en general, un ambiente reductor que impide la oxidación de proteínas, lípidos o ADN y garantiza las funciones vitales. Esta homeostasis es consecuencia de la presencia de sistemas eliminadores de ROS (sistemas antioxidantes) capaces de mantener la producción de especies reactivas de oxígeno bajo control. Sin embargo, diferentes fenómenos fisiológicos o situaciones de estrés como sequía y deshidratación, salinidad, frío, altas temperaturas, metales pesados, radiación ultravioleta, contaminantes atmosféricos tales como ozono y  $\text{SO}_2$ , escasez de nutrientes, ataque de patógenos o exceso de radiación lumínica entre otros, ocasionan cambios en los niveles de ROS que pueden generar perturbaciones en este equilibrio y el consiguiente aumento extra en los niveles de radicales libres, desencadenando una situación de estrés oxidativo (Noctor y Foyer, 1998; Dat y col., 2000; Hernández y col., 2001; Rodríguez-Serrano y col., 2006;

Romero-Puertas *y col.*, 2007; Rasmussen *y col.*, 2013; Zhao y Yi, 2014). De esta forma, la producción de ROS puede llegar a incrementarse en el ambiente celular hasta tres veces en forma de radical  $O_2^-$  y de 10 a 30 veces en forma del intermedio  $H_2O_2$  con respecto a sus condiciones basales (Gill y Tuteja, 2010) (Fig. 3). Sin embargo, aunque la producción incrementada de ROS plantea una amenaza para la célula, también es capaz de activar *per se* ciertas rutas de defensa (Jaspers y Kangasjärvi, 2010; Rasmussen *y col.*, 2013), participando en mecanismos de transducción de señales capaces de contrarrestar el estrés tal y como se verá a continuación.



**Figura 3: Relación entre los niveles de oxidantes y antioxidantes en la célula, en condiciones basales y en condiciones de estrés oxidativo.** Extraído de Gill y Tuteja (2010). *Abreviaturas: Antx: antioxidantes.*

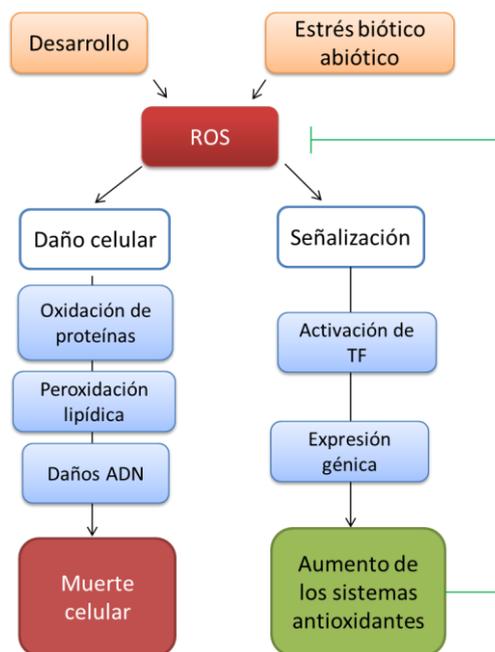
#### 1.4. El efecto dual de los ROS

La producción de ROS en los sistemas vivos tiene un efecto doble, por una parte producen oxidaciones indeseadas en los componentes metabólicos y estructurales de la célula, como se ha comentado, y por otra actúan como señalizadores en un conjunto de eventos celulares. Su participación en la señalización celular podría tener una razón evolutiva al conducir a las células desde el control de la toxicidad de los ROS, mediante el empleo de sistemas antioxidantes, al de su aprovechamiento para propósitos de señalización (Mittler, 2002), lo que parece ser un hecho congruente con una forma de reutilización de los subproductos celulares. Además, el uso de los ROS como moléculas señalizadoras es particularmente ventajoso en el caso del peróxido de hidrógeno ya que su larga vida media,

su relativamente baja reactividad y su capacidad para atravesar las membranas, probablemente a través de acuaporinas (Dynowski y *col.*, 2008), hace posible la activación de respuestas redox en células lejanas al sitio de producción de ROS (Miller y *col.*, 2009) y en consecuencia, la anticipación a los procesos oxidativos.

Diferentes situaciones de estrés y fenómenos fisiológicos ocasionan cambios espacio temporales en los niveles de ROS que se comportan como importantes señales que regulan el crecimiento, el desarrollo, la tolerancia a los factores de estrés abiótico, una adecuada respuesta a los patógenos y la muerte celular programada (Vacca, 2004; Tyburski y *col.*, 2009; Lariguet y *col.*, 2013; Wu y *col.*, 2013). De esta forma, según la concentración de ROS en la célula puede dominar el efecto oxidativo frente al señalizador o a la inversa. Altas concentraciones de ROS pueden dañar macromoléculas, saturar la capacidad antioxidante de la célula y propiciar mecanismos de muerte celular programada (Vacca y *col.*, 2004), mientras que concentraciones subletales de ROS podrían desencadenar una tolerancia hacia diferentes situaciones estresantes para la célula (Foyer y Noctor, 2013) a través de la síntesis y modulación de los distintos sistemas antioxidantes. Además, no sólo la concentración de ROS celular es importante, los distintos tipos de ROS producidos y el balance entre los niveles de los mismos puede ser también de especial relevancia en determinar la respuesta y van a estar sujetos a la interacción entre las diferentes fuentes generadoras y los distintos sistemas eliminadores, que pueden cambiar radicalmente dependiendo de las condiciones fisiológicas de la planta y de la integración de los distintos estímulos ambientales, de desarrollo y bioquímicos (Noctor y *col.*, 2007; Møller y Sweetlove, 2010).

Las rutas por las que diferentes ROS activan distintas respuestas celulares son diversas. Mientras los sensores específicos de ROS no han sido muy estudiados, hay una gran cantidad de datos que señalan diferentes componentes en la red de señalización, incluyendo proteínas quinasas, fosfatasa, calcio y factores de transcripción. Los ROS pueden actuar modificando algunas de estas moléculas y activando rutas bioquímicas que conducen a la expresión de genes específicos. La oxidación de determinados residuos aminoácidos en las proteínas favorece la modulación de sus funciones y por tanto la ejecución de las diversas rutas celulares.



**Figura 4: Efecto dual de los ROS en la célula.** Diferentes circunstancias fisiológicas y ambientales pueden causar un aumento de ROS en las células, la respuesta de las mismas va a depender de la intensidad y duración del estrés, de forma que un estrés intenso genera un daño oxidativo irreversible en la célula a nivel proteico, lipídico y de ADN que desencadena una muerte celular. Sin embargo, un estrés moderado genera daños oxidativos reversibles en las macromoléculas orgánicas debido a la activación de rutas que generan la expresión de sistemas antioxidantes y otros complejos capaces de disminuir el estrés oxidativo generado. Modificado de Vieira Dos Santos y Rey (2006). *Abreviaturas: TF: factor de transcripción.*

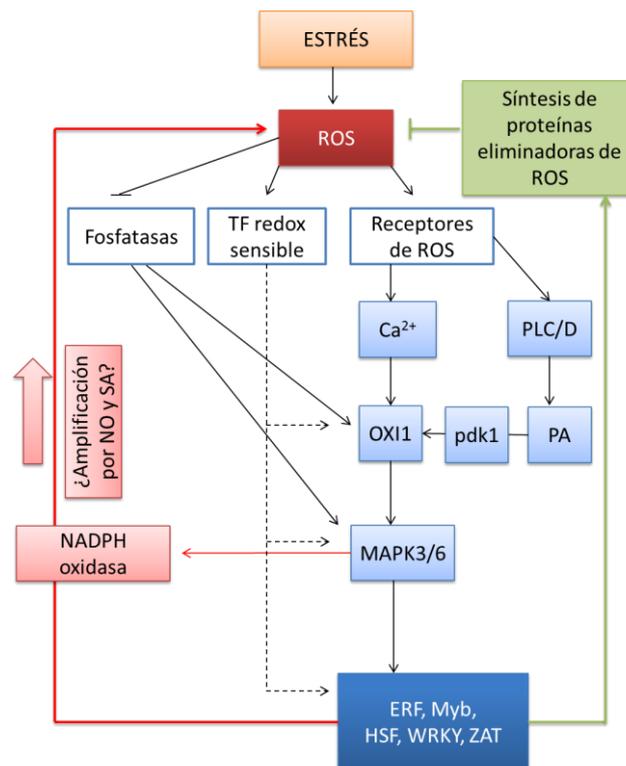
Un ejemplo es la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK). Estas proteínas juegan un papel central en la transducción de señales intra y extracelulares, incluyendo señales de tolerancia a estrés (Kovtun y *col.*, 2000; Mishra y *col.*, 2006; Xing y *col.*, 2008; Xu y *col.*, 2008) y pueden ser activadas por  $H_2O_2$  a través de receptores de ROS y calcio (Jonak y *col.*, 2002). Generalmente funcionan como una cascada secuencial de fosforilaciones donde sucesivas quinasas son activadas unas a otras para finalmente activar factores de transcripción específicos que regulan la expresión de genes relacionados con la defensa frente al estrés oxidativo generado (Fig. 5).

Los factores de transcripción (TF, Transcription Factor) son proteínas reguladoras de la expresión génica, que se unen a los promotores (secuencias de ADN aguas arriba del gen) de los genes que regulan (Castrillo y *col.*, 2011). Mediante análisis comparativo de los cambios

transcriptómicos inducidos por diferentes ROS en *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), se identificaron TF que responden de forma específica y general a diferentes tipos de ROS (Gadjev, 2006), si bien estos factores pueden ser también activados por la ruta de las MAPK comentadas. Miembros de las familias de factores de transcripción de respuesta a etileno (ERF, Ethylene Response Factor) y MYB (Myeloblastosis) son inducidos especialmente por  $^1\text{O}_2$ , mientras que diversos genes de choque térmico, HSP, (del inglés Heat Shock Protein) parecen responder de forma específica a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Gechev y col., 2005; Gadjev, 2006). Los factores de transcripción de choque térmico parecen regular la respuesta a una variedad de estreses, entre los que se incluyen el estrés por temperatura y el estrés oxidativo (Miller y Mittler, 2006), por lo que son capaces de regular genes de sistemas antioxidantes como el de la ascorbato peroxidasa (APX1) en *Arabidopsis* (Rizhsky, 2004). Otros factores de transcripción como los factores en dedos de zinc del tipo WRKY (de la secuencia de aminoácidos triptófano, arginina, lisina, tirosina) y ZAT son regulados por una gran diversidad de especies reactivas, como:  $\text{O}_2^-$ ,  $^1\text{O}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Tanto WRKY como ZAT12 participan en la respuesta al estrés abiótico, de hecho, plantas de *Arabidopsis* sobre-expresantes en ZAT12 tienen elevados los niveles de transcritos de elementos de respuesta a estrés oxidativo y lumínico, mientras que los deficientes en ZAT12 son más sensibles al estrés inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Rizhsky, 2004; Davletova y col., 2005).

Por otro lado, se han identificado genes inducibles directamente por ROS como un receptor de quinasas (Desikan y col., 2000), anexina (Moseyko y col., 2002) y genes implicados en la biogénesis de peroxisomas (Desikan y col., 2000).

Este panorama plantea que no solo los ROS *per se*, sino los productos de sus reacciones con los componentes celulares, como los estados oxidados de ciertas proteínas y genes, son cruciales para ciertas funciones celulares. Algunos ejemplos son la regulación post-traducciona de catalasa (Volk y Feierabend, 1989; Schmidt y col., 2006; Shao y col., 2008), la regulación post-transcripcional o inactivación de ascorbato peroxidasa (Mittler y col., 1998; Shikanai y col., 1998; de Pinto y col., 2006), y la sobre-oxidación o nitrosilación de peroxirredoxinas (Dietz y col., 2006; Barranco-Medina y col., 2007).



**Figura 5. Modelo generalizado de las rutas de transducción de señales mediadas por ROS.** Los ROS pueden ser detectados gracias a la modulación redox de sus dianas, al menos por tres mecanismos: receptores de ROS, factores de transcripción y fosfatasas. La detección de ROS por los receptores conlleva la generación de señales de calcio y la activación de fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD) que genera ácido fosfatídico (PA). Se especula que PA y  $\text{Ca}^{2+}$  activen a una proteína quinasa llamada OXI1. La activación de OXI1 resulta en la activación de la cascada de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), entre las que se incluyen MAPK de tipo 3 (MAPK3) y MAPK de tipo 6 (MAPK6) y la inducción de diferentes TFs que regulan la eliminación y producción de ROS. La activación o inhibición de determinados TF podría también afectar a la expresión de OXI1 y otras quinasas y/o la inducción de TF específicos. La inhibición de fosfatasas favorece la activación de las quinasas por estrés oxidativo. En este esquema se muestran dos vías diferentes implicadas en las rutas de transducción de señales: una respuesta de defensa, que se representa con líneas negras y que puede ser activada para eliminar ROS (líneas verdes), mientras que un proceso de amplificación positiva (líneas rojas) puede ser activado para aumentar la señalización por ROS vía NADPH oxidasas. Ácido salicílico (SA) y óxido nítrico (NO) podrían estar implicados en estos círculos de amplificación como potenciadores de la señal. *Abreviaturas: HSF, factor de choque térmico; PDK, fosfoinosítido dependiente de quinasa; TF, factor de transcripción.* Extraído de Mittler (2011).

## 2. Sistemas antioxidantes

Como se deduce de lo descrito anteriormente, un estricto control de los niveles de ROS es esencial para prevenir su toxicidad y garantizar la ejecución precisa de sus funciones señalizadoras. Para ello, las plantas han desarrollado un elaborado sistema antioxidante formado por enzimas y metabolitos. Normalmente, cada compartimento celular cuenta con más de un sistema antioxidante que elimina un ROS en particular, sin embargo, la aparente redundancia parcial de estos sistemas junto con las enzimas productoras de ROS, explica la complejidad existente en la regulación de la homeostasis oxidativa y redox, que debe ajustarse de forma precisa según las necesidades de la célula (Gadjev y *col.*, 2006; Gechev y *col.*, 2006).

Los sistemas antioxidantes se clasifican por su capacidad de catálisis en enzimáticos y no enzimáticos. Mientras los primeros catalizan el proceso de eliminación de ROS a través de la regeneración de reductores, los no enzimáticos son capaces de amortiguar a los ROS, reduciéndolos de forma directa. De esta forma, los radicales libres  $^1\text{O}_2$  y  $\text{OH}\cdot$  están principalmente controlados por sistemas no enzimáticos, mientras que los radicales  $\text{O}_2\cdot^-$  y el  $\text{H}_2\text{O}_2$  son fundamentalmente eliminados por vía enzimática.

Sin embargo, esta clasificación es muy restrictiva, ya que numerosos descubrimientos han descrito el papel de la oxidasa alternativa en condiciones de estrés oxidativo en la disipación del potencial de membrana mitocondrial y en consecuencia en la disminución de ROS mitocondriales (Foyer y *col.*, 2009; Møller y Sweetlove, 2010; Millar y *col.*, 2011). Por ello, esta enzima podría considerarse también “antioxidante”, pues si bien no interviene de forma directa en la eliminación de ROS, sí que disminuye su tasa de producción.

Los principales sistemas antioxidantes se encuentran referidos en la Tabla 2. Sin embargo, en los siguientes apartados se describirán con mayor detalle los principales sistemas antioxidantes mitocondriales encontrados en plantas.

**Tabla 2: Principales sistemas antioxidantes celulares.** Abreviaturas: Cys: Cisteína, GSH: glutatión, ASC: ascorbato, Vit E: vitamina E, SOD: superóxido dismutasa, CAT: catalasa, APX: ascorbato peroxidasa, PRX: peroxirredoxina, MDAR: monodeshidroascorbato reductasa, DHAR: deshidroascorbato reductasa, GR: glutatión reductasa, TRX: tiorredoxina, GRX: glutarredoxina.

ANTIOXIDANTE	GRUPO	MIEMBROS	FUNCIÓN
NO ENZIMÁTICOS	Reductores hidrosolubles	Cys/GSH/ASC/ ác. úrico/glucosa/ manitol /albúmina	Reducen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y/o O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	Reductores liposolubles	Vit E/flavonoides/ β-carotenos	Reducen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y/o O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>
	Quelantes de metales	Transferrina/ferritina/ fitoquelatinas	Quelan Fe <sup>3+</sup> y evitan la formación de OH <sup>•</sup>
ENZIMÁTICOS	Antioxidantes 1º	SOD/CAT/APX/PRX	Reducen O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (SOD), el resto H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
	Antioxidantes 2º	(M)DHAR/GR/TRX/ GRX	Reducen moléculas oxidadas (regeneran a reductores)
	Antioxidante 3º	Glicosiltransferasas/ glioxilasas	Señalizadora
	Otros	AOX Deshidrogenasas Alternativas	Minimizan la producción de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>

## 2.1. Sistemas antioxidantes mitocondriales

La principal ROS generada en la mitocondria es el radical O<sub>2</sub><sup>•-</sup> como resultado de la reducción del oxígeno durante el proceso de respiración, es por ello, que los principales sistemas antioxidantes mitocondriales tienen importantes enzimas de eliminación de superóxido de forma directa o indirecta como superóxido dismutasas y oxidasas alternativas respectivamente así como otras enzimas implicadas en la destrucción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como la ascórbico peroxidasa a través del ciclo ascorbato-glutatión.

### 2.1.1. Oxidasa alternativa

La enzima AOX es un componente de la cadena de transporte electrónico de mitocondrias vegetales. Actúa aceptando electrones de la CTE procedentes del reservorio de la ubiquinona (UQ) y los utiliza para reducir directamente el oxígeno a agua (Figura 2). Esta

ruta, por tanto, no genera ATP, ya que la vía de transporte de electrones no incluye ni el citocromo c (Cyt c), ni los complejos II y IV ni el gradiente protónico consecuente. AOX compite así por el poder reductor de la vía de conservación energética del Cyt c, siendo esta competencia importante ya que la expresión de la isoforma 2 de la AOX es constitutiva y se mantiene generalmente en un estado activo, según han demostrado diversos estudios *in vivo* (Millenaar y *col.*, 2002; Ribas-Carbo, 2005).

Desde un punto de vista molecular la AOX es una oxidasa diférrica que se encuentra en la membrana mitocondrial interna formando un homodímero cuyos polipéptidos se encuentran unidos por un puente disulfuro y siendo la forma reducida más activa que la oxidada (Millar, 2003; Millar y *col.*, 2011). Se ha planteado que su función en la mitocondria podría ser importante para disminuir el aumento de poder reductor en la cadena de transporte de electrones mitocondrial y limitar así la producción de ROS (Møller, 2001). Diversas condiciones favorecen el flujo de electrones por la vía alternativa como ocurre en presencia de una concentración elevada de ubiquinona reducida, un aumento de NADH mitocondrial o la presencia de piruvato, citrato u otros compuestos orgánicos que aumentan significativamente (alrededor de 100 veces) la afinidad de la AOX por la ubiquinona reducida, lo que indica que AOX sería capaz de recibir electrones de forma más eficaz que la citocromo c oxidasa. Este hecho nos indica la relación existente entre el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y la actividad AOX (Rhoads y *col.*, 1998; Umbach y *col.*, 2006).

La vía de la AOX en vegetales es importante en la tolerancia al estrés (Feng y *col.*, 2013) por sequía, congelación, estrés salino, estrés nutricional, lumínico y por patógenos (Millenaar y Lambers, 2003), así como en los procesos de desarrollo, floración, senescencia y maduración del fruto (Maxwell y *col.*, 1999; Considine y *col.*, 2001). Sin embargo, a pesar de todas estas funciones, la mejor confirmada y que realmente compromete la participación de la AOX es la termogénesis en especies de la familia Araceae, donde el calor producido durante la floración moviliza compuestos aromáticos que atraen a los insectos polinizadores (Onda y *col.*, 2007; Ito-Inaba y *col.*, 2009; Zhu y *col.*, 2011).

### 2.1.2. Superóxido dismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1)

Las superóxido dismutasas (SODs) son las enzimas antioxidantes intracelulares más efectivas que existen ya que son capaces de catalizar la dismutación del radical  $O_2^-$  a  $O_2$  y  $H_2O_2$  (McCord y Fridovich, 1969) a una velocidad de  $3 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$ , unas 10.000 veces superior a la velocidad de dismutación espontánea del  $O_2^-$  a pH fisiológico (Fridovich, 1998). De esta forma, se previene la formación del altamente reactivo radical hidroxilo por la reacción de Haber-Weiss (sección 1.1) y por lo tanto, su ubicuidad en todos los organismos aerobios está más que justificada.

Las SODs constituyen una familia de metaloenzimas cuya diferencia fundamental es el cofactor metálico de su centro activo, lo que da nombre a las mismas, conteniendo como cofactor  $Cu^{2+}$  y  $Zn^{2+}$ , denominándose cuprozinc superóxido dismutasas (Cu-Zn-SODs);  $Mn^{2+}$  llamadas manganeso superóxido dismutasa (Mn-SODs) y un tercer tipo que contiene  $Fe^{3+}$  y que son conocidas como hierro superóxido dismutasas (Fe-SODs). También se han descrito algunas SODs atípicas que contienen distintas combinaciones de estos metales en sus moléculas (Duke y Salin, 1985; Barkley y Gregory, 1990; Almansa y col., 1991; Hernández y Almansa, 2002). Por ejemplo, las Fe/Mn SOD descubiertas en la bacteria *Sinorhizobium meliloti* parecen tener una homología de secuencia a las Fe-SOD pero en su estructura parecen albergar  $Mn^{2+}$  como cofactor ante un estrés por peróxido de hidrógeno, sin embargo, la enzima parece responder también al estrés por  $H_2O_2$  usando hierro como cofactor (Santos y col., 1999).

La distribución de la mayoría de isoenzimas de SOD es multiorganular, de este modo, la enzima Mn-SOD, es una proteína tetramérica caracterizada inicialmente en hojas de guisante (*Pisum sativum* L.) (Sevilla y col., 1982) y localizada en mitocondrias aunque posteriormente se localizó también en peroxisomas y glioxisomas (Scandalios, 1987; del Río y col., 1992; del Río y col., 2003; Duchêne y Giegé, 2012). La enzima Cu,Zn-SOD ha sido ampliamente descrita en citoplasma, cloroplastos, peroxisomas y apoplasto (Bueno y col., 1995) y algunos autores la han localizado asociada a las membranas tilacoidales (Ogawa y col., 1995; Meneguzzo y col., 1998; Gómez y col., 2004) y en el espacio extracelular (Streller y

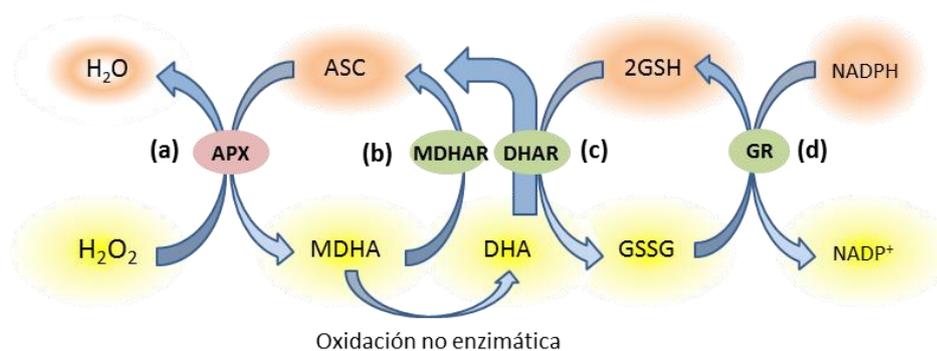
Wingsle, 1994; Fridovich, 1995; Ogawa *y col.*, 1996; Hernández *y col.*, 2001; Karpinska *y col.*, 2001). En cuanto a Fe-SOD, aunque es una enzima principalmente cloroplastídica, en algunas especies vegetales se ha localizado en citoplasma, mitocondrias y peroxisomas (Salin y Bridges, 1980; Becana *y col.*, 1989; Droillard *y col.*, 1989; Gómez *y col.*, 2004).

### **2.1.3. Ciclo ascorbato-glutati3n (ASC-GSH)**

La eliminaci3n del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hasta H<sub>2</sub>O puede producirse a trav3s de un mecanismo catal3tico en el que est3n implicadas varias enzimas como catalasas (CAT) y peroxidasas. La elevada Km de la CAT por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y su baja capacidad de saturaci3n por el sustrato determinan que sea la enzima m3s eficaz en llevar a cabo esta reacci3n. De hecho, la actividad CAT aumenta linealmente en un amplio rango de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y por tanto mantiene controlados de forma importante los niveles de esta especie de oxigeno activado en la c3lula (Scandalios, 2005). Sin embargo, su afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es tan alta como cabr3a esperar y a concentraciones muy bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad ascorbato peroxidasa (APX) del ciclo ASC-GSH elimina este per3xido de forma m3s eficiente que la CAT ya que posee una Km mucho menor (Nakano y Asada, 1981; Palma, 2006). No obstante, a pesar de estas consideraciones, en ausencia de suficientes evidencias que demuestren la presencia de catalasa mitocondrial, podemos decir que el ciclo ASC-GSH es una de las principales v3as antioxidantes de eliminaci3n de per3xido de hidr3geno en mitocondrias (Jim3nez *y col.*, 1997).

El ciclo ASC-GSH constituye una secuencia de pasos de 3xido-reducci3n acoplados cuyo objetivo es eliminar per3xido de hidr3geno y mantener los niveles redox de los principales metabolitos antioxidantes de la c3lula, ASC y GSH, por lo que constituye adem3s, el principal tamp3n fisiol3gico que existe. Durante su actividad, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es eliminado por la APX que utiliza el ASC como donador de electrones (Fig. 6a). El monodeshidroascorbato (MDHA) formado, y a partir de 3ste el deshidroascorbato (DHA) resultante por dismutaci3n espont3nea, se utilizan para reciclar el ASC mediante la acci3n de la monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR) dependiente de NADH (Fig. 6b) y la deshidroascorbato reductasa (DHAR) que usa glutati3n reducido (GSH) como donador de electrones respectivamente (Fig. 6c). Alternativamente, la regeneraci3n del ASC tambi3n podr3a producirse por otros compuestos

redox como glutarredoxina (Grx) y sistemas de tiorredoxina (Trx) (Potters y *col.*, 2002; Meyer y *col.*, 2012). El glutatión oxidado (GSSG) se reduce por la flavoproteína glutatión reductasa (GR) (Fig. 6d) y se puede oxidar también por la NADPH Tiorredoxina Reductasa (NTR), ambas dependientes de NADPH (Noctor y Foyer, 1998; Barranco-Medina y *col.*, 2007; Marti y *col.*, 2009). En consecuencia, este sistema antioxidante depende de un suministro adecuado de NAD(P)H que es mantenido por transhidrogenasas en la membrana mitocondrial, así como las enzimas isocitrato deshidrogenasa y malato deshidrogenasa de la matriz mitocondrial (Rasmusson y Wallstrom, 2010) constituyentes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos.



**Figura 6: Ciclo ASC-GSH.** (a) Reacción catalizada por APX, (b) Reacción catalizada por MDHAR, (c) reacción catalizada por DHAR, (d) reacción catalizada por GR. Círculos amarillos, especies oxidadas, círculos naranjas, especies reducidas. *Abreviaturas (ver texto)*

Los componentes del ciclo se distribuyen en la mitocondria de distinta forma. La APX se localiza en la membrana mitocondrial, con al menos dos isoenzimas, orientadas hacia la cara externa de la membrana externa mitocondrial y la segunda orientada hacia el espacio intermembrana, la MDHAR anclada en la membrana externa mitocondrial y el resto de componentes en la matriz mitocondrial (Jimenez y *col.*, 1997; Jiménez y *col.*, 1998; Chew y *col.*, 2003). Merece la pena destacar que la presencia de APX en el espacio intermembrana favorece la estabilidad de la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GalLDH). Esta enzima participa en la biosíntesis del ASC y está físicamente asociada al complejo I mitocondrial y funcionalmente a los complejos III y IV al usar citocromo c oxidado como aceptor de electrones (Pineau y *col.*, 2008), de esta forma, la capacidad de las plantas para producir ASC está ligada a la cadena de transporte de electrones (Millar, 2003; Bartoli y *col.*, 2005; Szarka y *col.*, 2007), al menos en la mitocondria. La biosíntesis del GSH ha sido descrita

en plastos y citoplasma, si bien, se ha sugerido que la CTE mitocondrial podría tener también cierto efecto sobre su biosíntesis ya que se ha demostrado que mutantes KO de *Arabidopsis* para el complejo I (CI) mitocondrial presentan altos niveles de GSH y son insensibles a un inhibidor de la biosíntesis de este antioxidante (Koprivova *y col.*, 2010). Se ha sugerido que su transporte a mitocondrias es estimulado por malato y piruvato e inhibido por glutamato o la disrupción de la fuerza protón-motriz de la CTE mitocondrial con ionóforos. Los transportadores dicarboxilato y 2-oxoglutarato presentes en la membrana mitocondrial interna son los principales transportadores de GSH a la mitocondria tal y como se ha propuesto en animales (Wilkins *y col.*, 2012).

El descubrimiento de la ubicación diferencial de las distintas isoenzimas de APX y MDHAR en la mitocondria sugiere una función complementaria y doble para ambas. Por un lado, podrían oxidar NADH endógeno para mantener un suministro constante de  $\text{NAD}^+$ , necesario para el metabolismo mitocondrial (Douce *y col.*, 2001), y por otro lado, podrían proteger a la célula frente al estrés por  $\text{H}_2\text{O}_2$  (del Río *y col.*, 1998; Jiménez *y col.*, 1998; Chew *y col.*, 2003). Entre las principales funciones de los metabolitos ASC y GSH destacar su gran capacidad antioxidante, si bien el ASC comparado con el GSH, elimina radicales libres de un modo más efectivo debido a que el radical libre oxidado resultante MDHA es mucho menos reactivo y menos perjudicial que los radicales derivados del GSH (Sturgeon *y col.*, 1998). El ASC funciona además como cofactor enzimático y como precursor en la síntesis de oxalato y tartrato, participando en gran variedad de procesos, incluida la fotosíntesis, crecimiento de la pared celular y expansión celular, resistencia a distintos tipos de estrés ambiental y síntesis de etileno, giberelinas, antocianinas e hidroxiprolina (Smirnoff, 2001). Las funciones de GSH como antioxidante se centran en la eliminación de ROS, metales pesados, xenobióticos y regulación del ciclo celular (Foyer y Noctor, 2009; Diaz Vivancos *y col.*, 2010; Rouhier, 2010), si bien gran parte de estas funciones las desarrolla gracias a su potencial para glutationalizar proteínas y con ello modificar su actividad. La glutationalización se considera una modificación post-traducciona muy importante en una gran diversidad de proteínas (Zaffagnini *y col.*, 2012).

A pesar de que el ciclo ASC-GSH se encuentra presente en todos los organismos y en la mayoría de compartimentos celulares (Foyer y Halliwell, 1976; Arrigoni y *col.*, 1981; Edwards y *col.*, 1990; Jimenez y *col.*, 1997), presenta un alto grado de complejidad en términos no solo de compartimentación subcelular de cada uno de sus componentes, sino también del tamaño de sus familias génicas y de su regulación. Así, esta complejidad podría estar asociada además, al papel del glutatión, el ascorbato y el  $H_2O_2$  en los procesos de señalización en respuesta a diferentes tipos de estrés (Jiménez y *col.*, 1997; Jimenez y *col.*, 2002).

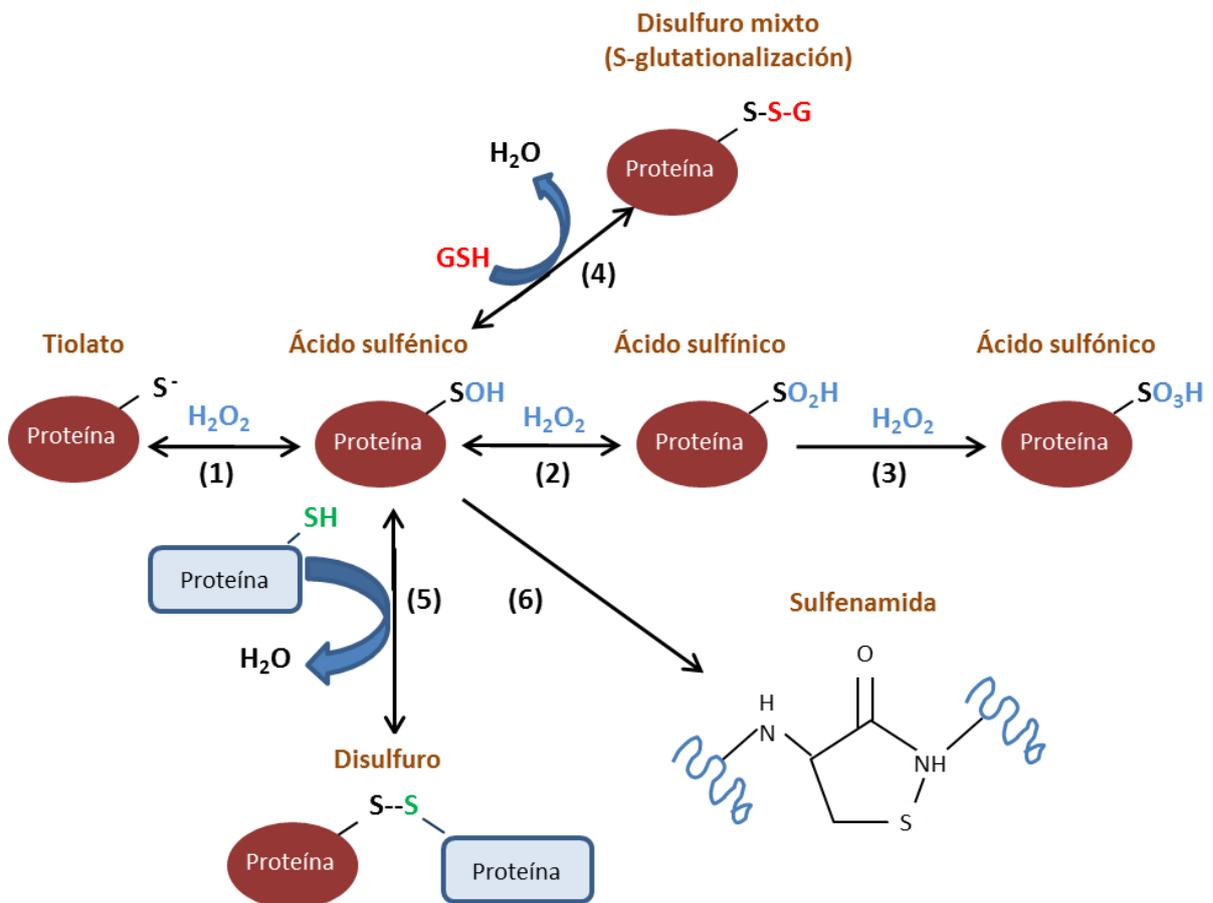
## 2.2. Sistemas redox mitocondriales

Una parte de la regulación oxido-reductora (redox) de la célula se basa en la modulación de la actividad de distintas proteínas a través de la modificación oxidativa de grupos que son fácilmente oxidables en sus residuos aminoacídicos, normalmente cisteína (Cys) y metionina (Met). La característica común es que estos grupos presentan azufre y el azufre tiene diez estados de oxidación. El grupo tiol que forma la cisteína en su forma reducida, se puede presentar de un menor a un mayor grado de oxidación en forma de disulfuro (S-S), ácido sulfénico (R-SOH), sulfínico (R-SO<sub>2</sub>H) o sulfónico (R-SO<sub>3</sub>H) (Fig. 7) (Marinho y *col.*, 2014). Los grupos disulfuro son particularmente estables y reversibles en la célula en condiciones óptimas u oxidantes suaves, protegiendo de esta forma a la cisteína de posteriores oxidaciones. Los grupos sulfínico o sulfónico se forman bajo condiciones altamente oxidantes y constituyen modificaciones en general irreversibles y altamente reactivas, que acaban con la degradación de la proteína, (Montrichard y *col.*, 2009; Marinho y *col.*, 2014) (Fig. 7), si bien recientemente se ha descrito que los grupos sulfínico también pueden ser revertidos en algunas proteínas por la acción de enzimas como las sulfirredoxinas (Srxs) (Iglesias-Baena y *col.*, 2010).

De esta forma, los cambios en el estado de oxidación de las cisteínas pueden conducir a una alteración en la estructura de las proteínas que está acompañada de una pérdida o ganancia de función y/o un incremento en la susceptibilidad a las proteasas o a la desnaturalización, por lo que los residuos de cisteína son críticos en la conformación y en la estabilidad y por lo tanto, son esenciales en la función proteica (Cejudo y *col.*, 2014). Así

pues, las proteínas capaces de formar puentes disulfuro sufren modificaciones en su actividad o en las propiedades relacionadas. Los principales sistemas basados en la regulación de grupos tiólicos-disulfuro están ligados a Trx y Grx, las cuales además de su papel en la regulación redox, pueden actuar como sustratos de enzimas reductoras tales como peroxidasas o ribonucleótido reductasas (RR).

El estado redox de la célula dependerá entonces, en parte, de los grupos tioles y disulfuro de los antioxidantes GSH, Trx y Grx entre otros. Estudios recientes demuestran que el estado redox de los distintos compartimentos celulares, medido como el cociente entre la cantidad de grupos tioles y disulfuro del metabolito GSH y la proteína Trx, se mantiene estable para cada una de estas moléculas en los distintos compartimentos. Sin embargo, a pesar de estas consideraciones, no existe un equilibrio relativo entre ellas en las distintas organelas, lo que determina que el estado redox no dependa del desequilibrio entre los grupos oxidados y reducidos de GSH y Trx, sino de sus cocientes relativos en cada compartimento (Go y Jones, 2008; Go y *col.*, 2010). Además, la oxidación de tioles tiene un posible papel señalizador en la célula (Balaban y *col.*, 2005; D'Autreaux y Toledano, 2007). Todos estos hechos se reúnen en la llamada "hipótesis redox" que establece que los tioles oxidables son elementos de control organizados en circuitos redox que están física y cinéticamente separados y pueden funcionar de forma independiente para regular distintos procesos biológicos (Go y *col.*, 2010). Sin embargo, estos mecanismos se interrumpen cuando las concentraciones de ROS son lo suficientemente elevadas como para sobrepasar la capacidad antioxidante de las células.



**Figura 7: Modificaciones oxidativas de las cisteínas (Cys).** Los grupos sulfidriilo (SH) de residuos Cys con bajo pKa pueden ionizarse formando tiolatos. Los tiolatos son buenos nucleófilos y forman ácido sulfénico (SOH) cuando reaccionan con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1). Una vez formados, pueden ser reducidos para formar un puente disulfuro al reaccionar con otros grupos SH de residuos Cys de otra proteína (5). De forma alternativa, el ácido sulfénico puede reaccionar con un tiol de bajo peso molecular, glutatión (GSH) (4) para formar un puente disulfuro mixto en una reacción conocida como S-glutationalización o S-tiolación. Cuando no hay residuos cercanos de Cys o GSH con los que reaccionar, el grupo SOH puede formar sulfenamida (6). Por otro lado, el SOH puede volver a reaccionar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para generar más formas oxidadas del sulfuro, el ácido sulfínico (SO<sub>2</sub>H) (2) y sulfónico (SO<sub>3</sub>H) (3). Los disulfuros pueden ser reducidos a tioles usando los sistemas tiorredoxina/ tiorredoxin reductasa y glutarredoxina/GSH/Glutatión reductasa. Los ácido sulfínicos en 2-Cys peroxirredoxinas pueden ser reducidos a tioles usando la enzima sulfurredoxina. No se conocen proteínas capaces de catalizar la reducción del estado sulfónico, por lo que este estado se considera una modificación oxidativa irreversible en la proteína. Extraído de Marinho (2014).

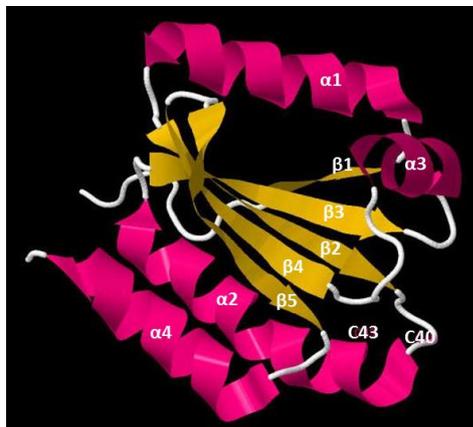
## 2.2.1. Tiorredoxinas

### 2.2.1.1. Generalidades

Las tiorredoxinas (Trxs) son pequeñas proteínas globulares con una masa molecular en torno a 12-14 kDa que constituyen una familia de enzimas oxido-reductasas implicadas en la reducción de los enlaces disulfuro de otras proteínas a través de un intercambio ditiol-disulfuro, lo que modula, como vimos anteriormente, la estabilidad y función de sus proteínas diana (Buchanan y Balmer, 2005). Estas enzimas presentan un sitio activo conservado formado por unos pocos aminoácidos y dos cisteínas (-WC(G/P)PC-). Si bien la naturaleza de estos aminoácidos puede variar entre algunos grupos taxonómicos y miembros de la familia, la presencia de las dos cisteínas es común a todos y convierte a la superfamilia de las tiorredoxinas en uno de los reductores más eficaces de la célula, llegando a catalizar la reducción de puentes disulfuro con una eficiencia de hasta 10.000 veces mayor que el DTT a igualdad de pH (Holmgren, 1979; 1985).

Todas las Trxs tienen unas propiedades redox similares, además, presentan la misma conformación espacial, y a pesar de que la homología aminoacídica sea menor del 25% en algunos casos, la estructura terciaria de estas proteínas está muy bien definida y está constituida por una estructura globular compacta compuesta por un núcleo hidrofóbico conformado por una lámina  $\beta$  de cinco hojas, tres paralelas y dos antiparalelas rodeado de cuatro hélices  $\alpha$ . La secuencia presentada por la estructura secundaria en todas las Trxs es  $\beta_2, \alpha_2, \beta_3, \alpha_3, \beta_4, \beta_5$  y  $\alpha_4$ . (Fig. 8). En esta molécula, el centro activo está situado entre las unidades  $\beta_2$  y  $\alpha_2$ , en una región protuberante relativamente hidrofóbica (Schurmann y Jacquot, 2000), que se encuentra muy expuesta al medio y presenta unas características superficiales que discriminan la interacción con las diferentes proteínas diana (Eklund y col., 1991; Wangensteen y col., 2001) (Fig. 8). Este tipo de organización conocido como “plegamiento tiorredoxina” se da también en otros grupos de la superfamilia de las Trxs como las glutarredoxinas (Grx) y las proteínas con actividad disulfuro isomerasa (PDI), glutatión S-transferasas (Nishida y col., 1998), peroxidasas dependientes de tioles (Choi y col., 1998) y canales de cloro intracelulares (Ashley, 2003). A pesar de estas peculiaridades, las Trxs son proteínas muy específicas en su función, debido a que existe una

complementariedad estructural muy particular y específica entre cada Trx y su proteína diana.

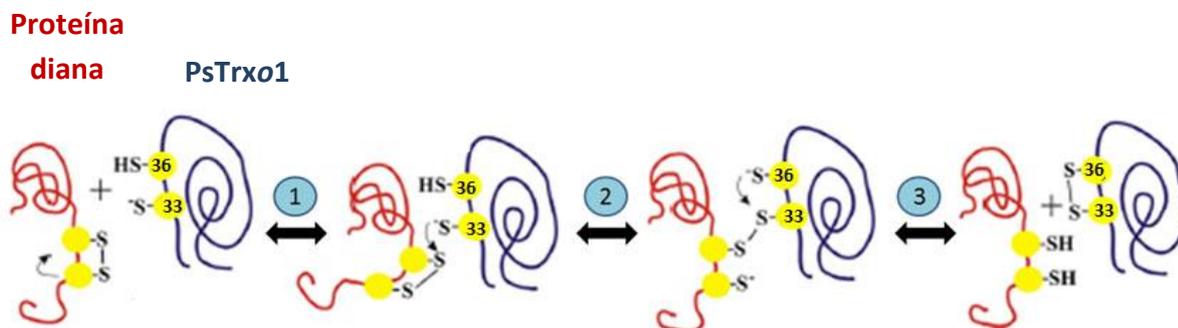


**Figura 8:** Estructura tridimensional por difracción de rayos x de Trx *h1* de *Arabidopsis thaliana*. En amarillo se representan las láminas beta y en rosa las hélices alfa, también se representan las dos cisteínas del centro activo C43 y C40. Extraído de Protein Data Bank (PDB), número de acceso 1XFL.

#### 2.2.1.2. Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las Trxs es consecuencia de la disposición de sus dos cisteínas del centro activo que al encontrarse en distintos ambientes no actúan del mismo modo (Holmgren, 1985). Además, a pesar de que el pK de los grupos tiólicos normalmente posee un valor entre 8,0 y 9,0, en el caso de las Trxs, una de las cisteínas del centro activo lo tiene inferior. De este modo, la cisteína N-terminal está muy expuesta al medio y es desprotonada a pH fisiológico, es la denominada cisteína nucleofílica y en *Escherichia coli*, posee un pK de 6,75, mientras que la otra cisteína del centro activo está escondida y poco expuesta al medio, por lo que normalmente está protonada y tiene un pK de 9,0 en *E. coli*. (Holmgren, 1995), (Fig. 9). Estas características estructurales permiten un ataque ditiol en dos etapas; la cisteína nucleofílica ataca el puente disulfuro de la proteína diana formando un complejo disulfuro mixto con ella, el cual se rompe inmediatamente mediante el ataque de la segunda cisteína que ha perdido su protón probablemente por algún residuo de aspártico o glutámico cercano (Guey y Peitsch, 1997). Este proceso tiene como resultado la obtención de la proteína diana reducida y la Trx oxidada (Holmgren, 1995; Jeng y col., 1998).

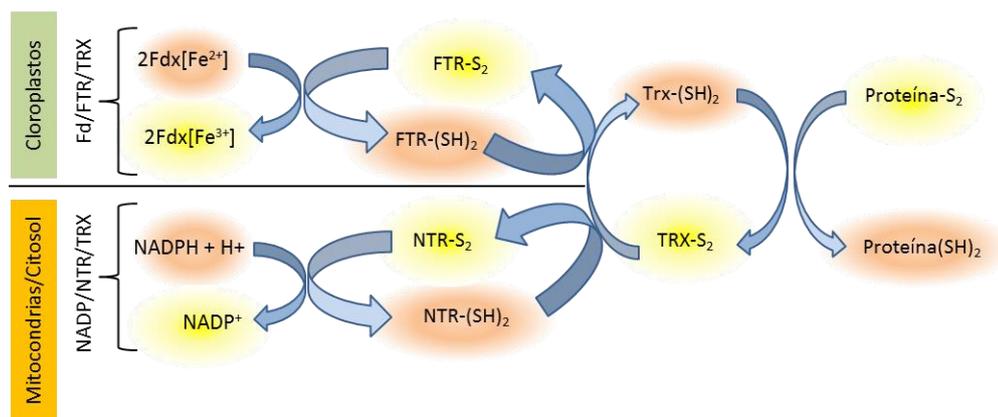
Este mecanismo de acción también es compartido por Grx, PDI e incluso NTR y ferredoxin tiorredoxin reductasas (FTR).



**Figura 9. Mecanismo de acción de la Trx o1 de *Pisum sativum* L.** La tiorredoxina se representa en azul y la proteína diana en rojo. Las cisteínas con un círculo amarillo 1) La cisteína electrófila de Trx ataca el puente disulfuro de la proteína diana formando un intermedio disulfuro con la misma. 2) La cisteína 36 produce un ataque electrófilo a fin compensar el déficit electrónico. 3) La tiorredoxina forma un puente disulfuro intramolecular mientras que la proteína diana queda en estado reducido ditiol. Modificado de Berndt y col. (2008) según describen Lázaro y col. (2013).

El mantenimiento en la célula de la tiorredoxina en estado reducido depende de un donador de electrones externo. De hecho, la tiorredoxina en cada uno de los orgánulos en los que se distribuye, forma parte de un sistema de reducción acoplado específico. Así, las tiorredoxinas mitocondriales, citoplasmáticas y nucleares se reciclan a través de la enzima NTR (NADPH/tiorredoxina reductasa) que emplea NADPH como donador de electrones vía FAD en un sistema llamado NADPH/NTR/Trx, mientras que las tiorredoxinas cloroplásticas usan los electrones procedentes de la CTE via ferredoxina (F) para reducirse gracias a la enzima ferredoxina/tiorredoxina reductasa (FTR) formando el sistema Fd/FTR/Trx (Balsera y col., 2014; Cejudo y col., 2014) (Fig. 10). Estos sistemas son específicos *per se* en los distintos orgánulos. Se han descrito dos genes que codifican NTR en Arabidopsis: AtNTRB que expresa la forma mitocondrial y AtNTRA que expresa la forma citoplasmática y nuclear (Reichheld y col., 2005; Tovar-Mendez y col., 2011; Marchal y col., 2014). Además, una nueva NADPH NTR (NTRC) se ha demostrado que se encuentra presente en los cloroplastos y en los plastidios no fotosintéticos (Serrato y col., 2004; Kirchsteiger y col., 2012). Esta NTRC tiene un dominio tiorredoxina y otro NTR en la misma cadena polipeptídica, lo que le permite actuar por sí

misma como un sistema Trx, al transferir el poder reductor del NADPH a la 2-Cys-Prx cloroplastídica (Spinola y *col.*, 2008; Perez-Ruiz y *col.*, 2009), lo que constituye un sistema alternativo al dependiente de poder reductor en forma de ferredoxina generado durante la fotosíntesis, utilizando el NADPH producido por el transporte fotosintético de electrones durante el día o en las primeras reacciones de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato durante la noche (Perez-Ruiz y *col.*, 2006; Alkhalfioui y *col.*, 2007).



**Figura 10: Sistemas regeneradores del poder reductor de tiorredoxinas en distintos compartimentos.** El sistema cloroplastídico recibe los electrones de la ferredoxina reducida que cede sus electrones a la Trx a través del enzima FTR. El sistema mitocondrial utiliza NADPH como fuente de electrones, que cede los electrones a la Trx gracias a la acción catalítica de la NTR. La Trx reducida es capaz de reducir a sus proteínas diana modulando de esta forma la función de las mismas.

### 2.2.1.3. Presencia de tiorredoxinas en plantas

Las Trxs son proteínas presentes en prácticamente todos los seres vivos, excepto en arqueobacterias y tripanosomas (Bult y *col.*, 1996; Bhattacharyya y *col.*, 2002). Constituyen una gran familia multigénica formada por distintas isoenzimas clasificadas en base a su estructura primaria y localización. Mientras que en procariontes, levaduras y mamíferos sólo se han encontrado tres clases de Trxs (Trx 1, 2 y 3), esta diversidad se multiplica por diez en plantas, en las que se han identificado alrededor de 40 Trxs distintas.

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* permitió la identificación de una treintena de genes de *Trxs*, todos ellos de codificación nuclear (Meyer y *col.*, 2005). El análisis de la

estructura primaria de las proteínas que codificaban, posición de intrones y localización subcelular permitió la clasificación de las distintas isoenzimas en dos grupos, las Trxs clásicas y aquellas similares a Trx (Trxs atípicas). Las Trxs clásicas comparten una masa molecular de 10-12kDa y la presencia de un único centro activo con la secuencia típica -WC(G/P)PC-, mientras que las Trxs atípicas poseen algunas características comunes con las Trxs típicas, si bien se diferencian de aquellas en centros activos atípicos, múltiples dominios Trx o motivos Trx asociados. Los principales miembros del grupo de las Trxs clásicas se clasifican en las isoformas: Trx *f*, Trx *h*, Trx *m*, Trx *o*, Trx *x*, Trx *z* y Trx *y*. Entre los miembros de las Trxs atípicas destacamos las proteínas disulfuro isomerasas (PDI), las nucleorredoxinas (Nrx), algunas Trx *h*, las proteínas tipo picot (del inglés Protein kinase C PKC-interacting cousin of thiooxidin) y TDX (Tetratricopeptido TPR-repeat Domain thiooxidin), entre otras (Tabla 3). Así mismo, gracias al creciente número de ESTs (Expressed Sequences Tags) que aparecen en las bases de datos, se ha comprobado que estos grupos de Trx están también presentes en todas las plantas superiores estudiadas, por lo que la diversidad de Trxs encontradas en *Arabidopsis* es representativa del resto de plantas superiores, a excepción de una Trx presente en la leguminosa *Medicago truncatula* que no aparece en dicha especie. Esta Trx es la llamada Trx *s* que podría estar implicada en simbiosis y ser particular de cierto tipo de plantas (Alkhalfioui y col., 2008).

La localización de las tiorredoxinas es fundamentalmente cloroplastídica y citoplasmática, si bien, también existen miembros en mitocondrias, núcleo y retículo endoplásmico (RE). Entre las Trxs plastidiales en *Arabidopsis* se agrupan en 10 miembros que a su vez se dividen en 5 tipos. En esta familia se encuentran la mayoría de tiorredoxinas clásicas como las Trxs *f* y *m* con importantes funciones en la regulación de la fotosíntesis, específicamente en el Ciclo de Calvin (Kagawa y Hatch, 1977; Jacquot y col., 1978; Wolosiuk y col., 1979), la Trx *x* implicada en la respuesta al estrés oxidativo en cloroplastos por activación de 2-Cys peroxirredoxinas (Mestres-Ortega y Meyer, 1999; Collin y col., 2003; Pulido y col., 2010), la Trx *y* con capacidad para reducir a distintas peroxirredoxinas plastidiales (Lemaire y col., 2003; Collin y col., 2004), la Trx *z* (Arsova y col., 2010) con una función importante en el desarrollo del cloroplasto al controlar la transcripción de genes cloroplastídicos específicos (Rivas y col., 2004; Pfalz y col., 2006). Además, esta Trx *z* tiene un

función única dentro de las Trx plastidiales ya que puede ser reducida por otras Trxs (Bohrer y col., 2012). En cuanto a las atípicas CDSP32 (Broin y col., 2000; Broin y col., 2002) con un papel funcional importante durante el estrés hídrico y las proteínas similares a las PDI, las APR (Adenosine 5'-Phosphosulfate Reductase) que participan en el metabolismo del azufre a través de la reducción de sulfato a sulfito entre otras funciones (Setya y col., 1996; Martin y col., 2005).

A nivel citoplasmático la mayoría de Trxs localizadas pertenecen al grupo de las Trxs *h*. Se asume que a mayoría de Trxs *h* son proteínas citosólicas, ya que carecen de péptido señal, aunque para algunas de estas Trxs han sido sugeridas localizaciones alternativas (Gelhaye y col., 2004; Serrato y col., 2008; Traverso y col., 2013). El grupo de las Trx*h* es el más numeroso en plantas y está formado por al menos 10 miembros en plantas superiores. Algunas están representadas solamente por un miembro en Arabidopsis, aunque otras tienen ortólogos en todas las plantas vasculares. Datos recientes indican que la familia de las Trx*h* se divide en tres subgrupos (I, II y III) en base a su similitud de secuencia y propiedades bioquímicas. De entre éstos, sólo las Trx*h* del subgrupo I (h1, h3, h4 y h5) tienen una estructura clásica cuyas funciones más relevantes se agrupan en: su respuesta al estrés biótico y abiótico (Mou y col., 2003; Laloi y col., 2004; Tada y col., 2008), el control redox de la proliferación celular (Menges y col., 2002), la autoincompatibilidad floral (Gaude y Cabrillac, 2001) o la influencia en la movilización de reservas amiláceas durante la germinación en semillas de trigo de la Trx*h* A (Serrato y Cejudo, 2003). Entre las Trx*h* atípicas destacar una función hasta ahora no descrita para las tiorredoxinas vegetales y es la encontrada para la Trx*h*9 como mensajero celular, al actuar como un señalizador capaz de migrar desde su lugar de expresión en las células de la endodermis a otras capas celulares más profundas en la raíz (Meng y col., 2010).

El sistema Trx mitocondrial es mucho más simple que el plastidial y en Arabidopsis solo una Trx, la Trx*o*1 se encuentra exclusivamente en mitocondria, mientras que su parólogo Trx*o*2 se expresa a muy bajo nivel y su localización subcelular no ha sido del todo establecida (Laloi y col., 2001). En álamo (*Populus trichocarpa*), se ha demostrado la presencia de una Trx*h*2 mitocondrial a pesar de carecer del péptido señal de localización mitocondrial

(Gelhaye *y col.*, 2004), sin embargo, su ortólogo en *Arabidopsis*, *AtTrxh2*, está presente tanto en citoplasma como en mitocondria (Meng *y col.*, 2010). Por otro lado, en guisante se ha descrito más recientemente una doble localización para la *Trxo1*, no solo en mitocondrias sino también en el núcleo de estas leguminosas en condiciones normales (Martí *y col.*, 2009).

A diferencia del resto de orgánulos, en el núcleo son particularmente frecuentes las Trxs atípicas como la TDX y Nr<sub>x</sub> si bien, también se ha descrito la presencia de Trxs clásicas como la *Trxo1* de guisante con doble localización celular como se ha indicado anteriormente, mitocondrial y nuclear (Martí *y col.*, 2009) o la Trx *h* de trigo detectada en núcleo bajo condiciones de estrés oxidativo durante la germinación (Serrato *y col.*, 2001; Serrato y Cejudo, 2003; Pulido *y col.*, 2009). La TDX es una proteína atípica formada por un dominio co-chaperona que favorece el plegamiento de otras proteínas, y otro dominio Trx. Esta proteína se encuentra sólo en plantas vasculares, aunque los dominios co-chaperona homólogos se encuentran también en animales (Hohfeld *y col.*, 1995). Las Nr<sub>x</sub>s son proteínas con dos o tres dominios Trx y se encuentran preferencialmente en el núcleo en *Arabidopsis*, si bien el ortólogo de *AtNRX1* de *Zea mays* muestra una doble localización citosólica y nuclear (Laughner *y col.*, 1998). *AtNRX1* se ha descrito que tiene un papel en el crecimiento del tubo polínico y el pistilo, pero no en el crecimiento del tubo polínico *in vitro* (Qin *y col.*, 2009), sugiriendo que esta NRX integra señales del tejido materno del óvulo al tubo polínico. Además, recientemente se ha descubierto que esta NRX es reducida por NTRA, lo que podría constituir un sistema Trx completo en este orgánulo (Marchal *y col.*, 2014).

La abundancia de diferentes tipos de Trx en la célula (Tabla 3), así como la coexistencia de diferentes tipos redundantes de Trxs dentro de un mismo orgánulo, podría indicar la participación en distintas vías redox de cada una de ellas. No obstante, no se tiene información suficiente sobre la función específica de cada Trx, la interacción de las distintas Trxs con sus proteínas diana o la implicación de cada una de ellas en redes redox específicas. Además, la gran diversidad de Trxs en plantas en comparación con los seres humanos, indica la presencia de un apoyo antioxidante adicional en los vegetales.

**Tabla 3: Presencia de tiorredoxinas encontradas en *Arabidopsis thaliana*.** Modificado de Miller (2008).Nº acceso: TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Abreviaturas: RE: Retículo Endoplásmico.

Nº acceso	Tipo Trx	Nombre	Localización	Sitio redox
<b>CLÁSICAS</b>				
AT3G02730	f	f1	Cloroplasto	WCGPC
AT5G16400		f2	Cloroplasto	WCGPC
AT1G03680	m	m1	Cloroplasto	WCGPC
AT4G03520		m2	Cloroplasto	WCGPC
AT2G15570		m3	Cloroplasto	WCGPC
AT3G15360		m4	Cloroplasto	WCGPC
AT1G50320	x	x	Cloroplasto	WCGPC
AT1G76760	y	y1	Cloroplasto	WCGPC
AT1G43560		y2	Cloroplasto	WCGPC
AT2G35010	o	o1	Mitocondria	WCGPC
AT1G31020		o2	¿Citoplasma?	WCGPC
AT3G06730	z	z	Cloroplasto	WCGPC
AT3G51030	h (tipo I)	h1	Citoplasma	WCGPC
AT5G42980		h3	Citoplasma	WCGPC
AT1G19730		h4	Citoplasma	WCGPC
AT1G45145		h5	Citoplasma	WCGPC
AT1G76080	CDSP32	CDSP32	Cloroplasto	HCGPC
AT2G41680	NTRC	NTRC	Cloroplasto	
AT3G17880	TDX	TDX	Citoplasma/núcleo	WCGPC
<b>ATÍPICAS</b>				
AT5G39950	h (tipo II)	h2	Citoplasma	WCGPC
AT1G59730		h7	Citoplasma	WCGPC
AT1G69880		h8	Citoplasma	WCGPC
AT2G40790	h (tipo III)	CxxS1	Citoplasma	WCLPS
AT3G08710		h9	Citoplasma	WCGPC
AT3G56420		h10	Citoplasma	WCVPC
AT1G11530		CxxS2	Citoplasma	WCIPS
AT1G60420	Nucleorredoxina	Nrx1	Núcleo	WCGPC/WCPPC
AT4G31240		Nrx2	Núcleo	WCRPC/WCPPF
AT4G04950	Picot	p1	Citoplasma	WCDAS
AT4G32580		p2	Citoplasma	WCDAS
AT1G21750	PDI	PDI-1-1	RE	WCGHC
AT1G77510		PDI-1-2	RE	WCGHC
AT3G54960		PDI-1-3	RE	WCGHC
AT4G04610	APR	APR-1	Cloroplastos	WCPFC
AT1G62180		APR-2	Cloroplastos	WCPFC
AT1G34780		APR-14	Secreción	WCPFC
AT3G03860		APR-15	Secreción	WCPFC

#### 2.2.1.4. Funcionalidad de las tiorredoxinas

Basándonos en la identificación de dianas y en el fenotipo de plantas transformantes podemos asumir que la función más importante descrita para la mayoría de tiorredoxinas es la de actuar como una proteína redox y antioxidante. De esta forma, la Trx es capaz de ceder electrones en una cascada secuencial de óxido-reducción con la finalidad de eliminar los ROS en la célula. Un ejemplo de ello es la activación de la peroxirredoxina, una enzima que a su vez elimina el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular. La participación de la Trx en la modulación del equilibrio redox es otra función importante, ya que permite, mediante la reducción de puentes disulfuro de proteínas específicas, modular la funcionalidad de diversos ciclos celulares como es el Ciclo de Calvin o el ciclo celular. No obstante, en ocasiones se ha observado que la Trx ejerce funciones independientes de su capacidad reductora como es la de su participación como chaperonas foldasa y holdasa implicadas en el plegamiento de proteínas y en su prevención frente a la agregación (Du y col., 2015), como co-chaperonas (Prasad y col., 2010)(Prasad y col., 2010), o como elemento estructural durante la formación de vacuolas en levaduras (Xu y col., 1997), el ensamblaje de fagos en *E. coli* (Russel y Model, 1985) o la participación en la replicación del ADN por su unión al complejo de la ADN polimerasa del fago T7 (Mark y Richardson, 1976).

##### 2.2.1.4.1. Papel de las Trxs en el estrés abiótico

La evidencia del papel antioxidante de las Trxs vegetales *in vivo* ante un estrés oxidativo fue establecida por primera vez en ensayos de complementación heteróloga con una cepa carente de Trx en *Saccharomyces cerevisiae* (Mouaheb y col., 1998; Issakidis-Bourguet y col., 2001). Dos Trx *m* y una Trx *x* restauraban la tolerancia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma similar a la Trx de levadura endógena. Otros estudios en vegetales, mostraron que plantas de patata carentes de la Trx plastidial atípica CDSP32 eran más sensibles al estrés lumínico que las plantas control (Wt: Wild type) (Broin, 2002; 2003). Por otro lado, los efectos fenotípicos en algunas de las cepas carentes de Trx no eran muy evidentes, quizás como consecuencia de que la redundancia parcial de diversos tipos de Trx podría compensar la carencia de otras (Laloi, 2004).

Otros estudios demuestran que muchos genes de la familia de las Trxs se inducen en condiciones de estrés biótico o abiótico, como las Trx citosólicas Trx *h8* y *h5* (Laloi y *col.*, 2004), la Trxo1 de guisante ante un tratamiento de 150 mM de NaCl (Martí y *col.*, 2011), algunos genes de Trx plastidiales en hojas de Arabidopsis en respuesta a variaciones en la intensidad y la calidad de la luz (Barajas-López y *col.*, 2011), la Trx CDSP32 de patata en respuesta al generador de ROS metil-violágeno (MV) (Rey y *col.*, 1998; Broin y *col.*, 2000), la Trx *h* de plántulas de arroz ante este mismo herbicida MV (Tsukamoto, 2005) o la Trx *h5* de Arabidopsis ante un ataque por patógenos (Laloi y *col.*, 2004). Además, en procesos oxidativos que ocurren durante la desecación y germinación de semillas de cereales, se produce la acumulación de Trx *h* citosólica en el núcleo de células de aleurona y escutelo (Serrato y Cejudo, 2003). Todos estos datos nos conducen a plantear que la expresión de las Trxs puede ser controlada a nivel transcripcional por ROS, de hecho, se ha descrito la presencia de elementos que responden a ROS en algunos de los promotores de genes de Trx (Lee, 2005; Tsukamoto, 2005) apoyando esta afirmación. En otros ejemplos, se ha observado incluso la presencia de elementos que responden a MV en los promotores de los genes de Trx *h*, Grx y SOD (Tsukamoto, 2005), lo que demuestra la participación coordinada de las reductasas de disulfuro y SOD en los mecanismos de defensa frente a ROS.

#### 2.2.1.5. Función de las Trxs mitocondriales

El desarrollo de los métodos proteómicos, asociado a la producción de Trx recombinante mutada en la cisteína resolutive de su centro activo, han permitido la obtención de complejos estables entre la Trx y sus posibles proteínas diana, y por tanto han conducido a la obtención de nuevos datos en la búsqueda de funciones para la Trx. De esta forma, diversos estudios de localización de dianas a nivel mitocondrial mediante la técnica de cromatografía de afinidad han logrado identificar en mitocondrias aisladas de espinaca, guisante y patata 50 posibles proteínas diana de Trxs mitocondriales (Balmer y *col.*, 2004; Martí y *col.*, 2009)) lo que ha llevado a sugerir la participación de estas Trxs en procesos como: la regulación redox, la fotorrespiración, el ciclo del ácido cítrico, el plegamiento de proteínas, la síntesis hormonal, la síntesis del azufre, la síntesis de ATP, la respiración alternativa, la eliminación de ROS, el transporte intermembrana, la transducción

mitocondrial y su relación con reacciones relacionadas con el estrés, entre otros (Barranco-Medina y *col.*, 2008; Martí y *col.*, 2009). Algunas de estas dianas han sido validadas, además, por ensayos enzimáticos *in vitro* y de esta forma se ha comprobado que la PtTrxh2 es capaz de reducir los homodímeros de AOX y permitir su activación en presencia de su efector piruvato (Gelhaye y *col.*, 2004; Umbach y *col.*, 2006). Del mismo modo, en otros estudios se demuestra la inducción paralela de AOX y PsTrxo1 bajo condiciones de salinidad, así como la activación de AOX y el aumento en el consumo de oxígeno por la vía respiratoria alternativa en mitocondrias aisladas de hojas de guisante y soja, en presencia del sistema NADPH/NTR/Trxo1 de hojas de guisante (Martí y *col.*, 2009). AOX juega un papel importante en la prevención o minimización de la formación de ROS en mitocondrias de plantas (Maxwell y *col.*, 1999; Yip y Vanlerberghe, 2001; Millar y *col.*, 2011), por lo tanto, se ha sugerido que PsTrxo1 a través del control de los niveles reducidos de AOX, podría regular el metabolismo respiratorio y las reacciones asociadas. Además, la demostración de la unión *in vitro* de PsPrxIIIF a PsTrxo1 apoya la visión de que esta Trx mitocondrial podría desempeñar un papel uniendo ROS y la señalización redox en las mitocondrias (Barranco-Medina y *col.*, 2008).

#### **2.2.1.5.1. Función de las tiorredoxinas nucleares**

La función de las Trxs en el núcleo suele estar asociada a la modulación del ciclo celular, apoptosis o activación de determinados genes relacionados con el estrés abiótico entre otros. Los mecanismos por los que la Trx interviene en estas funciones son diversos y abarcan desde la activación de factores de transcripción específicos, como parte estructural de complejos de replicación del ADN o activando a quinasas o ciclinas dependientes de quinasas.

- **Modulación de factores de transcripción**

La participación de las Trx en la modulación de factores de transcripción (TF) ha sido ampliamente estudiada en células animales, factores tales como la proteína p53, la proteína AP-1 o el factor nuclear kappa ( $\text{Nf-k}\beta$ ), cuya activación depende de modificaciones redox en las cisteínas de sus centros activos. En plantas superiores este tipo de regulación está menos estudiada, si bien se han encontrado algunos ejemplos de TF regulados por Trx como

aquellos de la familia NAC en la caña de azúcar (*Saccharum spp.*) (SsNAC23), algunos factores de la clase bZIP en *Arabidopsis* o los miembros de la familia teosinta ramificada cicloidea (TCP) en plantas espermatófitas. Estos TF son capaces de responder frente a una señal oxidativa en el citoplasma, que normalmente determina la exportación del TF al núcleo donde además de Trx, en ocasiones, también Grx o GSH pueden reducirlos, permitiendo su unión a secuencias específicas en el ADN y en consecuencia favoreciendo la expresión de genes concretos.

En animales, la función de los TF destacados regulados por Trx se relaciona con procesos de ciclo celular y apoptosis. Así, la proteína supresora de tumores p53 controla la progresión del ciclo celular, la supervivencia celular, la apoptosis y la reparación del ADN en células expuestas a un estrés genotóxico (Seemann y Hainaut, 2005). Esta proteína se une a un factor redox formado por las proteínas APE/ref1 para formar un complejo con actividad endonucleasa y tiol reductasa reciclado por Trx y necesario para que p53 ejerza esta función activadora doble sobre genes específicos. De esta forma, la proteína p53 es capaz de parar el ciclo celular en fase G1 y evita que progrese hasta que los daños en el ADN hayan sido reparados (Lotem y col., 1996; Levine, 1997). Adicionalmente, el dominio tiol reductasa del factor redox1 es capaz de regular la actividad de la proteína activadora AP-1, un TF que controla procesos como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis. Por otro lado, el factor nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) regula la expresión de genes implicados en la inmunidad y en condiciones basales se encuentra inactiva debido a la acción de una proteína inhibidora de kappa beta que en condiciones oxidantes se fosforila liberando NF- $\kappa\beta$  lo que permite su traslado al núcleo donde ejerce sus funciones reguladoras sobre la expresión génica.

En plantas, las funciones del TF SsNAC23 se relacionan con el desarrollo, crecimiento de meristemas florales, hojas maduras y respuesta a estrés abiótico. De hecho, en diversos ensayos como el ensayo de dos híbridos en levadura (2-HYB) se muestra que este factor de transcripción se une a *Trxh1* (Ditt y col., 2011) y se induce por frío (Nogueira y col., 2005).

Otros TFs en vegetales como los TGA, llamados así por su lugar de unión al ADN "TGACG", están implicados en la regulación de genes relacionados con la patogénesis ya que

son capaces de interactuar con la proteína NPR1 (Nonexpresser of Patogenesis Related gene 1)(Kesarwani y *col.*, 2007). Esta proteína es reducida por Trxh5 y Trxh3 entre otras Trxs (Tada y *col.*, 2008), lo que favorece su agregación en un estado multimérico y activo (Mou y *col.*, 2003). En estas condiciones es capaz de dirigirse al núcleo y activar al TF TGA. Otras moléculas como el glutatión podrían también regular la actividad de TGA de forma directa mediante la modulación de su estado redox y Trxh (Tada y *col.*, 2008) y de esta forma participar también junto a las Trxs en las rutas de señalización de la respuesta sistémica adquirida.

El factor TCP (Teosinte branched1-Cycloidea-Proliferating cell factor1) en plantas espermatófitas parece tener una función importante en la regulación del desarrollo vegetal principalmente en los rasgos morfológicos (Koyama y *col.*, 2007; Martín-Trillo y Cubas, 2010; Uberti-Manassero y *col.*, 2012). Para ello se ha descrito que es necesaria su activación redox por GSH y Trx. De hecho, estudios en *Arabidopsis* muestran que la unión de TCP al ADN es inhibida por el tratamiento con agentes oxidantes como amida, glutatión oxidado, peróxido de hidrógeno o agentes productores de NO, mientras que la inhibición puede ser revertida por el tratamiento con agentes reductores como el DTT, el glutatión reducido o el sistema NTR/TRX. Además, la mutación de la Cys-20 en el factor TCP-15 hace que no responda a las variaciones redox celulares. De hecho, en condiciones oxidantes, esta cisteína forma un puente disulfuro con la cisteína de otro TCP-15 inactivando la unión de ambos factores de transcripción al ADN (Viola y *col.*, 2013).

- **Ciclo celular y apoptosis**

El ciclo celular constituye una serie de eventos que conducen a la célula a su división o duplicación (replicación) lo que produce dos células hijas. El control de la división celular es clave en la regulación del desarrollo vegetal y ha sido ampliamente estudiado en levaduras y animales, de hecho estos mecanismos básicos están conservados en todos los eucariotas. Por tanto, en células eucariotas este ciclo se divide en tres fases: interfase, mitosis y citocinesis. Durante la interfase la célula crece y acumula los nutrientes necesarios para la división celular y duplicación de su ADN. Esta fase es la más larga en la vida de una célula y

se divide a su vez en tres subfases: fase G1, S y G2. Si bien, existe otra fase, dentro de G1, llamada G0 donde las células permanecen en estado quiescente y no proliferan. Durante la fase G1 se produce el crecimiento de la célula con síntesis de proteínas y de ARN y es el período que transcurre entre el fin de una mitosis y el inicio de la fase S, donde se replica todo el material genético para poder ser transmitido a la descendencia. Como resultado cada cromosoma se duplica y queda formado por dos cromátidas idénticas. La siguiente fase es la G2, en esta fase la célula reanuda la síntesis de proteínas y ARN, continúa creciendo y se prepara para entrar en fase mitótica, cuyo inicio lo determina la condensación de los cromosomas. Durante la mitosis la célula madre se divide en dos células hijas idénticas. La progresión del ciclo depende de puntos de control específicos regulados por unas proteínas llamadas ciclinas y ciclinas dependientes de quinasas, entre otros elementos, que fosforilan a sus proteínas diana y con ello regulan su actividad.

La participación de la Trx en este ciclo ha sido descrita en varios puntos. Así, levaduras carentes de Trx presentan una fase S anormalmente larga y una ausencia virtual de la fase G1 (Muller, 1991) que se justifica como un compromiso del proceso de replicación del ADN. De forma similar en plantas, la ausencia de NTR muestra un fenotipo de bajo crecimiento (Reichheld y *col.*, 2007). En este sentido la importancia de la ribonucleótido reductasa (RR) como productora de desoxirribonucleótidos (dNTPs) parece ser vital en el proceso de replicación del ADN y se conoce que su actividad necesita ser regulada de forma redox por Trx fundamentalmente (Berndt y *col.*, 2007; Arner, 2009; Lu y Holmgren, 2009).

En animales son muchos los estudios que demuestran la influencia de la Trx en el cáncer, así células de cáncer de mama y pulmón carentes de Trx tenían un cese del ciclo celular en fase G1, debido a la supresión de la activación del promotor de ciclina D1 (Mochizuki y *col.*, 2009).

Los procesos de desarrollo celular requieren una homeostasis estrictamente regulada en un equilibrio entre proliferación y muerte celular. Estos procesos ocurren en un amplio rango de procesos fisiológicos, incluyendo la eliminación de células dañadas o innecesarias en fase G1 mediante un proceso de muerte celular programada, llamado apoptosis en

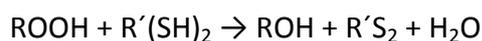
animales. La Trx es capaz de actuar en ambos sentidos como inhibidora o activadora del proceso apoptótico y desde este punto de vista podría considerarse un importante sensor redox del destino celular.

En animales, la Trx puede actuar como elemento anti-apoptótico al secuestrar a la MAP quinasa, ASK1 (Apoptosis Signal regulating Kinase 1). En condiciones reductoras la Trx mantiene inactiva a esta proteína, sin embargo, ante un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula, la Trx se oxida y libera este factor que favorece la activación de rutas de muerte celular programada (Tonissen y Di Trapani, 2009). De hecho, diversos estudios demuestran que la deficiencia de Trx2 en pollo DT40 favorece la elevación celular de ROS, y aumenta el número de células que entran en apoptosis (Tanaka y *col.*, 2002), mientras que los sobre-expresantes de Trx2 inhiben la inducción de la apoptosis.

Como elemento pro-apoptótico, la Trx activa al factor de transcripción p53 directa o indirectamente a través del factor Ref-1 (Ueno y *col.*, 1999), p53 activa genes específicos que favorecen la síntesis de proteínas que facilitan la salida de citocromo c de la mitocondria, lo que constituye una señal capaz de originar toda una cascada de señalización que origina la fragmentación del ADN y la muerte de la célula.

### 2.2.2. Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas constituyen una familia de peroxidases dependientes de grupos tiólicos que catalizan la eliminación de peróxidos (ROOH) a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, alcohol hidroperóxidos y peroxinitritos a agua y el alcohol correspondiente (ROH) (Storz y *col.*, 1989; Chae y *col.*, 1993; Lim y *col.*, 1998; Bryk y *col.*, 2000; Rhee y *col.*, 2005; Dietz, 2006).



Todas las Prxs se presentan como homodímeros y contienen un residuo de cisteína en la región NH<sub>2</sub>-terminal localizado en un ambiente estructural conservado y que es esencial para la actividad catalítica (Verdoucq, 1999; Rhee y *col.*, 2001; Dietz, 2003). Se caracterizan además, porque no contienen ningún grupo hemo, por lo que para compensar la pérdida del

grupo prostético necesitan un donador externo de electrones, que generalmente es la Trx (Kwon *y col.*, 1994; Kang *y col.*, 1998), aunque también pueden utilizar a la Grx (Rouhier *y col.*, 2001; Rouhier *y col.*, 2002; Rouhier, 2010), el GSH (Hofmann *y col.*, 2002; Dietz, 2003) y a la ciclofilina (Lee *y col.*, 2001; Bernier-Villamor, 2004; Dietz, 2006).

Las Prxs han sido descritas en varios organismos incluyendo bacterias (Tartaglia *y col.*, 1990), levaduras (Chae *y col.*, 1993; Chae *y col.*, 1994), células animales (Kim *y col.*, 1988) y plantas (Baier *y Dietz*, 1996; Cheong *y col.*, 1999). En vegetales, las Prxs se clasifican en cuatro subclases en función del número y posición de los residuos conservados de cisteína (Cys): las Prxs de 1-Cys, Prxs de 2-Cys, Prxs asociadas a la bacterioferritina (Prx Q) y Prxs relacionadas con la proteína YLR109 (Prxs de tipo II). De este último grupo se han encontrado miembros en *Arabidopsis*, arroz, álamo y guisante con localización citoplasmática (PrxIIC), plastidial (PrxIIE) y mitocondrial (PrxIIF). No obstante, también se han encontrado representantes del resto de grupos (Horling *y col.*, 2002; Dietz *y col.*, 2006), con diferente distribución tisular y organular, regulación transcripcional y propiedades bioquímicas y estructurales, lo que sugiere que puedan ejercer distintas funciones biológicas (Park, 2000; Horling, 2003; Dietz, 2006)). De hecho, se ha demostrado que las Prxs participan en una pléthora de eventos celulares como en el proceso de germinación, inhibiéndolo en condiciones de estrés abiótico (Prx1-Cys) (Stacy *y col.*, 1996; Haslekås *y col.*, 1998; Haslekas, 2003), en los procesos de estrés foto-oxidativo en cloroplastos (Prx Q), (Rey *y col.*, 2005) y oxidativo por cadmio y salinidad en mitocondrias (PrxIIF), (Finkemeier *y col.*, 2005) o asociada a los procesos de ciclo celular al ser reprimida directamente por ciclinas (Rhee *y col.*, 2005).

El mecanismo de acción de la Prx no se reduce simplemente al de su actividad peroxidasa y como consecuencia de la sobre-oxidación de sus grupos tiólicos puede adquirir una función chaperona, protegiendo a las estructuras celulares del daño oxidativo (Finkemeier *y col.*, 2005; Barranco-Medina *y col.*, 2008; Barranco-Medina *y col.*, 2009). Diversos estudios demuestran que la forma sobre-oxidada de la PrxIIF puede funcionar como un marcador no-transcripcional del ritmo circadiano, que es un oscilador endógeno de 24 h que regula multitud de procesos biológicos críticos en plantas. Una de las características clave del reloj circadiano es que se tampona frente a la temperatura, manteniendo un ritmo

aproximado de 24 h en un amplio rango de temperaturas fisiológicas. La existencia de una forma sobre-oxidada de PrxIIIF y de su sistema de retro-reducción a través de la actividad sulfirredoxina (Srx) plantea la cuestión de si este antioxidante mitocondrial podría funcionar o no como reloj circadiano (O'Neill y Reddy, 2011). Esta característica podría ser crucial para las plantas que crecen en un entorno en constante cambio y así esta hipótesis aún sin verificar, es un reto para futuras investigaciones que lleven a dilucidar nuevas funciones para las Prxs de plantas.

### **2.2.3. Glutarredoxinas**

Las glutarredoxinas (Grxs) son pequeñas y ubicuas tiol-oxidoreductasas que generalmente son reducidas por glutatión (GSH) (Holmgren, 1979), aunque algunas Grxs son recicladas por tiorredoxina reductasas (Zaffagnini *y col.*, 2008; Couturier *y col.*, 2009); además, la Grx reducida puede oxidarse por acción de la glutatión reductasa. Las Grxs fueron identificadas en arroz en 1994 (Minakuchi *y col.*, 1994) como un reductor alternativo de la ribonucleótido reductasa y en la actualidad se han identificado como una familia de isoenzimas formada por 30 genes distintos en organismos fotosintéticos (Meyer *y col.*, 2008). En la mayoría de los casos las diferentes Grxs se han identificado por similitud de secuencia, por lo que sólo se conocen las propiedades bioquímicas de un número reducido de Grxs. De esta forma, aunque las Grxs poseen estructuras tridimensionales muy similares a las de tiorredoxinas, su caracterización bioquímica indica que podrían tener funciones distintas; de este modo, mientras las Grxs son más eficientes en la reducción de puentes disulfuro intramoleculares, las Trxs son más eficientes en la reducción de puentes disulfuro intermoleculares. Además, las Grxs son capaces de deglutationalizar proteínas revirtiendo su grupo disulfuro libre. La glutationalización, como ya se ha indicado anteriormente, implica el ataque covalente de residuos de cisteína con un grupo GSH a través de la formación de un puente disulfuro mixto y se considera una modificación post-traduccional importante en la modulación redox de la actividad de proteínas y para la señalización redox en plantas. De esta forma, Grx participa reciclando los grupos GSH de sus proteínas diana.

El conocimiento actual indica que distintas isoformas de Grx se localizan en distintos orgánulos como ocurre con otras familias de enzimas, incluyendo Trxs y Prxs. Así, los miembros mitocondriales Grxs-15 y Grxs-10 son proteínas importantes para la respuesta de las plantas al estrés oxidativo a través de la regeneración de enzimas antioxidantes como peroxirredoxinas de clase II (Rouhier y *col.*, 2001; Finkemeier y *col.*, 2005; Vieira Dos Santos y *col.*, 2007; Couturier y *col.*, 2009) y también están implicadas en el metabolismo del hierro. Otras Grxs no mitocondriales se ha descrito que participan además en la regulación de factores de transcripción del tipo “cremallera básica de leucina” llamados TGA (Ndamukong y *col.*, 2007), probablemente gracias a su actividad deglutationalizante.

#### 2.2.4. Sulfirredoxinas

Las sulfirredoxinas (Srxs) son pequeñas reductasas dependientes de ATP presentes en eucariotas. Cuando hacemos un alineamiento múltiple (BLAST) de las Srx de los distintos organismos se observa que existe un 30% de homología en su estructura primaria y un centro activo -GCHR- cuyo residuo cisteína está particularmente conservado y es crítico para su función antioxidante (Jonsson y Lowther, 2007); además, poseen una región altamente variable en su extremo N-terminal que determina su localización. En *Arabidopsis* este extremo N-terminal posee un péptido señal de localización cloroplastídica (Liu y *col.*, 2006).

La importancia de las Srx en la célula reside en su capacidad para revertir las formas sobre-oxidadas de diversas proteínas. Este fue un descubrimiento importante ya que durante mucho tiempo se pensaba que el estado sulfínico en las proteínas era un estado de oxidación irreversible (Woo y *col.*, 2003). Las Srxs son capaces de reducir el estado sulfínico pero no el estado sulfónico de algunas proteínas sobre-oxidadas (Biteau y *col.*, 2003). En vegetales, estas enzimas son capaces de reducir a las Prxs de clase 2-Cys cloroplastídicas (Woo y *col.*, 2005) y a las Prxs atípicas tipo IIF (Iglesias-Baena y *col.*, 2011). Estos resultados establecen un mecanismo general de retro-reducción para la amplia diversidad de peroxirredoxinas presentes en la célula que presumiblemente podrían responder al tipo de Srx así como a la localización subcelular de la misma.

La retro-reducción de la forma sulfínica de las Prx por la Srx supone un proceso lento ( $K_m = 0,18 \text{ min}^{-1}$ ) (Chang y *col.*, 2004) que requiere ATP como fuente de energía, magnesio (u otro metal bivalente) como cofactor y un donador electrónico como el GSH o la Trx como reductor (Biteau y *col.*, 2003). La retro-reducción de la cisteína peroxidática sobre-oxidada hasta su forma sulfínica, se produce por la unión específica de la Srx, que reconoce residuos críticos superficiales de la 2-Cys Prx. La Srx transfiere el grupo gamma-fosfato del ATP siendo crucial su cisteína conservada y la presencia del reductor (Rhee y *col.*, 2007), esta transferencia provoca una generación de Pi delimitada por la cantidad de Prx-SO<sub>2</sub>H (Jonsson y *col.*, 2008; Roussel y *col.*, 2008; Iglesias-Baena y *col.*, 2010). En ausencia del agente reductor, en condiciones *in vitro*, se produce un aumento en el ratio (ADP+Pi)/ATP impidiendo que la reacción progrese.

La función de la Srx se relaciona con el mantenimiento del estado redox. Diversos estudios aportan numerosas pruebas a esta afirmación, como el aumento de los niveles de expresión de *AtSrx* bajo un estrés por peróxido de hidrógeno o la sensibilidad al estrés oxidativo en líneas carentes del gen *AtSrx* (KO: Knock Out) KO *AtSrx*. Además, después de un tratamiento con paraquat, el KO *AtSrx* incrementa los niveles de ROS en cloroplastos, mientras que esta hipersensibilidad se revierte al restaurar la expresión de *AtSrx* por transformación genética. Estos datos indican que la expresión y función de *AtSrx* en cloroplastos es esencial para una adecuada respuesta de la planta a las condiciones de estrés (Liu y *col.*, 2006). Este papel en el equilibrio redox acompañado del hecho de su especificidad por Prx y de la necesidad de un reductor como podría ser la Trx para llevar a cabo su actividad, así como de la unión Trx-Prx, han llevado a plantear la existencia en la célula de un sistema de regulación redox formado por Trx, Prx y Srx, llamado sistema Trx/Prx/Srx.

### 2.3. Señalización organelar

Las mitocondrias se consideran uno de los compartimentos más activos desde el punto de vista redox, debido a que consumen más del 90% del oxígeno utilizado por la célula. Son orgánulos con una elevada susceptibilidad a la oxidación y junto con cloroplastos constituyen las principales fuentes y dianas de ROS (junto con cloroplastos), por lo que

deben poseer un estricto control de su estado redox interno. Este control se sugiere que se ejerce a través de mecanismos de señalización coordinados con el núcleo y otras organelas.

Numerosos ensayos bioquímicos demuestran que un aumento en los niveles de ROS en diversas organelas puede modificar la expresión de genes nucleares que codifican proteínas específicas para este orgánulo, capaces de contrarrestar el aumento de estas especies reactivas. Este tipo de señalización se denomina “señalización retrógrada” porque la señal se origina en el orgánulo que dirige la expresión de genes específicos en el núcleo. La enzima oxidasa alternativa constituye un ejemplo típico de señalización retrógrada (Van Aken y *col.*, 2009). La expresión de esta enzima se encuentra incrementada en condiciones de estrés abiótico. Su aumento se correlaciona con una disminución de los niveles de ROS en la CTE y una inhibición de la muerte celular; de hecho, la represión de AOX con inhibidores o aproximaciones transgénicas produce alteraciones en la expresión de antioxidantes mitocondriales y cloroplastídicos (Giraud y *col.*, 2008) y estimula la activación de genes marcadores asociados a la senescencia que conducen a la muerte celular (Maxwell y *col.*, 2002).

Los cambios redox en los cloroplastos también pueden generar una señalización retrógrada con el núcleo a través de la proteína parecida a la fructoquinasa (FLP: Fructoquinase Like Protein). Esta proteína es activada por Trx z que parece constituir un sensor redox. Ante condiciones de estrés lumínico e hídrico este sistema favorece que aumente la expresión de una ARN polimerasa plastidial que activa la expresión de genes cloroplastídicos capaces de contrarrestar el estrés (Arsova y *col.*, 2010; Wimmelbacher y Börnke, 2014). En otros casos, los niveles de ROS cloroplastídicos, pueden generar un aumento de la expresión de antioxidantes mitocondriales, lo que se traduce en una señalización de tipo interorganelar. En este sentido, se ha sugerido que los niveles y el estado redox del ASC mitocondrial podría proteger a la fotosíntesis de la fotoinhibición y de esta forma, la síntesis mitocondrial de ASC, que depende de cambios en la respiración, podría regular la expresión de genes nucleares de origen cloroplastídico (Talla y *col.*, 2011).

El estado redox celular se encuentra modulado además por otro tipo de mecanismos de señalización que se originan en el citoplasma. En este sentido, los cambios redox en el citoplasma son los que desencadenan la expresión de genes organelares y es lo que ocurre con la señalización anterógrada. Un ejemplo sería la activación por la luz de genes nucleares cloroplastídicos (Ohgishi y *col.*, 2004) que regulan las funciones y desarrollo en el cloroplasto.

Entre los intermediarios que coordinan todos estos tipos de señalización se ha descrito que tanto los ROS *per se*, como los péptidos oxidados resultantes de la ruptura proteolítica de las proteínas oxidadas podrían ejercer un efecto sobre el transcriptoma nuclear (Pesaresi y *col.*, 2006). Algunos artículos proponen que la especificidad de la señalización sería fundamentalmente ejecutada por proteínas específicas presentes en cada orgánulo que al oxidarse y degradarse podrían servir como elementos de señalización clave en la expresión génica de proteínas concretas (Apel y Hirt, 2004; Møller y Sweetlove, 2010).

### 3. Muerte celular programada

El ciclo celular en los seres vivos está controlado de forma positiva (protoncogenes) y negativa (genes supresores de tumores) y por tanto, el destino de una célula estará determinado por un equilibrio entre ambos factores. Los primeros desencadenan procesos de proliferación y supervivencia celular mientras que los segundos estimulan la muerte celular. Como ya se ha comentado en los seres vivos, este tipo de muerte se llama muerte celular programada o PCD (Programmed Cell Death), también apoptosis en animales, ya que la célula es capaz de desencadenar un programa de suicidio orquestado por una serie de señales moleculares controladas genéticamente y que tienen el propósito de autocontrolar su desarrollo y crecimiento. Este tipo de muerte hace posible la destrucción de las células dañadas, redundantes o deslocalizadas y evita la proliferación descontrolada de las células sin ocasionar daños en los tejidos circundantes.

En plantas la PCD tiene lugar durante una variedad de procesos incluyendo la diferenciación de elementos traqueales (Fukuda, 2000), la diferenciación del gametofito femenino (Wu y Cheun, 2000), el desarrollo del endospermo y la capa de aleurona en la

semilla de cereales (Fath y *col.*, 2000; Young y Gallie, 2000), así como en respuestas a estímulos externos tales como la respuesta de hipersensibilidad contra el ataque de patógenos (Lamb y Dixon, 1997; Beers y McDowell, 2001) y severos estreses abióticos como una elevada intensidad lumínica y temperatura, concentraciones elevadas de aluminio y metales pesados (Koukalová y *col.*, 1997; Rao y Davis, 2001).

En contraste, un daño agudo en los tejidos puede desencadenar una muerte violenta llamada necrosis. Este tipo de muerte no está dirigida por ningún mecanismo molecular y resulta en un daño rápido de los tejidos circundantes.

### 3.1. PCD en animales *versus* plantas

Las investigaciones de PCD en plantas se han enfocado desde la perspectiva de la identificación de similitudes con el proceso de PCD en animales. De hecho, se han observado varias similitudes morfológicas y bioquímicas en células animales apoptóticas y células vegetales en fase de muerte, tales como la condensación de la cromatina, la constricción del citoplasma, la degradación del ADN genómico, la activación de caspasas y la liberación de citocromo *c* de la mitocondria. Sin embargo, todas estas señales no parecen ser exclusivas de una muerte programada en vegetales y en ocasiones, algunas de ellas, se presentan también en procesos necróticos (van Doorn y *col.*, 2011).

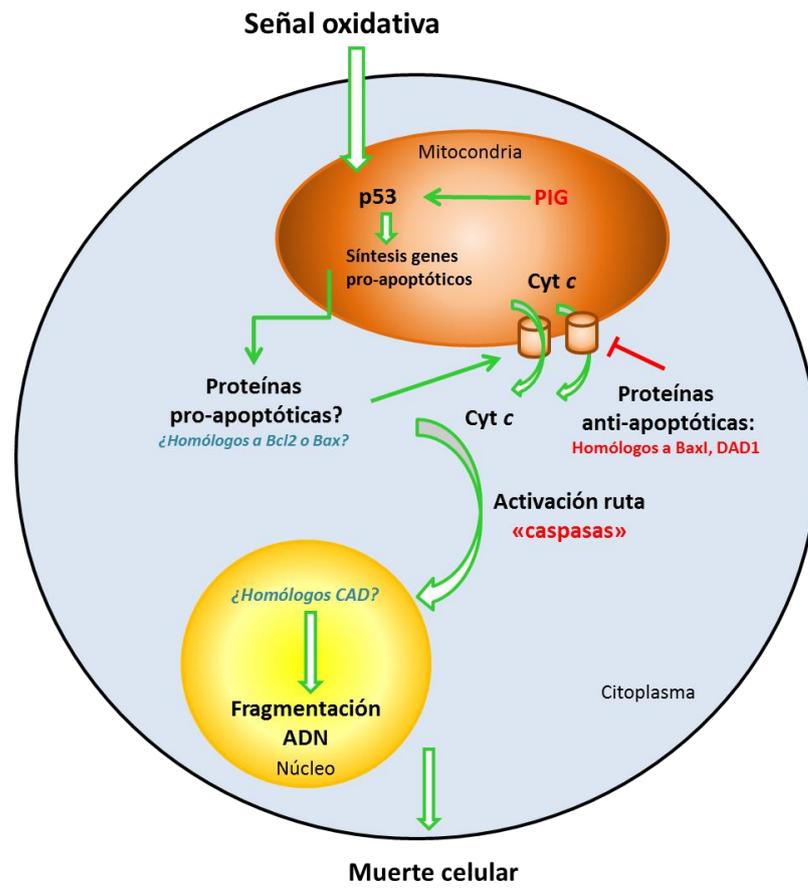
La presencia de una pared en las células vegetales y la ausencia de fagocitos determinan que el término “apoptosis” no pueda ser usado de la misma manera en plantas para los mecanismos de muerte celular programada. De hecho, diferentes formas de PCD vegetal exhiben solo algunas señales morfológicas y moleculares de la apoptosis (Danon y *col.*, 2000; Cacas, 2010). A este respecto, hay una gran controversia en llamar a este proceso “similar a la apoptosis” o “muerte vacuolar” (van Doorn y *col.*, 2011), como sostienen algunos investigadores, al apoyar que la característica más evidente es la formación de una gran vacuola lítica con un papel similar al que tendrían los lisosomas en las células animales.

Las rutas moleculares que conducen a apoptosis en animales están ampliamente estudiadas, si bien en plantas no existe tanta información, sí que se ha observado que

algunos componentes y mecanismos de estas rutas son similares a las que usan los animales (Fig. 11).

La liberación del citocromo *c* (cyt *c*) de la mitocondria es uno de los eventos bioquímicos que caracterizan a la apoptosis animal (Balk *y col.*, 1999; Sun *y col.*, 1999; Kim *y col.*, 2008). Este evento ha sido bien documentado en plantas (Balk *y col.*, 1999; Robson y Vanlerberghe, 2002; Vacca, 2006; Andronis y Roubelakis-Angelakis, 2010) aunque en casos concretos está siendo cuestionado (Xu y Hanson, 2000; Yao *y col.*, 2004). La liberación de cyt *c* es un proceso estimulado por la acción de genes apoptóticos, previa activación por factores de transcripción como p53. Muchos de estos genes pertenecen a la familia de dominios de homología Bcl-2, BH (B-cell lymphoma-2, B-homology) y producen miembros pro-apoptóticos, como las proteínas Bax y Bak (Brenner *y col.*, 2000; Cregan *y col.*, 2002) y anti-apoptóticos como la proteína Bcl-2. Las proteínas Bak-Bax pueden formar un complejo oligomérico en la membrana interna mitocondrial (OMM: Outside Mitochondrial Membrane) (Brenner *y col.*, 2000; Cregan *y col.*, 2002) a modo de canal y de esta forma facilitar la salida de cyt *c* al citoplasma (Kroemer y Reed, 2000), mientras que Bcl-2 inhibe a estas proteínas pro-apoptóticas evitando la formación del poro en la OMM. En este contexto el equilibrio entre estos factores pro y anti-apoptóticos es fundamental en el desencadenamiento de una PCD (Huang, 2000).

Hasta la fecha no se han encontrado factores homólogos a miembros de la familia Bcl-2 en vegetales, aunque, la expresión de proteínas pro-apoptóticas animales en plantas induce muerte celular (Lacomme y Santa Cruz, 1999) y plantas sobre-expresantes de factores anti-apoptóticos animales aumentan su tolerancia a estrés biótico y abiótico (Mitsuhara *y col.*, 1999). Sin embargo, se han encontrado homólogos de plantas, principalmente anti-apoptóticos para otras proteínas que intervienen en la regulación de la apoptosis como el supresor de la muerte apoptótica-1 (DAD-1), un Inhibidor de BAX-1 (BI-1) y 3 genes inductores de p53, PIG (p53 Induced Gene) (Nakashima *y col.*, 1993; Venot *y col.*, 1998; Chae *y col.*, 2003).



**Figura 11: Rutas de PCD descritas en plantas por homología en animales.** Una señal oxidativa puede activar rutas de muerte celular programada. En animales, la activación del factor de transcripción p53 favorece la síntesis de proteínas pro-apoptóticas que permiten la salida de citocromo c de la mitocondria. Este citocromo activa una ruta de caspasas que conlleva la fragmentación del ADN en unidades discretas y con ello la muerte de la célula. Estas rutas en plantas se solapan con las de animales, si bien solo se han encontrado algunos homólogos a las proteínas animales como PIG, Bax1 y DAD1 (letras rojas, ver abreviaturas en el texto). Otras moléculas similares a Bax, Bcl-2 y CAD deben existir en plantas (letras azules), si bien aún no se han encontrado sus homólogos vegetales.

Durante el proceso apoptótico, la presencia de cyt c en el citoplasma favorece la formación del apoptosoma (Zou y col., 1999), un complejo que desencadena una cascada de activación de unas proteasas llamadas caspasas capaces de desencadenar en última instancia la activación de una endonucleasa nuclear llamada CAD (Cistienil-Aspartato-específica o Dnasa activada por caspasa) con capacidad para catalizar la rotura de los enlaces fosfodiéster en el ADN y con ello la degradación del ADN en fragmentos discretos. En

vegetales se han encontrado algunos homólogos de esta ruta. Así, enzimas proteolíticas implicadas en eventos de PCD han sido localizadas en distintos compartimentos de las células vegetales, como las metacaspasas en el citoplasma, las enzimas vacuolares procesadoras (VPE) en la vacuola o las fitaspasas en el fluido intercelular. De hecho, un mecanismo similar al coordinado para las caspasas animales ha sido establecido para “caspasas” vegetales (Enari *y col.*, 1998; Li *y col.*, 2004).

En conclusión, tanto en plantas como en animales, la variedad de rutas genéticas implicadas en las distintas formas de PCD a veces se solapan. La duración y el tiempo de activación de algunas de las rutas metabólicas son factores cruciales en determinar la activación de una respuesta específica (de Pinto *y col.*, 2006; Love *y col.*, 2008).

### **3.2. Señalización por PCD: papel del metabolismo antioxidante**

La intensidad del estrés así como el tiempo de aplicación son dos factores clave en el desencadenamiento de procesos de muerte celular. En células de tabaco BY-2 (TBY-2) se ha demostrado que una producción prolongada de  $H_2O_2$  durante varias horas activa un proceso necrótico, mientras que una cantidad de  $H_2O_2$  comparable a la que induce necrosis pero aplicada en un solo pulso desencadena PCD (de Pinto *y col.*, 2006). Además, la naturaleza química de los ROS parece ser crítica en la selectividad y especificidad de las señales durante este proceso por lo que distintos ROS pueden activar distintas rutas de señalización (Gadjev *y col.*, 2006). Por ejemplo, el radical superóxido activa la síntesis de antocianos en el cloroplasto, mientras que el peróxido de hidrógeno la inhibe y favorece la dispersión de procesos de muerte celular durante una respuesta hipersensible (HR) (Dietrich *y col.*, 1997; Aviv *y col.*, 2002; Mateo *y col.*, 2004; Kaminaka *y col.*, 2006).

El radical oxígeno singlete puede activar genes cloroplastídicos específicos como Executer 1 y 2 que median en la formación catalítica de peróxidos durante la PCD (Przybyla *y col.*, 2008). Sin embargo, de todas las especies de oxígeno activadas, el  $H_2O_2$ , es una de las señales más estudiadas dada su vida media y capacidad de difusión. De hecho, esta molécula es vital en el desarrollo de muchos procesos fisiológicos como la germinación, en la que un aumento de  $H_2O_2$  favorece la PCD de las células de la capa de aleurona y la consiguiente

movilización de reservas (Domínguez y Cejudo, 2014). Este aumento es favorecido por una represión de los sistemas antioxidantes, si bien esta supresión no es generalizada en todos los compartimentos celulares y en células TBY-2 sometidas a choque térmico se observa la modificación de algunos de los elementos del ciclo ASC-GSH que es específica dependiendo del orgánulo (Locato y *col.*, 2009).

A pesar de la gran cantidad de resultados que indican la implicación activa de los ROS en las rutas de señalización de PCD, también se han descritos casos en los que la PCD ocurre de forma independiente a la producción de ROS (Locato, 2006). El aumento de óxido nítrico (NO) es un evento común a muchos procesos de PCD, de modo que los tratamientos con generadores de NO disminuyen o aumentan los efectos de los ROS (Delledonne y *col.*, 2001), lo que sugiere la interconexión entre ambos metabolitos. De hecho, se ha demostrado que la HR es activada por el balance NO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y de esta forma cuando el NO reacciona con O<sub>2</sub><sup>-</sup> altera este balance y disminuye la inducción de muerte celular (Delledonne y *col.*, 2001). Parte de las rutas de señalización dependientes de NO están reguladas por modificaciones post-transduccionales como la S-nitrosilación (Leitner y *col.*, 2009), donde el NO se une covalentemente a los grupos sulfidrilo de residuos de cisteína en sus proteínas dianas modulando la actividad de proteínas como PrxIIIE y Prx IIF (Dietz y *col.*, 2006; Romero-Puertas y *col.*, 2007) o la APX (Locato y *col.*, 2008), enzimas capaces de eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular. En el caso de la APX, la S-nitrosilación modifica su cinética de una sigmoidal a una cinética hiperbólica, lo que conlleva el cese de su actividad (de Pinto y *col.*, 2013).

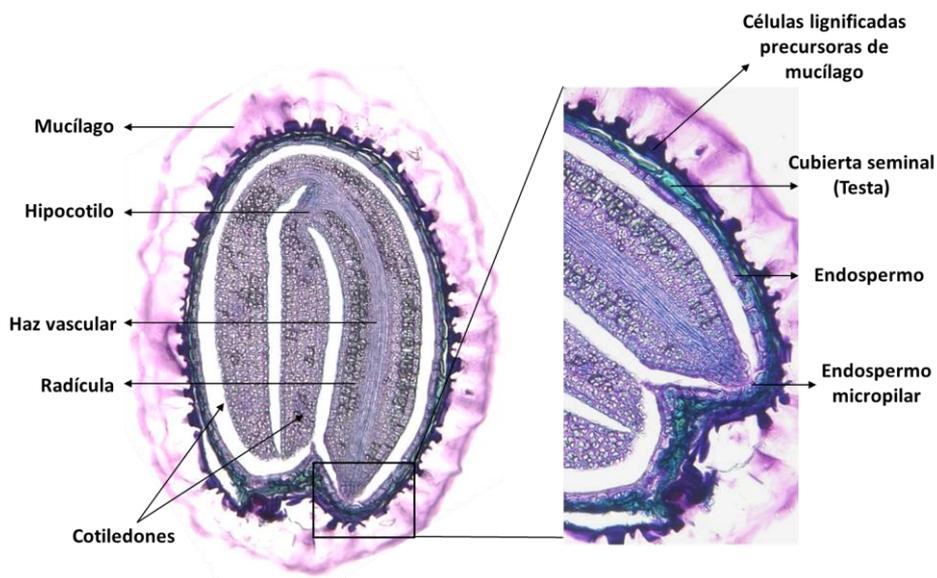
## 4. La germinación en *Arabidopsis thaliana*

### 4.1. La semilla

La semilla es la unidad de diseminación utilizada por las plantas superiores para su dispersión y propagación. La mayoría de semillas maduras de Angiospermas consisten en un embrión rodeado de dos capas fundamentales: la testa también llamada cubierta seminal, constituida por células cuyo contenido va desapareciendo a lo largo de la maduración de la semilla y constituida principalmente por células muertas y la capa endospermica, que sirve como órgano de almacenamiento de nutrientes. Sin embargo, la semilla exhibe diferencias

específicas en su estructura y en la composición de los compuestos de almacenamiento dependiendo de la especie (Obroucheva y Antipova, 1997; Linkies y col., 2010) por lo que constituye un criterio taxonómico importante.

La semilla oleosa de las Brassicaceas, *Arabidopsis thaliana* y *Lepidium sativum*, constituyen ejemplos de semillas endospermicas, aunque la mayoría de especies, almacenan los nutrientes directamente en los cotiledones embrionarios (Liu y col., 2005). Las semillas maduras de *Arabidopsis* denominadas con las siglas FA2 (Foliate Axile seed type) contienen un embrión en forma de espátula doblada similar a una navaja, rodeada de una fina capa endospermica constituida por una sola capa de células y protegido de la testa. La testa no solo protege al embrión del daño mecánico o del ataque por patógenos, sino que asegura la germinación de las semillas en las condiciones óptimas y proporciona un mecanismo de dispersión importante. Adicionalmente, una capa gelatinosa de mucílago rodea toda la semilla. Esta estructura se produce durante el desarrollo de la semilla y se deposita en la capa externa de la testa. Está formada por polisacáridos, es hidrofílica y se cree que regula el equilibrio hídrico en la semilla seca, de hecho, cuando la semilla es embebida, esta capa se desprende de la testa (Fig. 12).



**Figura 12:** Corte longitudinal de la semilla de *A. thaliana* embebida en agua 12 h. Tinción con el colorante vital azul tripán.

## 4.2. Ciclo de vida de la semilla

El ciclo de vida de la semilla comprende tres fases: desarrollo, maduración y germinación.

- **Desarrollo de la semilla**

La formación de la semilla comienza con la doble fecundación de la ovocélula haploide y de la célula central diploide del gametofito femenino por cada una de las células espermáticas haploides contenidas en el grano de polen. De cada fecundación se forman distintos tejidos, así la fecundación de la ovocélula origina un embrión diploide, mientras que la de la célula central diploide da lugar al endospermo triploide, una estructura que en monocotiledóneas almacena sustancias de reserva y en dicotiledóneas queda reducida a un elemento vestigial durante el desarrollo y maduración de la semilla. Por otro lado, la diferenciación de los integumentos del óvulo dará lugar a la cubierta seminal (Olsen, 2004; Berger y *col.*, 2008).

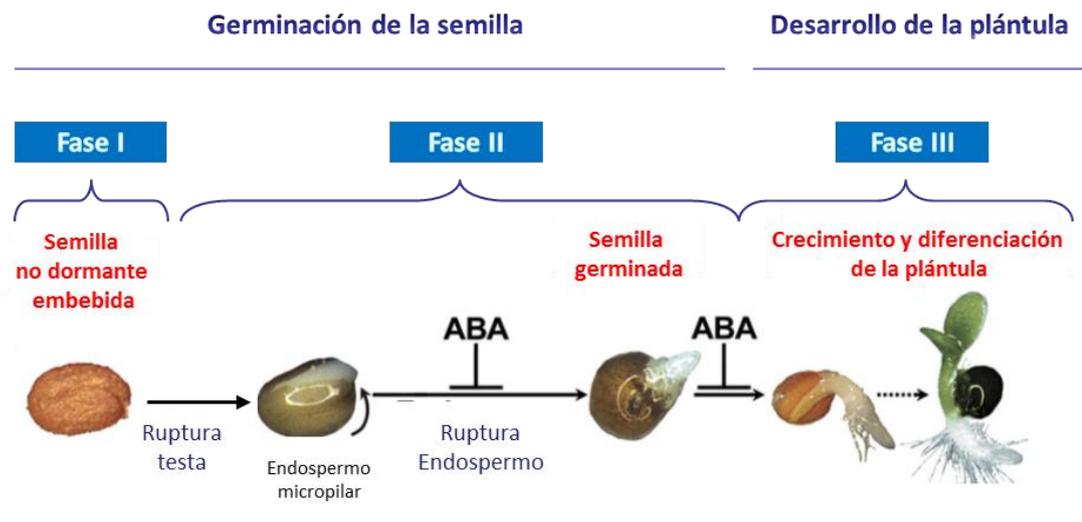
- **Maduración de la semilla**

La fase de maduración de la semilla engloba el cese de la división celular y la síntesis y acumulación de sustancias de reserva en el endospermo. Esta etapa culmina con un proceso de pérdida masiva de agua que da lugar a la semilla madura y que entra entonces en un periodo de dormición. La dormancia o latencia constituye el periodo más largo de vida de la semilla, y podría definirse como la incapacidad de una semilla seca, madura y viable para germinar en condiciones desfavorables (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006). La duración de este fenómeno es variable y tiene un gran efecto el fondo genético de la especie, las condiciones ambientales y la relación entre las hormonas ácido abscísico (ABA) y giberelinas (GAs). Durante el almacenamiento en seco de la semilla (AR: After-Ripening), la dormancia disminuye gradualmente debido a que la semilla incrementa su sensibilidad a factores que promueven la germinación (luz, temperatura, GA, etc.), disminuyendo aquellos factores que la inhiben (ABA). A este tipo de dormancia se le denomina dormancia primaria, y es el periodo durante la maduración de la semilla en que ésta es insensible a las condiciones ambientales favorables para la germinación. Una vez superada la dormancia primaria, si la

semilla se embebe en agua bajo condiciones ambientales desfavorables para la germinación, se induce la dormancia secundaria o inducida; sin embargo, la exposición de nuevo a AR puede promover la germinación de estas semillas. De esta manera, la semilla puede adquirir de forma cíclica estados durmientes y no durmientes dependiendo de las condiciones ambientales (Hilhorst, 2007; Finkelstein y *col.*, 2008).

- **Germinación de la semilla**

La germinación ocurre cuando la semilla ha superado este proceso de dormancia, las condiciones son las favorables y es embebida en agua. La entrada de agua reactiva el metabolismo y el crecimiento de los tejidos seminales. Fisiológicamente, la germinación comprende el periodo desde el comienzo de la imbibición de la semilla hasta que la radícula atraviesa las cubiertas seminales, marcando el comienzo de la etapa post-germinativa (Finch-Savage y Leubner-Metzger, 2006) (Fig. 12). El proceso de germinación se ha dividido clásicamente en tres etapas (Bewley, 1997). La primera etapa se caracteriza por la reactivación de la transcripción génica, síntesis proteica y respiración celular. La segunda etapa es un evento de desarrollo clave e incluye, la rotura de la testa, que se considera el primer signo externo de la germinación, la rotura del endospermo y la protrusión de la radícula (Müller y *col.*, 2006). La influencia de las células del endospermo en la ruptura de la testa aún no está del todo clara, si bien, parece responder más a una causa bioquímica que física. Así, se ha demostrado que la secreción de ROS y enzimas hidrolíticas podrían debilitar las estructuras de la testa permitiendo la salida de la radícula (Oracz y *col.*, 2011; Zhang y *col.*, 2014). Además, a este respecto, ABA y GA resultan cruciales, mientras que ABA inhibe el proceso de germinación, GA lo induce a través de la activación de enzimas hidrolíticas tales como alfa-amilasas, glucanasas y proteasas (Finkelstein y *col.*, 2008; Liu y *col.*, 2013), capaces de movilizar los compuestos de reserva que serán utilizados para nutrir el crecimiento de la nueva plántula. Por último, la tercera etapa o etapa post-germinativa es concomitante con la elongación de la radícula y determina el crecimiento de la plántula que hará uso de todas sus reservas hasta tener un aparato fotosintético preparado para la síntesis de su propia energía (Fig. 13).



**Figura 13: Eventos visibles que comprenden la germinación de la semilla.** Fase I: imbibición de la semilla, fase II: rotura de la testa y el endospermo, fase III: crecimiento y diferenciación de la plántula. Los niveles de ABA son particularmente bajos durante el proceso germinativo, mientras que los niveles de la hormona GA son más elevados. Extraído de Karin Weitbrecht y col., (2011).

### 4.3. Función del metabolismo antioxidante y redox durante la germinación

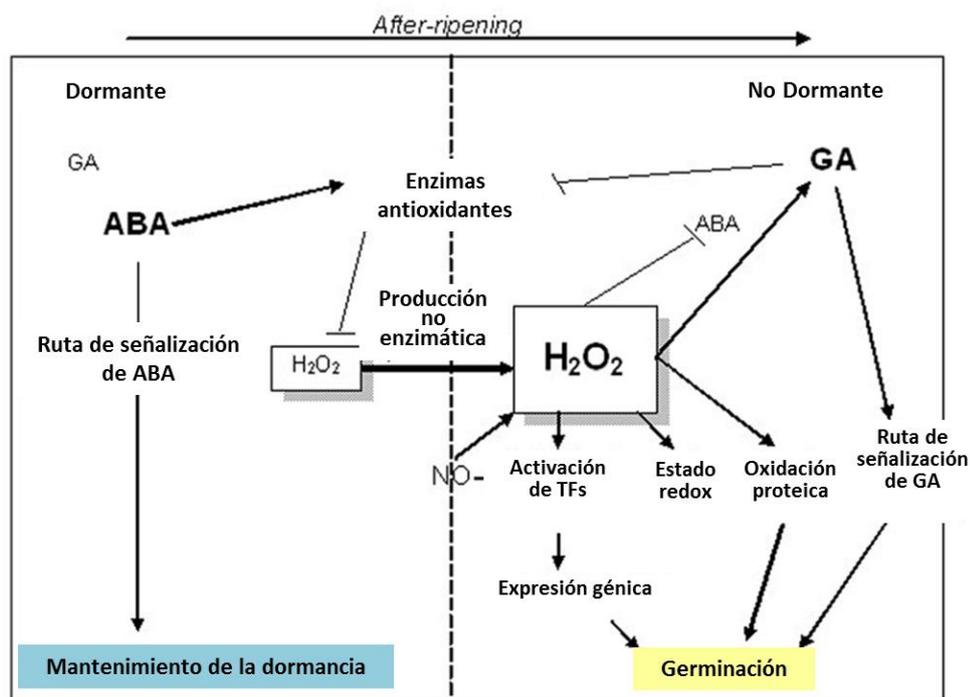
La germinación está asociada con muchos procesos metabólicos, celulares y moleculares que permiten la protrusión de la radícula y el establecimiento de la plántula. La producción de ROS y NO ha sido demostrada en semillas de numerosas especies vegetales desde la imbibición o absorción de agua por la semilla seca, hasta el alargamiento del eje embrionario (Caro y Puntarulo, 1999; Bailly, 2004; Bethke y col., 2004; Holdsworth y col., 2008). Estas especies reactivas no sólo se producen en células metabólicamente activas sino también en aquellos tejidos secos y quiescentes durante la dormición de la semilla o su almacenamiento. Con el tiempo de almacenamiento la acumulación de ROS ocasiona daños oxidativos en los componentes celulares que finalmente conducen a una muerte celular. Esto se manifiesta en el envejecimiento de la semilla y en consecuencia en una pérdida de la viabilidad de la misma. En base a estas observaciones Bailly y col. (2008) establecieron el concepto de “ventana oxidativa”, que define un rango de concentraciones para los niveles de ROS donde la semilla tiene capacidad germinativa. Valores umbral por debajo o por

encima de este rango implicarían la baja capacidad de la semilla para germinar, bien por el mantenimiento de la dormancia o por su envejecimiento respectivamente.

El papel no solo antioxidante, sino también señalizador de estas moléculas, ha sido descrito tanto en la germinación como en dormancia (Bailly, 2004; El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Una acumulación de  $H_2O_2$  favorece la salida de la latencia en numerosas especies vegetales y es una importante señal durante la imbibición de la semilla y en las etapas tempranas de la germinación en numerosas especies vegetales (Caliskan y Cuming, 1998; Hite *et al.*, 1999; Bailly *et al.*, 2002; Morohashi, 2002; Lariguet *et al.*, 2013). Además, la acumulación de  $OH^\cdot$ ,  $O_2^{\cdot-}$  y  $NO$  también ha sido detectada durante este proceso (Schopfer, 2001; Sarath *et al.*, 2007). Las fuentes de producción de estas ROS no están bien documentadas, si bien se presupone que la mayoría proceden de la mitocondria y de la actividad de la NADPH oxidasa (Gapper y Dolan, 2006; Sarath *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2014) como consecuencia de la reactivación del metabolismo mitocondrial que supone la imbibición de la semilla.

La importancia de los ROS en la germinación se ha establecido para varios procesos que se dan durante este fenómeno fisiológico, como el aflojamiento de la pared celular durante el debilitamiento del endospermo (Schopfer, 2001; Zhang *et al.*, 2014), la PCD en las células de la capa de aleurona de grano de cereal que favorece la movilización de reservas (Domínguez y Cejudo, 2014) o la protección de la plántula contra el ataque de patógenos. A nivel molecular, la acumulación de  $H_2O_2$  durante la imbibición regula las redes hormonales de GA y ABA (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; Oracz *et al.*, 2009), favoreciendo la biosíntesis de GA (Leymarie *et al.*, 2011) y el catabolismo de ABA (Liu *et al.*, 2010) y de esta forma liberando a la semilla de la dormancia. Del mismo modo, la oxidación de proteínas por carbonilación incrementa la susceptibilidad a la rotura proteolítica de macromoléculas orgánicas y su uso como fuente de energía (El Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). En esta dirección, se ha descrito que muchas proteínas implicadas en la glicolisis/gluconeogénesis son carboniladas durante la germinación, lo que proporciona poder reductor a través de la ruta de las pentosas fosfato. Además, el  $H_2O_2$  también activa rutas de expresión génica a través de la activación de factores de transcripción específicos capaces de regular la

activación de genes implicados en el desarrollo de la germinación, algunos de estos genes son importantes antioxidantes. De hecho la actividad de numerosas enzimas como CAT (Puntarulo y col., 1991; Gallardo y col., 2001; Posmyk y col., 2001; Chiu y col., 2002), SOD, APX y GR (Puntarulo y col., 1991; Tommasi y col., 2001; de Tullio y Arrigoni, 2003) aumentan en distintos momentos durante la germinación. Además, numerosas proteínas redox como Trx, Grx y el metabolito GSH aprovechan esta señal oxidativa para regular a otras proteínas implicadas en el proceso germinativo (Foyer y Noctor, 2003; Buchanan y Balmer, 2005), (Fig. 14).



**Figura 14: Modelo hipotético que propone un papel central de los ROS en la liberación de la dormancia y germinación.** En estado de dormancia, existen altos niveles de ABA que inducen una ruta de señalización implicada en el mantenimiento de la misma. Bajas concentraciones de ABA en semillas no dormantes podrían estar asociadas con altos niveles de ROS, presumiblemente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que podrían interferir con las rutas de señalización con ABA y GA, modificando el estado redox e induciendo la carbonilación de proteínas. El óxido nítrico (NO) podría interferir con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y activar la señalización por GA. El tamaño de las letras es proporcional a la cantidad relativa de los distintos compuestos (ABA, GA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Extraído de (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008).

De hecho, la implicación de las Trxs en la germinación ha sido particularmente demostrada en semillas de cereales ya que es capaz de activar proteínas implicadas en la movilización de reservas del endospermo amiláceo necesarias para el desarrollo de la plántula (Marx y col., 2003; Serrato y Cejudo, 2003; Wong y col., 2004). Además, en semillas de *Medicago truncatula*, la Trx parece modular una gran cantidad de proteínas implicadas en un abanico mucho más amplio de procesos como la respuesta al estrés oxidativo, la síntesis de ADN, la síntesis de aminoácidos y vitaminas, la estructura celular etc. (Alkhalfioui y col., 2007).

Todos estos datos sugieren la existencia de una interacción entre estado redox, sistemas antioxidantes y hormonas vegetales, orquestado principalmente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Así, este peróxido podría actuar tanto de mensajero en la red hormonal como de señalizador en la germinación de la semilla.

## 5. Estrés salino

La salinidad en los suelos y en el agua de riego es un serio problema para la agricultura en regiones áridas y semiáridas, ya que representa pérdidas en el rendimiento de las cosechas que oscilan entre un 65-87% (Buchanan y col., 2002; Flowers, 2004). La salinidad afecta a más de 80 millones de tierra cultivable en el mundo (Munns y Tester, 2008) y una tercera parte de la población mundial habita en tierras irrigadas con aguas de baja calidad y que suelen ser terrenos con baja pluviometría, por lo que ambos estreses podrían ser los más frecuentes y severos en el futuro.

El estrés salino se produce por un aumento de la concentración de iones sodio (Na<sup>+</sup>) y cloro (Cl<sup>-</sup>) en la fracción soluble del suelo que conduce a condiciones hiperiónicas e hiperosmóticas que perjudican la capacidad de las plantas para la toma de agua y micronutrientes. Las plantas, por otro lado, han adquirido distintos mecanismos adaptativos para controlar el impacto negativo de la salinidad y se clasifican en base a su respuesta a la salinidad en dos grupos: halófitas y glicófitas. Mientras las primeras son capaces de habitar en terrenos salinos gracias a la presencia de mecanismos adaptativos, muy bien integrados en su metabolismo, las glicófitas presentan una menor adaptación a la salinidad y su

crecimiento está muy limitado en estas condiciones de estrés (Tuteja, 2007). La mayoría de las especies de plantas cultivadas para cosecha son glicófitas, por lo que deben desarrollar diferentes mecanismos fisiológicos y bioquímicos a fin de sobrevivir y tolerar distintas concentraciones salinas en el suelo. El efecto del estrés va a depender de su duración y severidad (Rozema y Flowers, 2008; James y *col.*, 2011).

La respuesta de las plantas a la salinidad se divide en dos fases, una respuesta rápida que se lleva a cabo en el intervalo de unas horas y una respuesta a largo plazo que se manifiesta a lo largo de días y semanas. En la primera fase, también llamada “fase osmótica”, la alta concentración de sales en el suelo, altera el potencial osmótico del mismo y por tanto, la capacidad de las raíces para absorber agua se ve disminuida. Este hecho, produce un estrés osmótico en la planta que desencadena varios cambios fisiológicos, tales como la desestabilización de membranas, la disminución de la actividad fotosintética, la apertura estomática, alteración de la actividad respiratoria, (Munns y Tester, 2008; Rahnama y *col.*, 2010) y cambios en los niveles de ROS y sistemas antioxidantes que conllevan el subsiguiente estrés oxidativo. Con el tiempo de exposición al estrés, la sal produce un efecto propio de sus características como catión, llamado “efecto iónico”, que se traduce en la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en los tejidos de la planta y que desencadena un desequilibrio iónico y la consecuente toxicidad. Los daños celulares en esta fase, son consecuencia por tanto, de la acumulación de sal en las hojas, que alcanza niveles que exceden la capacidad de las células para secuestrar sales en la vacuola (Munns, 2002; Munns, 2005; Gupta y Huang, 2014). Sin embargo, las plantas han desarrollado algunas respuestas adaptativas para eliminar el excedente salino como son: 1) homeostasis y compartimentalización iónica, 2) transporte y exclusión iónica, 3) biosíntesis de osmoprotectores y solutos compatibles, 4) activación y síntesis de sistemas redox y antioxidantes, 5) síntesis de poliaminas, 6) generación de óxido nítrico (NO) y 7) modulación hormonal. Entre todos los mecanismos de respuesta planteados, en esta Tesis doctoral nos centraremos en el punto cuatro, por considerarlo el más estrictamente relacionado con la Trx. La implicación de Trx en el estrés salino y su correlación con la tolerancia de plantas en esta situación no está del todo elucidada. Resultados de análisis transcriptómico en variedades de álamo sensibles y tolerantes a salinidad han revelado que Trxs cloroplastídicas y citoplasmáticas presentan

patrones inconsistentes en respuesta a la sal en las hojas, con la mayoría de genes sin cambios mientras que otros incrementaban o descendían su expresión bajo las condiciones salinas (Ding *y col.*, 2010). Se ha descrito que cuando cepas de levadura carentes de Trx citosólica se complementaron con PsTrx *f* y *m1*, de plantas las nuevas cepas pudieron crecer en medios salinos con una concentración de hasta 650 mM de NaCl. Además, una situación de estrés salino induce un aumento tejido-específico de transcritos de las Trx *m*, *f* y FNR en plántulas de guisante (Fernández-Trijueque *y col.*, 2012). Por otro lado, la Trx01 de guisante ha sido descrita en nuestro laboratorio como implicada en la respuesta a salinidad, con un incremento de expresión a tiempos cortos de estrés y de su actividad en tratamientos prolongados de NaCl (150 mM) (Martí *y col.*, 2011). Así, se atribuye un papel para esta Trx01 como componente del sistema de defensa inducido por NaCl en mitocondrias de guisante, proporcionando a la célula con un mecanismo de respuesta al estrés, protegiendo a la mitocondria del estrés oxidativo inducido por la salinidad junto con Mn-SOD, AOX y PrxIIIF.

# **OBJETIVOS**



La caracterización de nuevos sistemas antioxidantes y de regulación redox mitocondriales y nucleares así como su implicación en la señalización celular mediada por ROS y RNS en procesos de salinidad y en desarrollo, constituye una de las líneas de investigación de nuestro grupo perteneciente al Departamento de Biología del Estrés y Patología Vegetal, del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC) de Murcia. Entre los componentes del sistema redox, concretamente la tiorredoxina PsTrx01 de doble localización, mitocondrial y nuclear, junto a su diana mitocondrial la peroxirredoxina PsPrx IIF y la sulfirredoxina PsSrx, están siendo objeto de estudio en nuestro grupo en estos últimos años. La funcionalidad de estas proteínas se encuentra bien establecida en células animales y en levadura, mientras que en células vegetales la función ejercida por las mismas es menos conocida, más específicamente su posible participación en procesos relacionados con respuesta a estrés abiótico, germinación y muerte celular programada. De forma similar, la información actual sobre la regulación génica de Trxs, Prxs y Srxs en plantas es muy escasa. En este contexto, la función celular de PsTrx01 en el núcleo es de especial interés considerando la participación descrita para tiorredoxinas de origen bacteriano y/o animal en la regulación del ciclo celular entre otros aspectos. Así mismo, el hecho descrito en nuestro laboratorio de la participación de PsTrx01 junto con PsPrxIIF y determinados componentes antioxidantes mitocondriales, en la respuesta a estrés salino en plantas de guisante, lleva a plantear el estudio de la función de estas proteínas tanto a nivel nuclear como en procesos de desarrollo, en condiciones normales e inductoras de estrés oxidativo, entre ellas el estrés salino. Estas investigaciones unidas a las de la regulación transcripcional de *Trx01* permitirán avanzar en la función celular de estas proteínas redox en vegetales.

En este trabajo de Tesis Doctoral se han propuesto los siguientes objetivos:

1. Identificación de las proteínas dianas nucleares de PsTrx01 como paso previo a determinar en qué procesos pueda estar implicada esta tiorredoxina ampliando sus funciones a las ya descritas en mitocondrias.
2. Análisis de la implicación de AtTrx01 en el proceso de la germinación de semillas en condiciones control y bajo estrés salino, empleando plantas Wt y mutantes de *Arabidopsis* KO de *AtTrx01*.

3. Caracterización del promotor del gen *AtTrxo1* como paso inicial al estudio de su regulación transcripcional.
4. Estudio de la implicación de PsTrxo1 en el proceso de muerte celular programada (PCD) inducida por tratamiento oxidativo en células TBY-2 sobre-expresantes de PsTrxo1.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Material vegetal

Todas las experiencias de esta tesis se han realizado utilizando como material vegetal plantas de guisante (*Pisum sativum* L. cv. Lincoln), *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia (*A. thaliana col-0* o *Arabidopsis*), y plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*), así como suspensiones de células de tabaco BY-2 (Tobacco Bright Yellow-2).

### 1.1. *Pisum sativum*

#### 1.1.1. Condiciones de cultivo

Las semillas de guisante se esterilizaron superficialmente con una solución de lejía comercial al 10% (v/v) diluida en agua durante 3 min. Seguidamente, se lavaron abundantemente con agua destilada y se germinaron en vermiculita adecuadamente humedecida y tratada con el fungicida Redomix™, en oscuridad, durante tres días en cámara de cultivo. Transcurrido este tiempo, las semillas se mantuvieron durante 12 días más en las condiciones de iluminación de la cámara. Durante la primera semana, las plantas se regaron con agua destilada y una vez transcurrido dicho tiempo, con solución nutritiva completa Hoagland (en meq/l: NO<sub>3</sub><sup>-</sup> 22,5; H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> 1,29; SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 3,13; K<sup>+</sup> 4,62; Ca<sup>2+</sup> 6,0; Mg<sup>2+</sup> 3,29; y en ppm, Fe 5,0; Mn 0,5; Cu 0,05; Zn 0,05; B 0,5; Mo 0,005. La solución nutritiva tenía una presión osmótica de 0,67 atmósferas y un pH de 5,5). Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo a una temperatura de 18°C-24°C, con un fotoperiodo de ciclo largo (16 h luz: 8 h oscuridad), una irradiación de 350 μmol x m<sup>-2</sup> x s<sup>-1</sup> (PAR) aportada por lámparas incandescentes (Philips SON-T, 400w), y una humedad relativa de 65%-80% (noche-día).

#### 1.1.2. Aislamiento de núcleos

Con el objetivo de purificar núcleos de hojas de guisante se utilizó el sistema comercial CellLytic PN (Sigma™) empleando el protocolo de obtención de núcleos semipuros recomendado por el fabricante.

Se incubaron 80 g de hoja de guisante en 240 ml del medio 1xNIB (Nuclear Isolation Buffer) que contenía DTT 100 mM, durante 20 min a 4°C. Posteriormente, las hojas se

homogeneizaron utilizando un triturador de uso doméstico (Osterizer™) en ese mismo medio y se filtraron a través de un filtro MES de nylon 100 (100 µm de diámetro de poro). El homogenizado se centrifugó 10min en una centrífuga refrigerada Beckman mod. J2-21 con un rotor de ángulo fijo JA-14 a 1260g durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 8 ml de medio NIBA (NIB, 1x cocktail de inhibidores de proteasas (Complete™), y Triton X-100 a una concentración final de 0,3% (v/v)).

En dos tubos de centrífuga transparentes aptos para el rotor JA-20 se adicionaron 27 ml de una disolución de sacarosa 1,8 M y sobre ésta se depositó la muestra. Tras centrifugar a 12.000g, 15 min se eliminó la fase superior, enriquecida en clorofila y la de sacarosa, recogiendo con NIBA los núcleos que se depositaron en el fondo del tubo. Los núcleos se lavaron con NIBA dos veces por centrifugación 12.000 g, 5 min. Estos núcleos parcialmente purificados se resuspendieron en buffer de almacenamiento a -80°C hasta su utilización.

## **1.2. Arabidopsis thaliana**

### **1.2.1. Condiciones de cultivo**

La germinación de *A. thaliana* en turba se realizó distribuyendo las semillas sobre la superficie de alveolos (5x5 cm) de una mezcla de tierra hortícola/vermiculita (3:1) estéril. Las bandejas se cubrieron con un film con pequeñas ventanas de aireación durante los primeros días, para favorecer un ambiente saturado en humedad y así estimular la germinación.

Para el cultivo en placa, las semillas se esterilizaron superficialmente 10 min con 70% etanol (v/v) en agitación por inversión en agitador 3D (Gyromini Labnet™) y 1 min con 100% etanol (v/v) para luego lavarse con agua destilada estéril 3-5 veces en campana de flujo laminar. Posteriormente, se germinaron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sólido. Para la preparación de las placas, 1 l de medio contenían 2,2 g de MS, 0,5 g MES (4-morpholineethanesulfonic acid monohydrate), 7 g Plant-Agar. El pH se ajustó a 5,7 con KOH y se autoclavó 121°C, 20 min para su esterilización.

Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo a 22<sup>o</sup>-18<sup>o</sup>C (día/noche), con una intensidad lumínica de 135  $\mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR), 60% humedad relativa, con fotoperiodo de ciclo largo 16:8 y realizando un riego regular cada dos días.

Para el cultivo en papel de filtro, se usaron placas de 90 mm de diámetro con dos papeles de filtro tipo Whatman<sup>TM</sup> de 70 mm de diámetro estériles y humedecidos en 2 ml de la solución correspondiente (acuosa o salina). En ellas, se distribuyeron de 50-150 mg de semillas/placa y se cerraron con parafilm<sup>TM</sup>. Las placas se mantuvieron en cámara de cultivo controlado.

### 1.2.2. Cepas empleadas

Las plantas de *A. thaliana* empleadas en este trabajo fueron suministradas por SALK y pertenecen a las líneas transgénicas (inserción T-ADN) indicadas en la Tabla 4.

**Tabla 4. Cepas de Arabidopsis utilizadas en esta tesis.**

Nombre	Mutante	Inserción	Gen <sup>a</sup>	Línea
<b>AtWt</b>	Cepa salvaje	-	-	-
<b>KO AtTrxo1</b>	Tiorredoxina o1	<i>At-Trxo1</i>	AT2G35010	SALK_143294
<b>KO AtTrxo1</b>	Tiorredoxina o1	<i>At-Trxo1</i>	AT2G35010	SALK_042792
<b>KO AtAzf2</b>	Factor de transcripción en dedos de zinc	<i>At-Azf2</i>	AT3G19580	SALK_132562

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

### 1.2.3. Manipulación de las semillas

Las semillas se recolectaron a partir de plantas crecidas durante ocho-nueve semanas aproximadamente, momento en el cual, las silicuas ya estaban secas. Para su recolección, la planta se colocó sobre un pliego de papel de filtro y las semillas se liberaron al presionar las silicuas, para posteriormente pasarlas por un tamiz con el fin de eliminar restos de hojas secas, silicuas, pétalos etc. hasta que quedaron completamente limpias.

Las semillas se almacenaron en cámara de cultivo a 22°C constantes y en oscuridad durante un mes hasta su uso, con el fin de superar naturalmente la dormición primaria o *after-ripening*.

#### **1.2.4. Transformación de plantas por *Agrobacterium tumefaciens* para generación de líneas estables de *Arabidopsis***

Para la generación de líneas transformadas estables de *Arabidopsis*, se sembraron unas 30 semillas en macetas de 10,5 cm de diámetro. La infiltración por *A. tumefaciens* se realizó cuando la inflorescencia alcanzó una longitud aproximada de 18 cm, momento en el cual se eliminaron todas las flores abiertas, semiabiertas y silicuas dejando las yemas florales cerradas.

Cinco días antes de la infiltración se sembraron en placa con los antibióticos de selección: Rifampicina (Rf), Gentamicina (Gm) y kanamicina (Km) (Tabla 5) los transformantes de *A. tumefaciens* portadores con las construcciones: *pAtTrxo1-1::uidA*; *pAtTrxo1-2::uidA*; *pAtTrxo1-3::uidA*; *pAtTrxo1-4::uidA*, (Fig. S1). Las colonias positivas se resembraron en placa, para obtener mayor biomasa y se incubaron durante 12 h a 28°C. Un poco de la estría se incubó en 10ml de LB estéril (Tryptona 1% (p/v); NaCl 1% (p/v); extracto de levadura 0,5% (p/v); pH 7), a modo de preinóculo, en agitación, durante 12 h y todo este preinóculo se añadió a 200 ml de LB estéril y se incubó en agitador orbital 120 rpm durante 48 h. Para seleccionar *A. tumefaciens* en los sucesivos subcultivos se usaron siempre los antibióticos de selección comentados (Tabla 5) y las condiciones de cultivo establecidas (ver sección 2.2.1.).

Las bacterias precipitaron a 4500 g, 10 min, 4°C y posteriormente, el pellet se resuspendió en 250 ml de una solución de infiltración, que contenía MS 5 g/l; MES 1,95 g/l; sacarosa 5 g/l y un pH de 5,6 ajustado con NaOH. Una vez resuspendidas las células se añadieron 200 µl de Silwet L-77 (Lehle seeds), un detergente que favorece la apertura de los estomas en el proceso de infiltración.

El medio de infiltración se colocó en un recipiente de diámetro ligeramente mayor al diámetro superior de la maceta, con el fin de que la parte aérea de la planta contactase con aquélla en un simple volcado. La inmersión de la parte aérea se produjo durante 50 seg. El exceso de solución de infiltración se eliminó colocando las plantas sobre papel de filtro. Las plantas se dispusieron horizontalmente en una bandeja tapadas con un film agujereado y se dejaron en la cámara de crecimiento (ver sección 1.2.1.). Transcurridas 24 h se eliminó el plástico, se colocaron en posición vertical y se regaron hasta su empleo para la recolección de semillas.

**Tabla 5: Antibióticos utilizados para la selección de clones de *A. tumefaciens* en placa y selección de plantas transgénicas.**

Antibiótico	Abreviatura	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Objetivo
Kanamicina	Km	50	Selección de clones
Gentamicina	Gm	20	Selección de clones
Higromicina	Higro	20	Selección de plantas transgénicas
Rifampicina	Rf	100	Selección de clones

### 1.2.5. Selección de transformantes

La selección de las líneas mutantes de *A. thaliana* se realizó en placa Petri de 9x9 cm sobre medio sólido suplementado con el antibiótico de resistencia (Tabla 5). Para este fin, se colocaron 100 semillas en estas placas y se estratificaron a 4°C durante dos días para sincronizar la germinación. Transcurrido este tiempo, se les sometió a un choque de luz de 2 h en la cámara de cultivo para estimular la germinación, y posteriormente se mantuvieron en oscuridad durante tres días más. Las plantas transformadas se distinguieron por un alargamiento del hipocotilo en relación con las no transformadas. Tras una semana, las plantas transformadas (resistentes a higromicina) seguían con el proceso de desarrollo mientras que las no transformadas morían, en este punto las plantas resistentes se trasplantaron a turba (ver sección 1.2.2.).

Mediante autofecundación de las diferentes líneas de la primera generación (T1) trasplantadas y crecidas en turba se obtuvo la segunda generación (T2). Las semillas de la T2 resistentes a higromicina fueron seleccionadas en placa Petri de la misma forma. La selección fue realizada del mismo modo para cada generación hasta obtener las líneas homocigóticas.

La selección de las líneas mutantes SALK obtenidas del NASC (The Nottingham *A. thaliana* Stock Centre), se llevó a cabo del modo comentado, pero usando el antibiótico Km como antibiótico de selección (Tabla 5). Las plantas resistentes de la primera generación se emplearon para obtener la segunda generación de transformantes T2 confirmándose las líneas homocigóticas por PCR.

#### **1.2.6. Test de segregación y búsqueda de líneas homocigóticas**

Para confirmar la existencia de un único lugar de inserción en las líneas transformantes, la T2 de cada una de las líneas mutantes se sometió a crecimiento en placa con el antibiótico de resistencia (ver sección 2.2.1. y Tabla 5), con el fin de establecer la proporción de transformantes. La proporción de transformantes no debía superar el 75%, ya que niveles superiores indicarían la existencia de más de un *locus* de inserción. De las plantas transformadas de la T2, se seleccionaron diez resistentes de cada línea y se trasplantaron a turba. Este método de selección se repitió hasta obtener la proporción 75:25. En este momento se escogieron diez plantas resistentes y se seleccionaron hasta que el porcentaje de resistencia fue del 100%, lo que suponía la homocigosis. De las líneas homocigóticas obtenidas, se seleccionaron tres líneas de cada construcción a fin de normalizar las posibles diferencias surgidas durante la transgénesis.

#### **1.2.7. Ensayos de germinación**

Los ensayos de germinación se realizaron en placa Petri con papel de filtro tal y como se describe en la sección 1.2.2 con semillas maduras durante 1 mes en cámara de cultivo y oscuridad.

En los ensayos de germinación en agua, las semillas sin estratificar y embebidas en agua se cultivaron en placas de la forma descrita y se mantuvieron en cámara de cultivo durante 96 h. A los distintos tiempos: 0; 12; 24; 36; 48; 60; 72 y 96 h se calculaba el porcentaje de germinación y/o se cogía una muestra de semillas para hacer los ensayos pertinentes (ver secciones 6.2., 6.3., 6.4., 6.5.).

En los ensayos de germinación en sal, las semillas se embebieron primero en agua y posteriormente se lavaron tres veces con la solución salina correspondiente. En este caso, los tiempos seleccionados se alargaron, ya que la sal atrasó el proceso de germinación.

### **1.3. Plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*)**

#### **1.3.1. Condiciones de cultivo**

Estas plantas crecieron en una relación turba: vermiculita (3:1), en macetas de 5x5 cm de tamaño y durante aproximadamente 15 días, a una temperatura constante de 26°C, fotoperiodo 16:8 y una radiación lumínica de  $90 \mu\text{mol} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  (PAR).

#### **1.3.2. Transformación transitoria de plantas por *A. tumefaciens***

Para la transformación de hojas de *N. benthamiana* con construcciones específicas a través de la bacteria *A. tumefaciens* se siguió el siguiente protocolo. Cinco días antes de la infiltración se sembraron en placa con los antibióticos de selección (Tabla 5 y sección 2.2.1.) los transformantes de *A. tumefaciens* con las construcciones: *pAtTrxo1-1::uidA*; *pAtTrxo1-2::uidA*; *pAtTrxo1-3::uidA*; *pAtTrxo1-4::uidA* (Fig. S1), así como las construcciones *pMDC32-P35S::LUC* [luciferasa (LUC)] para normalizar los datos y *pBIN61-P35S::P19* para evitar el silenciamiento génico.

Un cultivo saturado de estos transformantes en 1,5 ml LB se usó como preinóculo para añadir a 50 ml LB estéril, con los antibióticos de selección y 2 mM de acetosiringona y se incubó a 250 rpm en un agitador orbital, durante 12 h, 28°C. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) de entre 0,6 y 1,2 (fase exponencial-estacionaria), el crecimiento se frenó por refrigeración y las bacterias sedimentaron por centrifugación a 4500 g durante

10 min. Posteriormente, se resuspendió el precipitado en un volumen de medio MMS estéril (MS 5 g/l; MES 1,95 g/l; sacarosa 20 g/l; pH 5,6 ajustado con NaOH) y suplementado con acetosiringona 200  $\mu$ M hasta alcanzar una  $DO_{600nm}=3$ , valor considerado óptimo para la agroinfiltración.

La solución de infiltración se preparó mezclando volúmenes iguales de las construcciones; *pBIN61-P35S::P19*, *pMDC32-P35S::LUC* y cada construcción problema respectivamente y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Mientras tanto, las plantas de tabaco se regaron y se dejaron en oscuridad a fin de conseguir la apertura estomática y favorecer así el proceso de transformación.

A modo de réplicas biológicas y técnicas respectivamente, se emplearon tres plantas y tres hojas de cada planta en cada experimento. La solución se infiltró en el envés de hojas jóvenes y medianas empleando para ello una jeringa de 1 ml y al cabo de tres días se extrajo la proteína y se midió la fluorescencia (sección 4.9.1.). Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes de transformación para cada construcción.

## **1.4. Células de tabaco TBY-2 (*Tobacco Bright Yellow*)**

### **1.4.1. Condiciones de cultivo**

Las células TBY-2 (derivadas de *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2) se crecieron y se propagaron rutinariamente en medio MS, suplementado con tiamina 0,15 mg/ml, 2,4-D 0,2 mg/ml,  $KH_2PO_4$  0,02 mg/ml, sacarosa 3% (w/v) y mioinositol 1% (v/v) a pH 5,8 y esterilizado a 121°C, 20 minutos. Las células se subcultivaban a medio fresco en intervalos semanales de tiempo, para ello, una alícuota de 4 ml de células en fase estacionaria (etapa final del ciclo) se transfería a un matraz conteniendo 100 ml de medio y se mantenían a 120 rpm en un agitador orbital, durante 7 días a 26°C y oscuridad.

### **1.4.2. Transformación de plantas de *Nicotiana tabacum* por *A. tumefaciens***

La transformación de *N. tabacum*, se hizo con el fin de obtener células TBY-2 sobreexpresantes de la tiorredoxina mitocondrial *o1* de *Pisum sativum* (*PsTrxo1*). Para ello, el

ADNc completo codificante de *PsTrxo1*, incluyendo el péptido señal para su localización en mitocondria, se amplificó por PCR (ver primers en Tabla S1) y el producto se ligó en un vector de entrada pDONR ZEO (Invitrogen). Posteriormente, el inserto se recombinó en el vector destino pK7WG2D usando para ello la tecnología recombinacional específica de Gateway (Invitrogen) (ver sección 4.1.9.3.).

Las construcciones contenían el promotor 35S CaMV aguas arriba del gen *AtTrxo1* y el gen de la GFP como gen reportero (Fig. S2). Como control del experimento se usaron líneas sólo con GFP. Los vectores de expresión fueron introducidos en *A. tumefaciens* usando un sistema de electroporación Gene Pulser II (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Estos experimentos se realizaron en el Laboratorio del Dr Andreas Schiermeyer del Fraunhofer (Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologi en Aachen, Alemania). Se utilizaron células competentes de la cepa 6V3101-pMP90RK de *Agrobacterium* de las que disponía este laboratorio y tras la electroporación, *Agrobacterium* se creció en placas con un medio que contenía extracto de ternera 0,5%, extracto de levadura 0,1%, peptona 0,5%, sacarosa 0,5%, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.5% agar) conteniendo los antibióticos de selección espectomicina 50 µg/ml (del plásmido que contiene *Trxo1*, kanamicina 25 µg/ml (del plásmido de *Agrobacterium*) y rifampicina 50 µg/ml (del cromosoma de *Agrobacterium*). Las placas se dejaron a 26°C en oscuridad hasta que se formaron colonias que se analizaron por PCR para asegurar la transformación.

### 1.4.3. Obtención de callos celulares

Los cultivos celulares estables transformados de TBY-2 se generaron por co-cultivo con *Agrobacterium*. Para ello, un cultivo en fase exponencial de TBY-2 suplementado con 0,2mM acetosiringona se cultivó con un cultivo fresco (2-3 días) de *Agrobacterium* transformado ( $DO_{600nm}=1$ ) en placas Petri de 5 cm de diámetro y se dejó 72 h en oscuridad a 26°C. El medio de crecimiento estaba compuesto por medio MSMO (Murashige Skoog Minimal Organics, SIGMA) 4,4 g/L, sacarosa 30 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 200 mg/L, 2,4-D 0,2 mg/L, tiamina 0,6 mg/L, agar 8 g/L, pH 5,8 autoclavado. Tras al menos 3 semanas se obtuvieron los callos listos para su análisis. Los callos transgénicos positivos para la fluorescencia de GFP se examinaron para la

detección por inmunoblot de la presencia de PsTrx01 y aquellos con máximas expresiones se seleccionaron para establecer los cultivos celulares.

#### **1.4.4. Parámetros de crecimiento**

##### **1.4.4.1. Curvas de crecimiento**

Las curvas de crecimiento de las distintas líneas celulares se elaboraron de dos formas. En una de ellas, se cuantificó el peso fresco, a intervalos diarios durante un periodo de 9 días, de las células contenidas en 100 ml de medio de cultivo de un total de tres réplicas. Para ello, las muestras se filtraron a través de papel Whatman™ 3M en un sistema de vacío formado por un matraz Kitasato acoplado a un embudo Büchner.

De forma paralela también se midió la curva de crecimiento mediante medidas espectrofotométricas de  $DO_{600nm}$  a intervalos diarios durante 9 días, de las células contenidas en 1 ml de medio de cultivo de un total de tres réplicas. Para ello, 250  $\mu$ l del cultivo se diluían en 750  $\mu$ l de medio TBS (Tris-HCl 125 mM pH 7,5; NaCl 0,5 M; Cys 5 mM). Estos datos nos permitieron calcular el crecimiento como:

$$C = (1000 \times \text{Abs } 600 \text{ nm}(250 \mu\text{l}))/250$$

##### **1.4.4.2. Medidas de viabilidad celular**

La viabilidad celular se midió usando el colorante vital Trypan Blue. Este colorante no es capaz de penetrar a través de membranas semipermeables intactas, por lo que solamente tiñe las células muertas. Para ello, las células se tiñeron *in vivo* durante 5 min a temperatura ambiente con el colorante en una relación cultivo celular: colorante 2:1 y posteriormente se visualizaron en un microscopio Leica LMR de campo claro. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital Leica DC 500 con la versión 1,20 del software Leica IM 1000 Image Manager.

La viabilidad (V) se calculó como el porcentaje de células viables en un total de 1000 células distribuidas en diez campos aleatorios de la muestra.

$$V = (\text{n}^\circ \text{ de células vivas} / (\text{n}^\circ \text{ de células muertas} + \text{n}^\circ \text{ de células vivas}))$$

#### 1.4.5. Tratamiento de estrés y preparación de las muestras

Las suspensiones celulares en fase de crecimiento exponencial (día 5 de crecimiento) se expusieron a concentraciones finales de peróxido de hidrógeno que oscilaron entre 0-50 mM. Para analizar el efecto del peróxido de hidrógeno sobre los diferentes parámetros fisiológicos, bioquímicos y así como sobre la viabilidad celular, se recogieron a distintos tiempos de tratamiento (30 min; 4 h; 24 h; 48 h y 72 h), una alícuota de células. En términos generales, se recogieron 0,3 g de células mediante la extracción del medio de cultivo en bomba de vacío y filtración en papel Whatman<sup>TM</sup> 3M que dependiendo del objetivo final, se almacenaban en peso seco o bien se resuspendían en ácido metafosfórico, para las medidas de ácido ascórbico y glutatión (ver sección 6.1.). Posteriormente, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C. Para las determinaciones de óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y viabilidad se cogieron 1-2 ml del cultivo fresco no filtrado (ver secciones 6.4 y 6.5).

## 2. Bacterias

### 2.1. Escherichia coli

#### 2.1.1. Condiciones de cultivo

El crecimiento de *E. coli* se hizo en medio LB estéril con el antibiótico de selección pertinente (Tabla 6), en incubador a 37°C y en oscuridad. En el caso de los cultivos líquidos, se utilizó además una agitación de 130 rpm empleando para ello un agitador orbital.

#### 2.1.2. Cepas empleadas

Las cepas bacterianas empleadas para la clonación de las construcciones utilizadas en este trabajo fueron las siguientes:

- DH5α:
  - Genotipo: F<sup>-</sup>, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17*, *supE44*, *thi-1*, *relAL*, *lacZ*, λ.

- Puede ser complementada por una amplia variedad de plásmidos utilizados de forma frecuente en clonación.
- BL21 (DE3) (Novagen):
  - Genotipo: F-, *ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm (DE3)*.
  - Se emplea para la producción de proteínas recombinantes, a partir de un gen clonado en vectores pET, mediante la inducción por IPTG.
- Top 10 (Invitrogen):
  - Genotipo: F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1, araD139 Δ(ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG λ-*.
  - Ideal para la clonación de alta eficiencia y la propagación de los plásmidos (tecnología Gateway). Permite la replicación estable de plásmidos de alta copia.

Estas cepas están modificadas genéticamente de manera que es posible inducir en el laboratorio su competencia, así como mantener el plásmido de forma estable en su interior.

### **2.1.3. Preparación de células químicamente competentes**

La exposición de *E.coli* a  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  u otros iones divalentes a temperaturas próximas a  $0^\circ\text{C}$  favorece la penetración de ADN exógeno en la célula. El tratamiento de  $\text{CaCl}_2$  en frío origina en la célula un estado especial que se denomina “competencia”. Para preparar células competentes se sembraron en placas de LB agar las cepas DH5 $\alpha$  y BL21 y se incubaron 12 h a  $37^\circ\text{C}$ . Una vez crecidas las colonias se inoculó una de ellas en 20 ml de medio LB en las condiciones descritas (sección 2.1.1) hasta su saturación (12 h). Posteriormente, se inocularon 3 ml de este pre-cultivo en 250 ml LB sin antibióticos a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 h y en agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento ( $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,4-0,6$ ). El cultivo se incubó en hielo 10 min para detener el crecimiento bacteriano y las células se recogieron por centrifugación a  $3000\text{ g}$ , durante 10 min. El precipitado resultante se resuspendió en 75 ml de una solución fría de  $\text{MgCl}_2$  100 mM y se centrifugó a  $6000\text{ g}$ , 10 min. Las células precipitadas se resuspendieron en 125 ml de una solución fría de  $\text{CaCl}_2$  100 mM y se incubaron en hielo 20 min. Finalmente, las células

competentes se recogieron por centrifugación en las condiciones descritas y se resuspendieron en 2,5 ml  $\text{CaCl}_2$  100 mM y 15% glicerol (v/v). La suspensión se fraccionó en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$ . Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles.

#### 2.1.4. Transformación de células

Las células quimio-competentes DH5 $\alpha$  y BL21 se transformaron por choque térmico. A 100  $\mu\text{L}$  del stock glicerolado descongelado en hielo, se le añadió entre 5 y 10 ng de ADN plasmídico, o el volumen correspondiente a una reacción de ligación o recombinación. La mezcla se incubó en hielo durante 20 min y después se sometió a un choque térmico de  $42^\circ\text{C}$  durante 25 segundos. Tras 5 minutos en hielo, las células se recuperaron en 500  $\mu\text{l}$  de medio SOC (LB Broth Base (Life Technologies), KCl 250 mM, ajustado a pH 7 con NaOH y suplementado antes de su uso con sacarosa 20 mM y  $\text{MgCl}_2$  10 mM) en agitación 130 rpm, durante 1 h y a  $37^\circ\text{C}$ . Finalmente, se seleccionaron los clones positivos, en medio LB sólido con los antibióticos correspondientes (Tabla 6).

Las células electro-competentes TOP-10 se transformaron por electroporación utilizando un Electro Cell Manipulator ECM630 (BTX, A Division of Gentronix). Las condiciones del pulso eléctrico fueron las siguientes: capacitancia 25  $\mu\text{F}$ , voltaje 2,5 Kv, resistencia 200  $\Omega$ , tiempo 5 milisegundos. Las células se recuperaron y seleccionaron de la forma comentada anteriormente. Finalmente, las colonias positivas se comprobaron por PCR de colonia.

**Tabla 6: Antibióticos usados para selección de clones en *E. coli*.**

Antibiótico	Abreviatura	Concentración ( $\mu\text{g/ml}$ )	Objetivo
Kanamicina	Km	50	Selección de clones
Gentamicina	Gm	20	Selección de clones
Ampicilina/carbencilina	Amp/Cb	75	Selección de clones

## 2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

### 2.2.1. Condiciones de cultivo

Las células de *A. tumefaciens* no transformadas crecieron en medio líquido LB con los antibióticos Rif y Gm (Tabla 5). Los medios empleados para las células transformadas estaban además suplementados con Km. Las condiciones de cultivo fueron 250 rpm en un agitador orbital, durante 12-48 h y 28°C en oscuridad.

El crecimiento en placa se hizo en medio MS, agar y los antibióticos de resistencia especificados (ver sección 1.2.2. y Tabla 5).

### 2.2.2. Cepas empleadas

Las estirpes usadas en los ensayos de transformación fueron:

- cepa GV3101 (pMP90RK, Gmr Kmr), Rif<sup>R</sup>, conteniendo los factores de virulencia en el vector pMP90. Utilizada para la transformación de *Nicotiana tabacum*.
- cepa C58C1 (PJIC), alberga los factores de virulencia en el plásmido Ti pDUB1003 delta 31 y se empleó para la transformación de *Nicotiana benthamina* y *A. thaliana*.

### 2.2.3. Preparación de electro-competentes

Para la preparación de competentes de *Agrobacterium*, a 500 ml de LB se les añadió 10 ml de un cultivo saturado en bacterias e incubado a 250 rpm, 28°C, hasta que la DO<sub>600nm</sub> fue de 0,5-1. Las células se recogieron por centrifugación a 6000 *g* durante 10 min y se lavaron con agua estéril en dos rondas de centrifugaciones con las mismas condiciones y disminuyendo a la mitad el volumen final de agua de la segunda centrifugación. Finalmente, las células se resuspendieron en 1 ml de glicerol 10% y se fraccionó en alícuotas de 40 µl, que se congelaron en nitrógeno líquido y almacenaron a -80°C.

### 2.2.4. Transformación

Para los ensayos de transformación, alícuotas de electro-competentes se descongelaron en hielo siguiendo las mismas indicaciones que en la sección 2.1.4. En este caso, los antibióticos empleados para su selección están referidos en la Tabla 5.

## 3. Levaduras

### 3.1. Condiciones de cultivo

Las levaduras de *Sacharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) crecieron en medio YPAD (peptona 2% (p/v); extracto de levadura 1% (p/v); glucosa 2% (p/v)). Mientras que los transformantes, se multiplicaron en medio de cultivo con medio mínimo DOB (Drop-Out Base synthetic defined medium) y se suplementaron con los factores de auxotrofia necesarios para la selección (histidina, leucina, adenina y triptófano) (MP Biomedicals™). Estos medios se esterilizaron por autoclavado a 120°C durante 10 min. Los medios sólidos se prepararon añadiendo, además de lo comentado, 20 g/l de agar. Las condiciones de crecimiento fueron 48 h y 28°C y una agitación (200 rpm-500 rpm) para cultivos líquidos.

### 3.2. Cepas empleadas

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en esta tesis fueron las siguientes: Cepa Y187 $\alpha$  (MAT- $\alpha$ ) y Cepa YM4271 (MAT-a), estas cepas tienen la cualidad de conjugarse entre sí y por tanto, se utilizaron para los ensayos de un híbrido en levadura (sección 3.4.).

### 3.3. Transformación de levaduras

La transformación genética de *S. cerevisiae* se realizó por el método del Polietilenglicol (PEG) (Gietz y Woods, 2002). Se partió de 1,5 ml de un cultivo líquido saturado en levaduras que se recogieron por centrifugación a 5000 g, 10 min, 4°C y se resuspendieron en 1 ml de acetato de litio (LiAc) 100 mM. Tras una segunda centrifugación en las mismas condiciones, las células se recogieron y se les añadieron los siguientes reactivos en el siguiente orden: 240  $\mu$ l PEG al 50%, 36  $\mu$ l de LiAc 1M, 25  $\mu$ l de una solución de ADN de esperma de salmón 2

mg/ml previamente desnaturalizado (Sigma Aldrich) y 1 µg de las distintas construcciones de ADN plasmídico. El precipitado obtenido se disgregó por agitación con pipeta y se incubó 20 min a 42°C. Tras incubar 12 h en oscuridad, las levaduras precipitaron a 13.000 g, 1 min, eliminando 200 µl del sobrenadante, el resto se utilizó para resuspender el precipitado que se cultivó en el medio de auxotrofia correspondiente.

### 3.4. Ensayo de un híbrido

El ensayo de un híbrido (1HYB: ONE HYBrid) en levadura es un método que permite identificar interacciones entre una proteína diana, llamada presa y un ADN específico, llamado cebo.

Este sistema está basado en el factor de transcripción (TF: Transcription Factor) GAL4 de levaduras. Los TFs presentan una estructura modular con un dominio de unión al ADN (BD: Binding Domain), responsable de la unión del TF a la secuencia de ADN reguladora (promotor) de la expresión del gen y un dominio de activación (AD: Activation Domain), que implica el reclutamiento de la ARN polimerasa y el inicio de la transcripción del gen. Ambos dominios pueden separarse para recuperar su actividad cuando se reconstituye el sistema lo que permitirá la expresión del gen aguas abajo (gen delator). En los ensayos 1HYB se usaron como presas una genoteca normalizada de aproximadamente 1200 TFs de *A. thaliana* (ORFs) fusionados al AD (GAL4AD) del vector pDEST22 y clonados en la cepa de *S. cerevisiae* YM4271 (MAT-a). Estas presas se enfrentaron a un cebo constituido por una secuencia de ADN altamente conservada en el promotor del gen *AtTrxo1* (bloque B2) (Fig. S1). La región B2 se amplificó con cebadores específicos con las colas de restricción XbaI-XmaI necesarias para clonar en los sitios XbaI-XmaI del plásmido pTUY1H aguas arriba de un gen marcador de histidina (HIS3). Con este plásmido se transformó la cepa de *S. cerevisiae* Y187α (MAT-α).

La selección de las levaduras positivas portadoras de las construcciones de interés se hizo mediante auxotrofia a determinados aminoácidos. Las levaduras haploides se seleccionaron en medios carentes de: Leucina (L, cebo) o Triptófano (W, presa), mientras que los diploides, generados durante el apareamiento de los haploides, y positivos para la interacción cebo-presa se seleccionaron en medios, además, carentes de Histidina (H). Sin

embargo, cierta actividad basal en el promotor de la histidina hizo necesario un cribado previo con concentraciones crecientes de un inhibidor de este promotor, concretamente el compuesto, 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT, Sigma) y de este modo evitar falsos positivos. En nuestros ensayos, la concentración de 3AT necesaria y suficiente para inhibir esta actividad basal fue 1 mM.

Para el ensayo, la genoteca de presas y el cebo crecieron durante tres días en placas DOB-W y DOB-L respectivamente a 28°C. Posteriormente, se inocularon 200 ml YPAD con algunas colonias de cebo en un Erlenmeyer de 1 l de capacidad. Estos cultivos crecieron durante toda la noche a 28°C y en agitación (200 rpm). De forma paralela, las presas de la correspondiente genoteca se inocularon en 100 ml de YPAD distribuidos en placas de 96 pocillos. Para ello, con una pipeta multicanal se rellenaron los pocillos con un volumen de 100 µl por pocillo, mientras que las presas se inocularon de las correspondientes placas con un replicador. Después de incubar 12 h con agitación vigorosa (500 rpm), 100 ml de cebo se distribuyeron en pocillos de placas de 96, añadiendo a cada pocillo 100 µl de cebo y 100 µl de presa con una pipeta multicanal. Tras incubar dos días, sin agitación a 28°C se obtuvieron los diploides. Las células depositadas en el fondo del pocillo se resuspendieron con el replicador, con el que se inocularon a otra placa de 96 pocillos que contenía 200 µL de medio de selección de diploides (DOB-L-W). El replicador permitía transferir unos 5 ml de líquido en cada perno a cada pocillo cada vez y fue inoculado dos veces (dilución 1/20), previa esterilización por flameado con etanol absoluto entre placas. Después de un día de crecimiento a 28°C y con agitación intensa, las células diploides se resuspendieron con el replicador y se transfirieron a un medio de selección de diploides (DOB-L-W) y de cribado (DOB-L-W-H + 3-AT 1 mM). Las colonias positivas se hicieron visibles después de 2-5 días de crecimiento a 28°C (Fig. 15).

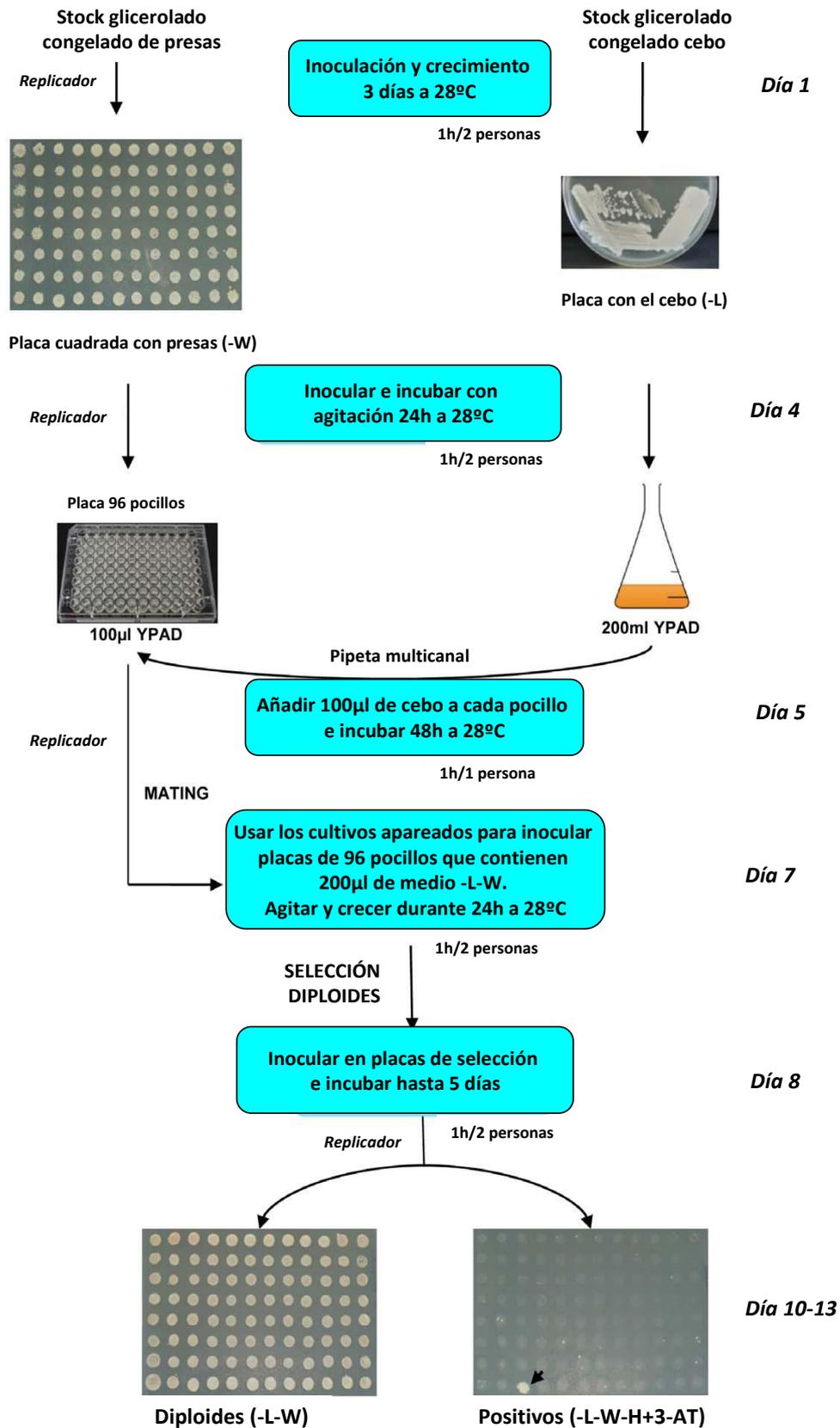


Figura 15: Método experimental ensayo de un híbrido en levadura. Extraído de Castrillo y col. (2011).

### 3.5. ADN

#### 3.5.1. Extracción de ADN genómico (ADNg)

Para la extracción de ADN genómico de *Arabidopsis* y células de tabaco TBY-2 se usó un protocolo basado en la precipitación con isopropanol. Unos 100 mg de hojas de *Arabidopsis* o 0,3 g de células de tabaco se congelaron en nitrógeno líquido y se homogeneizaron mecánicamente en mortero. A cada muestra se le añadió buffer de extracción en una relación 1:2 (p/v) (Tris-HCl 1 M pH 8; EDTA 0,5 M; NaCl 5 M) y se incubó durante 10 min a 65°C para favorecer el lisado. Después de la lisis, las proteínas y polisacáridos se precipitaron con 130 µl de acetato de potasio 5 M durante 10 minutos en hielo y se eliminaron por centrifugación 13.000 *g* en centrifuga de mesa (Mikro20) 15 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente, los ácidos nucleicos precipitaron con una mezcla de 640 µl de alcohol isopropílico 100% y 60 µl de acetato de sodio 3 M durante 20 min en hielo y centrifugación a 13.000 *g*, 3 min a temperatura ambiente. El precipitado se resuspendió con etanol frío al 70%, repitiéndose la operación dos veces. Los ácidos nucleicos secos se resuspendieron en 100 µl de agua estéril y se incubaron con ARNasa "A" a una concentración final de 60 ng/µl durante 1 h a 37°C.

#### 3.5.2. Extracción de ADN plasmídico

Para el aislamiento de ADN plasmídico se partió de 5 ml de cultivo líquido crecido durante 12 h y suplementado con los antibióticos adecuados en cada caso.

En la extracción de plásmidos bacterianos, a pequeña y gran escala, se utilizaron los siguientes kits comerciales, siguiendo las instrucciones recomendadas por los fabricantes: "Plasmid DNA Purification" (Machery-Nagel) y "Midiprep" (Macherey-Nagel) basados en un procedimiento de lisis alcalina y retención de ADN plasmídico en una membrana de sílica gel respectivamente.

En el aislamiento de plásmidos de levadura se usó el kit comercial "Zymoprep II-yeast plasmid miniprep". Este kit se basa en el método de lisis alcalina de *E.coli* pero usando zimoliasa en la solución de partida, una enzima que degrada la pared celular de levaduras. El

ADN se une a una columna formada por una matriz de sílice, se lava con etanol y se eluye con agua estéril.

### 3.5.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en gel de agarosa se usa para analizar, identificar y purificar fragmentos de ADN. El fundamento de la técnica es el hecho de que a pH básico o próximo a la neutralidad, la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante, independientemente de su longitud, por lo que al ser sometidos a un campo eléctrico, los fragmentos de ADN migrarán de forma inversamente proporcional a su tamaño, pudiendo separarse los distintos fragmentos de una mezcla y pudiéndose inferir su tamaño por referencia a unos fragmentos de peso conocido. Además, en el caso de moléculas circulares, como los plásmidos, la migración depende también del grado de enrollamiento, migrando más distancia los fragmentos que tienen un menor enrollamiento.

El gel de agarosa se preparó en tampón TAE 1x (Tris-Acetato 40 mM pH 8; EDTA 1 mM), más la cantidad de agarosa precisa. El uso del bromuro de etidio como fluoróforo que se intercala en el ADN y nos permite su visualización bajo luz UV estuvo restringido a algunos geles donde se necesitaba una alta resolución, en la mayoría de casos se usó Orange G (Thermo Scientific™) con la misma función que el bromuro de etidio pero sin efectos cancerígenos descritos. Por otro lado, el porcentaje de agarosa a usar dependió del tamaño del fragmento a separar, así en este trabajo se usaron las concentraciones referidas en la Tabla 7.

**Tabla 7: Porcentajes de agarosa utilizados según el tamaño de la molécula de ácido nucleico a separar.**

% Agarosa	Tamaño	Tipo de molécula
0,8	1-15Kb	Plásmidos completos, ADN genómico
1	200-1000pb	Fragmentos intermedios, ARN
1,5	50-200pb	Fragmentos pequeños

Para disolver la agarosa, la mezcla tampón-agarosa se calentó en un microondas hasta ebullición y se vertió en un molde perfectamente sellado hasta su solidificación. Por otro lado, las distintas muestras se prepararon añadiendo 1/3 del volumen de muestra del tampón de carga 5x (glicerol 30% (v/v); azul de bromofenol 0,3% (v/v); EDTA 60 mM pH 8 y orange G 2% (p/v)) y seguidamente se cargaron en cada pocillo del gel. Para las muestras visualizadas con bromuro de etidio, el gel se preparó con bromuro de etidio 0,3%.

A continuación, se procedió con la electroforesis. En general, las condiciones empleadas fueron: voltaje constante, de entre 80-100 V y un tiempo de 30-45 minutos. Las bandas se observaron en un transiluminador (Syngene) con luz ultravioleta.

En este trabajo los marcadores de tamaño molecular empleados fueron: DNA Ladder Mix (Fermentas™) de 100-10.000 pb y 100 pb Plus DNA ladder (GeneRuler™) de 100-3.000 pb.

#### **3.5.4. Extracción de ADN de geles de agarosa**

Para purificar fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa se usaron los kits comerciales: “QUIAEX II” y el “GENECLEAN turbo kit”. El primero de ellos fue más adecuado para extraer fragmentos pequeños de ADN (50-200 pb) que además se encontraban en baja concentración en el gel. El segundo kit fue más adecuado para tamaños mayores de ADN. En ambos casos se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante.

#### **3.5.5. Cuantificación de ADN en solución**

La concentración de ADN y su pureza se calculó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-100 (Agilent Technologies) midiendo la Absorbancia de UV a 260 nm, 280 nm y 230 nm. La concentración se calcula respecto al valor estándar  $DO_{260nm}=1$  para soluciones de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de ADN de cadena doble. La absorbancia a 280 nm indica una posible contaminación con proteínas y compuestos fenólicos, mientras que a 230 nm nos indica contaminación por sales y disolventes orgánicos. Por ese motivo es importante que la

relación de Absorbancia a 260/280 y 260/230 de las muestras esté entre 1,8 y 2,0 (Sambrook y Russell, 2001).

### 3.5.6. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction), es un método enzimático que consiste en la replicación *in vitro* de secuencias específicas de ADN, de forma tal que en cada ciclo del proceso se duplica el número de moléculas. De esta forma a partir de una sola molécula de ADN se pueden obtener hasta 100.000 millones.

Para amplificar los fragmentos de ADN por PCR convencional se preparó una reacción en la que se incluyeron los oligonucleótidos (primers) sentido y antisentido del gen a amplificar a una concentración final de 10 nM (stock 20  $\mu$ M), una mezcla de cuatro dNTPs (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) a una concentración final de 5  $\mu$ M (stock 100  $\mu$ M), tampón de reacción que contenía sales de amonio y magnesio, ADN polimerasa a la concentración recomendada por el fabricante, ADN molde (5-10 ng de cADN o ADN plasmídico, o 50-100 ng de ADN genómico) y agua ultrapura estéril a un volumen final de 10-20  $\mu$ l, dependiendo del experimento. En todos los casos se incluyó siempre un control negativo (sin ADN) y cuando fue posible, uno positivo.

Las ADN polimerasas termoestables utilizadas, se seleccionaron según el objetivo final y fueron las siguientes:

- **Ecotaq plus (ECOGEN)**: incorpora dATPs a los extremos 3' del fragmento amplificado, por lo que éste resulta adecuado para ligar en vectores que tienen extremos "T", por "TA-cloning". Fue utilizada para reamplificar productos que iban a ser ligados en el vector pGEM-Teasy.
- **rTaq (Takara)**: tiene una fidelidad de copia y un rendimiento de 1 kb/min. Utilizada en amplificaciones rutinarias con fines analíticos, en las que el producto amplificado no iba a ser utilizado.

➤ **ExTaq (Takara) y Platinum Pfx (Invitrogen, Life Technologies):** son enzimas con una alta fidelidad de copia y una alta sensibilidad exonucleasa 3'-5'. Además, tienen un rendimiento mayor en comparación con otras polimerasas. Pueden ser usadas también para genotipados de fragmentos de hasta 20 kb. Se usaron fundamentalmente para la amplificación de productos específicos que requerían posterior secuenciación.

Las condiciones de amplificación fueron las estándar, variándose el tiempo de extensión en función del tamaño de los fragmentos a amplificar (1 min/1 kb a 72°C) y la temperatura de anillamiento ( $T_a$ ) de los oligonucleótidos, que fue específica de los oligos empleados y se calculó empíricamente en función de la temperatura de desnaturalización o melting ( $T_m$ ), ( $T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$ ), y que viene determinada por la longitud y la composición de los oligos.

El termociclador utilizado fue el mod. Primus (MWGBiotech) y el equipo C1000 Thermal Cycler (Bio Rad).

### 3.5.6.1. Otros tipos de PCR

#### 3.5.6.1.1. PCR de colonia

La PCR de colonia nos ahorra tiempo al no tener que recurrir a una minipreparación de cada una de las colonias potencialmente positivas.

La amplificación sobre colonias de *E.coli*, *A. tumefaciens* o *S. cerevisiae* se realizó añadiendo directamente la colonia sobre el tubo de PCR con todos los componentes de la reacción, tras haber realizado una réplica en una placa nueva para poder identificar y conservar la colonia de partida. Las condiciones de la PCR fueron las convencionales (ver sección 4.1.7.).

#### 3.5.6.1.2. PCR anidada

En la PCR anidada el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, es decir, cuando tenemos el primer amplicón se pueden unir los

cebadores y se hace de nuevo una amplificación dentro del amplicón inicial. Este tipo de PCR se utilizó principalmente cuando añadimos las colas de recombinación en el sistema tipo GATEWAY (ver apartado 3.5.8.3), debido a que los oligonucleótidos son demasiado largos y tienen poca capacidad para hibridar en toda su longitud durante el proceso. En este caso, en la primera PCR se utilizó una concentración de cebadores de 2  $\mu\text{M}$  mientras que en la segunda, se usó una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , para asegurar una completa amplificación.

### 3.5.7. Manipulación enzimática del ADN

La digestión del ADN se realizó con enzimas de restricción (Tabla 8) en las condiciones óptimas indicadas por el fabricante para cada una de ellas.

Con fines analíticos normalmente el volumen total de reacción fue de 20-30  $\mu\text{l}$  con 0,5-1  $\mu\text{g}$  ADN y 1 unidad de la enzima de restricción correspondiente, en el tampón fijado por el fabricante. Normalmente la incubación se realizaba durante 1-2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ , en función de la cantidad de ADN y la enzima empleada.

En muchos casos usamos digestiones dobles con enzimas de restricción distintas, lo que nos permitía una inserción digerida o polarizada, es decir, en un solo sentido. En aquellos casos en los que las condiciones óptimas de ambas enzimas no eran compatibles se utilizaba en primer lugar aquella que requería una menor fuerza iónica en un volumen reducido y tras 1-2 h de reacción, se añadía la segunda enzima en su tampón específico diluyendo la mezcla anterior unas 10 veces. Las principales enzimas utilizadas se describen en la Tabla 8

**Tabla 8: Enzimas de restricción utilizadas para la clonación de fragmentos en el vector pTUY-1HY.**

Enzima	Tampón	Fabricante
<i>XbaI</i>	OPA <sup>a</sup> 10x	Roche
<i>MluI</i>	Tampón H	Roche
<i>Xma</i>	OPA 10x	Roche
<i>EcoRI</i>	Tampón H	Roche

<sup>a</sup>OPA 10x (One for All): 100 mM Tris-acetato pH 7,5, 100 mM Acetato de Mg, 500 mM Acetato de potasio.

### 3.5.8. Estrategias de clonación

#### 3.5.8.1. Clonación convencional

En la clonación convencional el fragmento de ADN amplificado por PCR, deberá tener los extremos necesarios (dianas de restricción) para ser incorporado en el vector destino. Para ello, deben tenerse en cuenta también, los lugares de restricción en el vector destino. Para que el inserto pueda ser ligado en el vector destino, este último deberá ser digerido con las endonucleasas de restricción correspondientes y desfosforilado en los extremos 5'-P con fosfatasa alcalina de intestino de ternera (Promega™) para evitar su autoligación.

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 Technologies™*). 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.

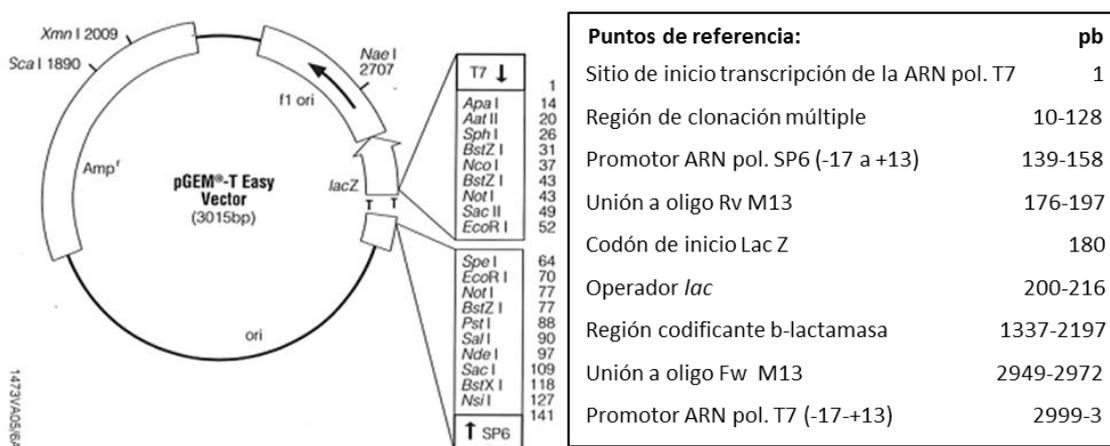
Una vez transcurrida la ligación se procedió a transformar bacterias de *E. coli* DH5α tal y como se describe en la sección 2.1.4, para obtener un clon que contuviese la construcción pertinente, la cual sería purificada y secuenciada (ver sección 3.5.9.).

#### 3.5.8.2. Clonación en pGEM®-T easy

El vector pGEM®-T easy (Fig. 16) es usado en la mayoría de ocasiones como vector de subclonaje, ya que solo exige la ligación del inserto mediante la enzima T4 ligasa y no requiere la presencia de enzimas de restricción. Por otro lado, nos permite identificar de forma sencilla las colonias positivas mediante el color. 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.

Los tratamientos de ligación se hicieron en volúmenes de 10  $\mu$ 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 y en tiempos de incubación de 12 h a 4°C.

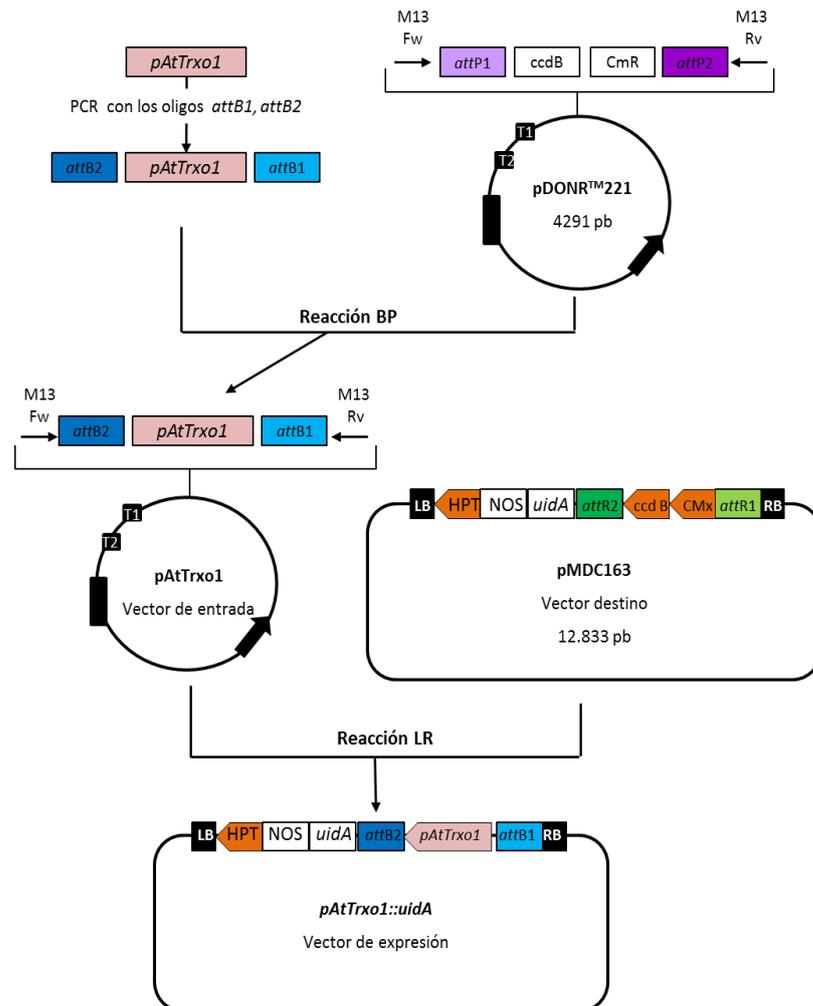


**Figura 16: Esquema del vector pGEM-T Easy.** Se representa el gen LacZ interrumpido por dos timinas desapareadas y que constituye el lugar de clonación múltiple. Se amplían los sitios de restricción que flanquean ambas timinas para incorporar el fragmento problema. En la tabla de la derecha se representa la localización de los principales elementos de este vector. *Abreviaturas: pol, polimerasa; Rv, reverse; Fw, forward.*

### 3.5.8.3. Sistema de clonación GATEWAY

La tecnología Gateway desarrollada por Invitrogen, permite introducir insertos de unos vectores a otros, a partir de reacciones de recombinación basadas en el sistema del bacteriófago  $\lambda$ . Primero, se introduce el fragmento de ADN amplificado por PCR con las colas attB1 y attB2 en un vector de entrada (*pDONR221*) que contiene los sitios de recombinación attP1 y attP2, a través de una reacción de recombinación mediada por la enzima BP Clonasa (reacción BP) que cataliza la recombinación entre los sitios attB1 y attB2 del fragmento de ADN y los sitios attP1 y attP2 del vector de entrada, generándose los sitios de recombinación

*attB1* y *attB2*. En una segunda reacción, la enzima LR Clonasa (reacción LR) reconoce los sitios *attB1* y *attB2* del vector de entrada y *attR1* y *attR2* del vector de destino y lleva a cabo la recombinación específica entre ellos formándose el vector de expresión con el gen de interés (Fig. 17). La transferencia por recombinación de los fragmentos de ADN sustituye el gen letal de los vectores, *ccdB*, permitiendo la selección de los transformantes.



**Figura 17: Construcción del vector de expresión *pAtTrxo1::uidA* utilizando la tecnología de clonación Gateway®.** Abreviaturas: *attB1*, *attB2*, *attP1*, *attP2*, *attR1*, *attR2*, sitios de recombinación; *ccdB*, gen letal; *CmR*, gen de resistencia a cloranfenicol; *LB*, borde izquierdo; *RB*, borde derecho; *HPT*, gen de la higromicina fosfotransferasa; *NOS*, gen de la enzima nopalina sintasa; *uidA*, gen *GUS*; Modificado de Thanh y col. (2012).

La reacción BP se llevó a cabo en volúmenes de 5 y 10  $\mu$ l, en ratios molares vector:inserto 1:1. La reacción LR se llevó a cabo en volúmenes de 10  $\mu$ l, con ratios molares

donador: receptor 5:1. Todas las reacciones de clonación se incubaron 12 h a 25°C siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### **3.5.9. Secuenciación**

Para la secuenciación de los distintos fragmentos de ADN, se clonaron en vectores plasmídicos con los que se transformó *E. coli*, *A. tumefaciens* o *S. cerevisiae* tal y como se ha descrito previamente. Los plásmidos de los distintos transformantes seleccionados, se purificaron tal y como se describe en la sección 3.5.2. Finalmente, los fragmentos de ADN se secuenciaron con los cebadores correspondientes, en la empresa de secuenciación SECUGEN S.L. (CIB, Madrid, España).

## **3.6. ARN**

### **3.6.1. Tratamiento del material**

Debido a la labilidad del ARN y a la ubiquidad de las ARNasas el material utilizado para su extracción se lavó previamente con una solución de NaOH conteniendo SDS 10% y EDTA 1 mM que posteriormente se esterilizó a 121°C y 1 atmósfera de sobre-presión durante 30 min. El agua utilizada se trató con DEPC (DiEtilPiroCarbonato) (1 ml/l) con el fin de eliminar enzimas ARNasas y ADNasas. Este tratamiento exige agitación durante doce horas en campana de extracción para favorecer la eliminación del vinilo y una doble esterilización en las condiciones anteriores.

### **3.6.2. Métodos de extracción**

El ARN procedente de semillas y tejido foliar de *A. thaliana* se aisló con una mezcla de fenol/cloroformo y posterior precipitado con 3 M LiCl (Lagrimini y col., 1987). En este método, las proteínas y lípidos se disolvieron en la fase orgánica, mientras que los ácidos nucleicos, sales y polisacáridos permanecían en la fase fenólica acuosa.

Se emplearon 1 g hojas o 10 mg de semillas, congeladas en nitrógeno líquido y pulverizadas con el equipo Mikro-dismembrator (Sartorius™) a 1500 rpm durante 1 min. El

homogenado resultante se resuspendió en 550µl de cloroformo y 550 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 200 mM pH 8; LiCl 400 mM; EDTA 25 mM; SDS 1% y agua estéril). La mezcla se resuspendió en vórtex y se centrifugó a 13.000 *g*, 5 min, temperatura ambiente, a fin de eliminar lípidos y proteínas. Posteriormente, el sobrenadante se lavó con un volumen de fenol y después con otro de cloroformo a 13.000 *g*, 3 min. Los ácidos nucleicos precipitaron con 1/3 del volumen obtenido de LiCl 8M durante toda la noche a 4°C y se recogieron a 13.000 *g*, 20-30 min a la misma temperatura. El ADN se eliminó incubando el precipitado con ADNasas (ARNase-free ADNase, Roche Applied Science™) en una relación de una unidad de enzima por cada µg ARN, durante 1 h 30 min a 37°C.

A continuación, el precipitado se lavó dos veces; el primero con acetato de sodio 3 M, pH 5,2 (7 µl) en 470 µl de agua DEPC y 250 µl etanol 70%, que se mezcló bien y se centrifugó 13.000*g*, 10 min, 4°C, y el segundo lavado con 6 veces menos de acetato de sodio 3 M y tres veces más de etanol 70%, incubándose 1-2h a -20°C.

El ARN se recogió a 13.000 *g*, 20 min, 4°C y el precipitado se lavó un par de veces con etanol 70% frío. El ARN se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 10-30 µl de agua DEPC.

El estado y calidad del ARN extraído se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa 1% y la ausencia de contaminación por ADN genómico se comprobó mediante PCR con oligonucleótidos específicos de una región intrónica del gen de la Tubulina 8 (AT5G23860, Tabla S1). A partir del ARN aislado se sintetizó cADN con el kit comercial “High-Capacity cADN Reverse Transcription Kit” (Applied-Biosystems™) a partir de moléculas de hexámeros degenerados como cebadores y siguiendo las indicaciones del fabricante.

### 3.6.3. Electroforesis ARN

Las muestras de ARN se separaron en geles de agarosa (1% p/v) con tampón TAE 1x estéril (ver sección 3.5.3.). Previamente la cubeta se descontaminó con peróxido de hidrógeno 3% durante toda la noche. Las muestras se prepararon de forma análoga a las de ADN (sección 3.5.3.). Para comprobar la integridad del ARN, se cargaron 150 ng ARN por

calle y se aplicó un voltaje constante de 60 V durante 40 min. La integridad del ARN se visualizó como dos bandas a 2000 y 5000 pb correspondientes al ARN ribosómico 18S y 28S respectivamente, presentes en una relación 1:2.

### 3.6.4. Cuantificación de ARN en solución

Para determinar la concentración de ARN de las muestras, así como su pureza, se utilizó un equipo ND-1000 (Nanodrop) 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  $DO_{260nm}=1$  para soluciones de 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN. Las relaciones  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  y  $DO_{260nm}/DO_{230nm}$  indican si existe contaminación por ADN, proteínas, fenoles y sales respectivamente. Estos cocientes deben presentar un valor cercano a 2,0. Valores inferiores a 1,85, indican la presencia de contaminación por estos sustratos (Tabla 9). Para una muestra pura de ARN, la  $A_{230:260:280}$  debe ser entonces alrededor de 1:2:1.

**Tabla 9: Correlación de la pureza de muestras de ARN a través del cociente 260/280**

% ARN	% proteínas	260/280
100	0	2,00
95	5	1,99
90	10	1,98
70	30	1,94
30	70	1,73
10	90	1,32
5	95	1,06
0	100	0,57

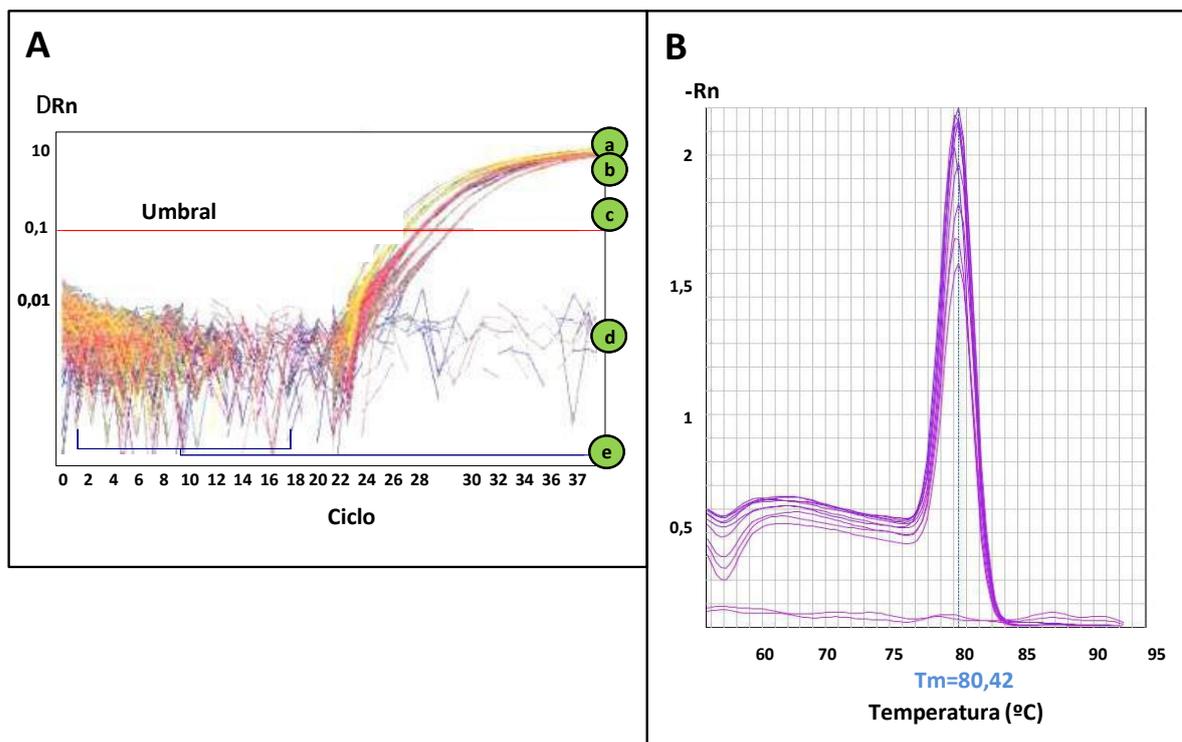
### 3.6.5. PCR cuantitativa a tiempo real

Los análisis de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real o RT-qPCR por sus siglas en inglés ReaI-Time-quantitative Polymerase Chain Reaction, se realizaron empleando el equipo Eco Real-Time PCR Illumina System (Illumina™) con el fluoróforo SYBR Green que, excitado mediante luz azul ( $\lambda_{\text{max}} = 488 \text{ nm}$ ) emite luz verde ( $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$ ). Este fluoróforo se intercala en el surco menor de la doble hélice de ADN emitiendo fluorescencia, lo que evita tener que utilizar sondas específicas marcadas. La intensidad de

emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto obtenido en la fase de amplificación exponencial que se alcanza al aumentar el número de ciclos. Llegará un momento en que algún componente de la amplificación limite el proceso lo que originará una fase lineal seguida de una fase de meseta (Fig. 18A).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ l. Éstas incluían 2X SYBR-Green, entre 10-25 ng de ADNc molde y 0,5  $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) específicos para cada gen.

Las condiciones de PCR fueron: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 10 seg a 95°C y 30 seg a 60°C. Al final de cada experimento se llevó a cabo una fase de disociación para comprobar la amplificación de un único producto (Fig. 18B).



**Figura 18: Datos de salida proporcionados por el software 7300 Real Time PCR System. (A)** Curvas de amplificación. Los distintos colores indican distintos productos génicos. a) fase de meseta, b) fase lineal, c) fase exponencial, d) background o fondo, e) línea basal. **(B)** Curva de melting o curva de disociación, representa la amplificación de un único producto de PCR. Cada producto de PCR tiene una  $T_m$  ( $T^{\circ}$  melting) específica.

A fin de corregir posibles diferencias en la cantidad y calidad de ARN, eficiencia de los oligos usados etc., la cuantificación de los amplicones debe relativizarse a un gen de referencia, gen constitutivo o *housekeeping*. En esta tesis se utilizó el gen de la Actina 8 (AT1G49240) que tiene una expresión estable y mayor que en nuestros genes problema en todos los tejidos y procesos fisiológicos analizados. Los niveles de expresión de nuestros genes problema se determinaron por el método Ct, número de ciclos de PCR necesarios para alcanzar una síntesis de amplicón en fase exponencial (Pfaffl, 2001); que se basa en la comparación del Ct del gen de interés y del gen de referencia ( $\Delta Ct$ ). Los niveles de expresión de un gen se calculan entonces como la potencia  $2^{-\Delta Ct}$ . Esto se cumple siempre y cuando la eficiencia de los oligonucleótidos empleados sea próxima a 2. La eficiencia (E) de los oligonucleótidos usados en este trabajo (Tabla S1) se calculó a partir de 4 diluciones seriadas entre 10 y 0,01 ng/ $\mu$ l de una mezcla de ADNc de distintos tejidos o de ADNg para aquellos genes cuyos niveles de expresión eran muy bajos; aplicando la fórmula  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ , donde el valor de la pendiente viene dada por la recta de regresión entre los valores de Ct y el logaritmo en base diez de las concentraciones ensayadas.

## 4. Proteómica

### 4.1. Extracción de proteínas

#### 4.1.1. Plantas

Para la obtención de muestras proteicas de plantas, se emplearon entre 0,1-1 g de hojas. En el caso de *A. thaliana* también se utilizaron 0,01 g de semillas. El material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su extracción. La extracción y homogeneización de la muestra se llevó a cabo en un mortero con nitrógeno líquido. El triturado se disolvió en un tampón de extracción, cuya composición variaba ligeramente según el objetivo final del ensayo. Para la medida de proteínas oxidadas el tampón estaba formado por: tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7 y una mezcla de inhibidores de proteasas 25x (Roche™). Para la medida de actividades enzimáticas, el tampón contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7; Cys 0,05% (p/v) y BSA 0,1% (p/v).

Posteriormente, el homogenado obtenido se centrifugó a 13.000g, 20 min, 4°C empleándose el sobrenadante para medir la concentración de proteínas y realizar los ensayos pertinentes.

Cuando la concentración de proteínas de la muestra era menor de 0,5 µg/µl se procedía a su concentración en filtros Amicon™ Ultra-0.5ml 3K (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **4.1.2. Núcleos de *Pisum sativum***

La extracción de proteínas de núcleos de hojas de guisante se realizó empleando el tampón de extracción del kit “CellLyctic PN (Sigma)” al que se le añadieron DTT a 5 mM concentración final e inhibidores de proteasas 1:100 (v/v) (Roche™). Tras descongelar el homogenado nuclear resuspendido en tampón de almacenamiento, facilitado por el fabricante, se centrifugó 13.000 g, 10 min, 4°C y el precipitado se resuspendió en un volumen de solución de extracción aportada por el kit “CellLyctic PN” (Sigma™) igual a los 2/3 del volumen de precipitado obtenido. La mezcla se incubó 30 min a 4°C y en agitación y el contenido nuclear se recogió mediante centrifugación 12.000 g, 10 min, 4°C.

#### **4.1.3. Cultivos de células de tabaco BY2**

Para la obtención de proteínas de cultivos celulares, se partió de 0,3 g de células obtenidas por filtración de los cultivos en bomba de vacío, y en su caso, mantenidos a -80°C. Las proteínas se extrajeron por homogenización en mortero utilizando nitrógeno líquido y el extracto se resuspendió en los tampones específicos según su empleo posterior, en una relación 1:2 (p/v) (ver sección 6).

#### **4.1.4. Callos de células TBY-2**

La extracción de proteínas de los callos celulares se llevó a cabo de igual forma que la comentada en el caso de las suspensiones celulares, sólo que en este caso se partió de un peso fresco que oscilaba entre 0,3 a 1,2 g. La muestra homogeneizada en nitrógeno líquido

se resuspendió en una relación 1:2 (p/v) del tampón de extracción: Tris-HCl 200 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; Tween 20 0,1% (v/v); DTT 5 mM y mezcla inhibidores de proteasas 1x (Roche™).

## **4.2. Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

### **4.2.1. Expresión de proteínas en *E. coli***

Para la expresión de proteínas recombinantes maduras PsTrx01 subclonadas en vectores tipo pET (construcción HisPsTrxo1C37S y PsTrxo1), se siguió el siguiente protocolo.

Se partió de un precultivo, para lo cual se seleccionó una colonia de *E.coli* (BL21:DE) portadora de la construcción de interés, y se añadieron 20 ml LB, más Ampicilina a una concentración final 0,1 mg/ml. Se dejó crecer 12 h, en agitación 120 rpm, a 37°C y con 5 ml de este preinóculo se inocularon 250 ml de LB y se dejaron crecer en las mismas condiciones, hasta que alcanzó la fase exponencial de crecimiento,  $DO_{600nm}=0,6$ , momento en el cual se añadió el inductor químico IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM, a fin de inducir la expresión de la proteína, continuando el crecimiento durante 3 h más. Transcurrido este periodo, las células se enfriaron en hielo y se recogieron por centrifugación a 2.500 *g* durante 15 min y el precipitado celular se almacenó a -80°C hasta su utilización.

### **4.2.2. Purificación de la proteína madura recombinante His(n)-PsTrx01**

La proteína madura recombinante PsTrx01 se purificó mediante cromatografía de afinidad empleando una resina con  $Co^{2+}$  (TALON, Clontech), a la que se unía directamente la proteína a través de la cola de histidinas presente en su extremo N-terminal, lo que permitía fijar las proteínas a las bolitas. Todas las etapas se realizaron a 4°C.

En primer lugar, los clones portadores de la construcción se rompieron en frío durante 15 minutos en un mortero con alúmina, empleando 2 g de ésta por cada gramo de células, y posteriormente se mezclaron con tampón de lisis (Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 50 mM; Nodidet P-40 0,1% (v/v); glicerol 5% (v/v); imidazol 5 mM y PMSF 1 mM), en una relación 1/6 (p/v). El lisado resultante se centrifugó a 8000 *g* durante 20 min. Por otro lado, para poder

proceder con la purificación fue necesario preparar la resina, lavándose ésta tres veces con el tampón de lisis y resuspendiéndose finalmente en el mismo medio. A continuación, la resina limpia se mezcló con el lisado anterior, manteniéndose en agitación 16 h a 4°C. Posteriormente, la resina que tenía fijada la proteína a purificar, se recuperó por centrifugación a 200 g y se resuspendió de nuevo en tampón de lisis. A continuación se lavó con un tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM; Nodidet P-40 0,1% (v/v) e imidazol 10 mM) y después dos veces con otro de composición TRIS-HCl 20 mM pH 7,9 y Nodidet P-40 0,1% (v/v). Finalmente, la proteína purificada se recuperó mediante la adición a la resina de un tampón de elución de composición Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 150 mM; Nodidet P-40 0,1% (v/v); glicerol 5% (v/v); imidazol 150 mM y PMSF 1 mM y se separó de ésta por centrifugación a 200 g. Este paso se realizó por triplicado.

El proceso de purificación se controló por análisis electroforético mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras con DTT y posterior tinción con PageBlue™ (ver sección 5.3.).

### **4.3. Electroforesis de proteínas**

#### **4.3.1. Electroforesis en condiciones desnaturizantes: SDS-PAGE**

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas en base a la movilidad de éstas en un campo eléctrico. La electroforesis vertical en geles de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes, nos permite separar las proteínas de un homogenado en base a su masa. Esto es debido a que el SDS es un detergente aniónico que desnaturiza a las proteínas eliminando sus estructuras secundaria y terciaria (pero sin alterar los enlaces disulfuro) y que además, confiere una carga negativa a cada proteína, de forma proporcional a su masa, de esta manera, se igualan las cargas de todas ellas y la separación depende sólo de los tamaños moleculares.

En este trabajo, la mayoría de electroforesis de proteínas se han hecho también en condiciones reductoras, a fin de reducir los puentes disulfuro y favorecer así el desplegado de algunas formas terciarias y cuaternarias, rompiendo las subunidades oligoméricas de las proteínas. En este caso, el homogenado proteico se calentó durante un tiempo breve a una

temperatura próxima a la de ebullición en presencia de un agente reductor, como el DTT o el 2-mercaptoetanol.

El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño. En nuestro caso, los extractos proteicos se analizaron según el método descrito por Laemmli (1970). La electroforesis se realizó en geles discontinuos compuestos de un gel concentrador de acrilamida:bisacrilamida (38:1) al 6% (p/v) y de un gel separador al 15% (p/v) en el sistema MiniProtean II (Bio-Rad). Los geles tenían un tamaño 8,6 x 6,8 cm y un grosor de 0,75 a 1,5 mm. La polimerización de los geles se llevó a cabo con persulfato amónico a una concentración final del 0,1% (p/v) y el TEMED como catalizador a una concentración final del 0,01% (v/v). Como tampón de desarrollo electroforético se usó un tampón Tris-Glicina formado por Tris-HCl 25 mM pH 8,3; Gly 192 mM; SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V durante 45 minutos. La cantidad de muestra por calle osciló entre 25 y 50 µg de proteína. El tratamiento de los homogenados se hizo de la siguiente manera: adición de DTT 10 mM durante 15 min a temperatura ambiente, adición del tampón de carga Tris-HCl 375 mM pH 6,8; glicerol 0,3% (v/v); SDS 1,5% (p/v) y azul de bromofenol 0,15% (p/v), en una proporción 2:1 (muestra:tampón) e incubación a 98°C durante 3 minutos. Como marcadores de masa molecular se emplearon los standards de Bio-Rad: Prestained SDS-PAGE y Kaleidoscope Prestained, cuyo rango abarca desde aproximadamente 7 a 200 kDa.

#### **4.3.2. Electroforesis bidimensional**

La electroforesis bidimensional consiste en separar un homogenado de proteínas en base a dos criterios independientes. En nuestro estudio, esta técnica se desarrolló para identificar proteínas diana nucleares de PsTrx01 en base a la reducción del puente disulfuro entre la tiorredoxina y su proteína diana (ver sección 4.7.). De esta forma, el primer criterio de separación fue una electroforesis en condiciones no reductoras (1D) para separar los

complejos Trx-diana y el segundo criterio una SDS-PAGE en condiciones reductoras (2D), donde se liberarían del complejo y se separarían entre sí las posibles proteínas diana.

La SDS-PAGE 2D se desarrolló en geles 10 x 10 cm y 1 mm de grosor, en el sistema Mini-Protean System (Bio-Rad). La SDS-PAGE en 1D se realizó con 1-2 mg de proteína procedente de preparaciones nucleares semi-purificadas empleando un gel separador de 1 mm de grosor al 10% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida y un gel concentrador al 6% (p/v) tal y como se explica en la sección 4.3.1. A la muestra a cargar se le añadieron: 15  $\mu$ l del marcador de peso molecular y tampón de carga en relación 2:1. La muestra se incubó a 60°C durante tres minutos. Las condiciones de la electroforesis fueron temperatura ambiente, 5 h, amperaje constante de 25 mA, y voltaje de 200 V como límite superior.

Transcurrida la primera dimensión, la calle del gel donde se encontraba la muestra, se recortó y se incubó durante 1h en agitación suave y a temperatura ambiente con tampón de muestra SDS-PAGE diluido 2,5 veces (Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; glicerol 12,5% (v/v); SDS 10% (p/v); DTT 100 mM). Transcurrido ese tiempo, la tira de electroforesis se depositó en la parte superior de un gel igual que el empleado en la primera dimensión, pero omitiendo el gel concentrador y se cubrió con una fina capa de agarosa al 0,8% (p/v), a fin de evitar la entrada de oxígeno que actúa inhibiendo la polimerización. Las condiciones de electroforesis fueron las mismas que para la primera dimensión. Una vez finalizadas las electroforesis, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie y las proteínas se secuenciaron según se describe en las secciones 4.4. y 4.8.2. respectivamente.

## **4.4. Tinción de proteínas**

### **4.4.1. Tinción con Coomassie**

El gel se sumergió tras la electroforesis en una solución de azul brillante Coomassie R-250 al 0,25% (p/v) diluido en metanol 50% (v/v), y se agitó suavemente durante 45-60 minutos (Garfin, 1990). Transcurrido ese tiempo, se eliminó dicha solución de tinción y se sustituyó por la solución decolorante compuesta por metanol y acético al 50% (v/v) y 10% (v/v) respectivamente, donde 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 se hicieran patentes y el fondo del gel quedase claro. Con esta técnica, se detectaron cantidades de proteína del orden de 0,1–1  $\mu\text{g}$ .

#### **4.4.2. Tinción con PageBlue™**

La tinción con PageBlue™ (Fermentas) es una tinción a punto final que está basada en el protocolo de tinción con azul de Coomassie pero presenta entre otras, la ventaja de que permite detectar cantidades de proteína del orden de los 5 ng.

Para llevarla a cabo, el gel tras la electroforesis se lavó con agua bidestilada (3 x 10 min) para eliminar el SDS y las proteínas de menor tamaño se fijaron durante 15 min con una solución de isopropanol al 25% (v/v) y acético 10% (v/v). Posteriormente, el gel se lavó de nuevo con agua bidestilada pero más suavemente, para eliminar los restos de fijador y se cubrió con solución PageBlue™ donde se mantuvo en agitación suave durante 60 min, tras lo cual se lavó de nuevo durante 5 min para su almacenaje.

#### **4.5. Medida de concentración de proteínas**

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo mediante una adaptación del método de Bradford (1976). Este microensayo es indicado para soluciones de proteína con concentraciones menores a 20  $\mu\text{g/ml}$  y se basa en el cambio de absorbancia a 595nm que presenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al interactuar con aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. La concentración proteica de la muestra problema se calculó por interpolación del valor de la absorbancia a 595 nm con una recta estándar de albúmina calibrada en un rango 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 20  $\mu\text{g/ml}$ .

#### **4.6. Técnicas de concentración de proteínas**

Para la concentración de soluciones de proteínas con tamaño molecular superior a 3000 Dalton y con volúmenes inferiores a 1 ml se emplearon filtros Amicon™ Ultra-0,5mM 3K. Estos filtros facilitaban una concentración rápida de las proteínas, así como la desalinización

del homogenado, lo que en determinadas situaciones era bastante importante para eliminar interferentes residuales en los pasos subsiguientes. En todo caso se siguieron las recomendaciones descritas por el fabricante.

Para volúmenes de muestra superiores a 1 ml se usaron columnas de Sephadex-G25 (Separation Pharmacia dextran). En este caso, la matriz de la columna es un gel de dextrano reticulado, que favorece la eliminación de sales, anfolitos, detergentes y fenoles, por lo que sigue el mismo principio que la diálisis.

En los casos en los que la muestra contenía solutos que interferían con la estabilidad de las columnas de filtración, y en las que no se realizarían determinaciones enzimáticas, la concentración de las mismas se realizó por precipitación con acetona. Para ello, se empleó acetona fría en relación 3:1 (v/v) para concentraciones menores de 3 mg/ml, o en relación 6:1 (v/v) para concentraciones superiores. Las muestras se congelaron y posteriormente se descongelaron en agitación durante una hora. Posteriormente se volvían a congelar a -20°C durante 16 horas. Transcurrido ese tiempo, la muestra se descongelaba y las proteínas se recogían en el sobrenadante tras centrifugar 13.000 g, 20 min, 4°C.

#### **4.7. Identificación de proteínas diana nucleares de PsTrxo1**

Para la identificación de las proteínas diana nucleares se siguió básicamente el protocolo descrito por Pérez-Pérez y *col.* (2006), que consiste en la inmovilización sobre una resina de afinidad, por medio de una cola de histidinas, de una Trx mutada en la segunda cisteína de su centro activo por una serina (C35S), tras lo cual se lleva a cabo la unión *in vitro* de las proteínas diana a dicha Trx. En este caso, el procedimiento experimental se desarrolló en las siguientes etapas:

##### **1) Preparación de la muestra**

En primer lugar se expresó y purificó la proteína recombinante His(n)-PsTrxo1-C37S tal y como se describe en la sección 4.2. Paralelamente se obtuvieron núcleos purificados de hojas de guisante siguiendo el protocolo descrito en la sección 1.1.2. Para extraer el contenido nuclear el homogenado fue incubado con el tampón de extracción proporcionado

por el kit CellLytic PN (Sigma) tal y como se describe en la sección 4.1.2. y posteriormente, las proteínas extraídas se concentraron con filtros Amicon™ Ultra-0.5mM 3K.

## **2) Unión de la proteína recombinante His(n)-PsTrxo1C37S a la resina de afinidad**

Una cantidad de 2 mg de la proteína recombinante His(n)-PsTrxo1C37S se trataron con DTT 20 mM durante 1 h a 4°C. A continuación, la muestra se transfirió a columnas Sephadex G25 con el objetivo de eliminar el reductor DTT y se eluyó en un tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 50 mM; glicerol 5% (v/v) y PMSF 1mM. Esta muestra reducida se mezcló con 5ml del tampón anterior que contenía 400 µl de la resina de afinidad TALON (Clontech), previamente lavada empleando dicho tampón, según el protocolo de la sección 4.2. La mezcla de resina con proteína recombinante se mantuvo incubando a 4°C en agitación suave durante 16 h, con el objetivo de fijar de nuevo la proteína a la resina.

## **3) Purificación de los complejos proteicos His(n)-PsTrxo1C37S-diana**

La resina con la proteína recombinante His(n)-PsTrxo1C37S fijada, se recogió mediante centrifugación a 200 g, y tras 2 lavados con el mismo tampón en el que se encontraba, se resuspendió en un volumen de extracto de proteínas nucleares que contenía 1 mg de proteína. La mezcla de resina con proteína recombinante fijada se mantuvo incubando a 4 °C en agitación suave durante 16 h con el extracto nuclear, con el objetivo de formar los complejos proteicos His(n)-PsTrxo1C37S-diana. A continuación se lavó con un tampón de lavado (Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 500 mM; Nodidet P-40 0,1% (v/v) e imidazol 10 mM) y después dos veces con otro de composición Tris-HCl 20 mM pH 7,9 y Nodidet P-40 0,1% (v/v). Finalmente, la elución de los complejos se facilitó por una solución de composición Tris-HCl 20 mM pH 7,9; NaCl 150 mM, Nodidet P-40 0,1% (v/v), glicerol 5% (v/v), imidazol 150 mM y PMSF 1 mM. De todos estos componentes el imidazol a altas concentraciones, es el agente eluyente más destacable, ya que esta molécula es capaz de desplazar la histidina de su unión con el cobalto y con ello los complejos Trx-diana. La elución de la columna se aceleró mediante centrifugación a 200 g. Este paso se realizó por triplicado.

A lo largo de todas estas etapas, cada uno de los perfiles de proteínas, se analizó mediante SDS-PAGE reductora y posterior tinción de los geles correspondientes.

#### **4.8. Secuenciación por masas**

La secuenciación de proteínas se llevó a cabo en el Servicio de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC) por espectrometría de masas como se describe a continuación.

##### **4.8.1. Digestión de proteínas en gel**

Las manchas de proteína fueron escindidas manualmente y digeridas de forma automática en un robot digester Proteineer DP (Bruker-Daltonics). Se empleó el protocolo de digestión de Shevchenko *y col.* (2006) con ligeras variaciones: los fragmentos fueron reducidos con DTT 10 mM en bicarbonato amónico (pureza: 99,5%; Sigma Chemical<sup>TM</sup>) 50 mM y alquilados con yodoacetamida (Sigma Chemical<sup>TM</sup>) 55 mM en bicarbonato amónico 50 mM. Los fragmentos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM y acetonitrilo (calidad HPLC; Merck<sup>TM</sup>) y fueron secados en corriente de nitrógeno. A continuación, se añadió a los fragmentos tripsina porcina modificada (calidad secuenciación; Promega<sup>TM</sup>) a una concentración de 8 ng/ $\mu$ l en bicarbonato amónico 50 mM y se dejó transcurrir la digestión durante 8 h. Por último, se añadió ácido trifluoroacético (pureza: 99,5%; Sigma Chemical<sup>TM</sup>) al 0,5% (v/v) para extraer péptidos.

##### **4.8.2. MALDI-MS/MS y búsqueda en bases de datos**

Una alícuota del digerido descrito anteriormente se mezcló con una alícuota de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Bruker-Daltonics<sup>TM</sup>) en acetonitrilo acuoso al 33% (v/v) y 0,25% (v/v) de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en un portamuestras MALDI pretratado AnchorChip de 600  $\mu$ m (Bruker-Daltonics<sup>TM</sup>) y se dejó secar a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS/MS se obtuvieron de forma automática en un espectrómetro de masas MALDI Ultraflex (Bruker-Daltonics) equipado con un dispositivo LIFT-MS/MS (Suckau *y col.*, 2003). Los espectros de masas se midieron en modo positivo, a una frecuencia de láser de 50 Hz, y se acumularon entre 100 y 1000 espectros individuales. Para el análisis de iones

fragmento en modo tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), los precursores fueron acelerados a 8 kV y seleccionados mediante una compuerta iónica temporal. Los iones fragmento generados mediante descomposición inducida por láser del precursor fueron de nuevo acelerados a 19 kV en la cámara LIFT y analizados en el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se llevó a cabo con el software flexAnalysis (Bruker-Daltonics™). Los espectros MALDI-TOF fueron calibrados internamente empleando como referencia señales de masa de dos iones provenientes de la autólisis de la tripsina con  $m/z = 842,510$  y  $m/z = 2211,105$ ; la calibración para las medidas MALDI-MS/MS se realizó con los espectros de los iones fragmento de las señales protonadas de una mezcla de péptidos que cubría el intervalo  $m/z = 800-3200$ . Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa BioTools (Bruker-Daltonics) para buscar en una base de datos no redundante (NCBI nr;  $\sim 4,8 \times 10^6$  entradas; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, EE.UU.; o SwissProt;  $\sim 2.6 \times 10^5$  entradas; Swiss Institute for Bioinformatics, Suiza) empleando el software Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido) (Perkins *et al.*, 1999). Tanto los espectros MALDI-MS/MS como los resultados de la búsqueda en bases de datos fueron revisados manualmente en detalle utilizando el programa BLAST protein de la base de datos online [www.expasy.org](http://www.expasy.org).

## **4.9. Ensayos de expresión de *PsTrxo1* mediante la enzima $\beta$ -glucuronidasa (GUS).**

### **4.9.1. Ensayo de expresión transitoria**

El análisis cuantitativo de la actividad  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUS), se realizó sobre hojas de *N. benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones deladoras derivadas de la clonación de cuatro fragmentos del promotor del gen *PsTrxo1* de 1047 pb, 622 pb, 455 pb y 314 pb aguas arriba del codón de inicio de la transcripción (Fig. S1), amplificadas con oligonucleótidos específicos (Tabla S1) e introducidas en el vector PMDC163 según la tecnología recombinacional GATEWAY (Fig. 17), (sección 3.5.8.3.).

El ensayo fluorimétrico para detectar la actividad glucuronidasa (GUS) se realizó siguiendo el método de Jefferson (1987). Para la extracción de proteínas, secciones de hojas

de 1 cm<sup>2</sup> de plantas agroinfiltradas se congelaron en nitrógeno líquido y se pulverizaron en el equipo Mikro-Dismembrator (Sartorius<sup>TM</sup>) a 1500 rpm, 2 min, mantenido en frío para evitar así la descongelación de la muestra. Los homogenados se resuspendieron en 300 µl del tampón de extracción GUS (fosfato potásico 0,2 M; pH 7,2; PMSF 0,5 mM y DTT 1 mM), hasta su completa descongelación. A continuación se centrifugaron a 12.000 g, 30 min, 4°C y se recogió el sobrenadante con la fracción soluble de proteínas.

La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 40 minutos, en oscuridad, en placas de 96 pocillos en un volumen final de 200 µl por pocillo y que incluían; 20 µl del extracto de proteínas a una concentración de 1 µg/ml y 180 µl del tampón de reacción GUS (fosfato sódico 50 mM pH 7; EDTA 10 mM; SDS 0,1% (v/v) y Tritón X-100 0,1% (v/v)) más el sustrato MUG (4-Methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide trihydrate, Duchefa Biochemie<sup>TM</sup>) 1 mM, que es degradado por la enzima β-glucuronidasa dando lugar a un producto fluorescente MU (metilumbeliferona). Cada 10 min, se tomaron 20 µl de la reacción que se inhibieron con 180µl de NaCO<sub>3</sub> 1 M. La emisión de fluorescencia, equivalente a la actividad GUS, se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y 465 nm de emisión.

Los valores de fluorescencia se relativizaron a una recta patrón con el producto de la reacción: 4-metil-umbeliferil (MU) en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,01 µM.

La actividad GUS de cada muestra se normalizó con la actividad luciferasa. Para este ensayo, en placas de 96 pocillos de color blanco, para no interferir con la luminiscencia, se añadieron 40 µl del extracto de proteína y 50µl del sustrato de la luciferasa (Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity; Roche<sup>TM</sup>), que en presencia de la enzima luciferasa liberaba un producto fluorescente. El sustrato se añadió de forma inmediata a la medida en el equipo, debido a la alta velocidad de recambio de la luciferasa. La actividad luminiscente se midió utilizando una longitud de onda de excitación de 365 nm y 465 nm de emisión.

Las medidas de actividad por fluorescencia y luminiscencia se llevaron a cabo en un lector de placas Genios Pro 96/384 multifunction microreader (TECANR; TecanGroup, Mannedorf, Switzerland).

#### 4.9.2. Ensayo de expresión estable

La coloración histoquímica de plantas de *A. thaliana* portadoras de las construcciones descritas en la sección 1.3.2 y que además expresaban el gen GUS (*uidA*) se realizó según el protocolo de Jefferson y col (1987), el llamado análisis histoquímico X-Gluc. Los tejidos se sumergieron en tampón GUS (tampón fosfato sódico 50 mM pH 7; hexacianoferrato potásico II 5 mM; hexacianoferrato potásico III 5 mM; Na<sub>2</sub>-EDTA 50 mM pH 8; Metanol 20% (v/v); X-GlcA sodium trihydrate 38 mM disuelto previamente en dimetilsulfóxido (DMSO); Tritón X-100 0,1%) y se incubaron 12 h en el caso de las semillas y 16 horas para otros tejidos vegetativos a 37°C. Transcurrido ese tiempo, se procedió al lavado con agua destilada y etanol 70% (v/v) y a la decoloración de los tejidos con cloral-hidrato 60% durante 2 horas a temperatura ambiente o hasta la completa decoloración del tejido. A continuación se lavó de nuevo con etanol 70% (v/v) y el tejido se almacenó en la misma solución a 4°C.

Las estructuras teñidas se visualizaron y fotografiaron con una lupa LEICA, acoplada a una cámara digital Leica DC 500 con la versión 1.20 del software Leica IM 1000 Image Manager.

#### 4.10. Determinaciones enzimáticas

Las actividades enzimáticas se realizaron en células de tabaco BY-2. El homogenado celular se hizo como se describe en la sección 4.1.3. y se resuspendió en un tampón: Tris-HCl 50 mM pH 7; Cys 0,05% (p/v) y BSA 0,1% (p/v) en una relación 1/2 (p/v).

Según la Ley de Lambert-Beer (1852), la concentración de una sustancia en un homogenado es directamente proporcional a la absorbancia en la longitud de onda en la que absorbe dicha sustancia. Esta ecuación nos indica que la absorbancia es igual al coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ;  $M^{-1} \times cm^{-1}$ ), que refleja la capacidad que tiene una molécula de absorber radiación electromagnética a una longitud de onda, multiplicado por la concentración de esa sustancia ( $c$ ) y por la distancia recorrida (tamaño de la cubeta,  $l$ ).  $[Abs = \epsilon \times c \times l]$ . Normalmente entre 0 y 2 unidades de absorbancia se cumple la Ley de Lambert-Beer.

Atendiendo a estas consideraciones, podemos calcular la actividad específica del enzima que se define como los  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertidos por minuto y por  $\text{mg}$  de proteína ( $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ). No obstante, para calcular los  $\mu\text{mol}$  de sustrato convertidos por minuto es importante que la velocidad de la enzima de la reacción sea la máxima, y por tanto, constante, lo cual se consigue a concentraciones saturantes de sustrato. En este punto y teniendo en cuenta que la cinética de la reacción es michaeliana y de primer orden, se puede afirmar que la velocidad es directamente proporcional a la concentración de enzima total en la muestra ( $v \approx k_2[E]_{\text{tot}} = V_{\text{max}}$ ).

De esta forma, las medidas de actividad se hicieron a concentraciones saturantes de sustrato, por diferencias de absorbancia entre sustrato y producto en el pico de absorbancia del producto durante dos minutos, de los cuales, los primeros veinte segundos no se añadía el iniciador de la reacción a fin de comprobar el nivel basal de absorbancia.

#### 4.10.1. Enzimas del ciclo ASC-GSH

En extractos de células de tabaco BY-2, se determinó la actividad de las distintas enzimas del ciclo ASC-GSH: ascorbato peroxidasa (APX), monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR), deshidroascorbato reductasa (DHAR) y glutatión reductasa (GR), junto con la actividad catalasa (CAT). La actividad enzimática, expresada en  $\text{nmoles} \times \text{min}^{-1} \times \text{ml}^{-1}$ , se calculó a partir de la velocidad inicial de reacción ( $\Delta\text{ABS}/\text{min}$ ) y del coeficiente de extinción molar correspondiente para los distintos sustratos de las respectivas enzimas (Tabla 10).

Tabla 10: Coeficientes de extinción molar y longitud de onda de los sustratos de las distintas enzimas

ENZIMA	Sustrato	Epsilon ( $\epsilon$ )	$\lambda$ (nm)	Pendiente de la recta
APX	ASC	$2,7 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	290	negativa
DHAR	DHA	$13,5 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	265	positiva
MDHAR	NADH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
GR	NADPH	$6,2 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	340	negativa
CAT	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	$39,58 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	240	negativa

#### 4.10.1.1. Ascórbico peróxidasa (APX, EC 1.11.1.11)

La actividad APX en disolución se midió según el método de Hossain y Asada (1984) que está basado en la medida a 290 nm de la oxidación del ácido ascórbico. La mezcla de reacción, en un volumen final de 1 ml, contenía tampón Tris-acetato 0,1 M pH 6,4; 6  $\mu\text{l}$  ASC 50 mM; 10  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 17 mM y 5-40  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción a 25°C, se inició añadiendo el ASC y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siguiéndose la oxidación del ascorbato a 290 nm durante 1 min, en intervalos de 2 segundos tras la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

#### 4.10.1.2. Deshidroascorbato reductasa (DHAR, EC 1.8.5.1)

En la medida de DHAR se utilizó el método descrito por Dalton y *col.* (1993), con ligeras modificaciones, consistente en la medida a 265 nm y a 25°C, de la formación de ascorbato a partir de deshidroascorbato (DHA).

La mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml contenía, tampón fosfato 0,1 M pH 6,4; 20  $\mu\text{l}$  GSH 0,1 M; 10  $\mu\text{l}$  DHA 0,1 M y 10-30  $\mu\text{g}$  de proteína. La reacción se inició por la adición de GSH y DHA, midiéndose el incremento de absorbancia a 265 nm durante 2 min cada dos segundos después de su adición, frente a un blanco de muestra conteniendo el tampón de reacción. El valor final de absorbancia se corrigió restando el valor obtenido en ausencia del extracto enzimático.

#### 4.10.1.3. Monodeshidroascorbato reductasa (MDHAR, EC 1.6.5.4)

La medida de actividad de MDHAR se determinó siguiendo el método de Arrigoni y col. (1991), basado en la disminución de la absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADH a NAD, con algunas modificaciones.

El ensayo se llevó a cabo a 25°C y la mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml, que contenía tampón Tris-HCl 50 mM pH 8 y 10 µl ASC 0,1 M; 20 µl NADH 0,01 M y 1 0µl ASC oxidasa (AO, 250 U/ml) y 10-30 µg de proteína. La reacción se inició por la adición de NADH y AO. La oxidación del NADH fue igualmente corregida restando el valor de absorbancia obtenido en ausencia del extracto enzimático.

Como sistema generador del radical MDHA, se empleó una mezcla de ácido ascórbico 1 mM y 0,5 unidades de AO, necesaria para conseguir un descenso de la absorbancia a 265 nm comprendido entre 0,01 y 0,02 unidades por minuto.

#### 4.10.1.4. Glutación reductasa (GR, EC.1.6.4.2)

La medida de la actividad GR se hizo usando el método de Edwards y col. (1990), que está basado en la medida del descenso de absorbancia a 340 nm, debido a la oxidación del NADPH resultante de la reducción del glutación por la enzima.

La mezcla de reacción en un volumen final de 1 ml contenía, tampón fosfato 0,1 M pH 7,2; 10 µl NADPH 0,01 M y 10 µl glutación oxidado (GSSG) 0,1 M más 10-80 µg de proteína. La reacción se inició por la adición de NADPH y GSSG, siguiéndose la oxidación de NADPH durante dos minutos en intervalos de dos segundos.

#### 4.10.1.5. Catalasa (CAT, EC 1.11.1.6)

Para su determinación se empleó el método espectrofotométrico descrito por Aebi (1984) que está basado en la medida de la disminución de la absorbancia a 240 nm motivada por la desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La mezcla de reacción en un volumen de 1 ml, contenía tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  3,8 M y 10-30  $\mu$ g proteína. La reacción se inició por la adición de  $H_2O_2$ . El registro se efectuó midiendo frente a un blanco de tampón fosfato.

## 5. Técnicas inmunológicas

### 5.1. Transferencia a membrana para inmunodetección (Western blot)

El ensayo de Western blot se emplea para detectar y cuantificar una proteína determinada presente en una muestra. Para ello, las proteínas se someten a electroforesis, normalmente SDS-PAGE y posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. La detección de la proteína a estudiar en la membrana se realiza por medio de la unión específica de un anticuerpo primario frente a la proteína de interés. Un segundo anticuerpo, acoplado con un sistema enzimático, y contra la especie en la que se ha producido el primero, se emplea para localizar dónde se formaron los complejos antígeno anticuerpo.

Tras realizar la electroforesis de las muestras mediante SDS-PAGE, tanto el gel como una membrana de nitrocelulosa (Scheleicher y Schuell) de las mismas dimensiones se equilibraron durante 15 min en un tampón de transferencia pH 8,9 (TRIS 48 mM, glicina 39 mM; SDS 0,03% (p/v) y metanol 20% (v/v)). La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó a un voltaje constante de 20V durante 40 min usando un equipo de transferencia de tipo semi-seco (Trans Blot, Bio-Rad<sup>TM</sup>). La comprobación de la transferencia se hizo mediante la incubación de la membrana en una solución de rojo Ponceau S al 0,2% (p/v) en ácido tricloroacético 3% (p/v) y ácido sulfosalicílico 3% (p/v) durante 5min, donde se podían ver las proteínas teñidas de rojo. Tras esta comprobación la membrana se desteñía con agua destilada.

Para comprobar la cantidad de proteínas que quedaban retenidas en el gel después de la transferencia, éste se teñía con azul de Coomassie.

A fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo a la membrana, ésta se bloqueó con BSA 3% (p/v) en TBS (Tris-HCl 25 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM) durante 1 h a temperatura ambiente. Tras esta etapa de bloqueo se incubó la membrana con el anticuerpo primario

específico (Tabla 10) frente a la proteína de estudio, diluido con BSA 1% (p/v) en TBST (TRIS-HCl 25 mM pH 7,5; NaCl 150 mM y Tween-20 0,1% (v/v)). Después de una noche de incubación a 4°C con el anticuerpo primario, la membrana se lavó en TBST (5 x 6 min) y se incubó durante 1 h y 30 min con el anticuerpo secundario diluido con BSA 1% (p/v) en TBST (Tabla 11). Este anticuerpo, fue desarrollado frente a la especie en la que se produjo el primario y estaba conjugado con fosfatasa alcalina. Tras repetir los lavados con TBST (5 x 6 min), la membrana se lavó con TBS durante otros 5 min y posteriormente se sumergió en tampón de equilibrado compuesto por Tris-HCl 0,1 M pH 9,5 y NaCl 0,1 M (2 x 5 min). Para la detección de la proteína se empleó un método colorimétrico. Para ello, la membrana se sumergió en una solución de BCPI-NBT (Roche Diagnostics™) diluida 1:50 en el tampón de equilibrado durante 15-30 min con agitación suave. Cuando aparecieron las bandas, la membrana se lavó repetidas veces con agua destilada y se dejó secar.

### 5.1.1. Anticuerpos empleados en los Western blots

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, aparecen recogidos en las Tablas 10 y 11, respectivamente. El anticuerpo policlonal frente PsTrxo1 fue obtenido en conejos blancos de Nueva Zelanda por la empresa Sigma-Genosys (UK), contra el péptido sintético ARLNHITEKLFKKD. Este péptido comprende 14 aminoácidos de la región C-terminal de la proteína y presenta una alta antigenicidad. Por otro lado los anticuerpos frente a PrxIIIF y AOX fueron cedidos por el Dr. Juan J. Lázaro (Estación Experimental del Zaidín) y por el Dr. Miguel Ribas-Carbó (Universidad de las Islas Baleares), respectivamente.

**Tabla 10: Anticuerpos primarios empleados en los ensayos de western blot.**

Proteína frente a la que se desarrolla el anticuerpo	Especie productora	Tipo	Dilución usada
PsTrxo1	Conejo	Policlonal	1:2000
AOX	Ratón	Monoclonal	1:50
PsPrxIIIF	Conejo	Policlonal	1:3000

**Tabla 11: Anticuerpos secundarios empleados en los ensayos de western-blot.**

Proteína frente a la que se desarrolla el anticuerpo	Dilución usada	Proveedor
IgG de conejo	1:6.000	Boheringer Mannheim
IgG de ratón	1:30.000	Sigma
IgG de cabra	1:30.000	Sigma

## 6. Metabolitos

### 6.1. Determinación de ASC y GSH

La determinación de ascórbico oxidado y reducido, así como el glutatión oxidado y reducido y el S-nitrosoglutatión se realizaron por espectrometría de masas HPLC–ESI/MS en el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia, usando un equipo Agilent 1100 Series HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con un autoinyector termostatzado y una bomba capilar, y conectado a un espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent Technologies) usando una interfase de ionización de electrospray. La recta de calibrado empleada para cada metabolito osciló en un rango de concentraciones de 0,1; 1; 10; 20; 50 y 100  $\mu\text{M}$ .

Para la preparación de los extractos celulares, se partió de 0,3 g de células TBY-2 resuspendidas en 600  $\mu\text{l}$  de ácido metafosfórico 5% (p/v), que se homogenizaron durante 3 min en un agitador tipo vórtex y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Las determinaciones se realizaron en el sobrenadante procedente de la centrifugación del material previamente descongelado, y centrifugado durante 20 min a 13.000 *g*,  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se filtró utilizando filtros Millex-GP 50pk 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Para la realización del análisis, 20  $\mu\text{l}$  de cada muestra o patrón se inyectó en una columna de HPLC Supelco Discovery C18 (5  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm; Supelco<sup>TM</sup>) a  $40^{\circ}\text{C}$  y se eluyó a un flujo de 1 ml/min, tal y como describen Rellán-Álvarez y *col.* (2006). La fase móvil consistió en el solvent A (ácido fórmico 0,1% en agua MilliQ) y el solvente B (ácido fórmico

en acetonitrilo 0.1% (v/v). Para la separación se realizó un gradiente lineal de 0 a 10% B (0–5 min). Para lavar la columna se incrementaba linealmente la concentración del solvente B de 10 a 50% de 5 a 6 min y se mantenía hasta los 9 min. Finalmente para regenerar la columna, el solvente se cambiaba linealmente a 0% hasta el min 11 y se mantenía así 4 min tras los cuales se inyectaba una nueva muestra.

## 6.2. Determinación de peróxidos lipídicos

La peroxidación de lípidos se estimó según el método de Buege y Aust (1972) que determina la concentración de malondialdehído (MDA) como producto de la peroxidación. El MDA es un subproducto de la peroxidación lipídica que en condiciones de bajo pH y alta temperatura reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) dando lugar al producto MDA-TBA que es detectable por espectrofotometría a 535 nm.

El daño oxidativo a lípidos se realizó tanto en semillas de *A. thaliana* como en células TBY-2 con ligeras diferencias en los tampones de extracción y en la cantidad de muestra utilizada. De esta forma, 0,3 g de células TBY-2 o 50-100 mg de semillas se pulverizaron con nitrógeno líquido, para luego resuspenderse en 500-600  $\mu$ l de un tampón fosfato potásico 0,1 M pH 7 que contenía inhibidores de proteasas (Complete, Roche<sup>TM</sup>, Germany) o en el mismo tampón pero añadiendo además EDTA 0,5 M; Tritón X-100 0,1% y PVP 1mM en el caso de semillas. Los homogenados se centrifugaron 10.000 *g*, 15 min, 4°C empleándose el sobrenadante como material de partida. De esta forma, 100  $\mu$ l se mezclaron con 1ml de un reactivo que contenía ácido tricloroacético al 15% (p/v), ácido tiobarbitúrico al 0,375% (p/v) y butilhidroxitolueno al 0,01% (p/v), preparado en HCl 0,25 N. Posteriormente, la mezcla se calentó durante 15 min a 95°C con agitación, se dejó enfriar y se centrifugó a 2000 *g* durante 5min, efectuándose la lectura a 535 nm frente a un blanco de agua ultrapura Milli-Q.

Los valores de absorbancia se relativizaron a una recta patrón de malondialdehído dimetil acetal comercial (MDA) partiendo de una solución madre 20  $\mu$ M y en un rango de concentraciones 0,05; 0,1; 0,25; 0,50; 1,0; 5,0 y 10  $\mu$ M y medida de forma simultánea a las muestras problema.

### 6.3. Determinación de proteínas oxidadas

El contenido de grupos carbonilo en proteínas se analizó como marcador de daño oxidativo, mediante la reacción de estos grupos con el reactivo 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH), (Levine y *col.*, 1990).

El extracto vegetal, preparado tal y como se describe en la sección 4.1., se trató con sulfato de estreptomicina al 10% (v/v) en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,4 y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con el fin de precipitar el ADN. Tras 10 min de centrifugación a 13.000 *g* se tomaron 400  $\mu$ l, de los cuales, 200  $\mu$ l se trataron con 100  $\mu$ l de una solución de dinitrofenilhidracina (DNPH) 10 mM en HCl 2M, previamente filtrada tras ser preparada con agitación durante toda la noche a 37°C. Los otros 200  $\mu$ l se incubaron con 100  $\mu$ l de una solución de HCl 2 M a fin de corregir las interferencias producidas por el ácido en la precipitación de grupos carbonilo. Tras una incubación en agitador giratorio 3D (Gyromini Labnet™), 1 h a temperatura ambiente se añadieron 500  $\mu$ l de ácido tricloroacético (TCA) al 20% (v/v) y se centrifugó a 12.000 *g* durante 3 min. Las proteínas precipitadas se lavaron varias veces en 500  $\mu$ l de una mezcla de acetato de etilo/etanol (1:1) y se centrifugó en las condiciones anteriores. Los lavados se repitieron hasta eliminar el exceso de DNPH, y se procedió igualmente con los controles de HCl. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 600  $\mu$ l de guanidina 6 M que solubilizó las proteínas. Después de incubar 15 min a 37°C, se centrifugó a 12.000 *g*, 3 min y se midió la absorbancia a 360 nm en el sobrenadante.

Los valores de absorbancia a 360 nm de las alícuotas con DNPH se les restaron los valores de absorbancia de los controles (sin DNPH). El contenido en grupos carbonilo se calculó utilizando un coeficiente de absorción molar de 22.000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Finalmente, se calculó la concentración de grupos carbonilo como nmoles de carbonil proteínas x mg<sup>-1</sup> proteína.

## 6.4. Determinación de peróxido de hidrógeno.

Para la determinación de peróxido de hidrógeno se utilizó una adaptación del método FOX (Cheeseman, 2006). Este método se basa en la oxidación del hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ) presente en el naranja de xilenol en medio ácido, por presencia de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno. El naranja de xilenol ( $\text{Fe}^{3+}$ ), en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , forma un cromóforo azul púrpura ( $\text{Fe}^{2+}$ ) el cual presenta un máximo de absorción a 550 nm.

### 6.4.1. Células TBY-2

Para hacer el ensayo, 1 ml de una suspensión de células TBY-2 se centrifugaron a 10.000g, 20 min, 4°C y el precipitado se resuspendió en acetona ácida (acetona en ácido sulfúrico al 0.072%) en una relación 1:2 (p/v) y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. El homogenado se descongeló en hielo y en agitación durante 45 min y se centrifugó a 12.000g, 10 min, 4°C, donde 100  $\mu\text{l}$  del sobrenadante se incubaron con 500  $\mu\text{l}$  del reactivo FOX, preparado añadiendo los siguientes reactivos en el siguiente orden: ácido sulfúrico 25 mM; Xilenol orange 100  $\mu\text{M}$ ; amonio sulfato ferroso 250  $\mu\text{M}$  y sorbitol 100  $\mu\text{M}$ . Estos reactivos se mantuvieron en agitación durante 45 min a temperatura ambiente.

La absorbancia se midió tanto a 550 nm como a 850 nm, ya que la disolución en medio ácido, aunque necesaria, causaba ciertas interferencias con la medida de las proteínas.

Los valores de concentración se calcularon interpolando los valores de absorbancia de la solución problema a los de una recta de calibrado con  $\text{H}_2\text{O}_2$  comercial en acetona ácida en un rango de concentraciones de peróxido de 10, 25, 50, 100, 150, 200 y 250  $\mu\text{M}$  y tratada de la misma forma que a la muestra.

### 6.4.2. Semillas de *A. thaliana*

La determinación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en semillas de *A. thaliana* se hizo del mismo modo que el comentado para células, solo que en este caso, la preparación de la muestra fue distinta. A los tiempos indicados (ver sección 1.2.7) se recogieron 100-200 mg de semillas, a las que se

añadió 1 ml de acetona ácida, se homogenizó en un agitador tipo vórtex y el extracto se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido.

## 6.5. Determinación de óxido nítrico

La determinación de óxido nítrico en las células TBY-2 se basó en la utilización de un fluoróforo capaz de unirse al NO intracelular y de esta forma cambiar su absorción.

Para hacer el ensayo, 1ml de células frescas se centrifugaron a 10.000 *g*, 20 min, 4°C. De esta forma, 50 µl del sobrenadante se diluyeron 1:2 con tampón HEPES y 50 µl de esta dilución se incubaron con HEPES y 1 µl DAF (diamino-fluoresceína) durante 1 h a 37°C. Por otro lado, el precipitado se resuspendió en tampón HEPES 50 mM relación 1:2 (p/v). Tras centrifugar 10.000 *g*, 10 min, 50 µl del sobrenadante se incubaron con 950 µl HEPES y 1 µl DAF durante 1 h a 37°C. Posteriormente, el homogenado se diluyó 5 veces en el tampón HEPES. Las medidas de fluorescencia se hicieron en un fluorímetro Rf-5301 PC (Shimadzu) a 495 nm de excitación y 515 nm de emisión frente a un blanco de tampón HEPES y DAF.

Para la determinación de NO en semillas de *A. thaliana*, 50-100 mg de semillas se homogenizaron en “mikro dismembrator” 1 min, 1500 rpm y se le añadió 1 ml de tampón tampón fosfato potásico 50 mM, pH 7 y una mezcla de inhibidores de proteasas 25x (Roche™). Posteriormente, se separaban 100 µl y se incubaban en 900 µl HEPES con 1 µl de DAF durante 1 h a 37°C. Las medidas en el fluorímetro se hicieron sin diluir este extracto, en las mismas condiciones que las comentadas anteriormente.

## 7. Análisis bioinformático

### 7.1. Diseño de oligonucleótidos

El diseño de cebadores varía según la secuencia a amplificar y el material de partida, así para el genotipado de las líneas mutantes se tuvo en cuenta la localización de la inserción en el gen y se diseñaron un par de cebadores que flanquearon el inserto tomando como molde el ADN genómico. El diseño de cebadores para la PCR semicuantitativa se hizo atendiendo a dos regiones que flanqueaban el inserto sobre ADNc molde, teniendo en cuenta que los

cebadores hibridaran sobre regiones exónicas y el tamaño del amplicón no superara los 300 pares de bases (pb).

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se encuentran en la Tabla S1.

Para el diseño de cebadores se utilizaron las siguientes web:

- T-DNA Express primer design: <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>
- NetPrimer Biosoft; [www.premierbiosoft.com/netprimer](http://www.premierbiosoft.com/netprimer)
- Primer3plus; [www.bioinformatics.nl/primer3plus/](http://www.bioinformatics.nl/primer3plus/)
- Cuando fue necesario un diseño manual, nos ayudamos del programa Tm calculador Applied Biosystem; <http://www6.appliedbiosystems.com/support/techtools/calc/> y blast: <https://www.arabidopsis.org/Blast/>

## 7.2. Dendrograma y sombreado filogenético

Todas las secuencias proteicas y genómicas de la familia Brassicaceae y Leguminosae utilizadas en este trabajo, se obtuvieron de la base de datos v8.0 Phytozome (Goodstein y col., 2012; <http://www.phytozome.net>). Los posibles genes ortólogos de *Trxo1* y *Trxo2* fueron seleccionados a través de la herramienta TBLASTN de la base de datos mencionada. Las secuencias de aminoácidos deducidas y completas de los 13 posibles genes ortólogos de *Trxo1* y *Trxo2* de las cinco especies de Brassicaceae y tres de Leguminosae se alinearon por el programa CLUSTAL W (Thompson y col. 1994) y posteriormente se utilizaron para hacer un árbol filogenético con el programa MEGA software, version 4.0 (Tamura et al. 2007), utilizando como ajustes el algoritmo de Neighbour-joining que asume una tasa de evolución constante y la ausencia de enraizamiento, un análisis de remuestreo (bootstrap) con 1000 réplicas y el uso de la matriz Jones–Taylor–Thornton.

La identificación de dominios proteicos conservados en las secuencias proteicas deducidas de los ortólogos seleccionados se establecieron a través del programa MEME, (<http://www.meme.sdsc.edu/meme/meme.html>), como describe Bailey y col. (2006), seleccionando un número máximo de 15 motivos identificados con un mínimo de 8 residuos

aminoacídicos. Las secuencias consenso establecidas seguían el criterio descrito por Joshi y col. (1997).

Las secuencias promotoras de los ortólogos de *Trxo1* y *Trxo2* seleccionadas se analizaron con el programa mVISTA Shuffle-LAGAN que se utilizó para crear alineamientos de pares de bases de estos promotores (Frazer y col., 2004); <http://Genoma.lbl.gov/vista>) y discernir las zonas de ADN conservadas por el método de sombra filogenética. Para ello, se establecieron como parámetros de ajuste, un porcentaje de homología mayor del 70% con una ventana deslizante de 50pb. Las secuencias de regiones conservadas dentro de los promotores se analizaron con T-Coffee (Notredame y col., 2000; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee>), mientras que los elementos *cis*- se identificaron en las siguientes bases de datos: MotifFinder (<http://www.genome.jp/tools/motif>) y PlantCare (Lescot y col., 2002; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/WebTools/plantcare/html>). Los análisis de expresión de transcritos de genes de *A. thaliana* en distintos órganos y tejidos en desarrollo se realizaron en la web Arabidopsis EFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Winter y col., 2007).

## 8. Tratamiento Estadístico

Los datos se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA) para un factor utilizando el test de normalidad Tukey que apoya la presencia de diferencias significativas para un valor de probabilidad  $p < 0,05$ . Para ello, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for Social Sciences, 2011).

Este análisis se realizó para distintos grupos de datos y en ellos se tuvo en consideración el tiempo de tratamiento, el tipo de tratamiento y las características genotípicas de las líneas. De esta forma, el primer análisis nos permitió comparar las líneas en el tiempo según su tratamiento, destacando las diferencias que surgen entre genotipos. Así, la comparación de los distintos parámetros en condiciones de no tratamiento a lo largo del tiempo, se representó en letras mayúsculas, mientras que de la misma forma, la comparativa entre los tratados se representó en letras minúsculas. El segundo análisis nos permitió destacar las diferencias surgidas como consecuencia del tratamiento al comparar, en cada genotipo y en

cada tiempo su control con su tratado. Esta comparativa se representó con asteriscos cuya significación representaba: (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

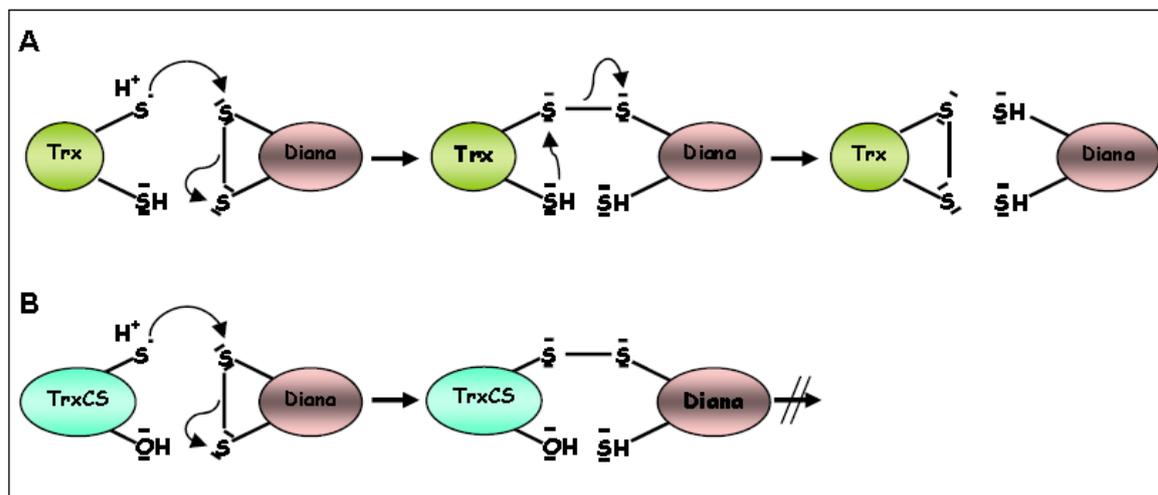


# **RESULTADOS**



## 1. Proteínas nucleares diana de Tiorredoxina o1 de *Pisum sativum*

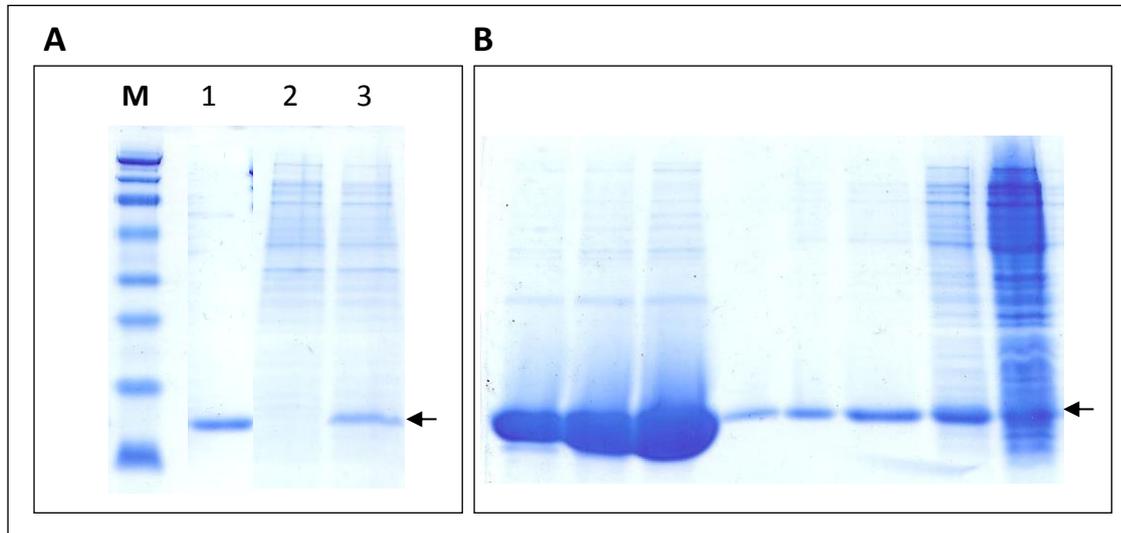
Con el objetivo de identificar las proteínas nucleares que podrían estar siendo reguladas por PsTrxo1 *in vivo*, se empleó la metodología descrita por Pérez-Pérez y col. (2006) que está basada en el mecanismo de reacción del intercambio tiol/disulfuro característico de Trxs. Debido a que las dos cisteínas del centro activo de las Trxs no son equivalentes, la cisteína más reactiva (normalmente la más cercana al extremo N-terminal) realiza un ataque nucleofílico sobre la cisteína de la proteína diana oxidada formando un complejo heterodisulfuro que es resuelto mediante el ataque de la segunda cisteína del centro activo de la Trx, separándose así la Trx oxidada de la proteína diana reducida (Fig. 19).



**Figura 19: Mecanismo enzimático de oxidoreducción de Trx sobre una proteína diana (A) Mecanismo de acción de las Trxs, (B) Mecanismo de acción de las TrxsCS (Trx donde la segunda cisteína del centro activo ha sido sustituida por una serina).**

En la técnica empleada en este trabajo de Tesis, se ha utilizado la Trxo1 de guisante mutada en la cisteína menos reactiva de su centro activo (Cys-37) que fue reemplazada por una serina (S). De esta forma, el complejo heterodisulfuro se estabiliza y la proteína diana queda atrapada, siendo liberada más tarde para su identificación. Esta Trxo1 recombinante fue clonada en un vector (pET15b) que presentaba una cola de histidinas y un promotor inducible por IPTG. Estos elementos permitieron la expresión inducida de la proteína en los clones bacterianos de *E. coli* (cepa BL21) y la producción de una proteína recombinante con la cola de histidinas en su extremo N-terminal lo que permitía su purificación por

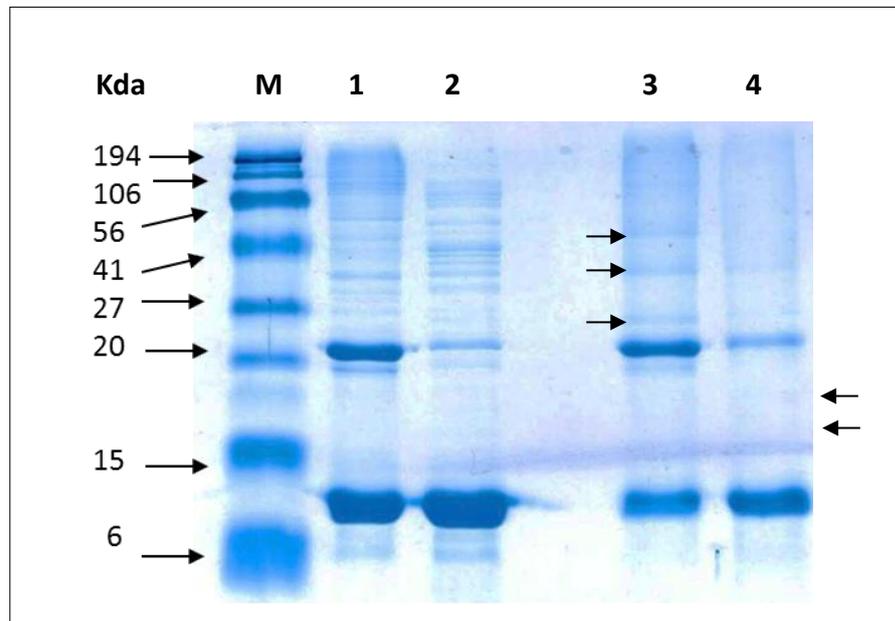
cromatografía de afinidad (ver Materiales y Métodos, sección 5.6). El resultado de la expresión y de la posterior purificación de la proteína recombinante se muestra en la Figura 20.



**Figura 20: SDS-PAGE realizada para analizar la expresión (A) y la purificación (B) de la proteína recombinante His-PsTrx01C37S. (A)** Bacterias BL21 transformadas con la construcción pET15b-His(n)-PsTrx01C37S **(1A)** Trx recombinante, **(2A)** antes de la inducción con IPTG y **(3A)** tras 4 h con IPTG para expresar la proteína. **(1-2B)**, sobrenadante obtenido tras la ruptura con alúmina y posterior centrifugación, de los cultivos bacterianos que expresaban HisPsTrx01C37S, **(1B)** antes de la adición de la resina y **(2B)** tras la incubación a 4 °C durante 16 h con la resina. **(3-5B)** eluidos resultantes de los tres lavados consecutivos de la resina tras la fijación a la misma de HisPsTrx01C37S **(6-8B)**, proteína HisPsTrx01C37S purificada obtenida de la resina tras sucesivos lavados para liberar la Trx recombinante. M: marcador de tamaño molecular. Todas las muestras se analizaron en condiciones reductoras en presencia de 10 mM DTT. La flecha señala a la proteína HisPsTrx01C37S.

A continuación, tal y como aparece descrito en la sección 5.2 de Materiales y Métodos, la proteína recombinante se fijó a la resina de afinidad donde se puso en contacto con las proteínas nucleares previamente obtenidas. Una vez que los complejos His(n)-PsTrx01C37S-proteína diana se formaron, se eluyeron y se separaron las proteínas diana de la proteína recombinante mediante SDS-PAGE en 1D en condiciones reductoras y SDS-PAGE en 2D en condiciones no reductoras/reductoras. Posteriormente, la identificación de las mismas se hizo mediante espectrometría de masas.

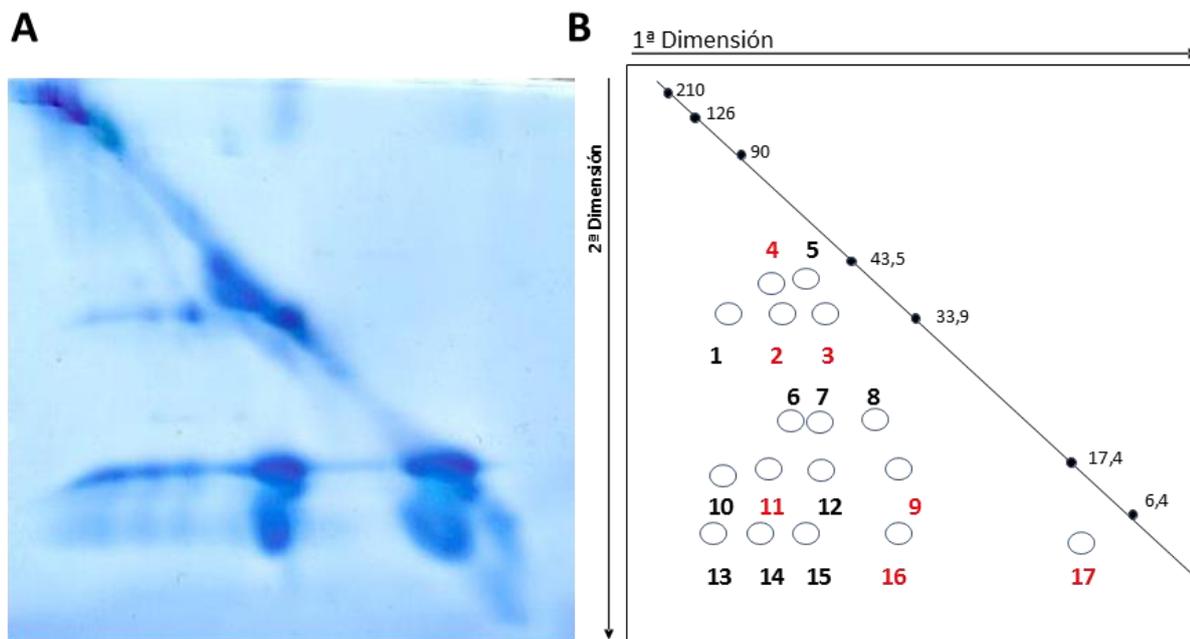
En la Figura 21 se muestra el resultado de los experimentos de SDS-PAGE en 1D en condiciones no reductoras (sin DTT) y reductoras (con DTT). En este último caso, los puentes disulfuro entre la Trxo1 y las dianas se rompen, migrando éstas en el gel hasta una posición que se corresponde con el de su masa molecular.



**Figura 21: Perfil de proteínas de los complejos HisPsTrxo1C37S-proteína diana obtenidos mediante SDS-PAGE en 1D en condiciones no reductoras (calle 3) y reductoras (calle 4).** Las proteínas diana secuenciadas se indican con una flecha negra. En la calle M se encuentra el marcador de peso molecular (M), en las calles 1 y 2 la Trx recombinante sin y con DTT, respectivamente.

Debido a que la SDS-PAGE en 1D en condiciones reductoras no resuelve completamente al encontrarse en una banda más de una proteína, se realizó también la identificación de las distintas dianas empleando SDS-PAGE en 2D en condiciones no reductoras/reductoras. En la Figura 22A, se observa el gel teñido con Coomassie de las posibles proteínas diana de PsTrxo1 y en la Figura 22B se observan las manchas de proteína que fueron secuenciadas. La diagonal del gel viene dada por el marcador de tamaño molecular, cuyas proteínas migran igual en condiciones no reductoras y reductoras y por debajo de ella, aparecen todas las proteínas diana de la Trx. Esto último se debe, a que en condiciones no reductoras dichas proteínas migran con un tamaño molecular superior al que le corresponde debido a la unión covalente con una o varias moléculas de His(n)-PsTrxo1C37S y/o a una estructura

oligomérica de las proteínas diana mediada por enlaces disulfuro intermoleculares, los cuales se rompen al llevar a cabo la segunda dimensión en condiciones reductoras, quedando las proteínas localizadas en el gel por debajo de la diagonal, en la zona que se corresponde con su tamaño molecular.



**Figura 22: Perfil de proteínas de los complejos His(n)-PsTrxo1C37S-proteína diana obtenidos mediante SDS PAGE en 2D en condiciones no reductoras/reductoras. (A)** Imagen del gel obtenido teñido con Blue Page<sup>R</sup>. **(B)** Composición de las proteínas identificadas en el gel A, donde **○** representa la localización aproximada de la proteína y **1,2,...** el número con el que se relaciona cada mancha con la proteína obtenida recogida en la Tabla 13.

Las principales manchas proteicas seleccionadas en el gel de la Figura 22 se secuenciaron por espectrometría de masas tal y como se comenta en la sección 5.8 de Materiales y Métodos. De esta forma, de entre las diferentes proteínas secuenciadas, se identificaron dos proteínas diana nucleares, concretamente: el antígeno de proliferación nuclear (PCNA) y un modulador del receptor de ABA nuclear (Pyr1) (Tabla 13). Además de estas posibles dianas nucleares se identificaron proteínas contaminantes procedentes de otras organelas como cloroplastos, mitocondrias o citoplasma (Tabla 14).

**Tabla 13: Proteínas diana de PsTrxo1 identificadas en núcleos de guisante mediante cromatografía de afinidad.**Abreviaturas: **PCNA***(Proliferating Cell Nuclear Antigen), Antígeno nuclear de proliferación celular, PYR1: componente regulador del receptor nuclear 11 de ABA.*

Nº gel	Secuencia	Proteína	Especie	parámetros BLAST <sup>a</sup>		Nº acceso <sup>d</sup>	Localización
				Score <sup>b</sup>	e-value <sup>c</sup>		
1, 8, 13, 14, 15	VAEMGYIRYYLAPK	<b>PCNA</b>	<i>Pisum sativum</i>	49	5x10 <sup>-4</sup>	O82134	Núcleo
1, 8, 14, 15	NLSMGMNLGNMSKMLK			58	8x10 <sup>-7</sup>		
5, 8, 13, 14, 15	YMNSFTKATPLSETVTISLSSELPVVVEYK			91	8x10 <sup>-17</sup>		
13, 14	LNLQKLATVAEAMAR	<b>PYR1</b>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	56	4x10 <sup>-6</sup>	O49686	Núcleo
13, 15	VGCTRDVIVISGLPANTSTER			75	1x10 <sup>-12</sup>		

<sup>a</sup>**BLAST**: Basic Local Alignment Search Tool, <sup>b</sup>**Score**: puntuación de homología con la secuencia problema, depende de la longitud de la secuencia problema, probabilidad de homología, cuanto menor es este valor, mayor es la homología esperada, <sup>d</sup>**Número de acceso** en Expasy <http://web.expasy.org/blast/>

<sup>c</sup>**e-value**:

Tabla 14: Contaminantes obtenidos en el ensayo de identificación de proteínas diana de PsTrxo1 por cromatografía de afinidad.

Abreviaturas:

**AtGlyR**, Glioxilato/succinil semialdehído reductasa 1; **AKr4C8**, miembro c8 de la familia 4 Aldo-ceto reductasa; **Pin1at**, Peptidil-prolil cis-trans isomerasa Pin1;**OEE**, Proteína promotora de evolución del oxígeno; **Trx-Prx**, peroxidasa dependiente de tiorredoxina.

Nº gel	Secuencia	Proteína	Especie	parámetros BLAST		Nº acceso <sup>c</sup>	Localización
				Score <sup>a</sup>	e-value <sup>b</sup>		
1, 5, 6, 8, 13, 14, 15	GGVLEQICEGK	AtGlyR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	43	3,1x10 <sup>-3</sup>	Q9LSV0	Citoplasma
8	SFYLGQVGNGAK			48	1x10 <sup>-3</sup>		Mitocondria
13, 14, 15	GSHMMEVGFLGLGIMGK			48	1x10 <sup>-3</sup>		
8	SSYPPAFPLKHQQK			55	8x10 <sup>-6</sup>		
1, 5, 6, 8, 13, 14, 16	CDELVEHGASVCESPAEVIK			73	3x10 <sup>-11</sup>		
5	SGLSSDTLLDILDGAMTNPMFK			37	24x10 <sup>-1</sup>		
13, 14	LALALGDENAVSMPVAAAANEAFKK			52	5x10 <sup>-5</sup>		
5, 6, 8, 13, 14, 16	MKLIVNMIMGSMNFAFSEGLVLADK			92	5x10 <sup>-7</sup>		
13, 14	GVHLSGYSPGQSQSK	AKr4c8	<i>Arabidopsis thaliana</i>	53	3x10 <sup>-5</sup>	O80944	Citoplasma
13, 10	WGLQTGHSVLPKSSSGAR			64	1x10 <sup>-8</sup>		
13, 15, 10	GVHLSGYSPGQSQSKGEVR			66	4x10 <sup>-9</sup>		
10, 13	TTAQVALRWGLQTGHSVLPK			71	1x10 <sup>-10</sup>		
13, 14, 15	EELFITSKLWSNDHLPEDVPK			79	6x10 <sup>-13</sup>		
6	VSDCSSAKR	Pin1at	<i>Arabidopsis thaliana</i>	36	34x10 <sup>-1</sup>	Q9SL42	Citoplasma,
6	EDIVSGKANFEEVATR			59	4x10 <sup>-7</sup>		RE, membrana

Tabla 14 (continuación).

Nº gel	Secuencia	Proteína	Especie	parámetros BLAST		Nº acceso <sup>c</sup>	Localización
				Score <sup>a</sup>	e-value <sup>b</sup>		
5	VPFLFTIK	OEE	<i>Pisum sativum</i>	36	34x10 <sup>-1</sup>	P14226	Cloroplasto
5	TPLAFQNTK			41	13x10 <sup>-2</sup>		
5	RLTFDEIQSK			41	10x10 <sup>-2</sup>		
5	GASTGYDNAVALPAGGR			59	6x10 <sup>-7</sup>		
5	DGIDYAAVTVQLPgger			62	7x10 <sup>-8</sup>		
5	LTYTLDEIEGPFVSADGSVK			76	4x10 <sup>-12</sup>		
5	QLVASGKPDSEFSGEFLVPSYR			74	2x10 <sup>-11</sup>		
5	FEEKDGIDYAAVTVQLPgger			75	6x10 <sup>-12</sup>		
5	GTGTANQCPTIDGGVDSFSFKPGK			84	1x10 <sup>-14</sup>		
5	ITLSVTQTKPETGEVIGVFESIQPSDTDLGAK			106	2x10 <sup>-21</sup>		
8	EWGVPGDFFGSLPGR	Trx-Prx	<i>Medicago truncatula</i>	58	8x10 <sup>-7</sup>	G7JS60	Cloroplasto
8	YKLPFTLLSDEGNK			54	2x10 <sup>-5</sup>		
8	NGVVQLVYNNQFQPEK			63	4x10 <sup>-8</sup>		
8	GKPVVVYFYPADETPGCTK			71	8x10 <sup>-11</sup>		
8	ETYVLDKNGVVQLVYNNQFQPEK			86	4x10 <sup>-15</sup>		

**BLAST:** Basic Local Alignment Search Tool, <sup>b</sup>**Score:** puntuación de homología con la secuencia problema, depende de la longitud de la secuencia problema, probabilidad de homología, cuanto menor es este valor, mayor es la homología esperada, <sup>d</sup>**Número de acceso** en Expsy <http://web.expasy.org/blast/>

<sup>c</sup>**e-value:**



## 2. Estudio del papel de *AtTrxo1* durante la germinación

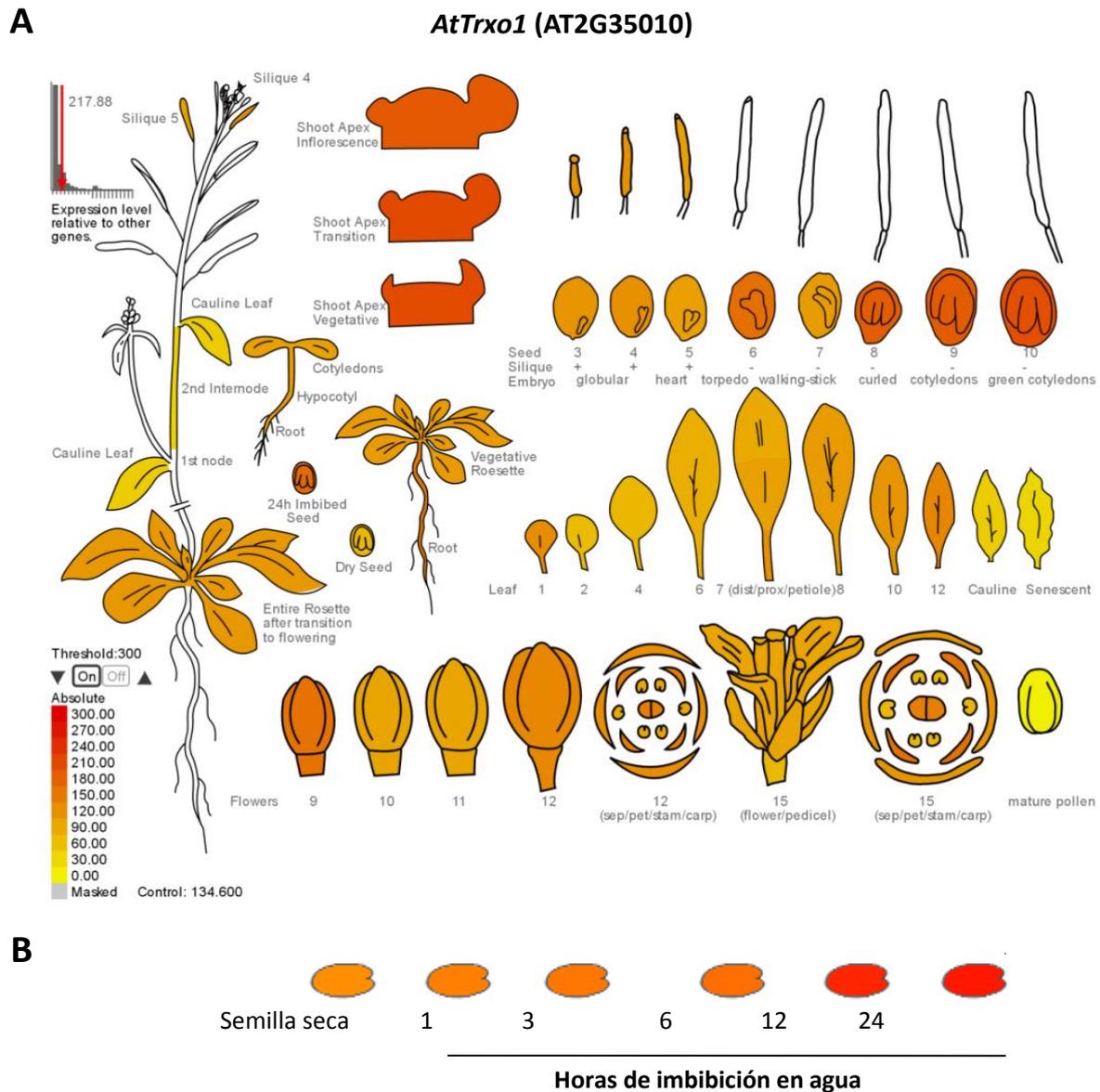
### 2.1. Análisis global de la expresión de *AtTrxo1* en distintos órganos de *A. thaliana*

La expresión génica en los organismos está regulada por programas transcripcionales que guían el desarrollo de los diferentes órganos y tejidos o la respuesta de la planta a distintos estímulos ambientales. A fin de investigar los procesos en los que podría estar interviniendo la proteína *Trxo1*, realizamos un análisis de su expresión global en distintos órganos de *Arabidopsis* tanto mediante búsquedas *in silico* en bases de datos de libre acceso de expresión génica (Chips de ADN, *microarrays*) presentes en la web, como mediante análisis de expresión por PCR cuantitativa (RTqPCR) o ensayos de expresión estable con líneas homocigóticas para el promotor de la *Trxo1* (*pAtTrxo1*) fusionado al gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS).

#### 2.1.1. Estudios de expresión *in silico*

La secuenciación del genoma completo de *Arabidopsis* en el año 2000 permitió realizar numerosos avances en el campo de la genética. Además, la construcción de matrices o chips de ADN (en inglés, *microarray*) con capacidad para monitorear la expresión diferencial de miles de genes de forma simultánea, permitió un estudio rápido y eficaz de cómo diferentes procesos están dirigidos en la célula vegetal. Existen bases de datos de libre acceso en la web que nos permiten localizar rápidamente la expresión de un gen en un determinado tejido, órgano e incluso durante un proceso fisiológico o en respuesta a un estrés concreto basándose en resultados obtenidos en estas matrices. Dado que un aumento de expresión suele estar asociado a un papel del gen en ese órgano, tejido o situación, estas bases de datos constituyen una aproximación a la posible funcionalidad de la proteína. La base de datos de *microarrays* para *Arabidopsis* “*Arabidopsis* eFP browser” nos permitió hacer una aproximación a los principales lugares de expresión del gen *AtTrxo1*. Este gen, descrito en *Arabidopsis* como codificante para una *Trx* o mitocondrial (Laloi y *col.*, 2001), se expresó en diferentes órganos con intensidades similares en flores, raíces y hojas, destacando una expresión especialmente elevada en

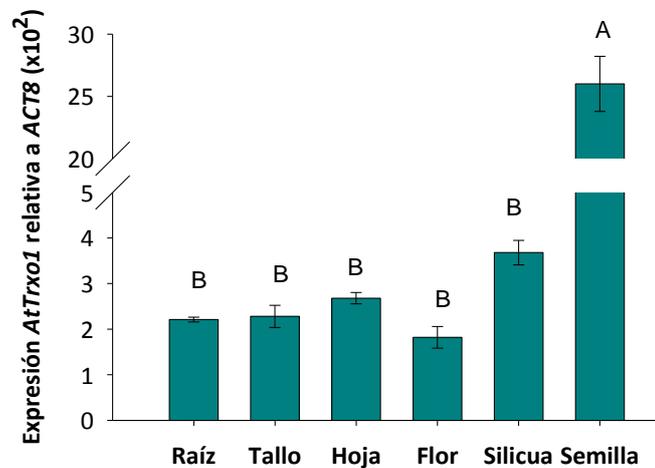
semilla en desarrollo (estadios 6, 8, 9 y 10) y en semilla embebida de 24 horas (Fig. 23A y B). Por otro lado, también se observó una expresión elevada en el ápice caulinar (Fig. 23A), sugiriendo la previsible importancia de la *Trxo1* tanto en la germinación como en el crecimiento longitudinal de la planta.



**Figura 23: Representación pictográfica de la expresión de transcritos de *AtTrxo1* obtenidos de bases de datos de expresión génica. (A) Expresión en distintos órganos de Arabidopsis. (B) Expresión en semillas almacenadas durante dos meses en condiciones controladas de temperatura y humedad (*after-ripening*), no estratificadas a distintas horas tras la imbibición en agua. La intensidad de la señal se muestra por un código de colores de mayor expresión (rojo) a menor expresión (amarillo).**

### 2.1.2. Estudios de expresión por RTqPCR y ensayos de expresión estable

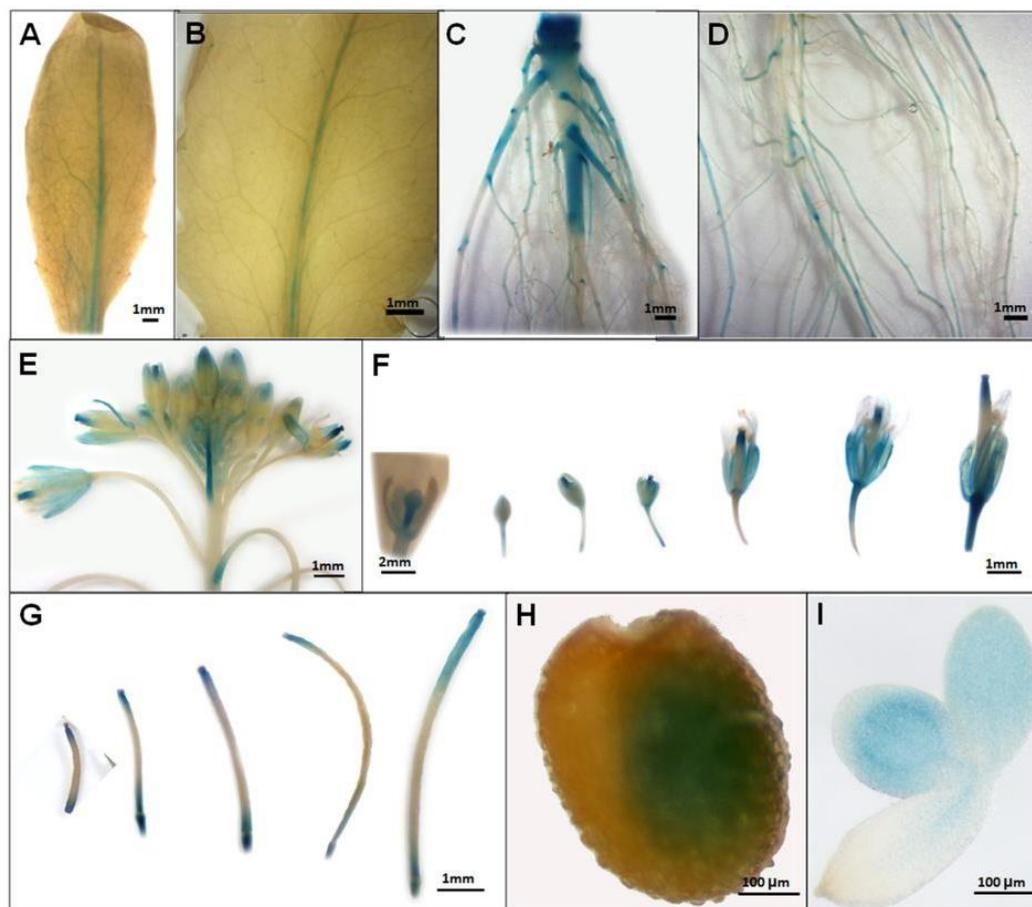
A pesar de los datos seleccionados anteriormente, la expresión en chips de ADN puede no corresponderse muchas veces con datos de expresión por otras técnicas como RTqPCR, debido a hibridaciones inespecíficas o cruzadas que podrían no ser consideradas en la normalización y generar falsos positivos. Con el objeto de validar los datos de expresión génica de *AtTrxo1*, localizados en las bases de datos de *microarrays*, analizamos la expresión relativa de este gen mediante PCR cuantitativa, usando el gen constitutivo de referencia o normalizador Actina 8 (*ACT8*: AT1G49240) (Graeber y col., 2011). En este estudio encontramos que la expresión de *AtTrxo1* estaba ubicuamente localizada en raíces, hojas basales, tallos, flores y frutos de *Arabidopsis* expresándose de forma similar en estos órganos. Sin embargo, destacó una expresión particularmente alta en semilla embebida de 24 h, que resultó ser de un orden de magnitud superior al resto de órganos (Fig. 24), por lo que estos resultados confirmaron la expresión observada en los chips del *eFP browser*.



**Figura 24: Expresión del gen *AtTrxo1* en distintos órganos de *Arabidopsis*.** Los niveles de transcritos se estandarizaron con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican las diferencias significativas entre las medias de los distintos datos para un  $p<0,05$  (Test de Tukey).

Los análisis de expresión por RTqPCR se complementaron con los ensayos de expresión estable. Estos ensayos consistían en la medida cualitativa de la actividad  $\beta$ -

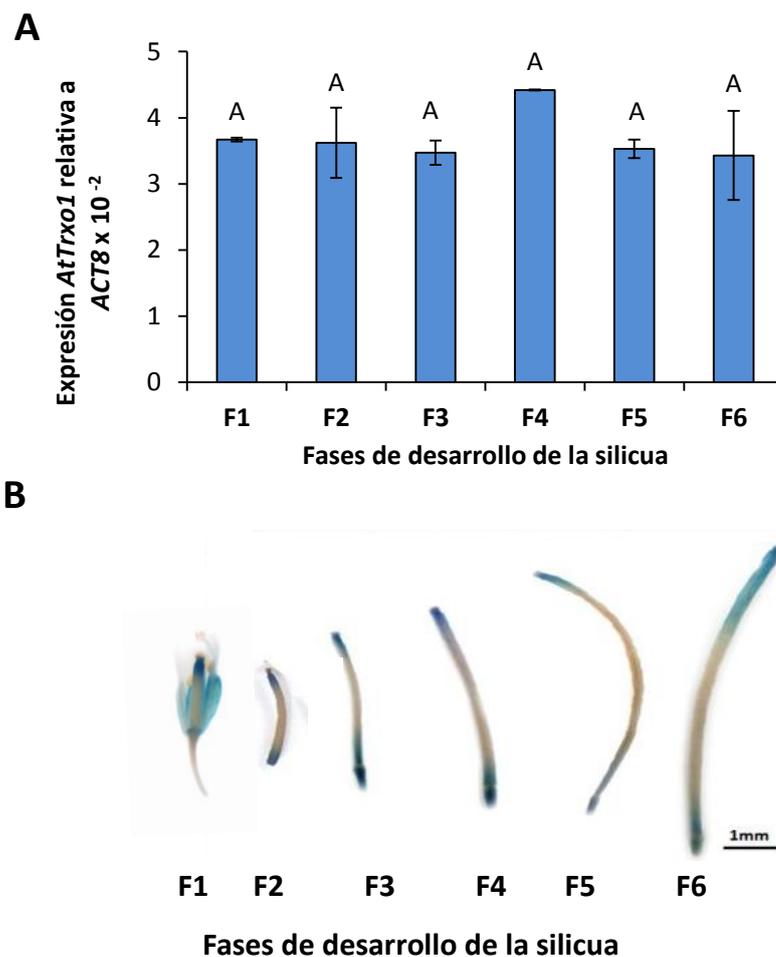
glucuronidasa en plantas homocigóticas para el transgén *pAtTrxo1::uidA*, formado por la fusión transcripcional de la región promotora de *AtTrxo1* y del gen delator *uidA*. Este gen delator codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa, que es capaz de hidrolizar el sustrato X-Gluc y generar un precipitado azul. Este ensayo permitió localizar la expresión de *AtTrxo1* en diversos órganos vegetales como: el nervio central de las hojas (Fig. 25A-B), los tallos y raíces jóvenes (Fig. 25C, D), la flor, concretamente el pedúnculo, los sépalos, los pétalos, la parte más distal del estilo en el carpelo y el filamento de los estambres (Fig. 25E-F). También se encontró expresión en la parte más basal y distal de la silicua (Fig.25G) y en el embrión de la semilla, específicamente en los cotiledones (Fig. 25H-I).



**Figura 25: Análisis de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en líneas transgénicas de *Arabidopsis* para la construcción *pAtTrxo1-1::uidA*. (A) Hojas basales. (B) Hojas caulinares. (C-D) Sistema radicular. (E) Inflorescencia. (F) Estádios en el desarrollo de la flor desde el primordio floral (izquierda) hasta la formación del fruto (derecha). (G) Etapas en el desarrollo de la silicua, de izquierda a derecha: fase 2, 3, 4, 5 y 6. (H) Semilla 24h tras la imbibición en agua. (I) Plántula extraída de semilla de 24h de imbibición.**

## 2.2. Análisis global de la expresión de *AtTrxo1* durante la maduración de la silicua y la germinación de la semilla.

Los niveles de expresión de *AtTrxo1* durante el desarrollo de la silicua fueron elevados (de 3,5 a 4,5 el nivel de expresión relativa frente a *ACT8*), pero se mantuvieron generalmente estables a lo largo de los estadios de desarrollo analizados, con un ligero incremento en la fase 4 de maduración (Fig. 26).

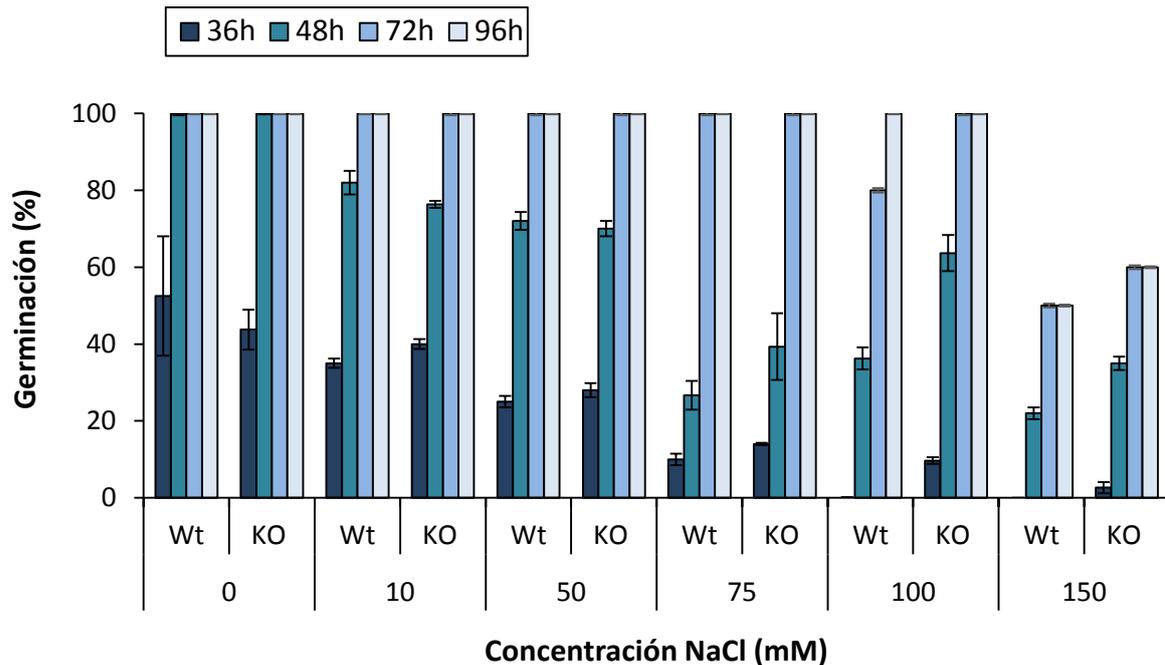


**Figura 26: Perfil de expresión del gen *AtTrxo1* durante la maduración de la silicua.** Las silicuas se recogieron a diferentes tiempos después de la polinización (ddp); 2, 4, 6, 8, 10 y 12 ddp, correspondientes a las fases 1, 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente. **(A)** Expresión por RTqPCR relativizada a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar (n=3). Análisis estadístico ver Fig. 2. **(B)** Determinación histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa durante el desarrollo de la silicua en líneas transgénicas homocigóticas para la construcción *pAtTrxo1::uidA*.

La respuesta de la Trxo1 durante el estrés salino ha sido descrita por nuestro grupo en *Pisum sativum*, donde se ha sugerido que esta proteína podría favorecer la tolerancia a la salinidad en plantas de guisante mediante la regulación redox de sus proteínas diana, incluyendo ciertas enzimas antioxidantes en la mitocondria. Debido a estos antecedentes, decidimos plantear la influencia de la salinidad en el proceso fisiológico de la germinación y analizar la expresión y el comportamiento de Trxo1 tanto en condiciones control como en condiciones salinas. Para ello, utilizamos un mutante KO *AtTrxo1* con el objeto de discriminar el efecto de la ausencia de la proteína en el desarrollo de la germinación en ambas condiciones, control y salinas, tal y como analizaremos en el apartado 2.3.

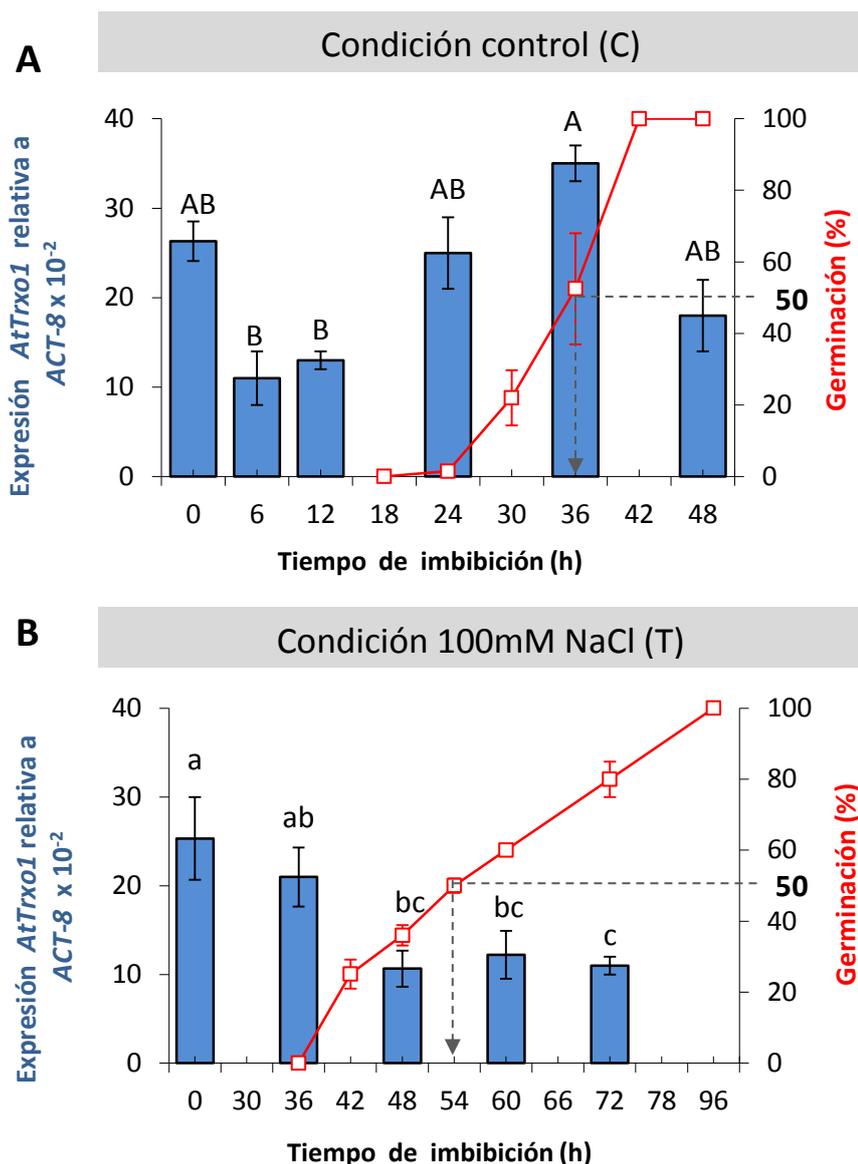
La primera aproximación consistió en seleccionar una concentración de NaCl que retrasara la germinación pero que no mermara el porcentaje final de semillas germinadas. Mientras que una concentración 50 mM no generó diferencias importantes respecto a la condición control en la tasa germinativa, 150 mM disminuyó el porcentaje final de germinación al 50 %. A una concentración 100 mM de NaCl se produjo un retraso importante en la germinación sin que esto afectara al porcentaje final de semillas germinadas y por tanto, esta concentración se seleccionó para la realización de los ensayos posteriores (Fig. 27).

Es bien sabido que la condición de salinidad produce diferentes respuestas en la planta como consecuencia de su efecto osmótico e iónico. A fin de discriminar si el retraso en la germinación fue consecuencia del efecto osmótico y/o iónico de la sal se utilizó una sustancia conocida por su efecto osmótico, el polietilenglicol (PEG). Un 10% de PEG era equivalente al potencial osmótico de 100 mM de NaCl. Cuando las semillas silvestres secas, maduras y no durmientes se embebieron en 10 % de PEG, el 100 % de semillas ya habían germinado a las 48 h, mientras que solo el 36 % lo hicieron en 100 mM de NaCl, justificando este comportamiento que el efecto iónico y tóxico del  $\text{Na}^+$  y/o  $\text{Cl}^-$  era predominante frente al efecto osmótico en el retraso observado en la germinación de estas semillas.



**Figura 27:** Medida del porcentaje de germinación a las 36, 48, 72 y 96 h de imbibición a distintas concentraciones de NaCl en la línea silvestre (Wt) y el mutante KO *AtTrxo1* (KO). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar (n=3).

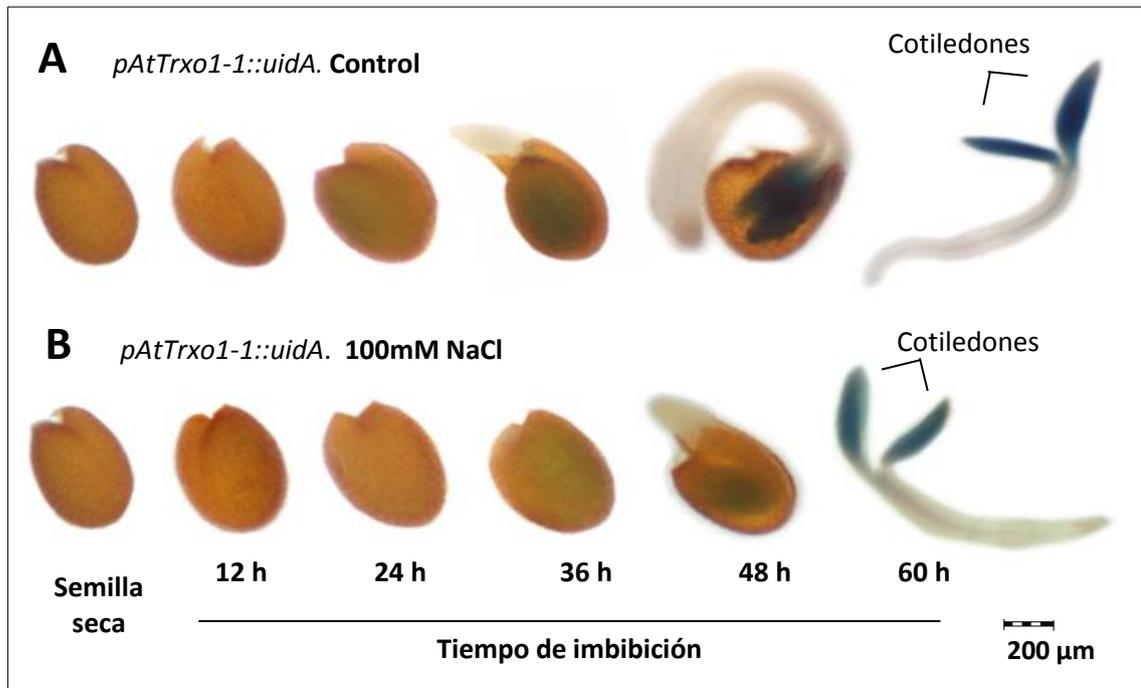
Tal y como muestra la Fig. 28A, la germinación de semillas Wt de *Arabidopsis* en agua se desarrolló durante 48h, alcanzando un 50% de germinación ( $t_{50}$ ) a las 36 h de la imbibición (Fig. 28A). En una concentración 100 mM de NaCl, las semillas embebidas tardaron unas 18 h más que en condiciones control en alcanzar el  $t_{50}$  y el proceso de germinación concluyó dos días más tarde (Fig. 28B). Adicionalmente, en condiciones control, la expresión relativa de *AtTrxo1* en semilla seca madura fue dos veces superior a la presentada en semillas embebidas de 6 h. La expresión de *AtTrxo1* durante la imbibición aumentó de forma paralela al porcentaje de germinación hasta alcanzar un máximo de expresión en el  $t_{50}$  (36 h). Este pico de expresión fue significativamente mayor al observado en las primeras horas de imbibición, pero no significativamente distinto del observado en semilla seca (Fig. 28A). En condiciones salinas, la expresión relativa de *AtTrxo1* aumentó en las primeras horas de la germinación, tras 36 h de imbibición, para disminuir y mantenerse estable en tiempos posteriores. Tanto en condiciones control como salinas, en el comienzo de la germinación, a las 24 h y 36 h respectivamente se observó una elevada expresión de Trxo1.



**Figura 28:** Perfil de expresión por RtgPCR del gen *AtTrxo1* durante la germinación de la semilla (eje ordenadas izquierdo) y porcentaje de germinación (eje ordenadas derecho) en condiciones control (A) y salinas (B). Las semillas fueron recogidas a diferentes tiempos de imbibición 6, 12, 24, 36, 48, 60 y 72h. Los niveles de transcritos se estandarizaron con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar. Letras indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en C (mayúsculas) y T (minúsculas). La flecha de puntos indica el tiempo de imbibición necesario para alcanzar el 50% de germinación ( $t_{50}$ ).

Por otro lado, los análisis de expresión estable mostraron también un aumento de la actividad GUS en el embrión de la semilla paralelo al tiempo de imbibición (Fig. 29), observándose una alta expresión GUS en los cotiledones tras 48 h y 60 h de imbibición.

Además, en general, los niveles de expresión de *AtTrxo1* analizados tanto por RTqPCR como por expresión estable durante el proceso de germinación fueron superiores en condiciones control que en condiciones salinas (Fig. 28 y 29).



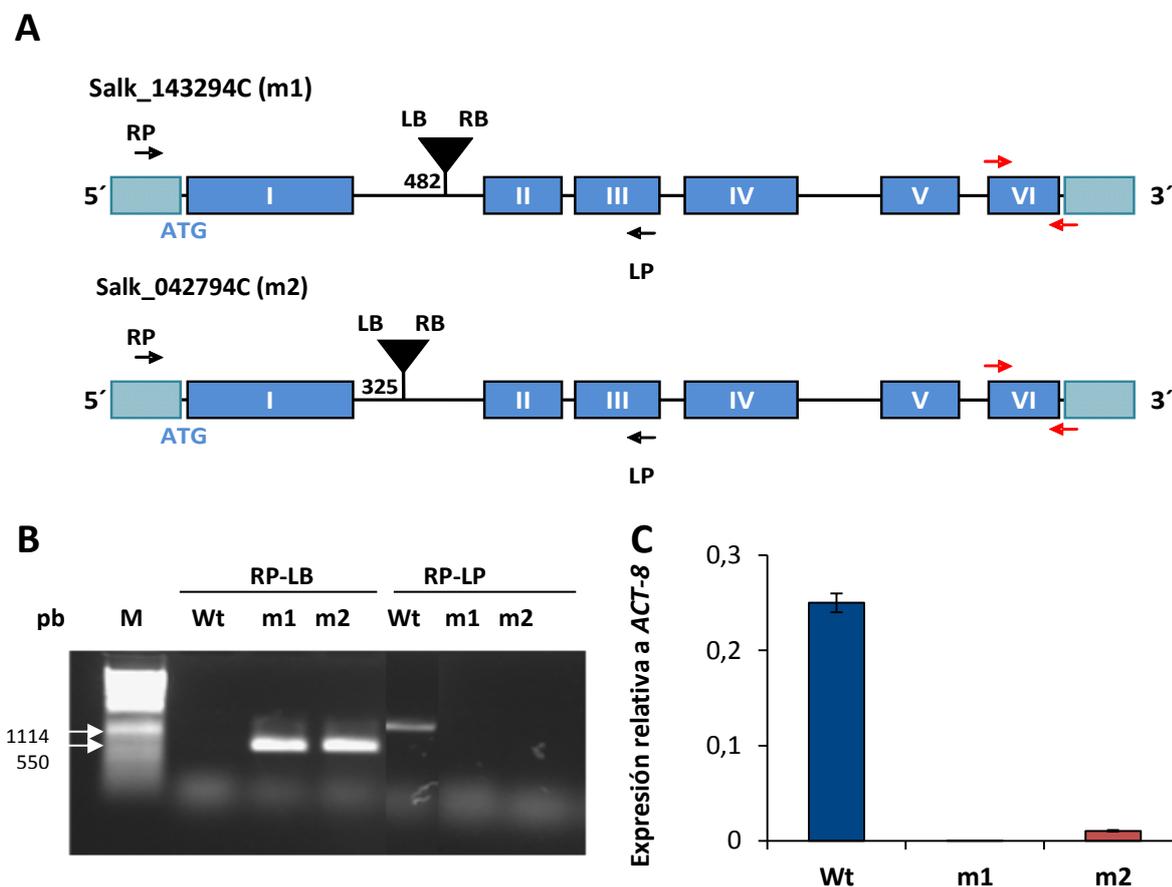
**Figura 29: Determinación histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa en semillas homocigóticas para la construcción *pAtTrxo1::uidA* en distintos tiempos de imbibición en agua (A) y en 100mM NaCl (B).**

## 2.3. Estudio de la germinación en semillas de *Arabidopsis* Wt y KO *AtTrxo1* en condiciones control y salinas.

### 2.3.1. Caracterización de líneas mutantes

Dos líneas knock-out (KO) para el gen *AtTrxo1* (SALK\_143294C y SALK\_042794), llamadas mutante 1 (m1) y mutante 2 (m2) respectivamente y procedentes del banco de semillas uNASC (European *Arabidopsis* Stock Centre) se genotiparon con el fin de comprobar la presencia, así como la homocigosis de la inserción. Tal y como se observa en la Figura 30A, el análisis genómico de los mutantes obtenido de la base de datos *T-DNA express* (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) mostró la posición del T-DNA (triángulo invertido) en el intrón uno del gen *AtTrxo1*, sin embargo, la posición de la inserción en este intrón variaba entre ambas líneas mutantes. En el m1, el T-DNA se encontraba entre los 482

y 507 pares de bases (pb) aguas abajo del codón ATG, con una delección de 80 nucleótidos, mientras que en el m2 ésta inserción se encontraba localizada entre los 325 y 452 pb con una delección de 127 nucleótidos (Fig. 30).



**Figura 30: Caracterización de líneas mutantes KO *AtTrxo1*.** (A) Esquema de la estructura intrón-exón de los mutantes SALK\_143294C y SALK\_042794. Los cuadros azules representan los exones y en números romanos el número del exón con respecto al ATG. Las líneas representan los intrones, los cuadros rayados son las regiones UTRs. Con un triángulo invertido se representa la localización de la inserción con el extremo izquierdo: *left border* (LB) y extremo derecho: *right border* (RB). Las flechas negras representan los primers LP (*Left Primer*) y RP (*Right Primer*), mientras que las flechas rojas representan la localización del primer derecho e izquierdo escogido para hacer la RTqPCR, (B) Electroforesis del producto de PCR amplificado con los cebadores RP-LB y RP-LP. Los productos obtenidos tienen un peso molecular de 1114 y 550 pb respectivamente (flechas blancas). (C) Expresión de *AtTrxo1* en semillas embebidas de 36h en la línea silvestre y las líneas mutantes. Los niveles de transcritos se han estandarizado con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar (n=3).

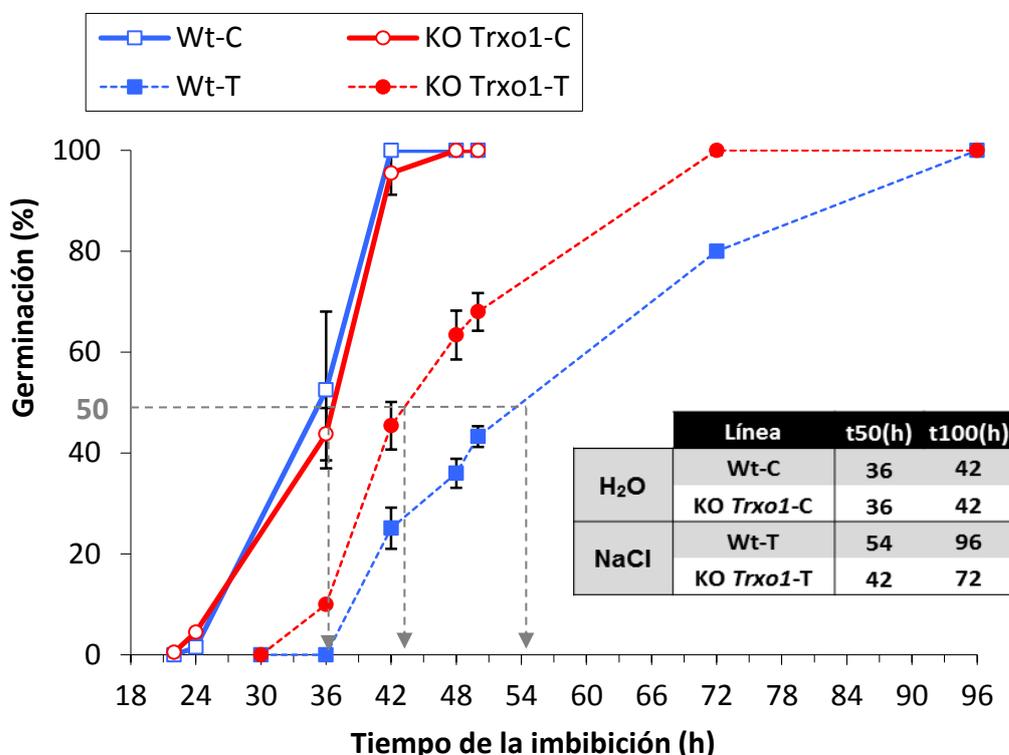
El genotipado de las líneas con inserciones de T-DNA nos permitió verificar la homocigosis de dichas líneas para el inserto (Fig. 30B). Una amplificación positiva con la pareja de cebadores RP-LP (del inglés, Right primers-Left primers), nos indicaría que la planta seleccionada no tenía el gen interrumpido, sin embargo una amplificación positiva para la pareja RP-LB (del inglés, Right primers-Left border) nos indicaría la presencia del inserto. Una misma planta, podría tener una amplificación positiva para los dos pares de PCRs si es heterocigótica para el inserto, sin embargo, si sólo posee la amplificación positiva RP-LB sería homocigótica para el inserto. En la Fig. 30B se observa la presencia del inserto y no del gen *AtTrxo1* en dos plantas escogidas de los mutantes m1 y m2 y la presencia del gen *AtTrxo1* y no del inserto en la Wt (control), lo que demuestra la homocigosis de estas líneas para la inserción.

Las inserciones en la región codificante de una proteína generan un knock-out, al menos en un 90% de las ocasiones (Wang y col., 2008). Esto es así porque en ocasiones es posible que sólo una pequeña parte del T-DNA se inserte en la región codificante favoreciendo una expresión disminuida de la proteína (knock-down) o que el T-DNA se inserte en un intrón, como es nuestro caso, con la posibilidad de que sea eliminado en el proceso de maduración del ARN mensajero y con la consiguiente producción de la proteína. Debido a estas particularidades, hicimos un análisis de expresión de ARNm de la *AtTrxo1* en semillas embebidas de 36h de cada mutante. En la Fig. 30C se observa que la línea mutante m1 sólo alcanzó un 0,08% de expresión *AtTrxo1* en comparación con el Wt, mientras que el m2 tenía un 4,16% por lo que ambas líneas podían considerarse KO para el gen *AtTrxo1*.

### 2.3.2. Análisis de la germinación

Las semillas Wt y las dos líneas mutantes KO *AtTrxo1* presentaron tasas de germinación similares, alcanzando el  $t_{50}$  a las 36 h y el  $t_{100}$  a las 42 h (Fig. 31). La imbibición de las semillas en 100 mM NaCl provocó un retraso en la germinación de varias horas con respecto a la condición control y además este retraso fue mayor en las semillas del fenotipo silvestre. Los mutantes empezaron a germinar 6 h antes que el silvestre, alcanzando el  $t_{50}$  12h antes y el  $t_{100}$  24 h antes que en el Wt (Fig. 31). Dado que ambas líneas mutantes mostraron el mismo

comportamiento durante la germinación tanto en condiciones control como salinas, se escogió una sola línea mutante (m1) para simplificar los análisis posteriores.



**Figura 31:** Análisis del porcentaje de germinación de la línea silvestre y KO *AtTrxo1* con respecto al tiempo de imbibición en condiciones control (línea continua) y en condiciones salinas (línea de puntos). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=4$ ). Abreviaturas: C: condición control, T: condición de tratamiento con 100mM NaCl.

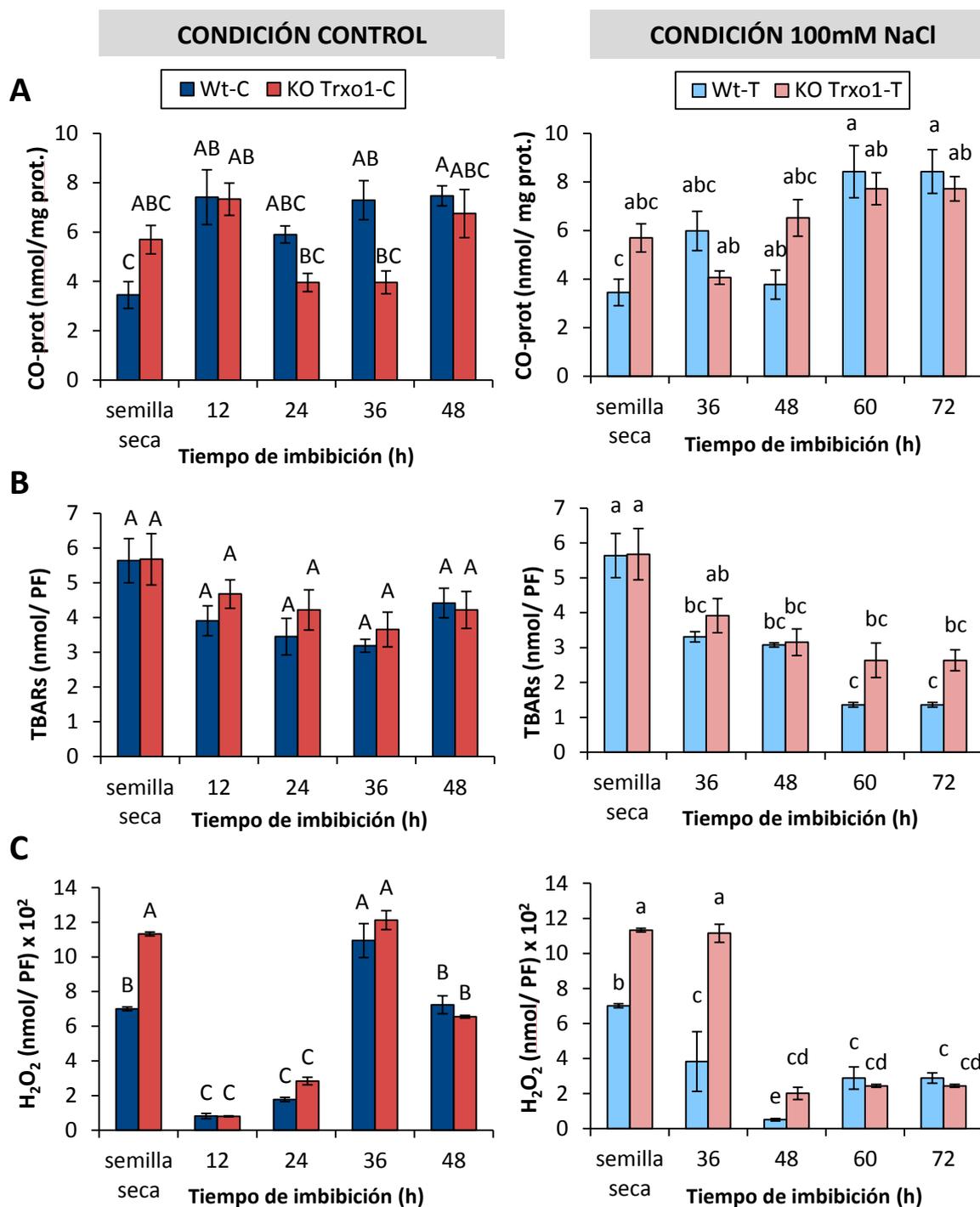
### 2.3.3. Medida de marcadores de estrés oxidativo

Numerosos estudios confirman la implicación de las Trxs, fundamentalmente la *Trxh*, en la regulación del estado oxidativo y redox celular durante la germinación. Con el objeto de discernir el posible papel que pudiera tener la *Trxo1* en este proceso fisiológico relacionado con el estrés oxidativo, se realizó un análisis de parámetros indicadores como la oxidación proteica y lipídica o el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en semillas de las líneas Wt y mutantes KO de *AtTrxo1* tanto en condiciones control como en presencia de 100mM NaCl.

Los niveles de proteínas oxidadas, medidas como proteínas carboniladas, fueron mayores en semilla seca de la línea mutante que en el Wt. La imbibición en agua y NaCl no ocasionó diferencias significativas entre la línea silvestre y mutante a lo largo del proceso germinativo. No obstante, en ambas condiciones se observó cierta tendencia a un mayor contenido de proteínas carboniladas en la línea silvestre (Fig. 32A).

Con respecto a los niveles de lípidos oxidados, en semilla seca los contenidos observados fueron semejantes entre líneas y la condición de imbibición en agua no modificó significativamente estos niveles a lo largo del proceso germinativo. Sin embargo, la imbibición de las semillas en presencia de NaCl disminuyó el nivel de peróxidos lipídicos con respecto a semilla seca en ambas líneas y de forma progresiva con el tiempo de imbibición. A pesar de que estas diferencias no resultaron ser significativas, la disminución de estos peróxidos lipídicos se acentuó en la línea mutante al final de su proceso germinativo (60 y 72 h) (Fig. 32B).

Estos resultados indicaron la ausencia de diferencias significativas en el nivel de proteínas y lípidos oxidados independientemente de la presencia de AtTrxo1 durante la germinación tanto en condiciones control como en condiciones salinas. Sin embargo, el contenido de  $H_2O_2$  varió en función del estado fisiológico de la semilla y de las condiciones analizadas. En semilla seca, los contenidos de  $H_2O_2$  fueron superiores a los encontrados en semilla embebida y además, en este caso, las semillas secas mutantes presentaron 1,5 veces mayor contenido de  $H_2O_2$  por gramo de peso fresco (PF) que la del Wt. La imbibición en agua disminuyó las diferencias entre líneas a lo largo de todo el proceso. Durante las primeras 24 h de imbibición, el contenido de  $H_2O_2$  bajó drásticamente para aumentar alrededor de seis veces a las 36h y disminuir un 41% a las 48h (Fig. 32C). En la condición de salinidad, el perfil de acumulación de  $H_2O_2$  fue distinto y, en este caso, el contenido se incrementó al iniciarse la germinación, a las 30-36 h de imbibición en el mutante y el Wt respectivamente. La ausencia de AtTrxo1 provocó un aumento en el contenido de  $H_2O_2$  tres y cuatro veces superior a las 36 h y 48 h de imbibición respectivamente con respecto a la línea control. Estos contenidos en  $H_2O_2$  se mantuvieron en los tiempos posteriores y las diferencias entre las dos líneas desaparecieron (Fig. 32C).



**Figura 32: Parámetros oxidativos medidos en semilla seca y a lo largo del proceso germinativo en condiciones control y salinas. (A) Niveles de proteínas oxidadas (CO-prot.). (B) Niveles de lípidos oxidados (TBARs) y (C) Niveles de peróxido de hidrógeno. Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p<0,05$  (Test de Tukey) en C (mayúsculas) y T (minúsculas). Abreviaturas: C: condición control, T: condición de tratamiento con 100mM NaCl, PF: peso fresco.**

### 2.3.4. Medida de enzimas antioxidantes

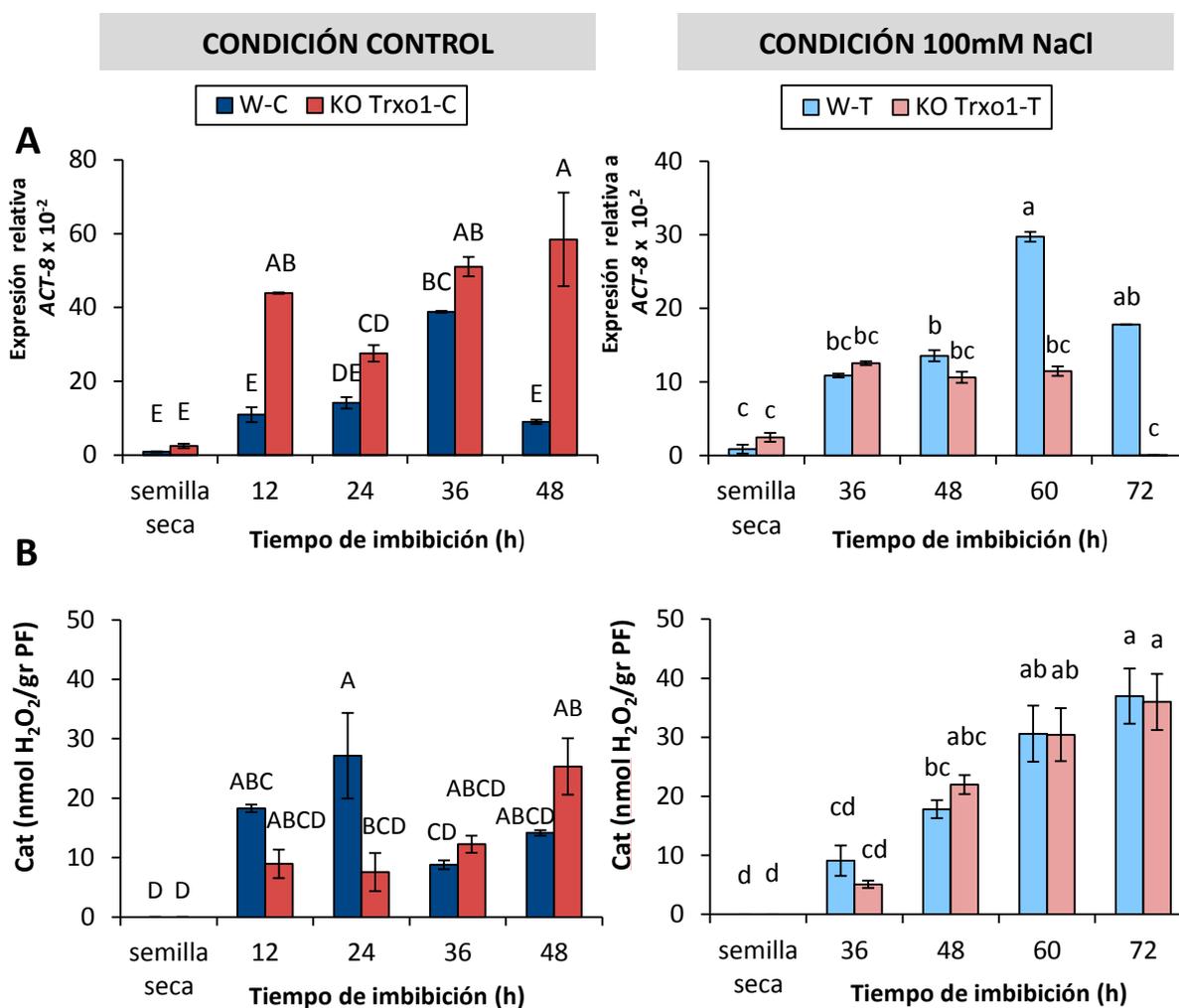
Las diferencias encontradas en los niveles de  $H_2O_2$  entre la línea Wt y mutante durante la germinación en condiciones de salinidad nos condujo a plantear la participación de AtTrxo1 en las vías de eliminación de  $H_2O_2$  durante la respuesta a estas condiciones de estrés abiótico. De esta forma, decidimos estudiar la expresión relativa de catalasa, Prx y Srx y la actividad catalasa durante la germinación de la semilla en las condiciones de salinidad descritas.

#### 2.3.4.1. Análisis de actividad y expresión catalasa

La enzimas catalasa (Cat) es fundamental en la eliminación y control del  $H_2O_2$  en la célula, por lo que se midió tanto la expresión del gen catalasa (*CAT2*), responsable de la mayoría de la actividad enzimática detectada en semillas, junto con la actividad Cat total.

La expresión relativa del gen *CAT2* durante la germinación fue bastante reducida en semilla seca y similar entre líneas. La imbibición en agua activó la expresión de esta enzima de forma particularmente importante en el mutante a lo largo de todo el proceso germinativo, principalmente a las 12 h y 48 h de imbibición (Fig. 33A). En contraposición, en condiciones salinas, la expresión de *CAT2* disminuyó de forma más acusada en el mutante, lo que condujo a niveles de expresión similares entre ambas líneas hasta las 60 h y 72 h de imbibición, en las que la expresión de las semillas Wt aumentó 3 y 18 veces los niveles observados en la línea mutante. Merece la pena destacar que tanto en condiciones control como en condiciones salinas el perfil de expresión de *CAT2* en la línea Wt mantuvo un máximo correlativo al  $t_{50}$  de germinación (Fig. 28), mientras que en la línea mutante la expresión se mantuvo constante durante todo el proceso germinativo. Con respecto a la actividad Cat, en semilla seca no fue detectable con el ensayo enzimático empleado, sin embargo, tras la imbibición en agua, la actividad Cat se hizo patente y mostró un aumento significativo en la línea Wt durante las primeras 24h de imbibición, mientras que en tiempos posteriores este patrón se invirtió, alcanzándose en el mutante una mayor actividad catalasa (Fig. 33B). En condiciones de salinidad no hubo diferencias significativas entre líneas y la

actividad Cat aumentó de forma proporcional al tiempo de imbibición (Fig. 33B), si bien, era ligeramente inferior en la línea mutante al inicio de la germinación



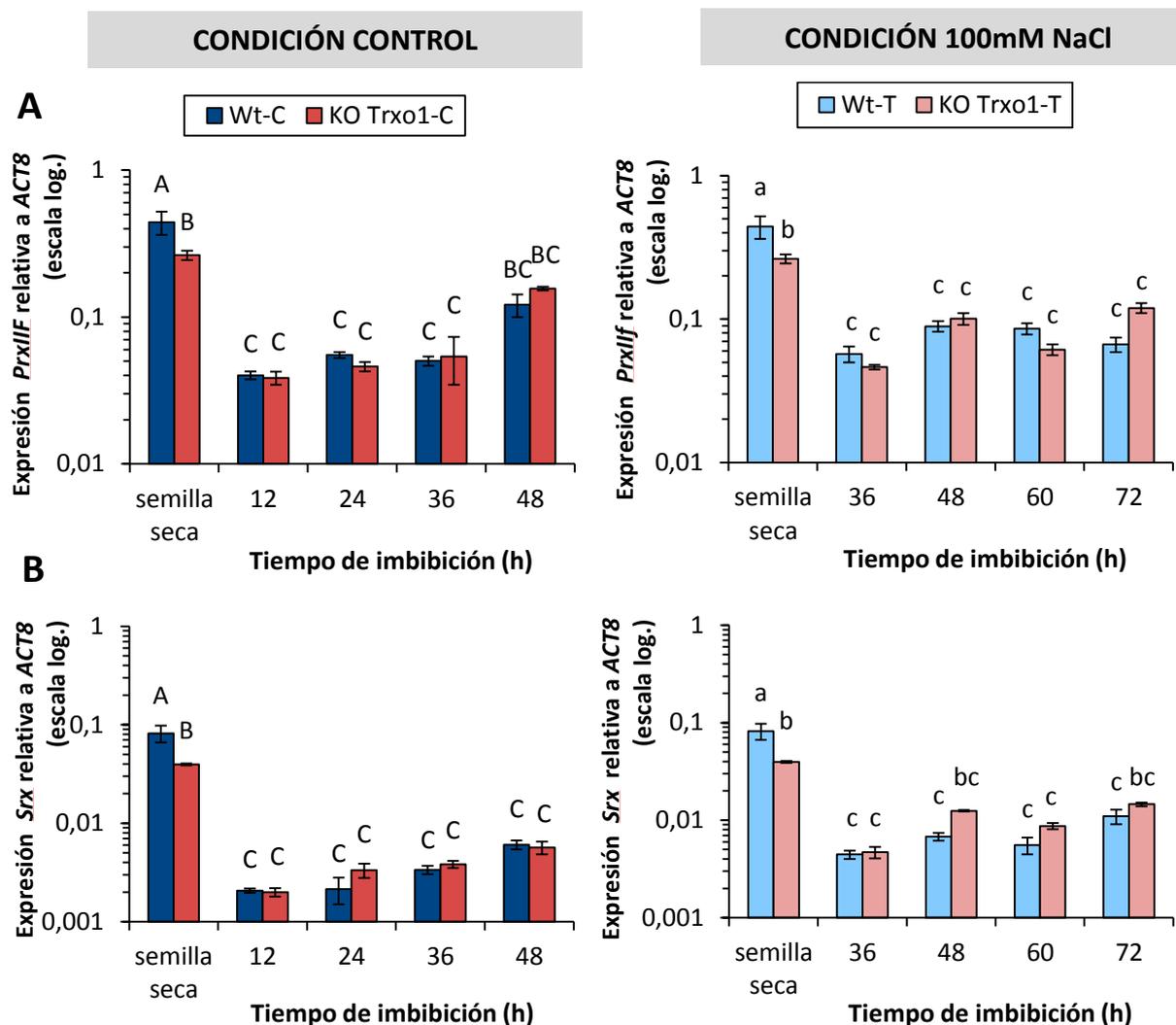
**Figura 33: Perfil de expresión y actividad catalasa durante la germinación en condiciones control y salinas. (A)** Perfil de expresión del gen *CAT2*, **(B)** Perfil de actividad Cat total. Las semillas fueron recogidas a diferentes tiempos de imbibición 12, 24, 36, 48, 60 y 72h. Los niveles de transcritos se han estandarizado con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p<0,05$  (Test de Tukey) en C (mayúsculas) y T (minúsculas). Abreviaturas: C: condición control, T: condición salina con 100mM NaCl.

### 2.3.4.2. Medida de expresión *AtPrxIIIF* y *AtSrx*

El sistema Trx/Prx/Srx, representado en la mitocondria de Arabidopsis por los miembros Trxo1, PrxIIIF y Srx, participa en la eliminación de hidroperóxidos, por lo que su análisis, junto al de la catalasa, constituye un elemento importante en el estudio del metabolismo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

En semilla seca la expresión de *AtPrxIIIF* y *AtSrx* fue bastante elevada con respecto a semilla embebida, llegando a ser un orden de magnitud superior en el caso de la *AtPrxIIIF* y de dos órdenes de magnitud en el caso de la *AtSrx*. Además, en ambos casos la expresión fue significativamente mayor en la línea silvestre que en el mutante (Fig. 34). La imbibición de las semillas en agua disminuyó en un 90% la expresión de *AtPrxIIIF* y *AtSrx* en ambas líneas con respecto a semilla seca. Los niveles alcanzados se mantuvieron estables a lo largo de todo el proceso germinativo y sin diferencias significativas entre líneas. Sin embargo, en ambas enzimas se observó cierta tendencia a aumentar su expresión a las 48h de imbibición (Fig. 34). Si bien los perfiles de expresión para ambas enzimas fueron paralelos, la *AtSrx* se expresaba menos y tuvo una expresión un orden de magnitud inferior a la *AtPrxIIIF*.

La expresión de *AtPrxIIIF* y *AtSrx* en semillas embebidas en NaCl fue similar a lo largo de todo el proceso germinativo, sin diferencias significativas entre líneas y con una tendencia a incrementarse a las 48 h y 72 h de imbibición. En estos tiempos, la expresión de *AtPrxIIIF* y *AtSrx* en el mutante fue ligeramente superior a la encontrada en el silvestre (Fig. 34).



**Figura 34: Perfil de expresión de *PrxIF* y *Srx* durante la germinación en condiciones control y salinas. (A)** Perfil de expresión del gen *PrxIF*. **(B)** Perfil de expresión del gen *Srx*. Las semillas fueron recogidas a diferentes tiempos de imbibición 12, 24, 36, 48, 60 y 72h. Los niveles de transcritos se han estandarizado con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p<0,05$  (Test de Tukey) en C (mayúsculas) y T (minúsculas). Abreviaturas: C: condición control, T: condición de tratamiento con 100mM NaCl.

### 3. Estudio de la regulación transcripcional de *AtTrxo1*

El control de la expresión génica es crucial para el desarrollo de los organismos vivos. Este proceso está regulado por programas transcripcionales mediados por cortas secuencias de ADN (elementos en *cis*) situados en las regiones promotoras de los genes (secuencias aguas arriba del codón de inicio de la traducción) y factores de transcripción (TFs), proteínas que reconocen y unen estos elementos en *cis*. Este mecanismo regula la expresión génica por lo que para revelar la complejidad de la regulación transcripcional es necesario identificar tanto los elementos funcionalmente relevantes (elementos en *cis*), como los TFs que interactúan con ellos (reguladores en *trans*).

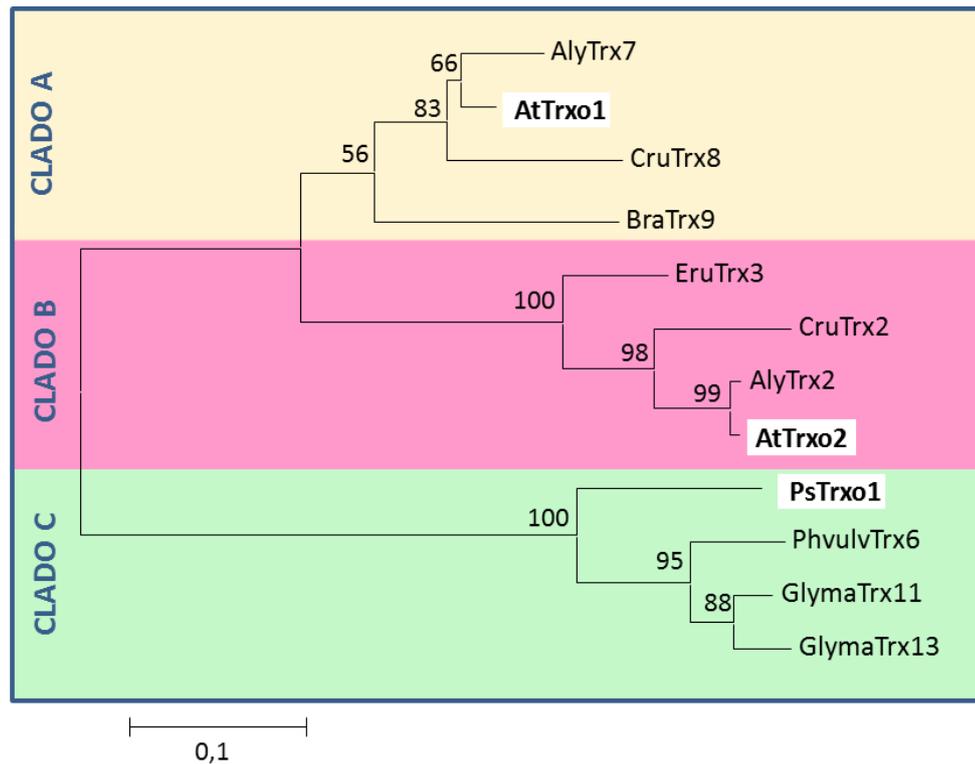
Las secuencias no codificantes en los promotores de los genes ortólogos (genes que codifican proteínas con estructuras y funciones semejantes en distintas especies) divergen rápidamente durante la evolución, excepto aquellas funcionalmente relevantes. La comparación de las secuencias de los promotores de genes ortólogos de especies relacionadas es una herramienta bioinformática utilizada para identificar aquellas posibles regiones funcionalmente importantes. Acoplando estos análisis *in silico* con el cribado (*screening*) en una genoteca normalizada de 1.200 marcos de lectura abierta (Open Reading Frame: ORF) de TFs de *A. thaliana* en levadura (ensayos de un híbrido, 1HYB; Castrillo y col., 2011) se pueden identificar nuevas interacciones *cis-trans* reguladoras de la expresión génica de un gen en particular

Para obtener información sobre la regulación transcripcional del gen *AtTrxo1* durante la germinación de la semilla y la respuesta en una situación de estrés salino, se realizó una búsqueda bioinformática de sus genes ortólogos y sus correspondientes promotores dentro de la familia Brassicaceae y Leguminosae. El alineamiento de las secuencias de los promotores por “*sombra filogenética*” condujo a la obtención de secuencias conservadas en *cis* que se utilizaron como cebo en experimentos de Y1H.

### 3.1. Caracterización funcional del promotor de *AtTrxo1*

#### 3.1.1. La subfamilia génica *Trxo* de *A. thaliana* y *P. sativum*

La subfamilia génica de *Trxo* está formada únicamente por dos genes en *A. thaliana*, *AtTrxo1* y *AtTrxo2* (Laloi y col., 2001) y un gen descrito en *Pisum sativum* *PsTrxo1* (Martí y col., 2009), que han sido utilizados para la búsqueda de genes ortólogos en especies relacionadas de la familia Brassicaceae (*Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Eutrema salsugineum*, *Brassica rapa*) y Leguminosae (*Phaseolus vulgaris* y *Glycine maxima*). Para este propósito se realizó un BLASTN utilizando la base de datos v8.0 Phytozome (Goodstein y col., 2011), (<http://www.phytozome.net>) de las secuencias problema *AtTrxo1*, *AtTrxo2* y *PsTrxo1* frente a una base de datos no redundante, y limitando las homologías al genoma de las especies de Brassicas y Leguminosas mencionadas. La correspondiente secuencia proteica deducida de los posibles genes ortólogos localizados fue utilizada para la construcción de un árbol filogenético donde se compararon las relaciones evolutivas entre estos miembros. El árbol filogenético se construyó con el programa MEGA software, versión 4.0 (Tamura y col., 2007), usando el algoritmo de Neighbor-joining, que asume una tasa de evolución constante, y para comprobar la fiabilidad de los diferentes agrupamientos se usó la técnica de remuestreo aleatorio (del inglés, *bootstrapping*). De esta forma, usando las 13 secuencias más cercanas a los genes indicados, se realizó un nuevo árbol filogenético, no arraigado, para una similitud en las parejas de aminoácidos superior al 50%, un valor umbral convencionalmente usado para clasificar un grupo de genes dentro de una familia génica. Este árbol estaba organizado en tres clados (A, B, C) según valores de re-muestreo aleatorio (*bootstrapping values: Bv*) mayores del 56%. Cada uno de estos clados correspondía a los ortólogos de *AtTrxo1* (Bv: 56%, clado A), *AtTrxo2* (Bv: 100%, clado B) y *PsTrxo1* (Bv: 100%, clado C) (Fig. 35). De esta forma, los clados A y B pertenecían a los ortólogos de Brassicaceas y el clado C al de Leguminosas.



**Figura 35: Árbol filogenético de los posibles ortólogos de AtTrxo1, AtTrxo2 y PsTrxo1 en Brassicaceas y Leguminosas.** Abreviaturas; Aly: *Arabidopsis lyrata*, At: *Arabidopsis thaliana*, Cru: *Capsella rubela*, Bra: *Brassica rappa*, Eru: *Eutrema salsugineum*, Ps: *Pisum sativum*, Phvul: *Phaseolus vulgaris*, Glyma: *Glycine maxima*. Los números que acompañan a cada ortólogo indican su posición en la base de datos de phytozome. El número de acceso para los cDNAs y las correspondientes proteínas predichas de los genes ortólogos de *Trxo* descritos aquí son, según la web *phytozome*: AlyTrx7 (482466), AtTrxo1 (AT2G35010), CruTrx8 (Carubv 10024096m.g), BraTrx9 (021942), EruTrx3 (Thahalv10008976m), CruTrx2 (Carubv 10010516m), AlyTrx2 (473345), AtTrxo2 (AT1G31020), PsTrxo1 (EMBL: Q257C6), PhvulvTrx6 (091018134m), PhvulvTrx8 (04781m), GlymaTrx11 (05g26300.1), Glymatrx13 (08g09210.1).

El alineamiento de las secuencias de este árbol por similitud de secuencias aminoacídicas mostró que efectivamente existían grandes regiones comunes a todos los miembros (Fig. S3) y que estas regiones se clasificaban en diez dominios proteicos claramente conservados entre clados. Todos los ortólogos seleccionados presentaban tres dominios proteicos comunes (1, 3 y 6, Tabla 15), donde los aminoácidos descritos como críticos para la actividad enzimática estaban presentes. Además, los miembros del mismo clado compartían dominios, como el dominio 4 en Brassicáceas y el 7 en Leguminosas, o el

dominio 9 en el subgrupo 1 (Aly7 y Ato1) del clado A, o el dominio 8 en el subgrupo 2 (Phvulv6, Glyma11, Glyma13) del clado C (Fig. 35).

**A**

Clado	Ortólogo Trxo1	Dominio proteico							
A	AlyTrx7	5	9		4	6	3	1	2
	AtTrxo1	5	9		4	6	3	1	2
	CruTrx8	5			4	6	3	1	2
	BraTrx9	5			4	6	3	1	2
B	EruTrx3				4	6	3	1	2
	CruTrx2				4	6	3	1	2
	AlyTrx2				4	6	3	1	2
	AtTrxo2				4	6	3	1	2
C	PsTrxo1	7				6	3	1	
	PhvulvTrx6	7	8			6	3	1	2
	GlymaTrx11	7	8			6	3	1	2
	GlymaTrx13	7	8			6	3	1	2

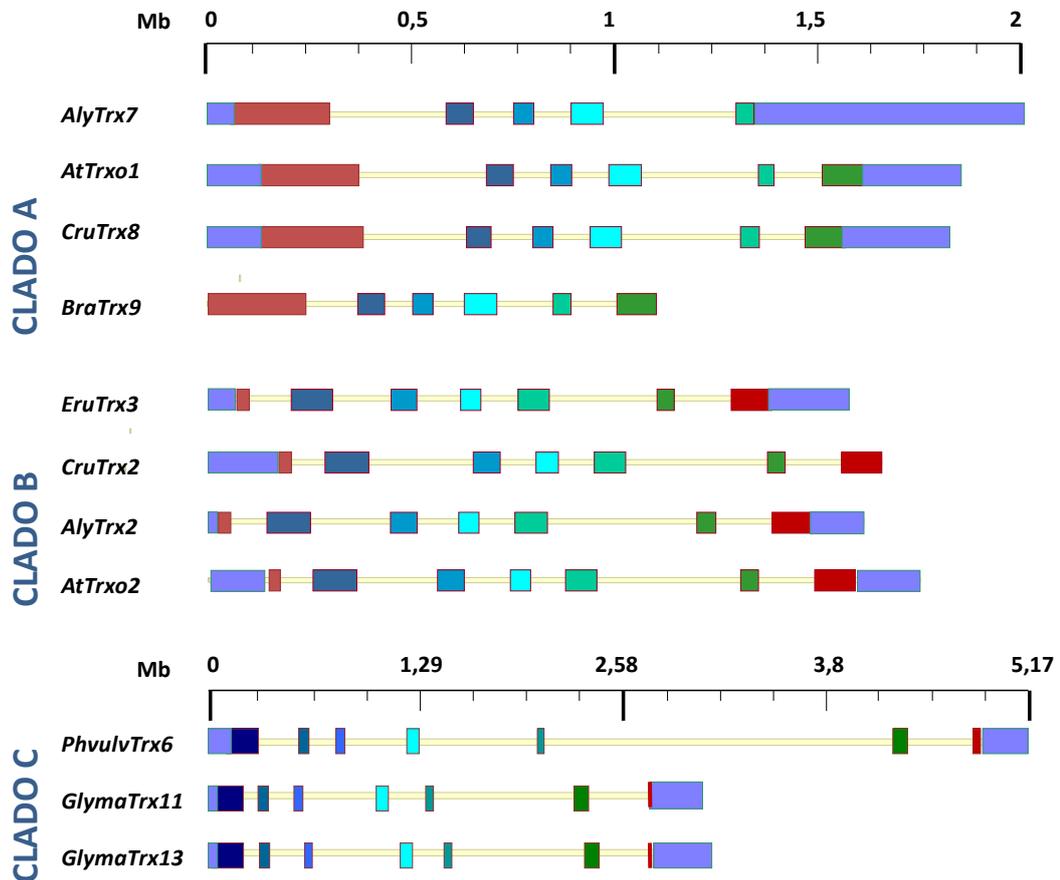
**B**

Motivo	Valor E	Secuencia consenso
1	$7,3 \times 10^{-472}$	K[AV][QR]D[GD]SL[PH][SA][VI]FYFTA[AV]WCGPCR[FL]I[SA]P[VI] [IV][GLV]ELSK[KQ]YPDVTYK[VI]DID[EQ][GE][GA][LI]
2	$6,8 \times 10^{-266}$	[IL][GS]KL[NQ][IV][ST][AS]VPTL[HQ]FF[KQ][GN]G[SVK]K[KA][AGD] E[ILV]VG[AV]DV[ATV][KR]LK[NS][LIV][MT]E[QK]L[YF]K
3	$1,0 \times 10^{-91}$	AG[GDA][EPR][SN][GDS][VF]V[LIV][VL][KN]SE[EA]EF[NI][NS][AI] [LM][ST]
4	$4,6 \times 10^{-82}$	[PQ][NWS][INM][FSP][SH][QL][AG]RNS[LF][FL][AT]AST[IVF][GY] [APV]S[IT][ED]FNF[SL]NTS
5	$1,0 \times 10^{-40}$	MKG[NS][WFL]SI[VI]R[QK][VFI][LF][HQ]R[RQ]FSTLRSS[TRS][PT]
6	$3,4 \times 10^{-26}$	[LF][PHL]H[RS]RS[LF][CS]
7	$6,2 \times 10^{-22}$	[MG][AT]R[NL][LW][VIL][VF]RSLALRH[AV][IM]KN[RT][VG][RL][PT] [LI][FLS][FT][NH][RAT][HILN][LH]
8	$4,1 \times 10^{+2}$	[TF]A[TA]A[TI]ASS[QR]LSELLP
9	$1,7 \times 10^{+4}$	RLSTS[IV]RPLV

**Figura 36: Estudio a nivel proteico de los ortólogos de AtTrxo1, AtTrxo2 y PsTrxo1. (A)** Distribución de los motivos proteicos conservados entre los ortólogos y las secuencias aminoacídicas correspondientes. **(B)** El valor  $E$  indica la probabilidad de que la homología entre ortólogos sea casual. Los motivos proteicos fueron identificados por el software MEME (Bailey y *col.*, 2006). Los aminoácidos conservados, críticos para la actividad enzimática están subrayados en rojo.

Las similitudes entre los miembros del árbol también se hicieron manifiestas a nivel genético. Todos los miembros del árbol filogenético compartían estructuras genéticas comunes constituidas por 6-7 exones y 5-6 intrones, si bien se observaron diferencias particulares entre clados, y todos los ortólogos del clado A compartían 5 exones y 6 exones,

mientras que los del clado B y C, 7 exones y 6 intrones respectivamente, si bien, los miembros del clado C tenían estructuras génicas ligeramente diferentes con exones más pequeños e intrones muy largos, lo que justificaba su distancia filogenética con los ortólogos de Brasicáceas (Fig. 37).

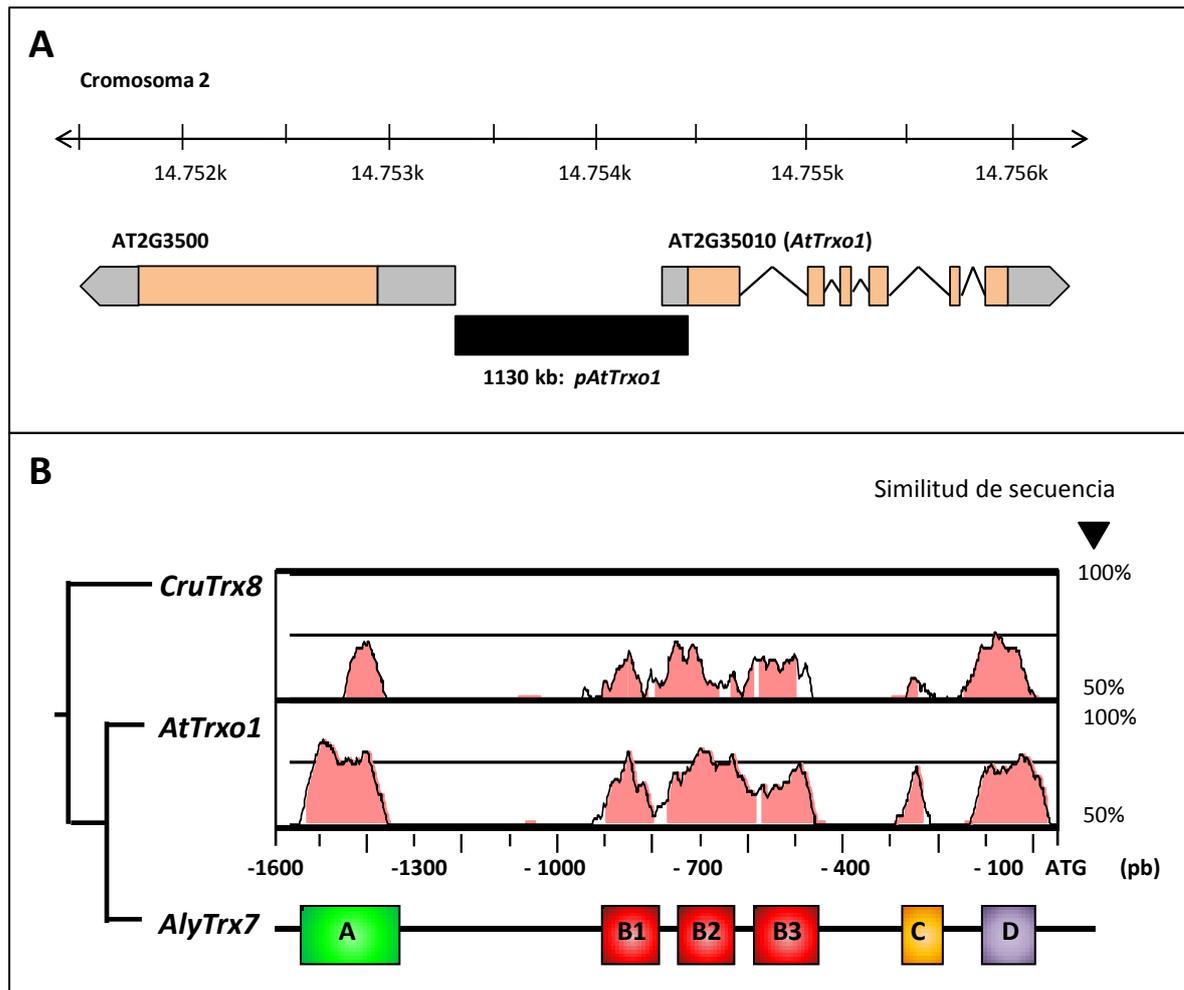


**Figura 37:** Representación esquemática de la estructura genética de los ortólogos de *Trxo* representados en el árbol filogenético de la Fig. 35. Los cuadros de color homogéneo representan los exones y los colores su localización con respecto al ATG (rojo, exon1; azul oscuro, exón 2; azul ultramar, exón 3; azul cian, exón 4; verde palo, exón 5; verde oscuro, exón 6 y rojo oscuro, exón 7). Los cuadros rayados indican las regiones UTRs. En línea amarilla se representan los intrones. *Abreviaturas; Mb:* megabases.

### 3.1.2. Búsqueda de elementos conservados en *cis* en el promotor de *AtTrxo1*

La búsqueda de motivos conservados en *cis* en el promotor de *AtTrxo1* (*pAtTrxo1*), posiblemente implicados en el control transcripcional de *Trxo1*, se realizó a través del alineamiento de los promotores de sus genes ortólogos mediante la aproximación de “sombra filogenética” (Fig. 38). Esta aproximación selecciona las zonas conservadas de entre un número de secuencias. En nuestro caso, se seleccionó la distancia intergénica desde el codón de inicio de la traducción ATG del gen hasta su gen predecesor (At2g35000 en At2g35010, Fig. 38A) y se consideraron estas secuencias como posibles promotoras. El alineamiento de los promotores de los 13 ortólogos de *Trxo* encontrados en especies de *Brassicaceae* y *Leguminosae* (Fig. 35) no presentó dominios en *cis* claramente conservados. Sin embargo, la selección de los ortólogos más cercanos a *AtTrxo1* reveló la presencia de cuatro dominios conservados, que se etiquetaron como A, B, C y D, y que presentaron unas longitudes que oscilaron entre los 50 y 200pb, excepto el dominio B que presentó una longitud mayor y fue dividido según picos de homología en tres subdominios: B1, B2 y B3 (Fig. 38B).

Mediante análisis *in silico* se comprobó la presencia de secuencias de nucleótidos conservadas, previamente descritas en los motivos en *cis* seleccionados mediante sombra filogenética. La mayoría de secuencias encontradas estuvieron presentes en el dominio B con un nivel de conservación mayor del 50% (Tabla 15). Además, la mayoría de secuencias fueron elementos de respuesta a estrés abiótico y biótico, como los elementos de respuesta a la hormona ABA, elementos de unión a factores de transcripción tipo NAC o WRKY de especial importancia en procesos de salinidad y deshidratación, así como elementos de tipo G-box a los que se unen múltiples familias de TFs (Tabla 15). La abundancia de secuencias descritas en la región B apoyó la importancia de este dominio en la regulación transcripcional del gen *Trxo1* en respuesta a distintos factores ambientales, por lo que fue utilizado, en una primera aproximación, como cebo en los ensayos de un híbrido.



**Figura 38: Identificación de elementos conservados en cis en los promotores de los ortólogos de *AtTrx1*.** (A) Vista genómica del locus *AtTrx1* en el cromosoma 2 de *A. thaliana*. Los exones de *Trx1* y el gen flanqueante *At2g3500* se representan en cuadros naranjas, las regiones UTR en cuadros grises y las líneas indican las regiones no codificantes. Las flechas indican la dirección de la transcripción. La secuencia promotora de *AtTrx1* (*pAtTrx1*) usada para el alineamiento por sombra filogenética se representa como un cuadro negro. (B) Alineamiento de los promotores de *AtTrx1* de los ortólogos de distintas especies de Brassicaceas: *CruTrx8* y *AlyTrx7* usando el programa web mVISTA. Al comparar este promotor (eje x) con el de los ortólogos se obtuvo un gráfico que representa la identidad de nucleótidos en una ventana deslizante de 50pb y un porcentaje mínimo de homología del 70%. Las regiones homólogas se representan como una mancha rosa cuya anchura representa la longitud y localización en el promotor de la secuencia conservada y la altura el porcentaje de similitud con las otras secuencias. Los cuadros de color verde, rojo, amarillo y violeta muestran las regiones conservadas delimitadas y etiquetadas como A, B1, B2, B3, C y D.

Tabla 15. Principales secuencias de ADN conservadas entre los promotores de los ortólogos de *AtTrxo1*, *AlyTrxo1* y *CrTrxo1*, su porcentaje de homología y su localización en los dominios en *cis* seleccionados por sombra filogenética.

Motivo	Dominio	Secuencia <sup>a</sup>	Conservación <sup>b</sup>
Elemento de respuesta a ABA	A	[A/G]C[C/G]T	50%
GT-1	B1	TTA[T/A]G[G/A]TGGTAGGA	80%
Elemento de unión a NAC	B2	[C/A][G/C]TGA	60%
G-box	B2	A (T/C/A)GT	75%
Elemento de unión a WRKY	A/B2/B3	TTGAC	100%
Sp1 respuesta a luz	B3	G[G/T]GCGGG	80%
HSE (Heat Stress Element)	C	AAAC[A/T]AAT[C/T]TC	80%
Skn-1 (endosperm expression)	D	GTCAT/CATC[A/G]	90-100%

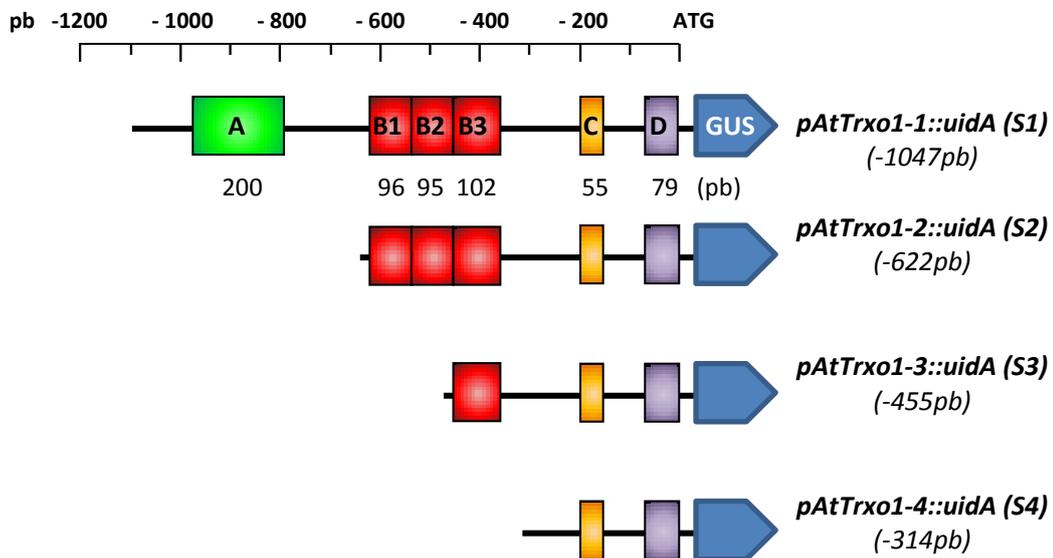
<sup>a</sup>Secuencia conservada [...] indica variaciones de bases entre ortólogos

<sup>b</sup>Indica el grado de conservación de esas secuencias entre los tres ortólogos seleccionados.

### 3.1.3. Ensayos de expresión transitoria

A fin de obtener una aproximación *in vivo* a la relevancia funcional de cada uno de los dominios conservados en el promotor de *AtTrxo1*, se generó una colección de líneas sobre-expresoras con deleciones seriadas del promotor de *AtTrxo1* fusionadas transcripcionalmente al gen delator *uidA* que codifica la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (GUS), (*pAtTrxo1::uidA*). Estas construcciones estaban formadas por: *pAtTrxo1-1::uidA* (-1047 pb) que contenía el promotor entero, *pAtTrxo1-2::uidA* (-622 pb) que carecía del dominio conservado A, *pAtTrxo1-3::uidA* (-455 pb) sin los dominios A, B1 y B2 y *pAtTrxo1-4::uidA* (-314 pb) con la única presencia de los dominios C y D (Fig. 39A). Estas construcciones se agroinfiltraron en hojas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*), donde al cabo de tres días se midió la actividad GUS. Los perfiles de actividad mostraron una disminución cuantitativa de la fluorescencia con la eliminación progresiva (en dirección 5'-3') de los distintos dominios. La eliminación del dominio A provocó una disminución del 50 % de la actividad GUS con respecto a la obtenida con la construcción entera (S1). La eliminación del dominio A y B1 disminuyó la actividad GUS con respecto a la construcción S2 de nuevo un 50%, sin embargo, la construcción S4 revirtió esta condición aumentando la actividad GUS a niveles

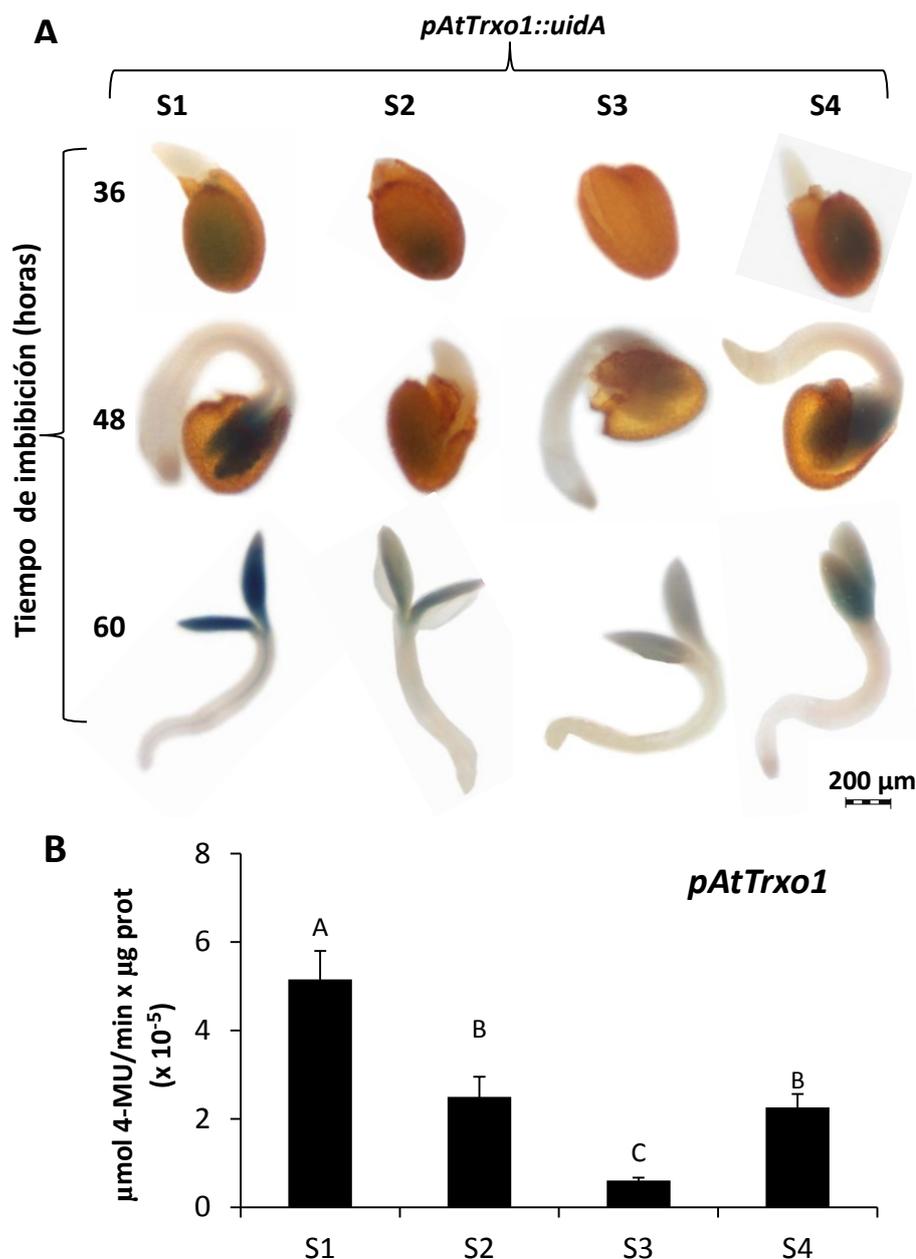
comparables a los obtenidos con la construcción S2, por lo que estos dominios parecían ser importantes en la regulación tanto positiva como negativa del gen *AtTrxo1* (Fig. 40B).



**Figura 39:** Representación esquemática de las delecciones seriadas del promotor de *AtTrxo1* fusionadas al gen reportero *GUS (uidA)*. Se representa la posición de cada dominio con respecto al ATG. Estas construcciones fueron utilizadas en ensayos de expresión estable y transitoria.

### 3.1.4. Ensayos de expresión estable

La generación de líneas de *Arabidopsis* homocigóticas para las construcciones mencionadas en el apartado anterior, nos permitió corroborar los experimentos de expresión transitoria realizados (Fig. 40). Durante la germinación, la actividad *GUS* estuvo restringida al embrión que empezó a hacerse visible en todas las construcciones, excepto en la S3, a partir de las 24 h de imbibición. La intensidad de la señal fue similar a la obtenida en los ensayos de expresión transitoria (Fig. 40B), con una menor intensidad *GUS* en las construcciones S2 y S3 con respecto a S1 y un aumento en la actividad S4 con respecto a la S3, comparable a la obtenida en S2. Además, la expresión *GUS* fue máxima en cotiledones a las 60 h de la imbibición en agua en todas las líneas presentadas (Fig. 40A).



**Figura 40: Localización de actividad GUS para las distintas construcciones *pAtTrxo1::uidA*. (A)** Determinación histoquímica de la actividad  $\beta$ -glucuronidasa durante el desarrollo de la germinación de semillas procedentes de líneas transgénicas y homocigóticas de *Arabidopsis* para las distintas construcciones *pAtTrxo1::uidA*. Las semillas fueron analizadas a las 36, 48 y 60 h de imbibición en agua. **(B)** Determinación cuantitativa de actividad GUS mediante la formación del producto 4-MU (4-metilumbeliferil) de hojas de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltradas con las construcciones descritas. Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos diferentes. Los datos se compararon con ANOVA de un factor. Las distintas letras mayúsculas indican las diferencias significativas entre las medias de los distintos datos para un  $p < 0,05$  (Test de Tukey).

## 3.2. Búsqueda de posibles reguladores en *trans* del gen *AtTrxo1*

### 3.2.1. Cribado de una genoteca de TFs de *A. thaliana* mediante ensayo de un híbrido en levadura

El elemento conservado en *cis* identificado *in silico* como motivo B2 (96 pb) se usó como cebo en el cribado de TFs de *Arabidopsis* clonados en levadura (presas). La genoteca utilizada para tal fin contenía alrededor de 1.200 ORFs de TFs de *Arabidopsis* dispuestos en un formato de 96 pocillos (genoteca RR; REGIA + REGULATORS) y clonados en plásmidos pDEST22. Para permitir el apareamiento entre levaduras se utilizó un plásmido episómico (pTUY1H) donde se clonó el motivo conservado B2 utilizado como cebo. Tras la conjugación (*mating*), las levaduras diploides con ambos plásmidos crecieron en un medio auxotrófico carente de leucina (L) y triptófano (W). La interacción cebo-presa se discriminó en un medio carente de histidina y con una concentración de 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) de 1 mM, un inhibidor del gen reportero de la histidina que evita el crecimiento basal y por tanto, los falsos positivos (Fig. 41).

Siguiendo este procedimiento, el dominio B2 fue capaz de reconocer alrededor de 30 TFs pertenecientes a 8 superfamilias de TFs distintas: BHLH (Basic Helix-Loop-Helix), bZIP (Basic Leucine Zipper 9), AP2/ERF (Ethylene Response Factor), NAC (NAC Domain containing Protein), C2H2 (Zinc finger family protein), C2C2 (C2H2-type zinc finger family protein), VIP3 (ABI3-interacting protein 3) y similar a SAUR (Small Auxin Upregulated Rna). De todas estas familias al menos la mitad (bZIP, ERF y C2H2) estaban formadas por importantes TFs que regulaban genes capaces de hacer frente a situaciones de estrés biótico y abiótico, mientras que la otra parte de familias seleccionadas tenían miembros relacionados con procesos de metabolismo, desarrollo y crecimiento (BHLH; NAC; VIP3; SAUR like AIA; C2C2) (Tabla 16). Estos resultados parecen indicar funciones para *AtTrxo1* relacionadas con el estrés y el desarrollo de la planta.

**Tabla 16: TFs que interactúan con el dominio B2 de *pAtTrx1* seleccionados mediante el sistema de un híbrido en levadura.** Información obtenida de la base de datos TAIR. *Abreviaturas: PCD: muerte celular programada, SAR: respuesta sistémica adquirida, HR: respuesta hipersensible, ABA: ácido abscísico, AIA: auxinas, JA: ácido jasmónico.*

Superfamilia	Nº acceso	Nombre	Descripción	Función
<b>BHLH</b>	AT4G37850	BHLH25	Hélice-bucle-hélice básica 025	Regulador transcripcional. (No hay función específica descrita).
	AT2G28160	BHLH29	Proteína inducida por déficit Hierro	Responde a etileno, hierro y óxido nítrico.
	AT3G23210	BHLH34	Hélice-bucle-hélice básica 034	Participa en la síntesis de antocianos. Responde a azúcar y luz UV-B.
	AT3G56970	BHLH38	Hélice-bucle-hélice básica 038	Participa en la homeostasis del hierro. Responde a la ausencia de hierro.
	AT3G56980	BHLH39	Hélice-bucle-hélice básica 039	Participa en la homeostasis del hierro. Responde a la ausencia de hierro.
	AT4G09820	BHLH42	Testa transparente 8 (TT8)	Participa en la síntesis de antocianos, flavonoides, desarrollo de la semilla y su cubierta seminal y en la diferenciación de los tricomas. Participa en la señalización de brasinosteroides. Responde a azúcar y luz UV-B.
	AT1G73830	BEE-3	Componente de señalización de Brasinosteroides BEE3	Activa el síndrome de evitación de la sombra en plántulas de <i>A. thaliana</i> . Participa en la señalización de brasinosteroides.
AT5G67060	HEC1	Hecate 1	Interviene en la formación y morfogénesis del carpelo.	
<b>BZIP</b>	AT5G24800	bZIP9	Cremallera básica de leucina 9	Responde a estímulo por glucosa.
	AT1G22070	bZIP22	Factor 3 relacionado con el TF TGA-1A	Interviene en la cascada de proteínas MAPK. Respuesta de defensa frente a estrés biótico (PCD, SAR, HR...).
	AT5G10030	bZIP57	Factor 4 de unión al motivo TGACG	Responde a estrés biótico, frío y xenobióticos.
<b>AP2/EREBP</b>	AT4G18450	EREBP-like	Factor de respuesta a etileno (subfam. B3)	Responde a quitina, calor, alta radiación UV y peróxido de hidrógeno.
	AT4G17500	ERF1	Elemento de unión al factor1 de respuesta a etileno	Interviene en señalización mediada por ABA/etileno, en el desarrollo de la vasculatura. Responde a ABA, Etileno, quitina y sequía.
	AT1G12980	ERF1B	Potenciador 1 de la regeneración de brotes	Interviene en la morfogénesis y polaridad de órganos, desarrollo del cotiledón. Responde a citoquininas.
	AT2G33710	ERF4	Factor de respuesta a etileno (subfam. B3)	Interviene en la explosión respiratoria durante respuestas de defensa. Responde a Etileno y quitina.
	AT2G31230	ERF15	Factor de respuesta a etileno (subfam. B4)	Interviene en rutas de señalización mediadas por etileno. Responde a quitinas.
	AT4G36900	DEAR4	Proteína 4 de motivo	Regulador transcripcional.

			DREB y EAR relacionado con AP2-10	(No hay función específica descrita).
	AT1G13260	RAV1	Factor 4 con elemento de unión al ADN de respuesta a etileno	Interviene en el desarrollo de: raíces laterales, hojas y flores. También en la biosíntesis de flavonoides y en la HR. Responde a brasinosteroides.
<b>NAC</b>	AT1G52880	NAC018	Proteína 18 con dominio NAC	Interviene en el desarrollo de organismos puricelulares.
	AT1G61110	NAC025	Proteína 25 con dominio NAC	Interviene en el desarrollo de organismos puricelulares.
	AT3G15170	NAC054	Proteína 54 con dominio NAC	Interviene en desarrollo floral y en su identidad como órgano, desarrollo embrión, raíz lateral, meristemas (establece la dominancia apical) y brotes secundarios.
	AT4G28530	NAC074	Proteína 74 con dominio NAC	Interviene en el desarrollo de organismos puricelulares.
	AT5G18270	NAC087	Proteína 87 con dominio NAC	Interviene en el desarrollo de organismos puricelulares.
	AT5G66300	NAC105	Proteína 105 con dominio NAC	Interviene en la biogénesis de pared celular 2ª y el desarrollo del sistema xilemático. Responde a brasinosteroides.
<b>C2H2 (Zn)</b>	AT2G37430	ZAT11	Dedo de zinc 11 de <i>A. thaliana</i>	Interviene en la biosíntesis de etileno, en la explosión respiratoria de respuestas de defensa. Responde a iones de níquel y quitina.
	AT5G59820	ZAT12	Proteína en dedo de zinc que responde a alta intensidad lumínica.	Interviene en la aclimatación al frío, calor, aclimatación fotosintética, biosíntesis de JA Responde a: sequía, LUV-B, frío, calor, hongos, estrés oxidativo y heridas.
	AT3G19580	AZF2	Proteína en dedo de zinc 2.	Interviene en señalización mediada por ABA, desarrollo del embrión a lo largo de la latencia de la semilla, explosión respiratoria de defensa. Responde a: salinidad, ABA/AIA/etileno/JA, quitina, sequía, heridas.
<b>C2C2</b>	AT3G12890	TOC1	Activador de espomina::Luc2	Interviene en la ruta de señalización mediada por azúcar.
	AT2G46790	TOC1-like	Regulador 9 de pseudorespuesta	Interviene en la regulación del ritmo circadiano y en la señalización de luz roja o rojo lejano. Responde a Tª.
<b>VIP3</b>	AT1G08780	AIP3	Proteína 3 que interacciona con ABI3	Interviene en el plegamiento de las proteínas.
<b>SAUR</b>	AT5G53590	SAUR30	Pequeña auxina activada por ARN 30	Responde a estímulos de AIA.

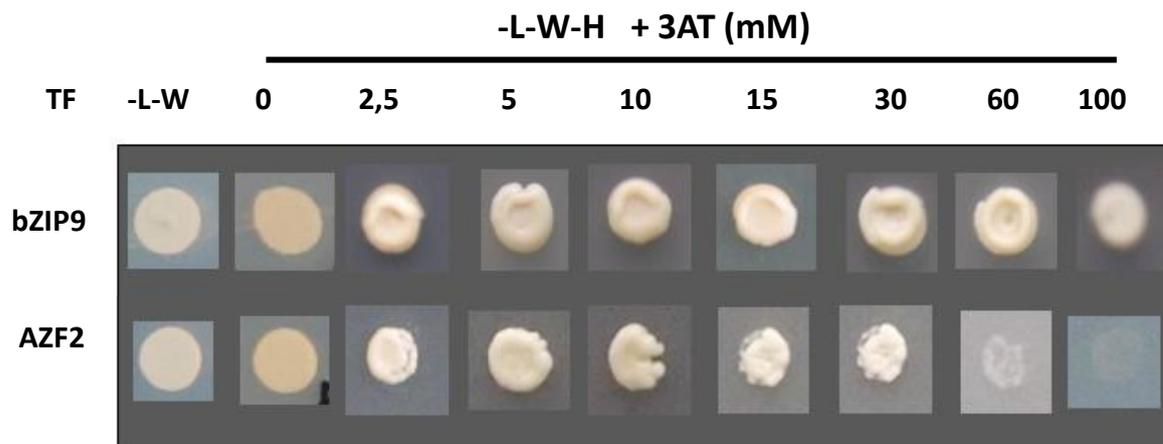
### 3.2.2. Validación y selección de los factores de transcripción obtenidos

La obtención de numerosos reguladores en *trans*, nos condujo a establecer una serie de criterios de selección. En primer lugar, los TFs obtenidos se validaron atendiendo a la presencia de elementos de unión al dominio B2 descritos en la bibliografía (Tabla 17). La mayoría de TFs seleccionados presentó secuencias de unión al promotor de *AtTrxo1* confirmando la posibilidad de su unión al mismo.

**Tabla 17: Elementos de unión descritos de los TFs seleccionados al dominio B2 *pAtTrxo1* y porcentaje de miembros pertenecientes a cada superfamilia.**

Superfamilia	Nº	%	Elemento de unión al ADN <sup>a</sup>	Referencia
BHLH	6	21	E-box: CANNTG	(Toledo-Ortiz, 2003)
BZIP	3	11	G-box: ACGT	(Jakoby y col., 2002)
AP2/EREBP	6	21	GCC-Box: AGCCGCC CAACA (RAV1)	(Licausi y col., 2013)
NAC	6	21	CGTGA	(Jensen y col., 2010)
C2H2 (Zn)	3	11	ACT	(Sakamoto, 2004) (Muthamilarasn y col., 2014) (Takasuji y col., 1998)
C2C2	2	7	G-box: ACGT Elemento HUB: CACATG	(Gendron y col., 2012)
VIP3	1	4	No descrito	(Jones y col., 2000)
SAUR like AIA	1	4	No descrito	(Chen y col., 2013)

Otro criterio de validación consistió en medir la fuerza de la interacción cebo-presa en concentraciones crecientes de 3-AT (Fig. 41). El 100% de los TFs seleccionados crecieron en medios con una concentración de 3AT de hasta 30 mM, el 70% logró crecer también en concentraciones de 60 mM y sólo el 3% en concentraciones de hasta 100 mM. El TF bZIP9, fue el único TF seleccionado con capacidad de interaccionar con el dominio B2 a concentraciones tan altas de 3-AT (Fig 41 y Tabla 18), por lo que fue escogido como posible elemento regulador del gen *AtTrxo1* para estudios posteriores.



**Figura 41: Medida de la fuerza de la interacción entre el dominio B2 del promotor de *AtTrxo1* y los TF de *Arabidopsis* Bzip9 y AZF2 a través del crecimiento de las levaduras en concentraciones crecientes del inhibidor basal del promotor de la histidina 3-AT. También se observa el crecimiento de los diploides en medios sin leucina (-L) y sin triptófano (-W) y el crecimiento en medio de selección sin histidina (-H) y sin 3AT.**

El perfil de expresión de los distintos TFs durante la germinación y durante condiciones de estrés salino, nos permitió seleccionar aquellos TFs con una importancia potencial en la regulación de *Trxo1* durante estos procesos fisiológicos. Para ello, se realizó una búsqueda *in silico* en la base de datos *Arabidopsis* EFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) (Baxter y col., 2007). Los TFs los organizamos desde una alta expresión (rojo) a una baja expresión (amarillo). En general, durante la germinación se observaron tres comportamientos distintos según el perfil de expresión; aquellos que presentaron una mayor expresión al principio de la imbibición, como algunos miembros de la familia en dedos de zinc (ZAT12, AZF2), miembros de los bZIP (bZIP057, bZIP022) o algunos factores de respuesta a etileno (ERF1); aquellos que presentaron un aumento de la expresión con el tiempo de imbibición como el bZIP9, el factor AIP3 o algunos factores de la familia BHLH (BHLH34, BHLH39, BHLH42) y aquellos otros factores cuya expresión fue constante a lo largo de todo el proceso germinativo, como ocurrió con muchos miembros de la familia de los NAC (NAC074, NAC54, NAC25). Atendiendo a estos patrones de expresión decidimos seleccionar aquellos TFs con una fuerte expresión durante la germinación y/o con un perfil de expresión

ascendente/descendente dependiente de la imbibición ya que estos resultados constituyen una aproximación a un posible papel del TF en el mencionado proceso.

**Tabla 18: Análisis de expresión transcriptómica de los distintos TFs a distintas horas de imbibición de la semilla.** El nivel de expresión se representa con un código de colores siendo el umbral de expresión de cero a 25 (amarillo), de 25 a 100 (naranja), de 100 a 500 (marrón) y mayor de 500 (rojo). Los TFs BHLH029, BHLH038 y ERF1b no estaban en la base de datos utilizada y, por tanto, su expresión en este proceso no pudo ser analizada. La tabla contigua de la derecha representa la intensidad de la interacción cebo-presa bajo un tratamiento de 30, 60 y 100 mM de 3AT. La fuerza de la interacción se representa con asteriscos (\*: señal débil, \*\*: señal media, \*\*\*: señal fuerte). Fuente: *eFP Browser*.

TF	Horas después de la imbibición de la semilla						[3AT] (mM)		
	0	1	3	6	12	24	30	60	100
BZIP22	119	139	588	250	164	115	**	*	
ZAT12	28	500	323	205	65	43	**	**	
AIP3	79	112	112	130	128	154	**	*	
BZIP57	122	147	164	123	89	57	**		
<b>AZF2</b>	282	359	95	87	32	41	**	*	
DEAR4	298	337	114	28	15	7	**	*	
BHLH034	29	39	31	58	77	106	**	*	
SAUR30	38	106	223	70	37	24	**		
TOC1-like	83	69	68	25	15	7	*		
ERF1	28	22	6	14	4	4	**	*	
HEC1	4	2	9	38	35	86	**		
NAC018	8	5	19	44	22	18	**	*	
BHLH025	2	3	1	0	2	1	**	*	
BHLH039	3	5	2	4	14	15	**	*	
BHLH042	2	1	0	1	3	3	*		
<b>BZIP9</b>	7	4	5	11	9	10	***	***	***
EREBP-like	6	5	1	4	5	6	**	*	
ERF4	4	2	5	13	6	6	**	*	
ERF15	1	1	0	1	1	0	**	*	
NAC025	3	4	2	4	5	4	**	*	
NAC054	2	1	2	2	14	4	**	*	
NAC074	10	6	10	9	9	9	**	*	
NAC087	7	9	16	25	14	7	**		
NAC105	15	3	7	8	4	5	**		
TOC1	6	10	6	11	6	8	**	*	
ZAT11	1	0	3	1	2	1	**	*	
RAV1	2	1	1	2	4	2	**	*	
BEE3	13	8	10	5	7	6	**	*	
BHLH029							**		
BHLH038							**	*	
ERF1b							**	*	

La expresión de estos TFs en respuesta a un tratamiento salino de 150mM varió en los órganos aéreos y subterráneos (Tabla 19). De hecho, la expresión en raíces fue elevada en las primeras horas de tratamiento en prácticamente todos los TFs analizados, destacando la alta expresión de ZAT12, AZF2, ERF-1 y RAV1. En general, el comportamiento de la hoja a la sal no fue tan evidente y se alcanzaron valores de expresión menores con respecto a la raíz. En la mayoría de TFs seleccionados, la expresión osciló en torno a unos valores medios a lo largo del tiempo, si bien en unos pocos TFs se alcanzó un pico a las pocas horas de tratamiento como en los factores BZIP (bZIP 9, 4 y 22), NAC (NAC018 y NAC74), o en dedos de zinc (AZF2, ZAT12).

**Tabla 19: Análisis de expresión transcriptómica de los distintos TFs a distintas horas después del tratamiento 150 mM NaCl en hoja y raíz. Especificaciones ver Tabla 18.**

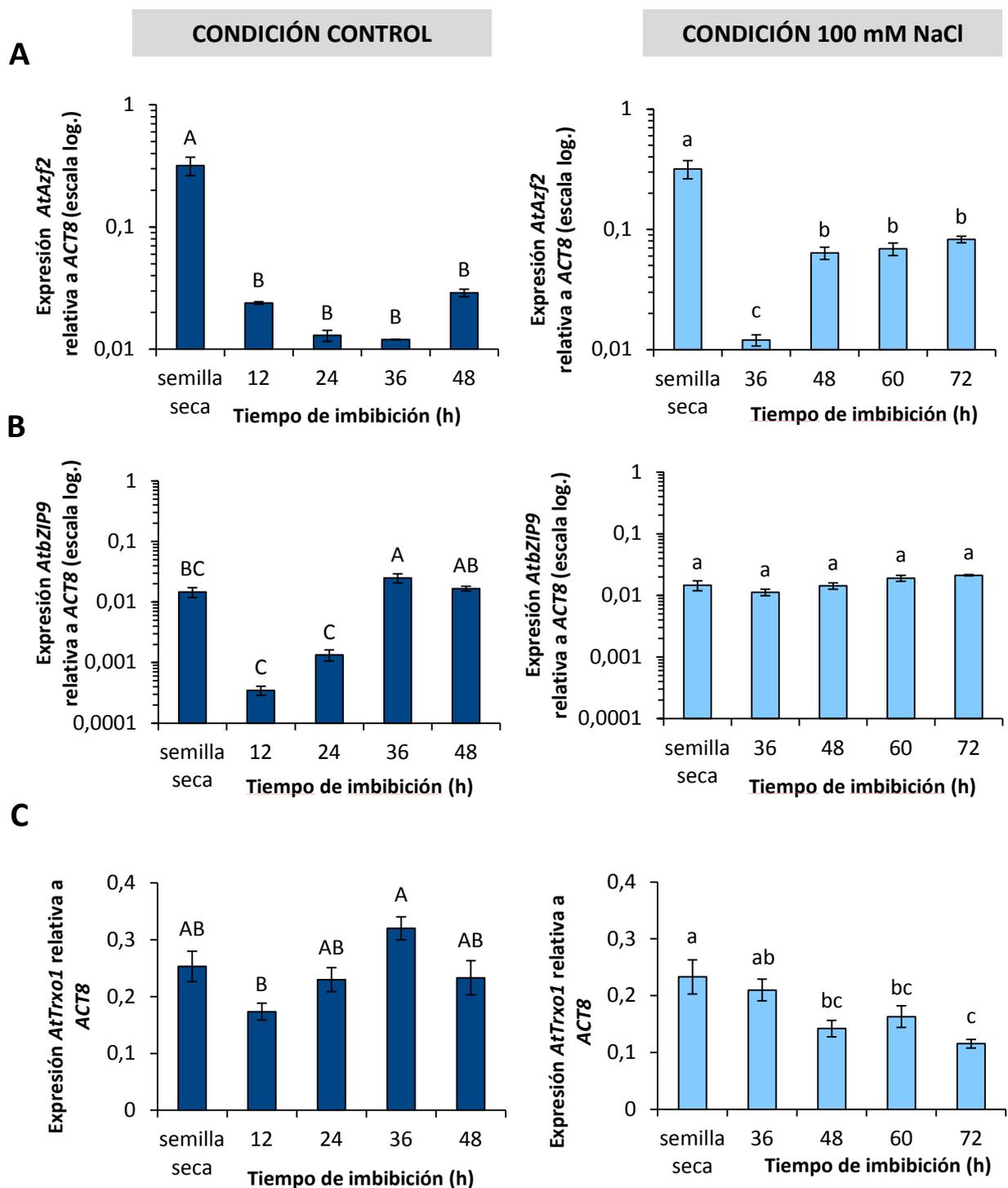
TF	RAIZ							TF	HOJA						
	Horas después del tratamiento con 150 mM NaCl								Horas después del tratamiento con 150 mM NaCl						
	0	0,5	1	3	6	12	24		0	0,5	1	3	6	12	24
ZAT12	175	264	568	2079	3774	3111	2819	<b>BZIP9</b>	241	289	272	412	257	212	191
ZAT11	60	44	208	1551	3121	1472	1146	NAC018	66	64	126	189	123	104	84
ERF1	108	209	472	1533	2134	967	780	BZIP22	74	75	92	134	195	137	70
<b>AZF2</b>	93	224	490	912	1189	604	585	RAV1	35	215	30	73	118	32	22
RAV1	126	188	192	370	605	234	235	TOC1-1k	86	56	212	290	82	6	129
ERF4	18	18	35	259	582	191	186	BEE3	156	15	53	28	21	1	15
<b>BZIP9</b>	352	314	267	223	156	265	289	<b>ERF1</b>	119	48	9	12	27	25	13
SAUR30	186	106	202	241	274	364	326	BHLH034	72	54	87	75	54	71	84
BZIP22	122	132	134	163	167	138	111	BZIP4	72	97	67	47	67	44	39
TOC1-1k	75	137	137	221	214	123	332	AIP3	72	78	84	60	70	85	63
NAC087	104	62	88	133	169	215	179	<b>AZF2</b>	50	38	31	114	57	50	81
AIP3	206	165	200	94	72	84	75	SAUR30	6	53	54	85	92	124	143
ERF15	25	28	33	125	95	35	50	ZAT12	63	26	13	17	21	32	50
BZIP57	104	85	87	79	60	70	65	DEAR4	12	21	22	44	31	26	31
BHLH034	66	58	64	102	94	63	60	ERF15	25	20	34	26	44	23	18
NAC018	34	34	42	43	39	53	56	NAC074	15	10	14	19	26	22	14
DEAR4	19	31	82	55	27	28	20	BHLH025	2	3	1	3	0	1	1
BHLH039	32	11	22	39	38	25	16	BHLH039	13	7	9	14	16	12	16
BHLH025	3	0	5	28	97	23	34	BHLH042	1	0	6	8	1	8	101
NAC074	22	14	21	14	25	73	35	EREBP-1k	3	5	6	6	6	5	5
BHLH42	1	1	1	0	1	0	1	ERF4	13	10	6	10	1	1	3
EREBP-1k	10	10	7	7	19	18	20	NAC025	4	5	5	4	6	4	5
NAC025	7	5	3	5	2	7	7	NAC054	1	2	2	1	2	4	1
NAC054	4	3	1	1	2	1	5	NAC087	18	14	20	15	19	11	19
NAC105	12	12	12	19	21	18	15	NAC105	10	9	15	13	14	7	13
TOC1	6	5	7	5	7	4	8	TOC1	9	9	9	6	6	7	6
BEE3	8	11	5	12	12	10	12	ZAT11	9	1	1	10	2	1	1
HEC1	6	4	6	6	10	6	7	HEC1	7	9	7	11	8	8	6

En base a estos perfiles de expresión, a la fuerza de la interacción cebo-presa y a la bibliografía consideramos que los TFs bZIP9 y AZF2 podían ser unos posibles reguladores transcripcionales del gen *AtTrxo1* durante la germinación y la salinidad, ya que presentaron una fuerte interacción con el dominio B2, mostraron una fuerte expresión durante la germinación y/o salinidad y su perfil de expresión a lo largo de la evolución de ambos procesos parecía compatible con la de posibles reguladores de los mismos.

### 3.2.3. Análisis de la expresión de los genes AZF2, y bZIP9 en los procesos de germinación de la semilla de Arabidopsis

Los estudios de expresión relativa de *AtAZF2* y *AtbZIP9* realizados mediante RtgPCR, indicaron el posible papel regulador de estos TFs sobre la expresión del gen *AtTrxo1*. El perfil de expresión de *AtbZIP9* a lo largo del proceso germinativo en condiciones control fue paralelo al obtenido para *AtTrxo1*, con un pico de expresión a las 36 h después de la imbibición y un descenso posterior (Fig. 42B). Durante la germinación en condiciones salinas, la expresión de este factor fue constante. Estos datos sugerían el papel diferenciador de este TF en la regulación de *AtTrxo1* dependiendo de las condiciones ambientales, de forma que en condiciones favorables actuaría como un regulador positivo de la *AtTrxo1*, mientras que en condiciones salinas su papel, analizando estos datos, no estaría del todo claro.

Con respecto al factor *AtAZF2*, su perfil de expresión durante la germinación en condiciones control fue opuesto al de *AtbZIP9* y al de *AtTrxo1*, alcanzando una expresión máxima en las primeras horas de la germinación para disminuir con el tiempo de imbibición (Fig. 42A). Además, en condiciones de salinidad, el perfil de expresión de *AtAZF2* siguió siendo inverso al de *AtTrxo1*. Estos resultados apoyan el posible papel de este TF como represor transcripcional de *AtTrxo1* durante la germinación tanto en condiciones control como salinas.



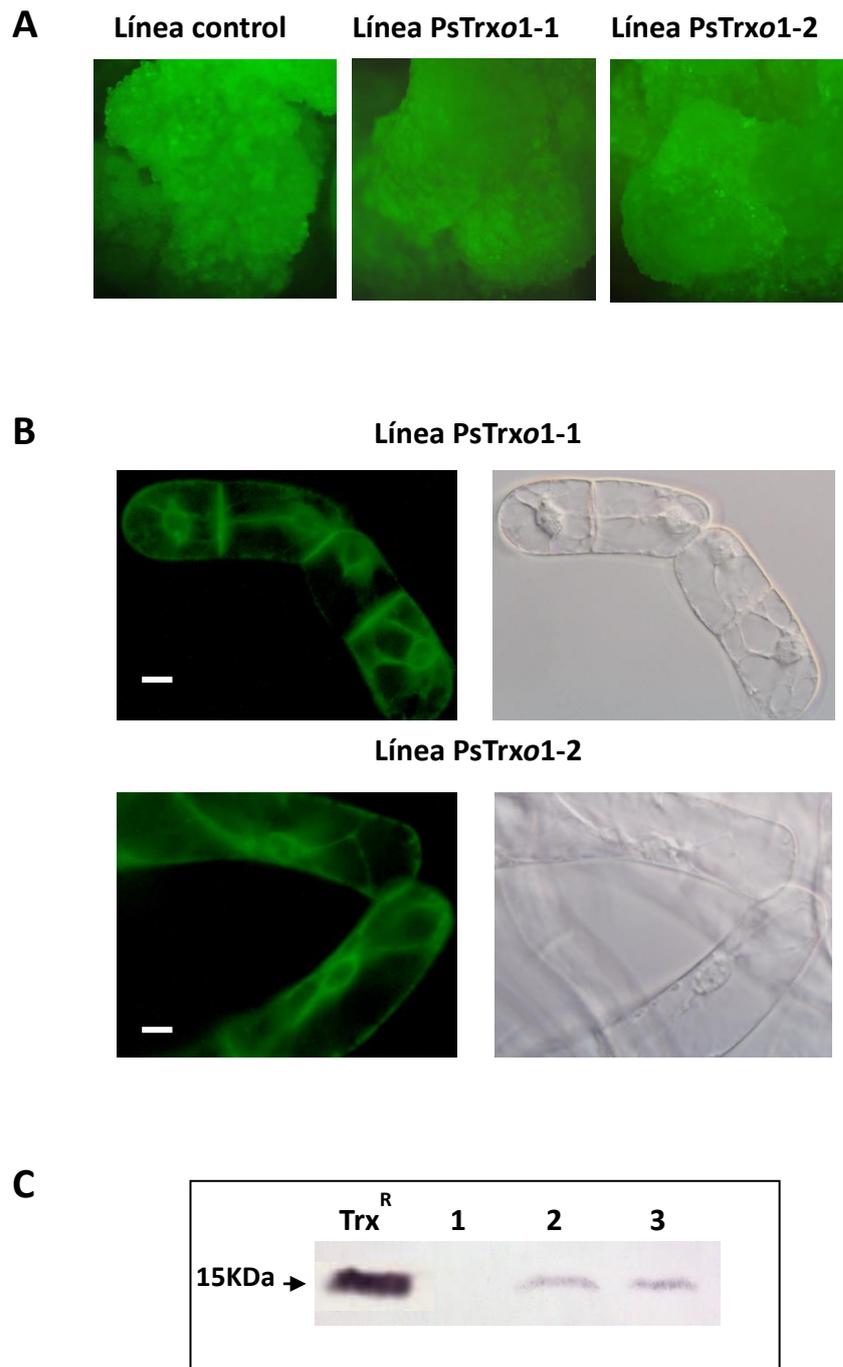
**Figura 42:** Perfil de expresión de los genes *AtAZF2* (A), *AtbZIP9* (B) y *AtTrxo1* (C) durante la germinación de la semilla en condiciones control y salinas. Las semillas fueron recogidas a diferentes tiempos de imbibición 12, 24, 36, 48, 60 y 72 h. Los niveles de transcritos se han estandarizado con respecto a los niveles de expresión del gen *ACT8* (%). Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Las letras distintas indican diferencias significativas para  $p<0,05$  (Test de Tukey) en C (mayúsculas) y T (minúsculas). Abreviaturas: C: condición control, T: condición de tratamiento con 100 mM NaCl.

## 4. Estudio funcional de PsTrxo1 en cultivos celulares de tabaco (*Tobacco Bright Yellow, TBY-2*) sobre expresantes

### 4.1. Caracterización del sistema

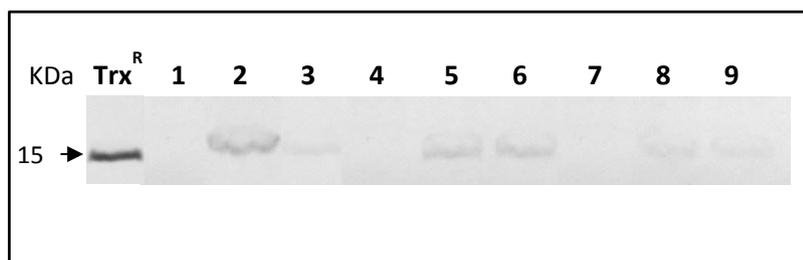
#### 4.1.1. Selección de líneas sobre-expresantes de la proteína PsTrxo1 en células TBY2

Con el objetivo de avanzar en los estudios de función de Trxo1, se obtuvieron líneas de células de tabaco BY-2 sobre-expresantes de la proteína PsTrxo1. El protocolo detallado se encuentra en la sección 1.4.2 de Materiales y Métodos. De forma sucinta, la secuencia completa de ADNc codificante del gen *Trxo1* de guisante se introdujo en un vector (Fig. S2) bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S y con el gen reportero de la proteína verde fluorescente (GFP) como segundo marcador de selección, fusionado a un péptido señal de retículo endoplásmico (RE). Las células de tabaco se transformaron con los clones de *A. tumefaciens* que contenían la construcción mencionada y la selección de los callos positivos para la transformación se hizo mediante la detección de la fluorescencia emitida por la proteína GFP. De las distintas líneas de callo sobre-expresantes se escogieron dos (PsTrxo1-1 y PsTrxo1-2) (Fig. 43A) que posteriormente se subcultivaron para su establecimiento en medio líquido como cultivo celular. La fluorescencia verde coincidió con la localización de la GFP en el RE (Fig. 43B). Además, la sobre-expresión de la proteína PsTrxo1 en estos callos se verificó por análisis de western blot, usando el anticuerpo anti-PsTrxo1 obtenido en conejo frente a un péptido de la proteína de guisante (Martí y col., 2009). Este anticuerpo reconocía la presencia de la proteína recombinante PsTrxo1 de 15kDa, usada como control positivo, así como una banda proteica del mismo tamaño en las líneas sobre-expresantes (Fig. 43C). Finalmente, la estabilidad de la transformación en los cultivos celulares se verificó por western blot a lo largo de sucesivos ciclos de crecimiento.



**Figura 43: Líneas TBY2 sobreexpresantes de PsTrx01.** (A) Aspecto de los callos transformados bajo la lupa. (B). Análisis de western blot sobre callos transformados. Calle 1: PsTrx01 recombinante, calle 2: línea control-GFP, calle 3: línea sobre-expresante PsTrx01-1, calle 4: línea sobre-expresante PsTrx01-2. La cantidad de proteína usada en cada calle fue de 2,5  $\mu\text{g}$  (calle 1) y de 30  $\mu\text{g}$  (calles 2, 3, 4). La flecha indica el tamaño de la proteína. (C) Visualización de las células TBY2 transformadas con el microscopio de fluorescencia y contraste de fases. La barra de calibrado representa 100 $\mu\text{m}$ .

La identificación parcial de la proteína a nivel organelar en las líneas sobre-expresantes se realizó mediante la obtención de diferentes fracciones subcelulares enriquecidas en mitocondrias, plastos, núcleo y citoplasma. El análisis de dichas fracciones en las líneas sobre-expresantes de PsTrx01 reveló la presencia de la proteína principalmente en mitocondrias, siendo su contenido más reducido en plastos y núcleo (Fig. 44).

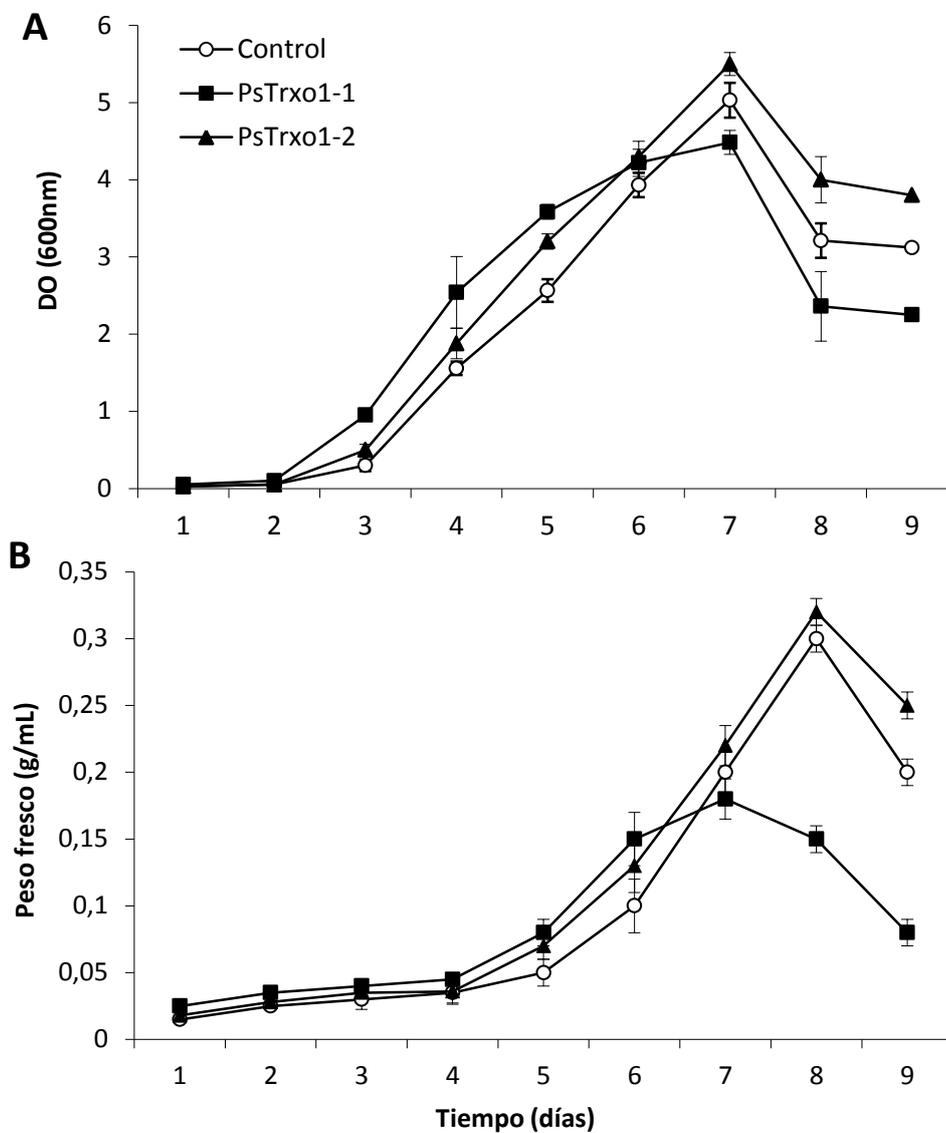


**Figura 44: Presencia de PsTrx01 a nivel subcelular.** Detección por western blot de PsTrx01 en fracciones celulares en las líneas sobre-expresantes PsTrx01-1, PsTrx01-2 y la línea control a día 7 del ciclo celular. Trx<sup>R</sup>: Tiorredoxina 01 recombinante; Calle 1: fracción plastidial línea control; Calle 2: fracción plastidial línea PsTrx01-1; Calle 3: fracción plastidial PsTrx01-2; Calle 4: fracción mitocondrial línea control; Calle 5: fracción mitocondrial línea Trx01-1; Calle 6: fracción mitocondrial PsTrx01-2; Calle 7: fracción nuclear línea control; Calle 8: fracción nuclear línea PsTrx01-1; Calle 9: fracción nuclear PsTrx01-2. Cada fracción contenía 30  $\mu$ g de proteína.

#### 4.1.2. Efecto de la sobre-expresión de PsTrx01 en el crecimiento celular

Con objeto de estudiar el efecto de la sobre-expresión de PsTrx01 sobre el crecimiento celular, se analizó la cinética de crecimiento de las células transformantes escogidas por el método de densidad óptica o turbidez de los cultivos a 600 nm, lo que nos permitió hacer un seguimiento de los cultivos semana tras semana (Fig. 45A). No obstante, también se utilizó el peso fresco como indicador de la cinética de crecimiento. Las curvas de crecimiento entre líneas fueron similares cuando se analizaba a través de la medida de turbidez (Fig. 45A), sin embargo, diferían ligeramente si teníamos en cuenta el peso fresco (Fig. 45B), si bien, en ambos métodos obtuvimos un ciclo de vida entre siete y ocho días con una fase basal o de latencia de 3-4 días, una fase exponencial de 2-3 días, una fase estacionaria de 1-2 días y una fase de senescencia de 4-5 días (Fig. 45B). El paralelismo encontrado entre las líneas sobre-

expresantes en la dinámica de crecimiento celular durante la fase exponencial con la línea control, nos condujo a seleccionar una sola línea mutante para los ensayos posteriores.



**Figura 45: Curvas de crecimiento de la línea control y de las sobre-expresantes.** Medidas durante 9 días tras el subcultivo en base al parámetro densidad óptica (DO) a 600nm **(A)** y peso fresco en gr/ml **(B)**. Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar de tres experimentos diferentes.

## 4.2. Efecto del peróxido de hidrógeno en la viabilidad de los cultivos celulares TBY-2

El uso del peróxido de hidrógeno como inductor de muerte celular en vegetales está ampliamente documentado en la literatura (Houot *y col.*, 2001; de Pinto *y col.*, 2006). A pesar de la interrelación existente entre Trx y muerte celular descrita en animales, la escasa información relativa a esta relación en células vegetales, nos condujo a plantear el papel específico de PsTrxo1 en los procesos de muerte celular inducidos por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Para ello, a partir del día cinco de crecimiento (fase exponencial), las líneas de células TBY-2 descritas, se sometieron a un tratamiento con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El análisis de viabilidad tras el tratamiento, nos permitió identificar grandes diferencias en las primeras 2, 24, 48 y 72 h, de forma que la severidad del tratamiento se vio reflejada en una disminución proporcional de la viabilidad en estos puntos. Sin embargo, cuando comparamos los efectos sobre la línea control y sobre-expresante, estas diferencias no eran exactamente iguales en ambas líneas. Concentraciones de 15 mM no plantearon diferencias en el porcentaje de viabilidad en ambas líneas, siendo ésta de un 80% tras 72 h de tratamiento. A concentraciones superiores a 35 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la línea control presentó una viabilidad de un 55% a las dos horas de tratamiento, mientras que la sobre-expresante mantenía un 70%. A las 72 h de tratamiento, no se detectaron células viables en la línea la línea, mientras que la sobre-expresante aún mantenía valores de viabilidad que oscilaban en torno a un 50-60%. Estas diferencias también se observaron con concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 45 mM. En este caso, el 100% de células de la línea control morían tras 24 h de tratamiento, mientras que las sobre-expresantes morían dos días después (Fig. 46). En todos los casos, las diferencias en viabilidad entre las células tratadas a las distintas concentraciones de peróxido y la viabilidad observada en la condición de no tratamiento eran muy significativas.

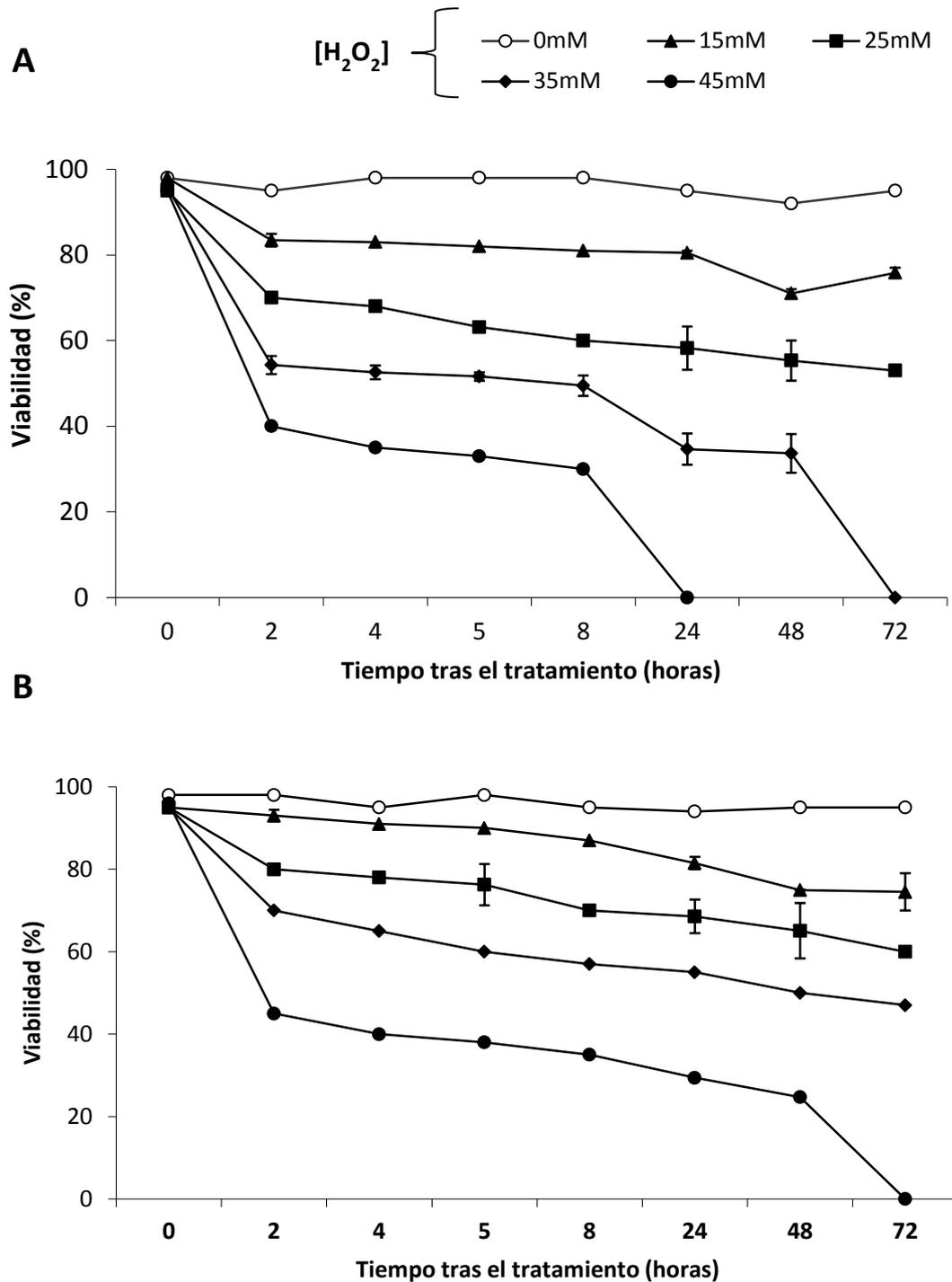


Figura 46: Curvas de viabilidad de células TBY-2 de la línea control (A) y sobre-expresante Trxo1-1 (B) a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno a lo largo del tiempo. Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar (n=4).

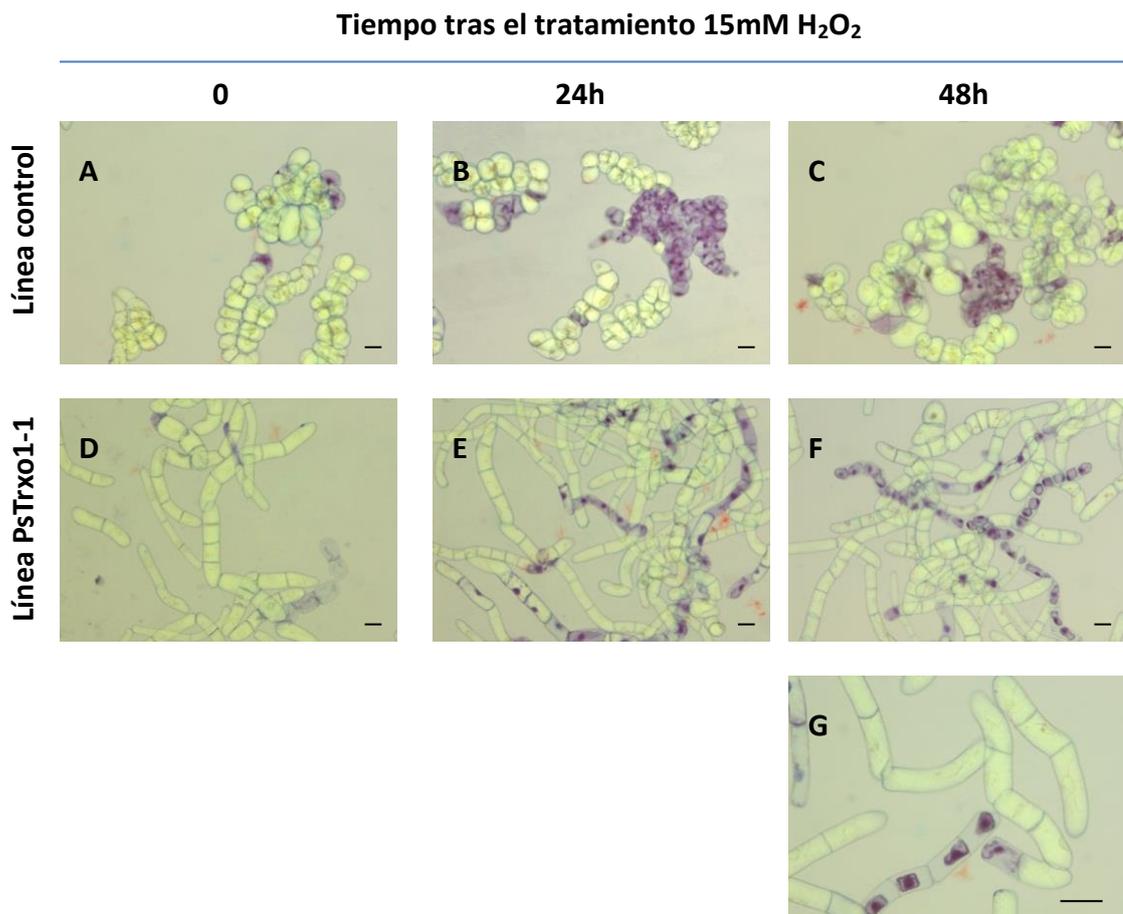
### 4.3. Estudio de PsTrx01 bajo condiciones de tratamiento con 15 mM de peróxido de hidrógeno.

Tal y como se observa en la Figura 45, una concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 15 mM originó una disminución del 15% en el porcentaje de viabilidad de la línea control y sobre-expresante sin afectar al ciclo de crecimiento celular. Con el fin de estudiar el comportamiento de PsTrx01 ante un tratamiento moderado de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se analizaron tanto parámetros de metabolismo oxidativo como marcadores de muerte celular y se analizó cómo mecanismos de muerte celular programada (PCD) y/o un estrés oxidativo podrían participar en la pérdida de viabilidad observada.

#### 4.3.1. Marcadores citológicos de PCD

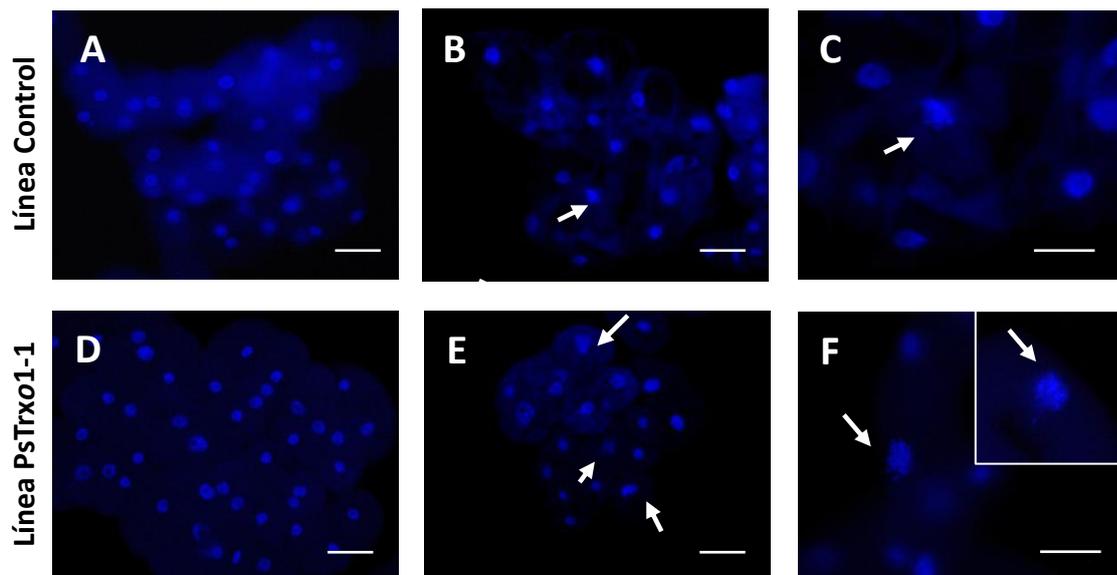
##### 4.3.1.1. Constricción del citoplasma y condensación de la cromatina

El proceso de la PCD produce numerosas señales morfológicas en las células afectadas. La pérdida del volumen celular como consecuencia del desbalance osmótico originado por la señal de estrés, causa una constricción citoplasmática característica (del inglés, *shrinkage*) y visible con el colorante vital Tripán Blue<sup>R</sup>. Este colorante es capaz de incorporarse a las células muertas y no a las células vivas, ya que éstas últimas poseen un transportador activo capaz de expulsar el colorante al medio extracelular. Las primeras señales de *shrinkage* se observaron 48 h después del tratamiento con peróxido de hidrógeno 15 mM en la línea sobre-expresante (Fig. 47F, G), mientras que en la línea control se observaron células muertas con un citoplasma extendido, sin señales evidentes de constricción (Fig. 47).



**Figura 47:** Células TBY-2 a distintos tiempos de tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15mM y teñidas con el colorante vital Tripán Blue. **(A)** Línea control no tratada a tiempo cero. **(B)** Línea control 24h después del tratamiento. **(C)** Línea control 48h después del tratamiento. **(D)** Línea sobre-expresante PsTrxo1-1 a tiempo cero. **(E)** Línea sobre-expresante PsTrxo1-1 24h después del tratamiento. **(F)** Línea sobre-expresante PsTrxo1-1 48 h después del tratamiento. **(G)** Detalle de línea sobre-expresante tras 48h de tratamiento. La barra de calibrado tiene una longitud de 100  $\mu$ m.

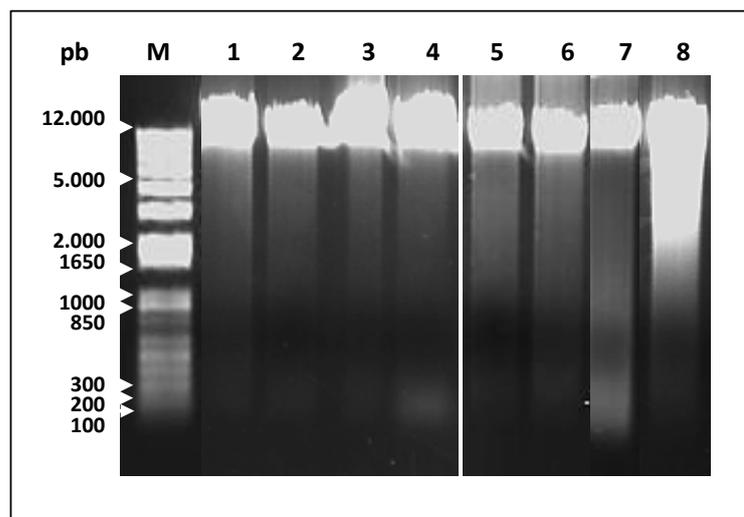
Durante la ejecución de la PCD, la cromatina sufre un cambio de fase desde una red heterogénea, genéticamente activa a un estado muy condensado, inerte, fragmentada y organizada en pequeñas vesículas llamadas micronúcleos. Tanto la línea control como la sobre-expresante presentaron micronúcleos a partir de las 48 h, si bien la frecuencia de aparición fue mayor en la línea sobre-expresante (Fig. 48).



**Figura 48: Núcleos de células TBY2 teñidos con DAPI. (A)** Células línea control no tratadas. **(B)** y **(C)** Células línea control 48h después del tratamiento. **(D)** Células línea sobre-expresante no tratadas. **(E)** y **(F)** Células línea sobre-expresante 48 h después del tratamiento. Las flechas indican la presencia de micronúcleos. *Las barra de calibrado corresponde a 100  $\mu$ m.*

#### 4.3.1.2. Fragmentación de ADN

La activación de endonucleasas específicas es una señal típica de PCD tanto en animales como en plantas. Estas nucleasas degradan el ADN cromosómico hidrolizando los enlaces fosfodiéster de los nucleótidos presentes entre los nucleosomas de la cromatina. Dado que la longitud internucleosomal es de 180-185 pb, los fragmentos generados tienen un tamaño múltiplo de esta longitud. En una electroforesis en gel de agarosa los distintos fragmentos de ADN se separan generando un patrón similar a una escalera (*laddering*), donde los fragmentos más pequeños se sitúan abajo en el gel y los más pesados arriba. Analizando nuestros resultados, observamos la integridad del ADN tanto en la línea control como en la sobre-expresante, que se muestra como una sola banda de 12kb al inicio del tratamiento. Sin embargo, en la línea sobre-expresante, el ADN también se resolvió como una sola banda de 12kb a las 48 h, pero estaba parcialmente degradado tras 72 h de tratamiento, sin una evidencia clara de *laddering* (Fig. 49).



**Figura 49: ADN genómico extraído de cultivos celulares.** Calle 1: línea control sin tratar 48 h, calle 2: línea control tratada con 15 mM  $H_2O_2$  tras 48 h, calle 3: línea control sin tratar 72 h, calle 4: línea control tratada 72 h. Calle 5: línea sobre-expresante sin tratar 48 h, calle 6: línea sobre-expresante tratada 48h, calle 7: línea sobre-expresante sin tratar 72 h, calle 8: línea sobre-expresante tratada 72 h. *En cada calle se cargaron 10  $\mu g$  de ADN.*

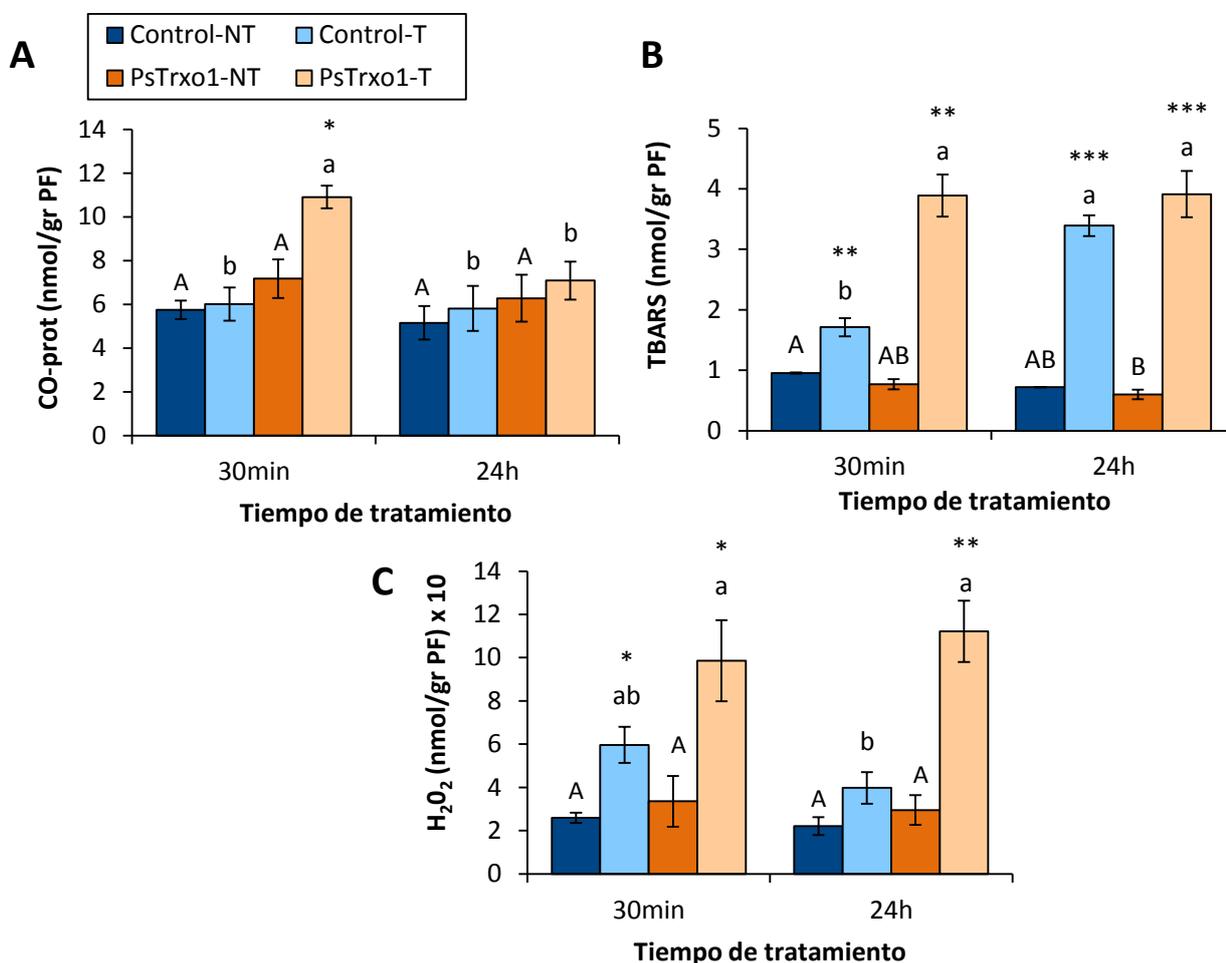
### 4.3.2. Marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo

#### 4.3.2.1. Carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y peróxido de hidrógeno

La capacidad de la línea control y sobre-expresante para tolerar el estrés oxidativo generado es otra característica que medimos analizando parámetros oxidativos. Basándonos en el estudio de viabilidad observamos que tanto la línea control como la sobre-expresante respondieron igual al tratamiento de 15 mM de  $H_2O_2$  y sus niveles de estrés oxidativo en términos de peroxidación lipídica, y contenido en  $H_2O_2$  fueron similares aunque ligeramente superiores en la línea sobre-expresante, tal y como se describirá a continuación.

Los niveles de proteínas oxidadas se midieron como la cantidad de grupos carbonilo en la fracción proteica total y en ambas líneas sin tratar, se mantuvieron parecidos a lo largo del tiempo. El tratamiento no modificó los niveles de proteínas oxidadas en la línea control,

mientras que en la línea sobre-expresante se observó un aumento de un 35% a los 30 min que fue compensado eficientemente tras 24 h, para volver a los niveles basales (Fig. 50A).



**Figura 50: Parámetros oxidativos en células TBY-2 control y sobre-expresantes en condiciones de no tratamiento y de tratamiento con 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Peroxidación lipídica, (B) carbonil proteínas, (C) peróxido de hidrógeno. Los valores equivalen a la media  $\pm$  error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,05$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.

Los peróxidos lipídicos, medidos como la cantidad del complejo malondialdehido-tiobarbitúrico (MDA-TBAR), fueron similares entre la línea control y sobre-expresante en la condición de no tratamiento. El tratamiento provocó un aumento significativo de los mismos

hasta las 24 h en ambas líneas, siendo este aumento tres veces superior en la línea sobre-expresante con respecto al control a los treinta minutos (Fig. 50B).

Paralelamente, se analizó el nivel de  $H_2O_2$  intracelular, que en condiciones de no tratamiento fue similar en ambas líneas a lo largo del periodo de estudio analizado. Sin embargo, como resultado del tratamiento, el contenido de peróxido aumentó más del doble en ambas líneas a los 30 min, aumento que permaneció estable en el caso de la línea sobre-expresante y disminuyó a los niveles basales tras 24 h en la línea control (Fig. 50C).

### **4.3.3. Metabolismo redox**

#### **4.3.3.1. Medida de ascorbato y glutatión**

Es bien sabido que diferentes estreses abióticos pueden causar cambios característicos en la cantidad y estado redox de los principales metabolitos antioxidantes de la célula ASC y GSH. Por esta razón, examinamos la variación de estos metabolitos después de un tratamiento inductor de estrés oxidativo por  $H_2O_2$ .

Los resultados revelaron que en condiciones de no tratamiento, los contenidos de ASC total (suma de las formas oxidadas y reducidas) y el estado redox (medido como la razón ascorbato reducido/ascorbato total) variaban ligeramente entre líneas pero sin diferencias significativas (Tabla 20). La exposición a 15mM de  $H_2O_2$  disminuyó los niveles de ASC total en ambas líneas debido fundamentalmente a una disminución de la forma reducida ya que se producía un aumento de la oxidada, aunque se encontraron diferencias entre las líneas (Fig. 51A). En la línea control la razón ASC/ASCt disminuyó alrededor de un 50% con el tratamiento debido a un aumento de DHA, mientras que en la línea sobre-expresante la disminución en la razón ASC/ASCt fue aproximadamente un 35%, indicando que la línea sobre-expresante mantenía el estado redox del ascorbato más balanceado en condiciones de estrés oxidativo que la línea control (Tabla 20).

Con respecto al glutatión, en condiciones de no tratamiento, su contenido total fue alrededor de dos veces y media mayor en la línea control que en la sobre-expresante debido a los niveles de GSH reducido y de oxidado (GSSG). El tratamiento provocó en ambas líneas

una disminución del glutatión total y del estado redox por un aumento en el contenido de GSSG y una disminución en el GSH (Fig. 51B), (Tabla 20).

**Tabla 20: Ascorbato y Glutatión totales y estado redox de ambos antioxidantes en células TBY-2 control y sobre-expresantes en condiciones de no tratamiento (NT) y de tratamiento (T) con 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Abreviaturas ASC: ascorbato reducido, DHA: deshidroascorbato, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.**

Línea-Tratamiento	ASCORBATO TOTAL		REDOX	
	ASC+DHA		ASC/ASC <sub>T</sub>	
	30min	24h	30min	24h
Control-NT	8,70 ± 0,03	8,89 ± 0,83	0,8412	0,7312
Control-T	2,08 ± 0,03	4,65 ± 0,14	0,4205	0,4068
PsTrxo1-1-NT	9,90 ± 0,20	10,61 ± 0,12	0,9336	0,9126
PsTrxo1-1-T	1,54 ± 0,02	6,62 ± 0,28	0,6190	0,8365

Línea-Tratamiento	GLUTATIÓN TOTAL		REDOX	
	GSH+GSSG		GSH/GSH <sub>T</sub>	
	30min	24h	30min	24h
Control-NT	38,10 ± 1,78	32,32 ± 0,13	0,9977	0,9984
Control-T	12,82 ± 0,43	16,99 ± 0,05	0,9908	0,9858
PsTrxo1-1-NT	13,07 ± 0,17	12,32 ± 0,32	0,9997	0,9998
PsTrxo1-1-T	7,40 ± 0,07	6,70 ± 0,03	0,9988	0,9995

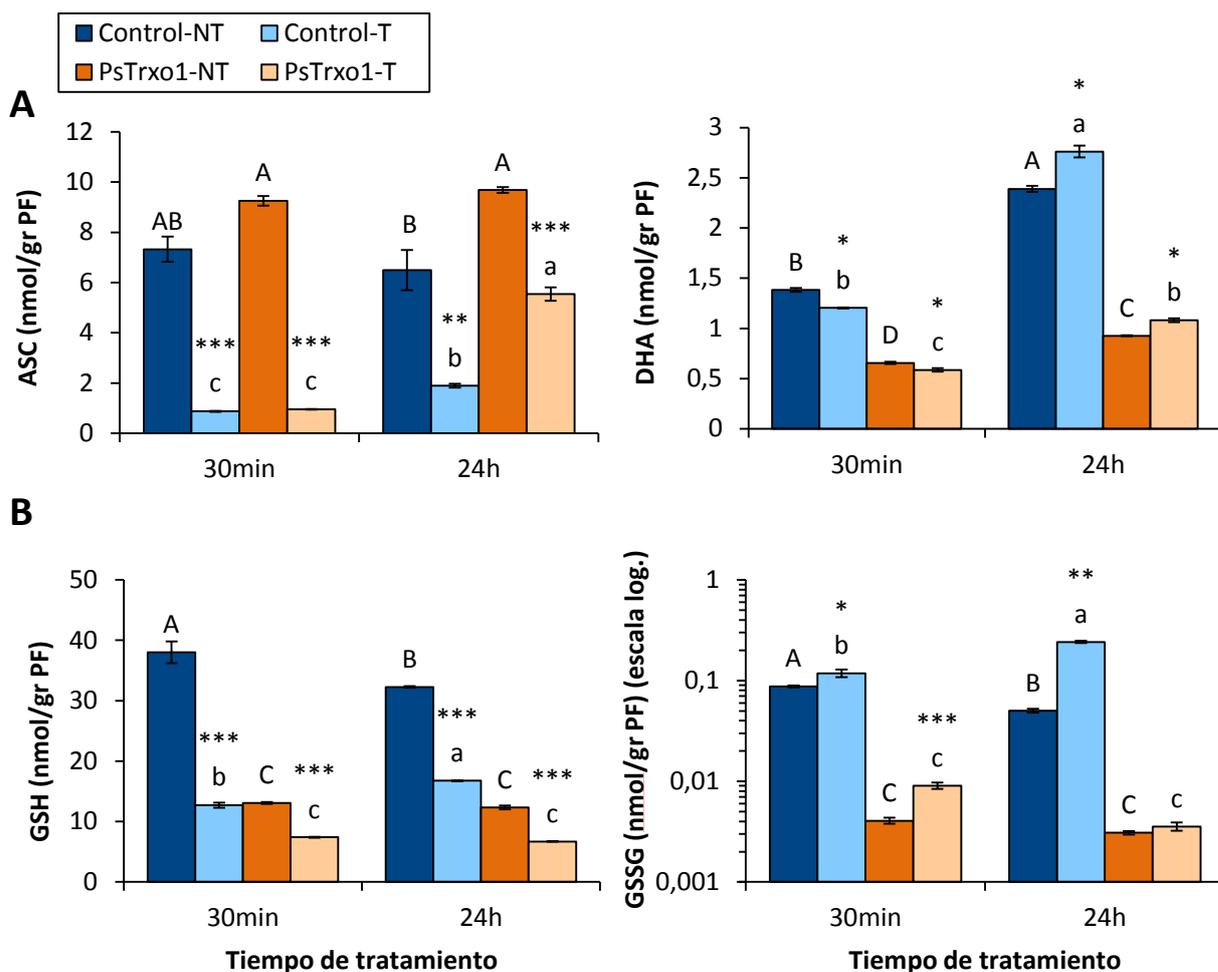


Figura 51: Ascorbato reducido (ASC) y oxidado (DHA) (A), glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) en cultivos de células TBY-2 control y sobre-expresantes a 30 min y 24 h tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno 15 mM. Los valores equivalen a la media  $\pm$  el error estándar ( $n=3$ ). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p<0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p<0,05$  (\*);  $p<0,01$  (\*\*);  $p<0,001$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.

#### 4.3.3.2. Medida de la actividad catalasa y de las enzimas del ciclo ascorbato-glutatión

El metabolismo del peróxido de hidrógeno intracelular es fundamental debido al papel señalizador del  $H_2O_2$  en diversos procesos metabólicos, incluida la PCD y la tolerancia al estrés. De los principales sistemas eliminadores de  $H_2O_2$ , destacamos las enzimas catalasa y

APX. Cuando analizamos la actividad catalasa y APX no se observaron diferencias en ausencia de tratamiento entre ambas líneas, si bien, la línea sobre-expresante presentaba en general una menor actividad (Fig. 52). La exposición de las células al tratamiento 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó una disminución en la actividad de ambas enzimas. La actividad CAT disminuyó alrededor de un 40% en la línea sobre-expresante y un 66% en la línea control a las 24 h. La actividad APX disminuyó bruscamente a los 30 min, mientras que a las 24 h estas diferencias se suavizaron, recuperándose el 50% de la actividad basal.

De la misma forma, también se analizaron el resto de las actividades enzimáticas del ciclo ASC-GSH, como MDHAR, DHAR y GR. En condiciones de no tratamiento destacó el mayor nivel de actividad GR en la línea sobre-expresante a los 30 min estabilizándose a nivel de la línea control a las 24h. El tratamiento con peróxido de hidrógeno no tuvo efecto en la actividad MDHAR y GR mientras que la actividad DHAR presentó un descenso de un 20% a los 30 min y un 50% a las 24 h, y no se encontraron diferencias significativas entre las líneas (Fig. 52).

En conclusión, el tratamiento de peróxido produjo una bajada importante en la actividad de las enzimas CAT, APX y DHAR. Esta bajada fue acusada a corto plazo solamente en APX y de forma similar entre líneas, sin embargo, tras 24 h se observó también una disminución en la actividad CAT y DHAR, siendo esta bajada similar en ambas líneas en el caso de la enzima DHAR y menor en la línea sobre-expresante que la encontrada en la línea control, en el caso de CAT.

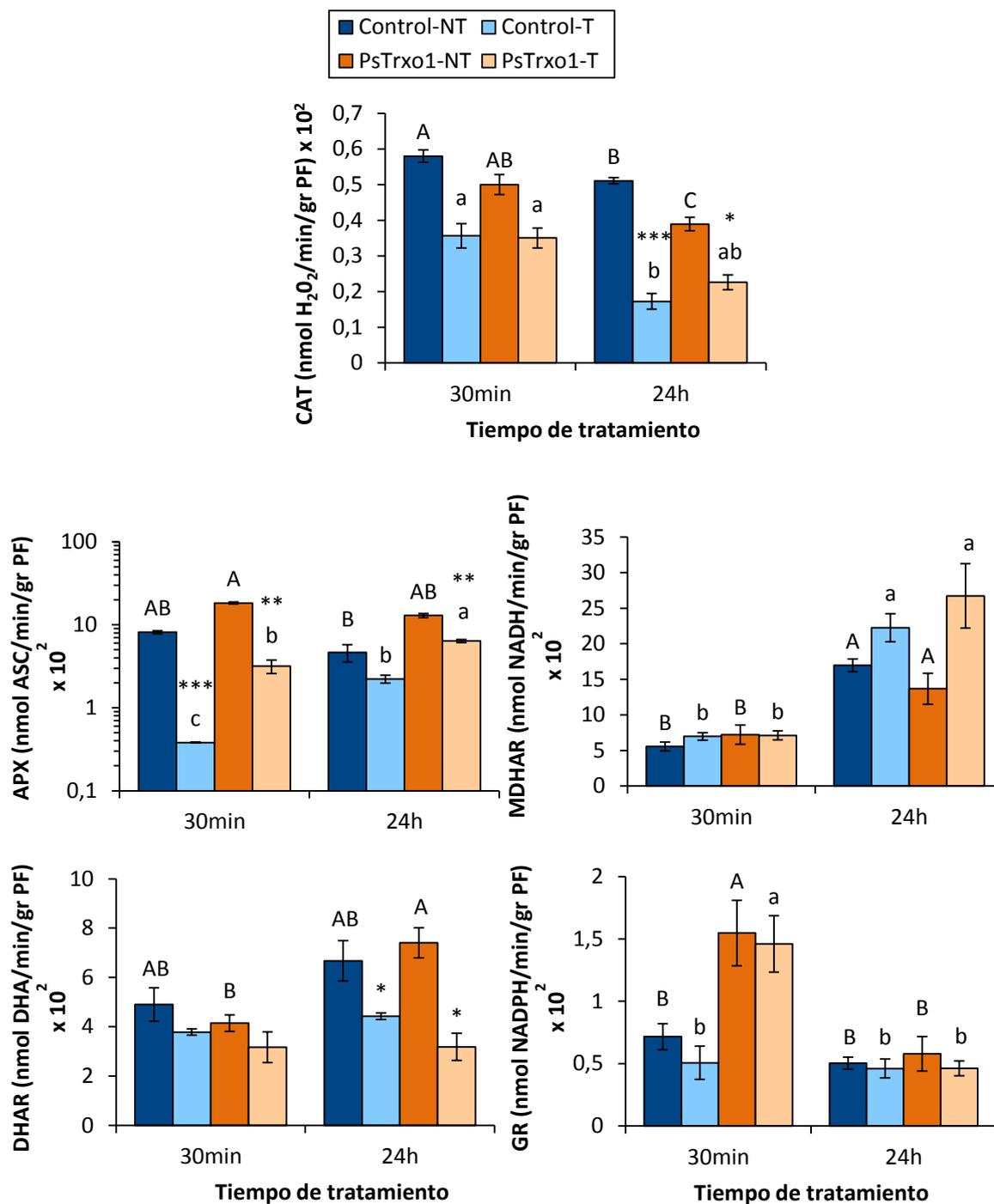


Figura 52: Medida de la actividad de la enzima catalasa (Cat) y de las enzimas del ciclo ASC-GSH en cultivos celulares TBY-2 control y sobre-expresantes a 30 min y 24 h tras el tratamiento con 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los valores equivalen a la media  $\pm$  error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para p<0,05 (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p<0,001 (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.

#### **4.4. Estudio de PsTrxo1 bajo una condición de 35 mM de peróxido de hidrógeno.**

##### **4.4.1. Viabilidad celular**

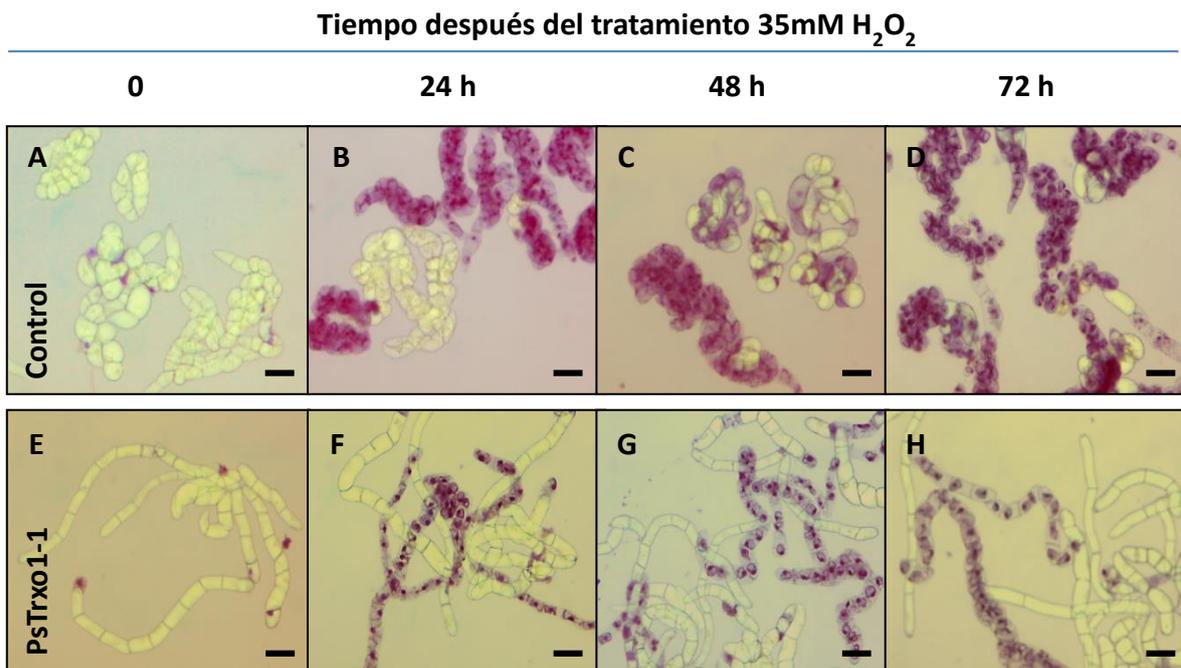
La aplicación de una concentración de peróxido de hidrógeno 35 mM produjo una disminución evidente en la viabilidad de las líneas utilizadas. Esta disminución no fue paralela en ambas líneas y a las 72 h después del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se observaron las mayores diferencias, y mientras en la línea control todas las células estaban muertas, en las líneas sobre-expresantes todavía había un 60% de células viables.

##### **4.4.2. Marcadores citológicos de PCD**

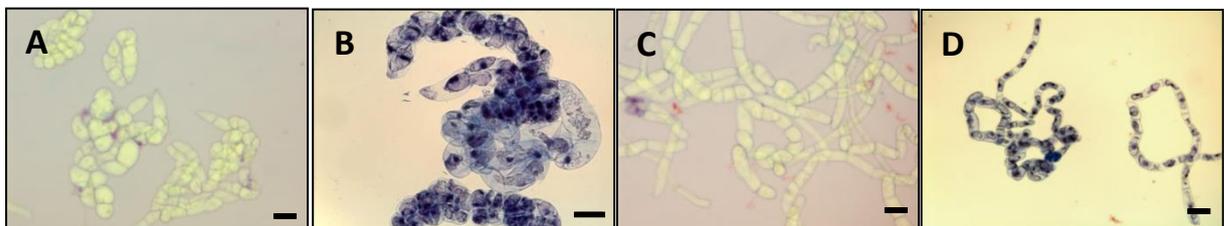
###### **4.4.2.1. Constricción citoplasmática**

El análisis de constricción del citoplasma reveló que a partir de las 24 h, la línea sobre-expresante comenzó a presentar un alto porcentaje de células muertas con este aspecto, mientras que en la línea control, esta constricción se hizo evidente solo en algunas células a las 72 h (Fig. 53), coincidiendo con una condición similar a la necro-apoptosis.

A fin de comprobar si la muerte celular iniciada en ambas líneas se mantenía si eliminábamos la limitación de nutrientes, se procedió a subcultivar en medio fresco ambas líneas a un mismo porcentaje de viabilidad (63%). La Fig. 54 muestra que ambas líneas acababan muriendo, si bien en la línea sobre-expresante esta muerte se retrasaba tres días con respecto a la línea control.



**Figura 53:** Células TBY-2 visualizadas al microscopio óptico teñidas con el colorante vital Tripán Blue. (A) Línea control a tiempo cero (A), 24 h (B) y 48 h (C) y 72 h (D) tras el tratamiento de peróxido de hidrógeno. Línea PsTrxo1-1 a tiempo cero (E), 24 h (F), 48 h (G) y 72 h (H) tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno. La barra de calibrado tiene una longitud de 100  $\mu$ m.

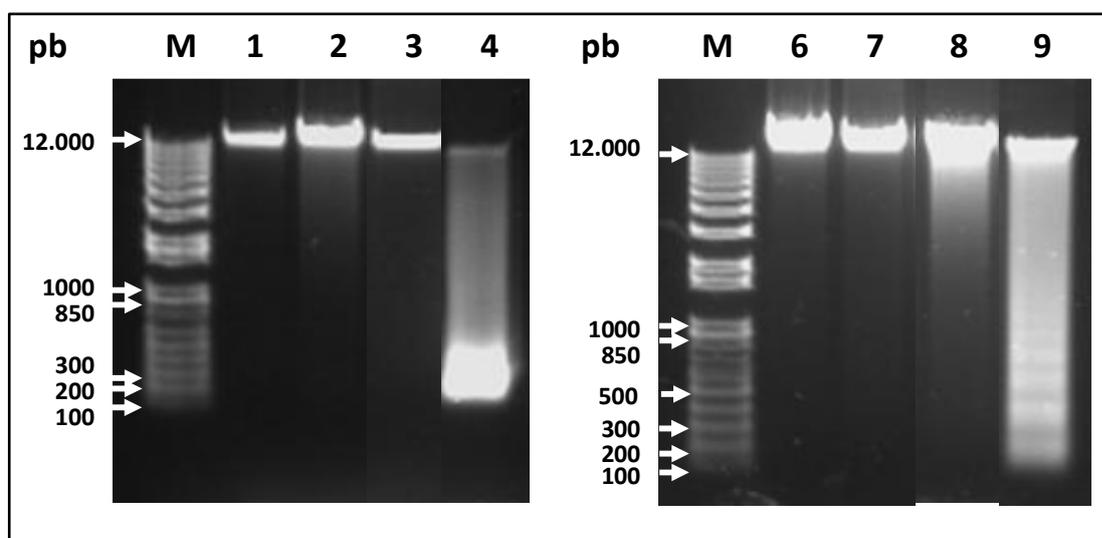


**Figura 54:** Viabilidad celular medida con Trypan Blue en línea control y sobre-expresante tras subcultivo a medio fresco. Imágenes obtenidas tras 6 días desde el subcultivo. (A) Control sin tratar. (B) Control tras tres días de tratamiento con 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Sobre-expresante sin tratar. (D) Sobre-expresante tras seis días de tratamiento. La marca de calibración corresponde a 100  $\mu$ m.

#### 4.4.2.2. Fragmentación de ADN

A fin de profundizar en la muerte celular programada a los diferentes tiempos después de un tratamiento con 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, examinamos el ADN genómico extraído de los cultivos celulares. La extracción del ADN de las células en condiciones control originó una banda de

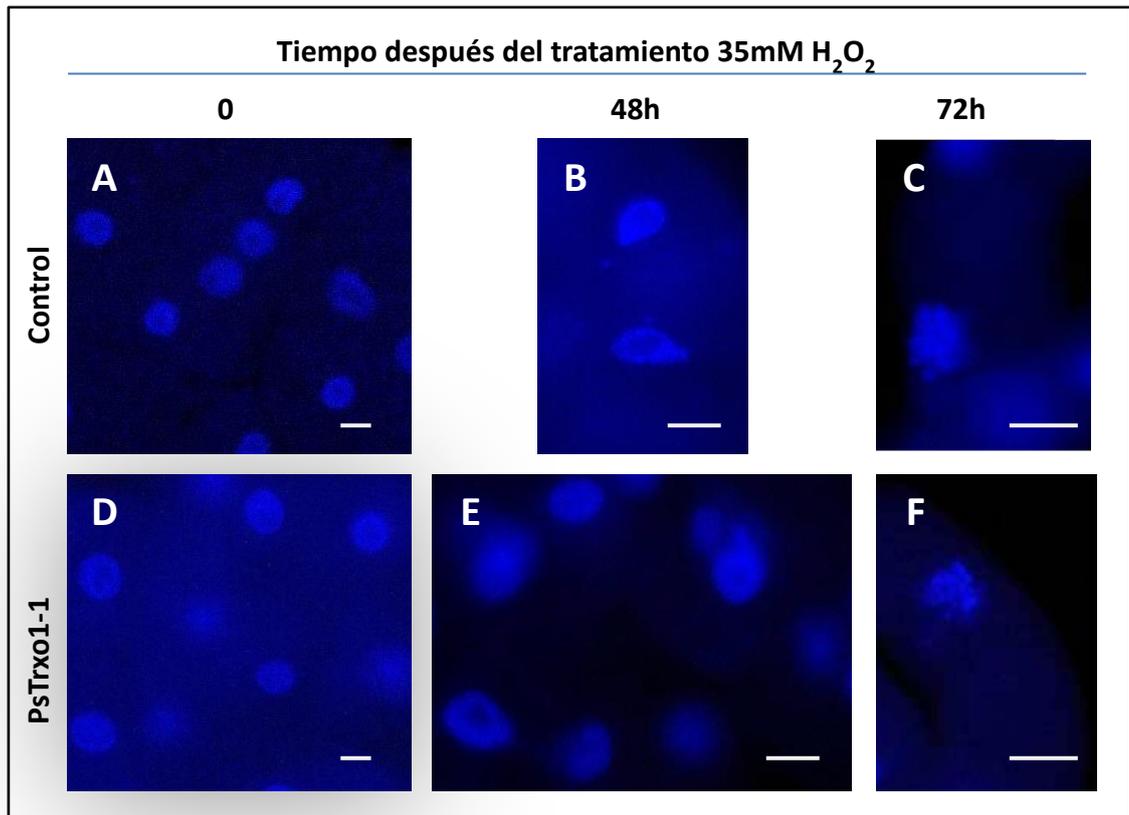
alto peso molecular (>10.000 pb) en un gel de agarosa al 1%, correspondiente al ADN genómico íntegro. Sin embargo, el tratamiento provocó la acumulación de diferentes fragmentos oligonucleosomales de ADN en las células muertas de la línea sobre-expresante. A las 72h de tratamiento, en la línea control, el ADN aparecía completamente degradado como una banda de bajo peso molecular, probablemente debido a un proceso de muerte celular anterior, mientras que la línea sobre-expresante presentaba un patrón de fragmentación tipo *laddering* claramente evidente (Fig. 55).



**Figura 55: Electroforesis de ADN genómico de cultivos celulares de la línea control (1-4) y sobre-expresante (6-9).** M. marcador de peso molecular. Línea control no tratada (1) y tratada (2) tras 30min de tratamiento; no tratada (3) y tratada (4) tras 72h de tratamiento. Línea sobre-expresante no tratada (6) y tratada (7) tras 30min de tratamiento. Línea sobre-expresante no tratada (8) y tratada (9) tras 72h de tratamiento. *Cada calle contiene 10  $\mu$ g de ADN.*

#### 4.4.2.3. Condensación de cromatina.

La tinción del núcleo de las células con el fluoróforo DAPI mostró algunas señales de organización apoptótica. A partir de las 48 h, se observaron núcleos pre-apoptóticos en ambas líneas (Fig. 56B y E), indicando una fase temprana de condensación de la cromatina. A las 72h se observó una condensación de la cromatina completa organizada en micronúcleos en la línea sobre-expresante (Fig. 56F) y en menor cantidad en la línea control (Fig. 56C).

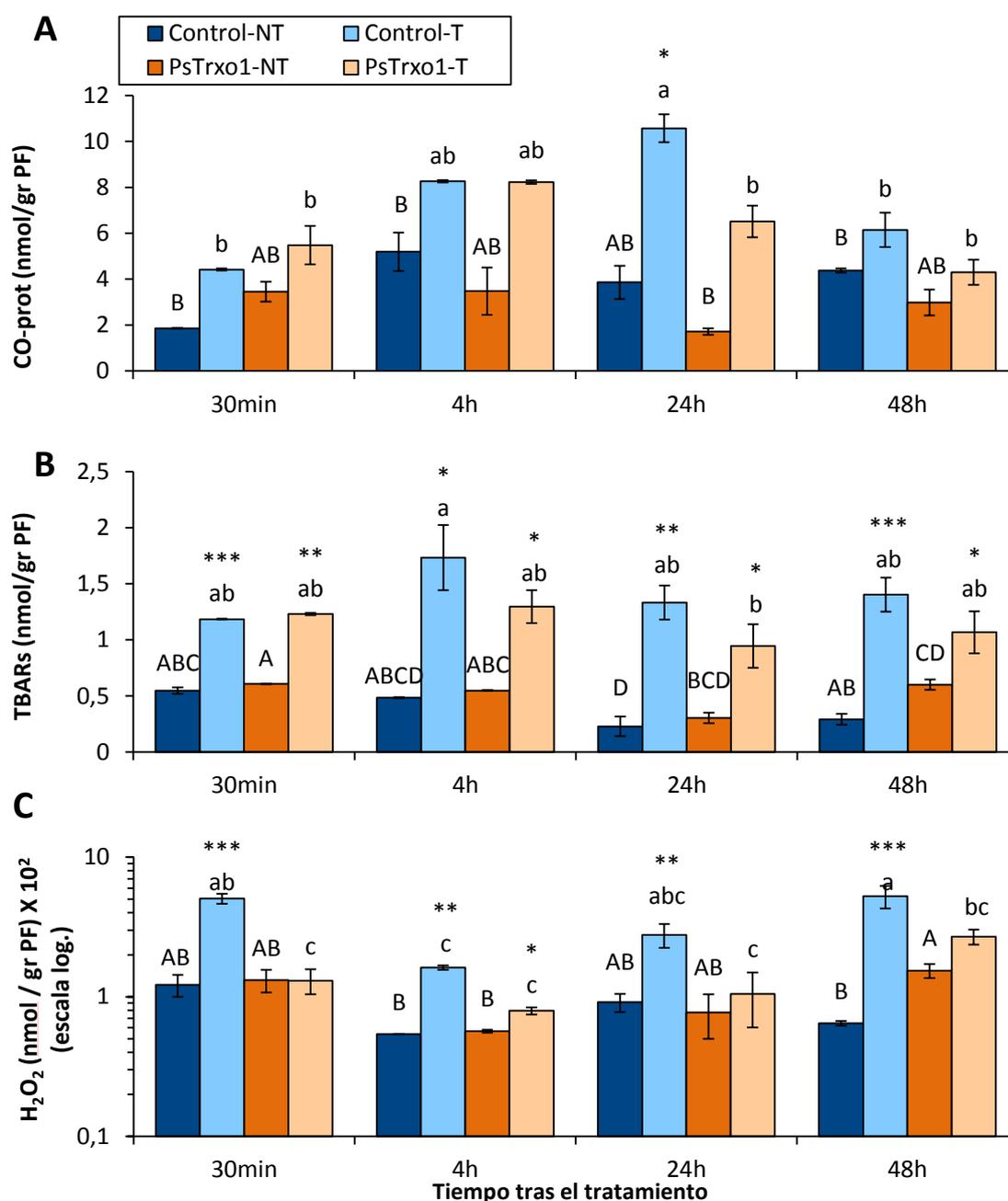


**Figura 56:** Tinción con el fluoróforo DAPI de los núcleos de células TBY-2. **(A)** Núcleos línea control sin tratar. **(B)** Núcleos pre-apoptóticos de la línea control tras 48 h de tratamiento. **(C)** Micronúcleos de la línea control tras 72h de tratamiento. **(D)** Núcleos línea sobre-expresante sin tratar. **(E)** Núcleos pre-apoptóticos de la línea sobre-expresante tras 48 h de tratamiento. **(F)** Micronúcleos de la línea sobre-expresante tras 72h de tratamiento. *Barra de calibrado: 25  $\mu$ m.*

#### 4.4.3. Marcadores de estrés oxidativo y nitrosativo

##### 4.4.3.1. Carbonilación de proteínas, peroxidación lipídica y peróxido de hidrógeno

Al igual que en los ensayos en los que se empleó una concentración 15 mM  $H_2O_2$  también en este tratamiento con una mayor concentración de  $H_2O_2$ , decidimos determinar distintos parámetros relacionados con el estrés oxidativo a los diferentes tiempos de exposición. Cuando comparamos los contenidos en carbonil proteínas entre líneas en condiciones de no tratamiento se observaron niveles similares entre ambas líneas (Fig 57A).



**Figura 57: Parámetros oxidativos en células TBY-2 control y sobre-expresantes en condiciones de no tratamiento y de tratamiento con 35mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Peroxidación lipídica, (B) carbonil proteínas, (C) peróxido de hidrógeno. Los valores equivalen a la media ± error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para p<0,05 (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p<0,001 (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.**

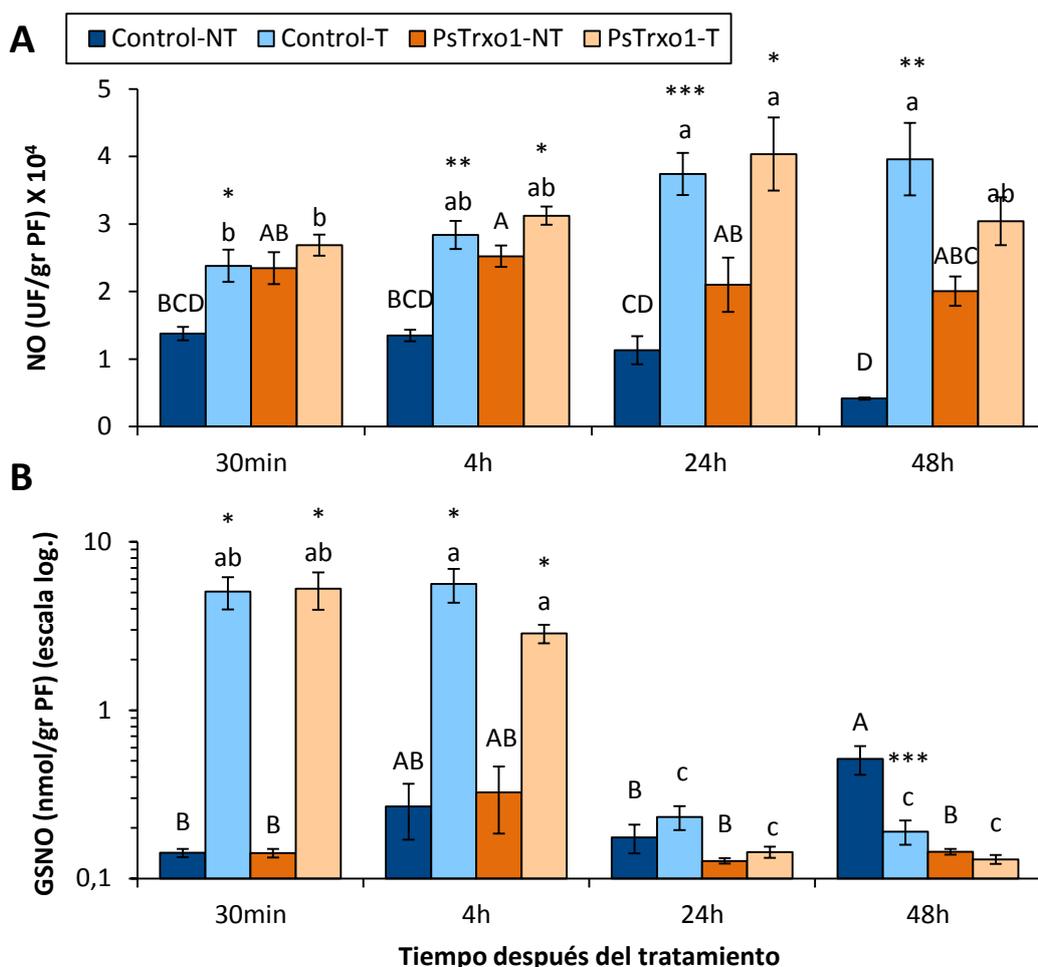
La exposición a 35mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó en general un aumento no significativo en los niveles de proteínas oxidadas en ambas líneas, con la excepción de la línea control a las 24h.. En términos de peroxidación lipídica, el tratamiento provocó un aumento significativo de los niveles de lípidos oxidados en ambas líneas, sin embargo, esta oxidación fue mayor en la línea control (Fig. 57B). De forma paralela a estos resultados, el contenido de peróxido de hidrógeno en la línea control fue dos veces superior al observado en la línea sobre-expresante a lo largo del tiempo (Fig. 57C). Por tanto, el nivel de estrés oxidativo fue mayor en la línea control que en la sobre-expresante, lo que podría justificar las diferencias en viabilidad observadas tras el tratamiento.

#### 4.4.3.2. Óxido nítrico y nitrosoglutatión

El contenido de NO es un elemento que junto con los de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene un papel en PCD. De hecho, el balance NO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está relacionado con la muerte celular (Delledonne *y col.*, 2001; Zago, 2006; Leitner *y col.*, 2009). En una condición de no tratamiento, el contenido de NO fue más elevado en la línea sobre-expresante que en la línea control. Sin embargo, el tratamiento causó un aumento de NO en ambas líneas. Este aumento se mantuvo más elevado y por más tiempo en la línea control con respecto a su condición de no tratamiento que en la línea sobre-expresante (Fig. 58A).

La reacción de GSH con peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y/o NO produce nitrosoglutatión (GSNO), un agente nitrosilante con capacidad para modificar la actividad de numerosas proteínas durante la PCD (Wang *y col.*, 2006; de Pinto *y col.*, 2013). En condiciones de no tratamiento no se produjeron diferencias estacables entre ambas líneas a excepción de las 48 h, momento en el que los niveles en la línea control fueron 3,5 veces superiores a los encontrados en la línea sobre-expresante (Fig. 58B). Por otro lado, la respuesta de ambas líneas al tratamiento fue paralela y así, el contenido de GSNO aumentó alrededor de 37 veces en ambas líneas en las primeras 4 h después del tratamiento con respecto a la condición de no tratamiento. A partir de las 24 h estos niveles descendieron a valores similares a los encontrados en la condición control. Estos resultados indican que la línea control responde con mayor contenido de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el tratamiento 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Además, gran parte del NO producido estuvo secuestrado en forma de GSNO en las primeras 4h después del tratamiento tanto en la línea control como sobre-expresante tal y como se observa por los bajos incrementos de NO observados hasta las 4h y los altos niveles de GSNO. A partir de las 24h el GSNO disminuyó 35 veces con respecto a las 4horas en ambas líneas y los contenidos de NO aumentaron justificando, en parte, esta relación.

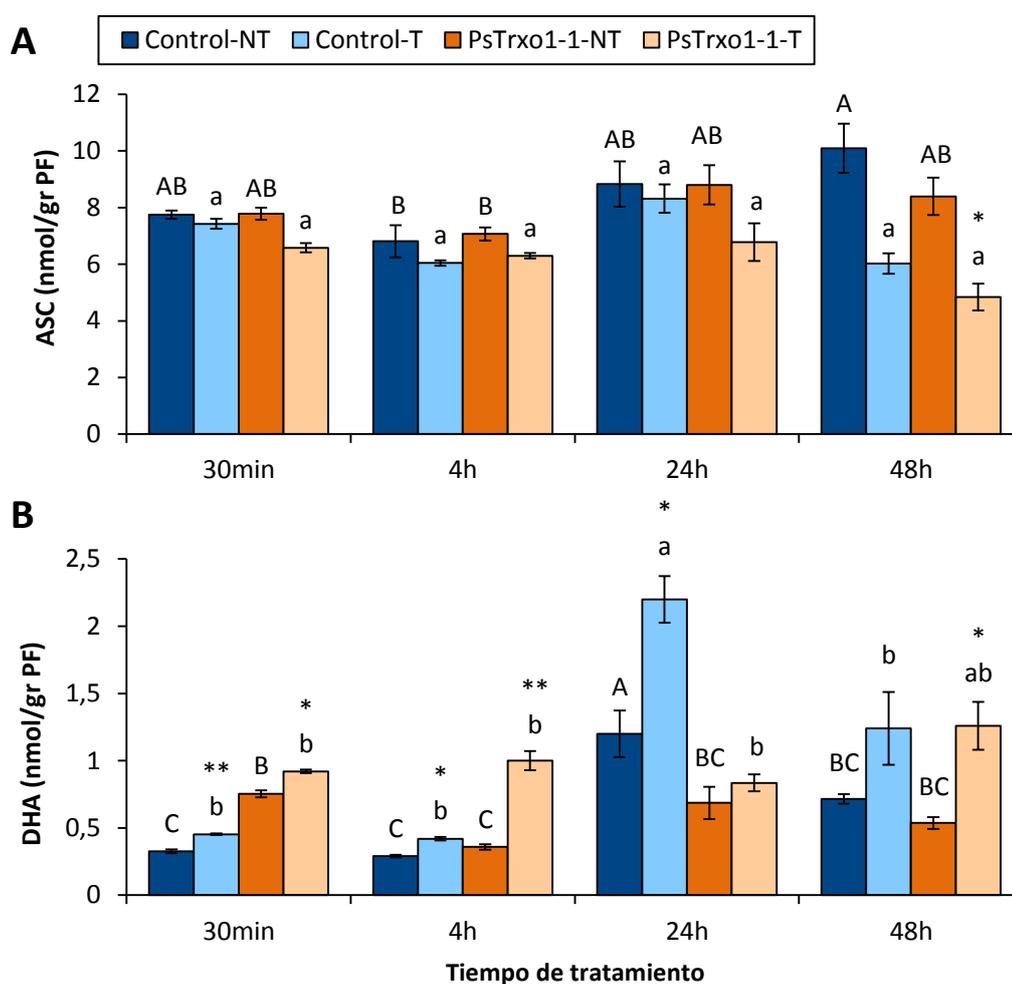


**Figura 58: Parámetros nitrosativos en células TBY-2 control y sobre-expresantes en condiciones de no tratamiento y de tratamiento con 35mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Óxido nítrico. (B) Nitrosoglutatión. Los valores equivalen a la media ± error estándar (n=3). Letras distintas indican significativas para p<0,05 (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para p<0,05 (\*); p<0,01 (\*\*); p<0,001 (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.**

#### 4.4.4. Metabolismo redox

##### 4.4.4.1. Medida de metabolitos ascorbato y glutatión

Para analizar el estado antioxidante de la célula después del tratamiento con 35mM  $H_2O_2$ , se midieron los contenidos de los principales metabolitos antioxidantes ascorbato y glutatión.



**Figura 59: Ascorbato reducido (A) y oxidado (B) en células TBY-2 control y sobre-expresantes en condiciones de no tratamiento y de tratamiento con 35mM  $H_2O_2$ .** Los valores indican la media  $\pm$  error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. *Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.*

Los resultados revelaron que en condiciones de no tratamiento, ambas líneas presentaban contenidos similares de ascorbato total (Fig. 58). Después de la exposición al  $H_2O_2$ , hubo una tendencia a la disminución del ASCt en ambas líneas debido a una disminución en el ascorbato reducido, fundamentalmente a las 48h (Fig. 58B). El estado redox el ascorbato expresado por la razón ASC/ASCt disminuyó en ambas líneas debido a un aumento del ascorbato oxidado, sin embargo, esta disminución en la sobre-expresante fue ligeramente mayor debido a un descenso más acusado en ascorbato reducido (Tabla 21).

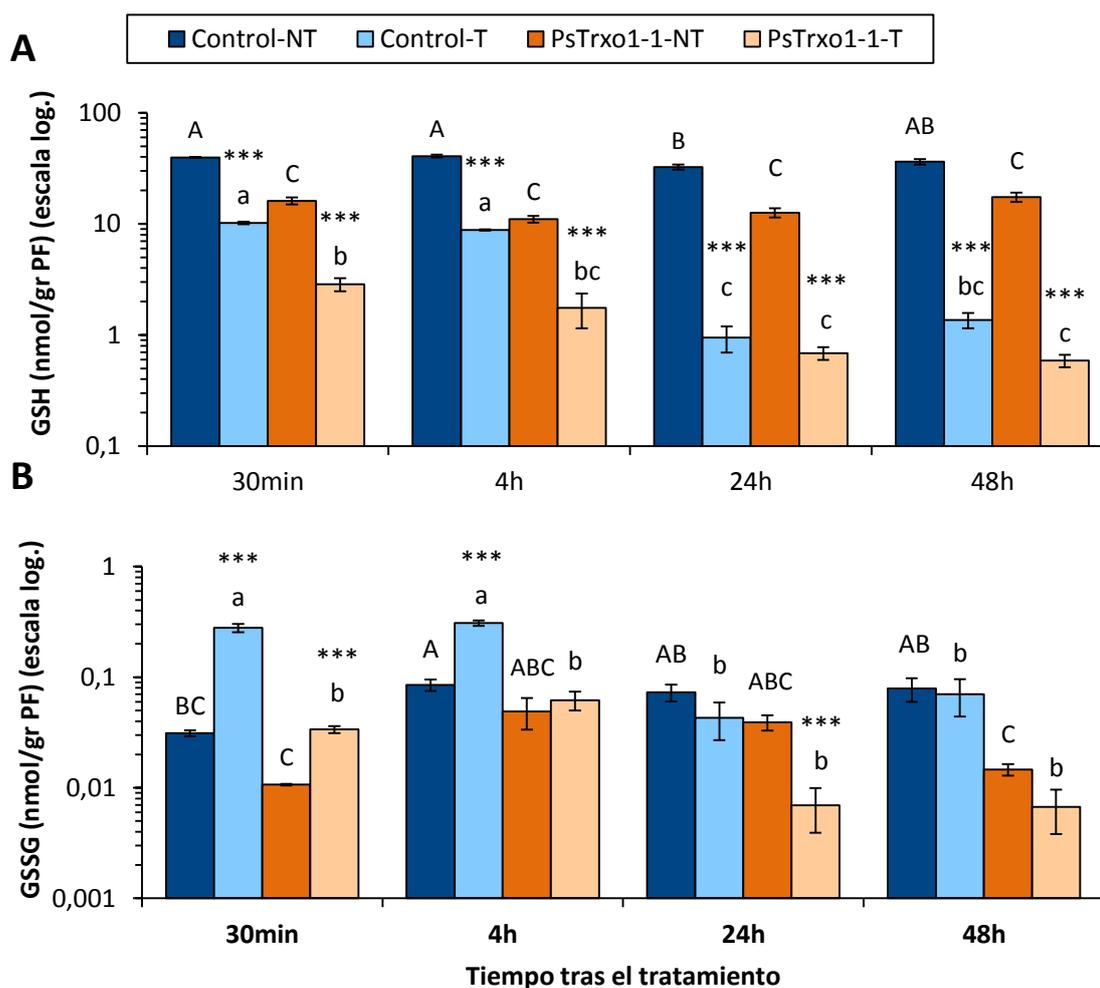
**Tabla 21: Ascorbato y Glutación totales y estado redox de ambos antioxidantes en células TBY-2 control y sobre-expresantes** en condiciones de no tratamiento (NT) y de tratamiento (T) con 35mM  $H_2O_2$ . Abreviaturas ASC: ascorbato reducido, DHA: deshidroascorbato, GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

Línea	ASCORBATO TOTAL				REDOX			
	ASC+DHA				ASC/ASCt			
	30min	4h	24h	48h	30min	4h	24h	48h
Control-NT	8,07 ± 0,16	7,10 ± 0,58	10,03 ± 0,97	10,81 ± 0,88	0,9596	0,9592	0,8804	0,9339
Control-T	7,87 ± 0,18	6,46 ± 0,11	10,52 ± 0,67	7,26 ± 0,63	0,9425	0,9352	0,7908	0,8292
PsTrxo1-NT	8,54 ± 0,24	8,93 ± 0,25	9,49 ± 0,81	8,93 ± 0,71	0,9118	0,9501	0,9277	0,9400
PsTrxo1-T	7,50 ± 0,18	7,18 ± 0,17	7,61 ± 0,73	6,10 ± 0,65	0,8773	0,7917	0,8904	0,7937

Línea	GLUTATION TOTAL				REDOX			
	GSH+GSSG				GSH/GSHt			
	30min	4h	24h	48h	30min	4h	24h	48h
Control-NT	39,73 ± 0,30	40,81 ± 1,27	32,58 ± 1,78	36,33±1,99	0,9992	0,9979	0,9978	0,9978
Control-T	10,48 ± 0,27	9,13 ± 0,14	0,99 ± 0,26	1,43±0,24	0,9734	0,9663	0,9566	0,9511
PsTrxo1-NT	16,14 ± 1,13	11,07 ± 0,76	12,67 ± 1,20	17,47±1,65	0,9993	0,9956	0,9969	0,9992
PsTrxo1-T	2,89 ± 0,39	1,81 ± 0,62	0,69 ± 0,09	0,59±0,08	0,9884	0,9659	0,9900	0,9887

La sobre-expresión de PsTrxo1 en células TBY-2 ocasionó un aumento de GSH total (GSHt) dos veces por encima del observado en la línea control, tal y como apuntamos anteriormente. El tratamiento con 35 mM  $H_2O_2$  produjo una disminución del GSHt debido a una disminución del GSH en ambas líneas (Fig. 60A). Sin embargo, en la línea sobre-

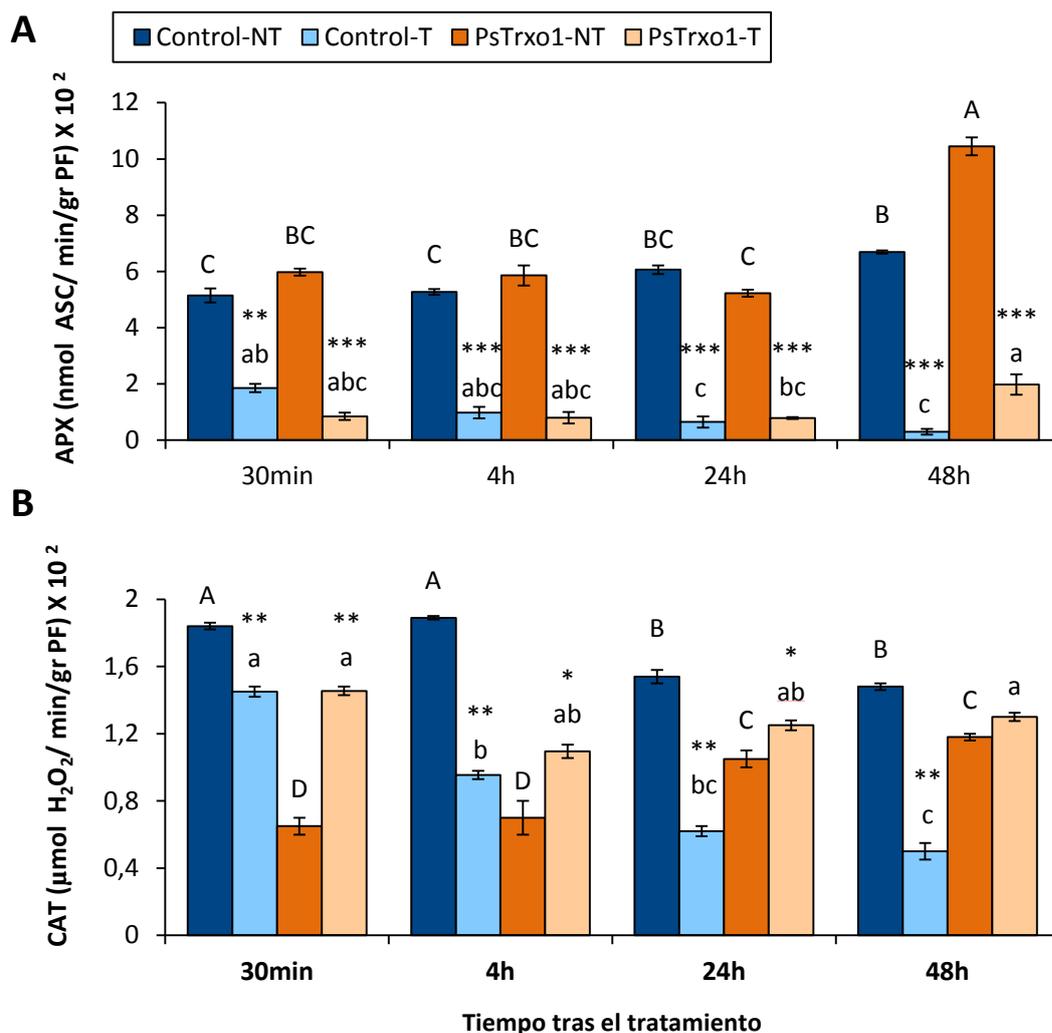
expresante, el estado redox expresado como la razón GSH/GSht disminuyó menos con el tratamiento que en la línea control, debido a un aumento menor en el GSSG (Tabla 22). En conclusión, bajo estas condiciones de estrés, los niveles de ASCt y GSht disminuyeron en ambas líneas como consecuencia de un descenso en los contenidos de las formas reducidas de ambos antioxidantes, si bien la línea sobre-expresante presentó un estado redox ASC/ASCt menor y un estado redox GSH/GSht mayor que el observado en la línea control.



**Figura 60: Glutación oxidado y reducido en células TBY-2 control y sobre-expresantes PsTrxo1 en condiciones de no tratamiento y de tratamiento con 35mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Los valores indican la media  $\pm$  error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. *Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.*

4.4.4.2. Enzimas eliminadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

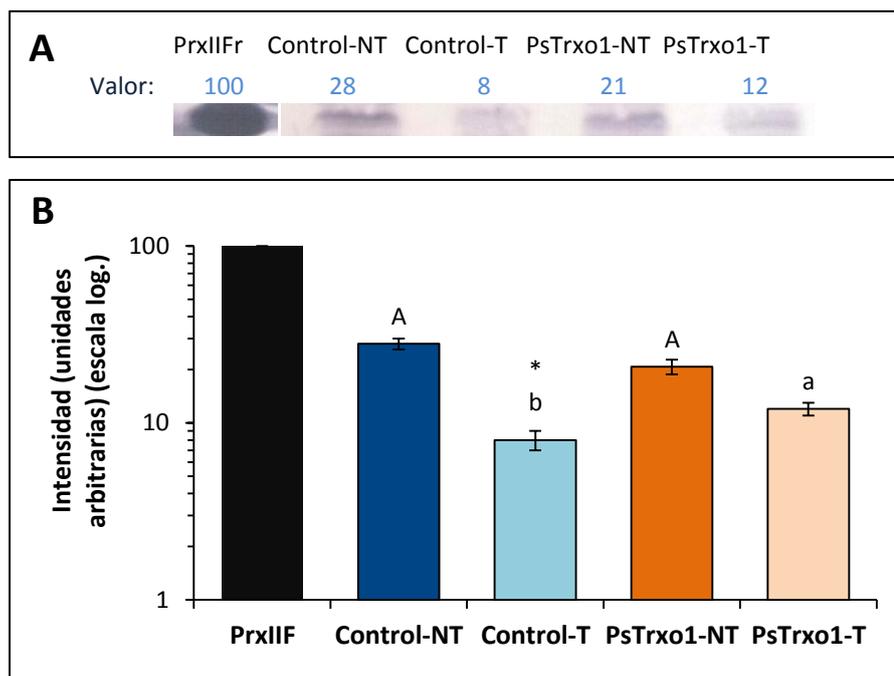
En cuanto a las enzimas antioxidantes eliminadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la actividad APX disminuyó con el tratamiento de dos a tres veces en la línea control y sobre-expresante en todo el periodo de estudio analizado, sin diferencias significativas entre líneas (Fig. 61A).



**Figura 61: Medidas de la actividad enzimática específica ascorbato peroxidasa (A) y catalasa (B) a 30 min, 4 h, 24 h y 48 h tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno.** Los valores indican la media  $\pm$  error estándar (n=3). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. *Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.*

La actividad catalasa fue distinta entre líneas en condiciones de no tratamiento. En este caso, se observó que la actividad era entre 2 y 3 veces mayor en la línea control que en la sobre-expresante durante el ciclo celular. La exposición al peróxido, sin embargo, causó una respuesta inversa; mientras que en la línea control se produjo una disminución de la actividad, en la línea sobre-expresante la actividad aumentaba con respecto a su condición de no tratamiento (Fig. 61B), lo que podría ser congruente con los menores niveles de  $H_2O_2$  observados con respecto a la línea control (Fig. 57C).

Otra peroxidasa implicada en la eliminación del peróxido de hidrógeno celular, es la peroxirredoxina mitocondrial (PrxIIIF), descrita como una proteína diana de la Trxo1 (Houot y col., 2001; Martí y col., 2009). Sus niveles proteicos se analizaron en ambas líneas en las condiciones descritas mediante western blot y revelado colorimétrico con fosfatasa alcalina. La sobre-expresión de PsTrxo1 en las células TBY-2 estuvo acompañada de una bajada en los niveles de esta diana, comparando con los niveles de la línea control, si bien la diferencia no fue significativa. Sin embargo, después del tratamiento con  $H_2O_2$ , en la línea control se redujeron los niveles de PrxIIIF un 70%, mientras que en la sobre-expresante esta disminución fue menos severa, alcanzando alrededor de un 40% (Fig. 62).



**Figura 62: Detección de la proteína PrxII Fr en cultivos celulares TBY-2 en la línea control y sobre-expresante PsTrxo1 tras 4h de tratamiento con 35mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) Western anti-PrxII Fr. La cantidad de proteínas es de 80 µg/calle. (B) Cuantificación de intensidad obtenida del western (escala logarítmica). Los valores indican la media ± error estándar (n=2). Letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0,05$  (Test de Tukey) en NT (mayúsculas) y T (minúsculas). Los asteriscos representan el nivel de significancia para  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,01$  (\*\*);  $p < 0,001$  (\*\*\*) entre cada control y su tratado en cada tiempo y cada línea. Abreviaturas: NT: condición de no tratamiento, T: condición de tratamiento.**

# DISCUSIÓN



## 1. Estudio de las proteínas diana nucleares de PsTrx01

En el estudio de la funcionalidad de una proteína, la aproximación de la búsqueda de sus posibles proteínas diana a las que puedan regular, es un punto clave en la descripción de su papel en la célula. A través de aproximaciones bioquímicas se han descubierto numerosas dianas de Trx en vegetales y con ellas también nuevas isoformas. Es por ejemplo el caso del descubrimiento de la Trx *f* capaz de reducir a la fructosa 1,6-bifosfatasa en condiciones de luz, o la Trx *m* capaz de activar a la malato deshidrogenasa (Buchanan y *col.*, 2002). De hecho, a partir de esta aproximación se descubrió que ambas proteínas participaban en la activación de numerosas enzimas pertenecientes al ciclo de Calvin y a la ruta de las pentosas fosfato. El establecimiento de las Trxs como reguladores redox es de vital importancia en la transducción de numerosas rutas celulares, no solo durante el proceso fotosintético, sino también durante otros procesos fisiológicos como la germinación, el crecimiento etc. La capacidad óxido-reductasa de la Trx se extiende a la de su papel antioxidante al activar peroxidasas específicas (Prx) capaces de eliminar hidroperóxidos como el peróxido de hidrógeno celular.

Sin embargo, a pesar de todas estas aproximaciones, no ha sido hasta que se ha logrado la secuenciación del genoma de algunos organismos cuando hemos podido deducir la secuencia de muchas más isoformas de Trxs con funciones específicas dentro de la célula. En los últimos estudios realizados en el genoma de *A. thaliana*, se han identificado hasta 22 genes que codifican Trx (Meyer y Hell, 2005), que difieren en su localización subcelular y por tanto en las posibles proteínas diana a las que regulan (Buchanan, 1991; Besse y Buchanan, 1997; Schürmann y Jacquot, 2000; Baumann y Juttner, 2002). Esta diversidad lleva a plantear la necesidad de establecer tanto la función como la especificidad de cada una de las distintas Trxs, especificidad que se debe a la elevada complementariedad estructural que existe entre cada Trx y su proteína diana, lo que permite interacciones muy selectivas entre ellas. Recientemente se ha logrado un importante avance en el número de proteínas diana de Trx identificadas en los diferentes orgánulos celulares, así como en los diferentes tejidos (Motohashi y *col.*, 2001; Takasaki y *col.*, 2001; Balmer y *col.*, 2003; Balmer y *col.*, 2004; Wong y *col.*, 2004) pasando en los últimos 30 años de menos de 40 posibles proteínas diana

conocidas en plantas terrestres, a más de 400 según la revisión realizada por Montrichard y *col.*, (2009). Esto supone además, un mayor conocimiento del papel de las Trxs en estos sistemas, pudiendo extender así sus aplicaciones médicas y tecnológicas.

A pesar del incremento en el número de proteínas diana descritas en estos estudios, hay escasas referencias sobre las posibles dianas de Trx en vegetales con localización nuclear, si bien, curiosamente la información disponible incide en la doble localización de algunas de estas Trxs y en su localización inducible por estrés oxidativo. Un ejemplo es el de la Trx *h* descrita en el citoplasma de células de semillas de trigo, que en condiciones de estrés oxidativo se colocaliza en el núcleo con NTR/1-Cys-Prx formando un sistema Trx completo (Pulido y *col.*, 2009). La Trx1 de humanos actúa de un modo parecido y se localiza en núcleo para activar rutas y determinados factores de transcripción que actúan en la respuesta de la célula a la apoptosis. Además, su relación con la respuesta antioxidante determina su papel como elemento de sistema clave de señalización durante el estrés oxidativo implicado en desarrollo (Ueno y *col.*, 1999).

Otras Trxs nucleares de origen vegetal descritas hasta la fecha como nucleorreductasa 1 (NRX1) y PsTrx01 se localizan en este orgánulo de forma constitutiva. NRX1 se colocaliza en núcleo con NTRA, una reductasa previamente descrita en citosol, y ambas constituyen un sistema redox Trx completo en este orgánulo (Marchal y *col.*, 2014). Además, también se ha descrito la posible función de NRX1 en el desarrollo del tubo polínico y se ha observado que los mutantes *nrx1* muestran un fenotipo con una reducida fertilidad polínica, sugiriendo un papel específico para esta proteína probablemente en la fase haploide (Marchal, 2014; Laugner, 1998). Sin embargo, PsTrx01 fue la primera Trx01 vegetal “clásica” descubierta de forma constitutiva en el núcleo de hojas de guisante, con una doble localización en mitocondrias (Martí y *col.*, 2009).

En este trabajo de Tesis hemos identificado algunas de las posibles dianas de PsTrx01. Para ello, se ha utilizado la metodología descrita por Pérez-Pérez y *col.* (2006) que consiste, tal y como se comentó anteriormente, en utilizar preparaciones purificadas de la proteína recombinante PsTrx01 con una mutación en la segunda cisteína de su centro activo (-

WCGPS-), para promover así la formación de un enlace disulfuro estable entre la Trx y su proteína diana. Además, al añadir una cola de histidinas a la Trx mutada, los complejos entre ésta y sus dianas se pueden aislar de forma sencilla mediante la unión por cromatografía de afinidad a una resina. Posteriormente, se identifican las proteínas diana por secuenciación, previa separación de la Trx por SDS-PAGE en 2D en condiciones no-reductoras (1ª dimensión) y reductoras (2ª dimensión). En la literatura aparecen descritos otros métodos que también permiten la identificación de proteínas diana. Estos métodos se basan en el bloqueo inicial de todos los grupos tioles libres presentes en extractos proteicos de plantas. Estos extractos posteriormente se reducen *in vitro* con Trx, revelándose así los nuevos tioles formados, que se marcan con sustancias fluorescentes específicas de este tipo compuestos como monobromobimano (Yano y col., 2002; Marchand y col., 2004), 5-iodoacetamidofluoresceína (Baty y col., 2002) o con sustancias radiactivas con mayor sensibilidad como [<sup>14</sup>C]-iodoacetamida (Marchand y col., 2004). Posteriormente se procede a una separación por IEF/SDS-PAGE.

El método empleado en este trabajo y a diferencia de los anteriores, permite una selección estricta de las proteínas que contienen tioles reactivos y expuestos en la superficie, antes de la electroforesis en 2D, por lo que las imágenes finales de los geles no presentan una mezcla tan compleja de proteínas. Motohashi y col. (2001) y Balmer y col. (2003), emplearon una aproximación similar a la utilizada en este trabajo, en la que la Trx cloroplastídica mutada en su centro activo se unió a una columna de Sepharosa activada con bromuro de cianógeno. Sin embargo, este procedimiento de inmovilización tiene como resultado una orientación al azar del centro activo de la Trx en relación a la matriz y por tanto, resulta en una población heterogénea de Trx unida a ella, la mitad de la cual lo más probable es que tenga el centro activo no accesible. Sin embargo, en el método empleado en nuestro trabajo, a la Trx mutada se le añade una cola de His en el extremo N-terminal, que según la estructura bien conservada de las Trxs está en una zona opuesta al centro activo, lo que conlleva un uso más optimizado de la Trx mutada, una mayor concentración de centros activos en la matriz y la elución de los complejos intactos Trx-proteína diana con imidazol en lugar de liberar las dianas en solitario con un reductor como se describe en los dos trabajos citados anteriormente. Además, la interacción entre la Trx y sus dianas se

puede verificar más tarde empleando una SDS-PAGE en 2D no reductora y reductora, donde los posibles contaminantes o subunidades de los complejos oligoméricos que no interactúan con Trx se distinguen de las dianas reales (Lindahl y Florencio, 2004).

A pesar de lo comentado, la descripción como tal diana de una determinada proteína nuclear requiere su verificación mediante estudios complementarios, que incluyen junto con la reducción *in vitro* por Trx de dicha diana purificada, el aislamiento de los hetero-complejos *in vivo*. Estos resultados permitirán un avance mucho mayor en la comprensión de la función de las Trxs en plantas y ayudarán a establecer las verdaderas proteínas reguladas por la PsTrx01 en guisante.

En el trabajo recogido en esta Tesis Doctoral y como paso inicial, hemos identificado dos potenciales proteínas diana nucleares de PsTrx01, el antígeno de proliferación nuclear PCNA y el receptor nuclear de ABA PYR1. Esto supone que esta tiorredoxina estaría implicada en al menos los procesos relacionados con la replicación y procesamiento de ADN y ARN, y en rutas de transducción mediadas por la hormona ABA.

### **1.1. El Antígeno de Proliferación nuclear (PCNA)**

PCNA es una de las posibles proteínas diana encontradas que interacciona con PsTrx01, con un *score* de 125 para un valor umbral de 73 según la probabilidad de que el suceso sea aleatorio para una  $p < 0,05$  según el software MASCOT obtenido del análisis por espectrometría de masas. Esta proteína PCNA de *P. sativum* de localización nuclear, está implicada en una plétora de eventos celulares (Shimizu y Mori, 1998; Strzalka y *col.*, 2009)(

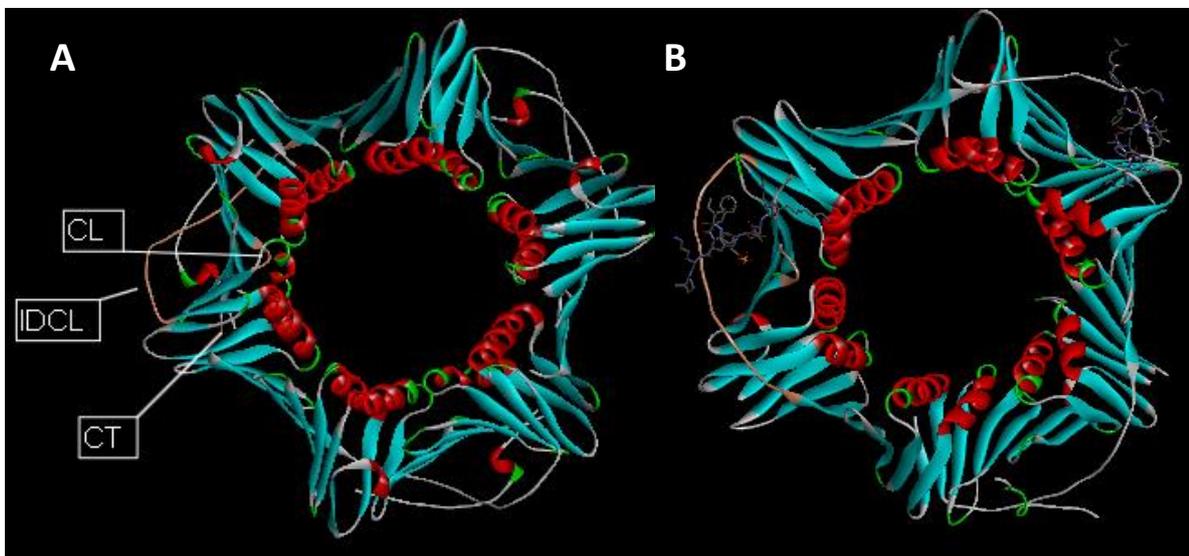
Los genes que codifican PCNA y/o sus productos han sido identificados en una amplia variedad de organismos incluyendo animales, levaduras y plantas superiores. Las plantas investigadas incluyen *Arabidopsis*, habichuela (Strzalka and Ziemienowicz, 2007; 2011), zanahoria (Hata y *col.*, 1992), maíz (López y *col.*, 1995, 1997), guisante (Shimizu y Mori, 1998), vincapervinca (Kodama y *col.*, 1991), colza (Markley y *col.*, 1993), arroz (Suzuka y *col.*, 1989), soja (Daidoji y *col.*, 1992) y tabaco (Park y *col.*, 1999). El análisis de todos los PCNAs conocidos sugiere que esta proteína está muy conservada en secuencia, estructura y

función. Así, los PCNAs de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) y mosca (*Drosophila melanogaster*) son capaces de sustituir a PCNA de mamíferos en ensayos de replicación (Bauer y Burgers, 1988; Ng y col., 1990); los PCNAs vegetales estimulan la actividad ADN polimerasa humana (Matsumoto y col., 1994; Strzalka y col., 2010) y el PCNA de mamíferos estimula la actividad y procesividad de dos ADN polimerasas  $\delta$  aisladas de embriones de trigo (Laquel y col., 1993). Todo ello implica que el PCNA debe tener unas regiones de unión a las distintas proteínas diana muy conservadas en la evolución.

El PCNA interviene como un coordinador clave de los procesos relacionados con la replicación del ADN a través de interacciones estrictamente reguladas y altamente coordinadas con numerosas proteínas asociadas, teniendo un papel central en la organización de la replicación del ADN normal, así como en una serie de procesos asociados como la reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, el establecimiento de la cohesión de cromátidas hermanas o el ciclo celular (Strzalka y Ziemienowicz, 2011).

El conocimiento de las propiedades estructurales de PCNA es clave para entender sus funciones. PCNA es un miembro de la familia de proteínas en “*pinza deslizante*”. Estas proteínas, que también incluyen a la subunidad  $\beta$  de la ADN polimerasa III de *E. coli* (Kong, 1992) y la proteína gp45 del fago T4 (Gogol y col., 1992) presentan una forma toroidal altamente conservada y una simetría pseudo-hexagonal, que se da en todos los miembros de la familia aunque la estructura primaria difiera. En eucariotas esta estructura es el resultado de la asociación de tres monómeros de PCNA unidos de forma cabeza-cola (C-terminal-N-terminal) formando un homotrímero. Cada monómero de PCNA se divide en dos dominios globulares estructuralmente similares (Fig. 63A), conectados por una larga secuencia de residuos aminoacídicos llamados lazo conector interdominios (IDCL), que en humanos tiene la secuencia <118-LMDLDVEQLGIPEQEYSC-135> y es el dominio preferencial de unión de proteínas dianas. Además, en su estructura existen otros dominios de unión a proteínas como la cola C-terminal (CT, 254-KIE-257) y una ranura hidrófoba en el lado frontal organizado por su bucle central (CL, 41-DSSH-44). El canal interno es bastante grande y está formado por hélices alfa con un núcleo cargado positivamente, que permite que el ADN pase a su través sin una repulsión electrostática (Fig. 63B). Además, la conformación

tridimensional del toroide le permite actuar como una plataforma de intercambio de numerosas proteínas a lo largo de su desplazamiento por el ADN, y es esta capacidad la que le permite realizar la multitud de funciones que se le atribuyen. De esta forma, PCNA a través del acoplamiento de interacciones proteína-proteína con su superficie externa y la inmovilización del ADN en el interior de su núcleo hidrofóbico previene, por ejemplo, la disociación de la polimerasa mientras avanza a lo largo del ADN, permitiendo el aumento de su procesividad (Kelman y O'Donnell, 1995). De igual manera, PCNA es capaz de asegurar la fidelidad de copias de ADN al reclutar proteínas reparadoras durante la detección de una mutación (Kim y *col.*, 2013).



**Figura 63: Estructura tridimensional del trímero PCNA de humanos. (A)** PCNA libre, extraído de PDB número de acceso 2ZVW; **(B)** PCNA unido a ADN polimerasa kappa, extraído de PDB número de acceso 2ZVL. En color naranja claro se representan los dominios de unión a las distintas dianas. Abreviaturas: CL: bucle central, IDCL: lazo conector interdominios, CT: Dominio C-terminal.

La relación de las tiorredoxinas con el proceso de la replicación fue descrito por primera vez en *E. coli* donde se demostraba que la Trx constituía un sistema donador de hidrógenos de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR), que cataliza la formación de desoxiribonucleótidos a partir de ribonucleótidos, necesarios para la elongación y reparación del ADN (Laurent, 1964). Tanto en bacterias como en levaduras y plantas se ha sugerido que la ausencia de un sistema TRX/NTR puede ser compensado parcialmente por el sistema

GRX/GSH, que también constituye un donador de electrones a RNR (Reichheld y col., 2007; Meyer y col., 2009) Sin embargo, la replicación de ADN en sistemas eucarióticos tiende a favorecer la ruta TRX/NTR como se demuestra en numerosos estudios (Arner, 2009; Lu y Holmgren, 2009). Por ejemplo, levaduras carentes de tiorredoxina exhiben una tasa reducida de proliferación, una producción baja de desoxiribonucleótidos y una fase S prolongada, sugiriendo que la ruta GRX/GSH es ineficiente en la provisión de electrones para la RNR (Koc y col., 2006). De forma similar, en plantas la ausencia de NTR muestra un fenotipo de bajo crecimiento que es consistente con una alteración de la velocidad de la replicación (Reichheld y col., 2007). Además, medidas del estado redox *in vivo* de RNR verifican que la Trx es normalmente el principal proveedor de electrones para RNR en levaduras (Camier y col., 2007).

Además de las funciones de la Trx como elemento redox en la replicación de bacterias, su función como elemento estructural también ha sido observada en diversos fagos. Así, la polimerasa gp5 (gene protein 5) del bacteriófago T7 que es una enzima no procesiva, necesita de la presencia de una Trx para permitir la síntesis de cientos de nucleótidos. No obstante, la mutación de las cisteínas activas de la Trx no modifica la asociación descrita, sugiriendo la importancia de la Trx como un elemento estructural del complejo de replicación en el fago T7, similar al que tiene el PCNA en la procesividad de diferentes polimerasas en eucariotas (Tran, 2012).

El proceso de replicación en eucariotas no consiste solamente en la duplicación del ADN sino también en la replicación de la cromatina, que mantiene la información genética y epigenética (Davis y col., 2012). Este hecho permite la transmisibilidad tanto de las regiones de ADN activas transcripcionalmente como aquellas regiones silenciadas, las llamadas estructuras heterocromáticas. La cromatina es descondensada durante el avance del complejo de replicación e inmediatamente ensamblada en las dos hebras hijas. Ya que la información epigenética, que implica la metilación de determinadas bases nucleotídicas y por tanto su silenciamiento, es codificada por modificaciones covalentes en el ADN, las enzimas implicadas en estas modificaciones deberán estar también unidas a la maquinaria de replicación. Experimentos en levaduras sugieren que algunas de las proteínas que

intervienen en este proceso son el factor1 de ensamblaje de la cromatina (CAF-1) que afecta a la herencia epigenética del ADN y a la estructura de la cromatina durante la fase S del ciclo celular (Zhang y *col.*, 2000), la enzima responsable de la herencia del estado metilado, y la ADN citosina metil transferasa (MeCtr) capaz de establecer el patrón de metilación en el genoma (Lida y *col.*, 2002). Estas proteínas son capaces de interactuar con el PCNA en el proceso replicativo favoreciendo la heredabilidad de las regiones silenciadas. La localización descrita para PsTrx $\alpha$ 1 en estructuras heterocromáticas (Martí y *col.*, 2009) sugiere su papel en la protección del genoma frente a la oxidación y en el control del silenciamiento de la transcripción del ADN no codificante (Kropotov y *col.*, 2006). El descubrimiento de PCNA como diana de PsTrx $\alpha$ 1 establece que esta tiorredoxina podría formar parte del complejo multiproteico organizado por el PCNA y las proteínas CAF-1, MeCtr y ADN polimerasa  $\delta$  responsables de la replicación de estas regiones del ADN.

Entre los genes que regulan el ciclo celular hay algunos que lo regulan positivamente (protooncogenes) y otros negativamente (oncogenes). Los primeros codifican genes que constituyen las proteínas del sistema de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (CDK). En este sistema de proteínas, las ciclinas activan a CDK que permite la progresión del ciclo celular a través de la fosforilación de serinas y treoninas en sus proteínas diana. En este sentido, diversos trabajos muestran que PCNA interviene en distintos momentos del ciclo celular, como en los puntos de control entre las fases G1/S y G2/M o la fase S activando a complejos ciclina-CDK específicos (Koundrioukoff y *col.*, 2000). Bajo condiciones normales el ciclo celular progresa sin problemas. Sin embargo, los daños en el ADN y el envejecimiento celular conllevan a la producción de la proteína p21 que bloquea la transición de la fase G1 a S (iniciación de la replicación) a través de la inhibición de la actividad del complejo ciclina-CDK (Sherr y Roberts, 1995). De hecho, la proteína p21 ha sido identificada en complejos PCNA-ciclina-CDK (Xiong y *col.*, 1992, 1993). Además, estudios *in vitro* sugieren que la unión de p21 al complejo PCNA-ADN podría bloquear la interacción con la ADN polimerasa  $\delta$  y por lo tanto parar la síntesis de ADN (Flores-Rozas y *col.*, 1994; Waga y *col.*, 1994). De esta forma, este factor puede actuar como un supresor de tumores al producir un arresto del ciclo celular. Todo esto conduce a que PCNA parece actuar como un importante mediador de la función de p21. En plantas hasta la fecha no se ha identificado un homólogo de la proteína

p21, aunque el PCNA de guisante es capaz de interactuar con el p21 humano (Ball y Lane, 1996; Strzalka y col., 2009, 2010), lo que indica una alta homología estructural entre PCNAs de animales y plantas, y sugiere la existencia de una proteína similar y análoga en función a la p21 animal que podría estar implicada en la regulación del ciclo celular en plantas (Boruc y col., 2010). Como veremos más adelante se ha encontrado una relación entre este factor p21 y Trx1 de humanos.

Las pruebas de la implicación del PCNA en la proliferación celular han sido también descritas en plantas, aunque en menor medida que en animales; así la expresión en arroz es acusada en raíces, y en general en regiones meristemáticas, que están constantemente en crecimiento y no en hojas maduras (Kimura y col., 2001). Así mismo, Strzalka y Ziemienowicz (2007) demostraron que la proteína PCNA en *Phaseolus vulgaris* se acumulaba preferencialmente en semillas en germinación y en zonas meristemáticas. Otros autores estudiaron los niveles de transcritos en yemas secundarias dormantes de guisante, demostrando que antes de la decapitación de las yemas, el nivel de transcritos era minúsculo, mientras que después de la decapitación, la expresión génica de PCNA se disparaba, correlacionándose esto con el crecimiento de las yemas y por tanto, con la proliferación celular (Shimizu y Mori, 1998; Shimizu y Mori, 1998). Además de esto, otras pruebas confirman la importancia de PCNA en este proceso y un anticuerpo anti-PCNA de humanos se ha descrito que reacciona sólo en el núcleo de células proliferantes de animales experimentales (Celis y col., 1987), si bien también se ha descrito en el núcleo de células vegetales (Daidoji y col., 1992).

La alta expresión de AtTrx01 en yemas apicales caulinares y en semillas en germinación, como se ha observado en los arrays localizados en el Arabidopsis eFP browser (Fig. 23) y en este trabajo de Tesis, así como lo revelado por diversos autores para la expresión de PCNA en yemas caulinares de guisante (Shimizu y Mori, 1998), podría establecer un papel adicional para AtTrx01 junto con PCNA en el metabolismo del ADN en estas células proliferativas. Sin embargo, se necesitarán nuevas aproximaciones experimentales, entre ellas ensayos encaminados a determinar la co-localización de ambas proteínas en tejidos proliferativos, para poder sustentar esta hipótesis.

## 1.2. El receptor nuclear de ABA: PYR1

El receptor PYR1 es otra de las posibles proteínas diana encontradas que interacciona con PsTrx01, con un score de 125 para un valor umbral de 73 según la probabilidad de que el suceso sea aleatorio para una  $p < 0,05$  según el software MASCOT obtenido del análisis por espectrometría de masas. Esta proteína de localización nuclear está implicada en las rutas de transducción de ABA.

Como ya se ha comentado en el capítulo de germinación de esta Tesis, la hormona vegetal ABA controla procesos relacionados con la fisiología de la semilla y la tolerancia al estrés abiótico, entre otros (Weitbrecht *y col.*, 2011; Sakata *y col.*, 2014). Los elementos que intervienen en las rutas de transducción de ABA constituyen un sistema de sensores y transductores que finalmente producen una respuesta dirigida a tolerar el estrés o sobre un determinado proceso. Los sensores de ABA son unos receptores que forman parte de una familia de proteínas llamadas AbelV y se caracterizan por la presencia de un dominio conservado de unión a ABA de tipo START, que comentaremos más adelante. Existe una gran diversidad de receptores acorde con su localización, expresión y especificidad según el proceso fisiológico que regulen, si bien estos se agrupan en tres tipos fundamentales: PYR1 (Pyrabactin Resistance1), PYL (PYR1-like) y RCAR (Regulatory Component of ABA Receptor 1) (Ma *y col.*, 2009; Park *y col.*, 2009). Los transductores de la respuesta inducida por ABA son unas proteínas fosfatasas de tipo 2 (PP2Cs) y una familia de quinasas del tipo SnRK2 (quinasa similar a las proteínas no fermentadoras de glucosa). La forma en la que interactúan estos elementos es la siguiente: bajo un estrés abiótico como sequía y alta salinidad, los niveles de ABA en la planta aumentan, iniciando las respuestas de adaptación. La percepción de ABA por PYR/PYL/RCARs produce un cambio conformacional en estos receptores que conduce a la inhibición de las PP2C que permite la liberación de SnRK2 y su autoactivación por autofosforilación (Fujii *y col.*, 2007; Nakashima *y col.*, 2009; Okamoto *y col.*, 2013). Esta enzima activa diversas proteínas entre las que se incluyen factores de transcripción que modulan la expresión de genes que responden a ABA (Sirichandra *y col.*, 2009; Puli y Raghavendra, 2012) y que en última instancia permiten el cierre estomático ante la deshidratación, el mantenimiento de la dormancia en semilla seca o el retraso de la

germinación en condiciones de salinidad. Sin embargo, en ausencia de ABA, PP2Cs mantienen a SnRK2 en un estado inactivo por una desfosforilación crítica de un residuo serina en su lazo de activación. Esto permite la formación de heterodímeros PP2Cs-SnRK2 que bloquean el acceso de la quinasa al sustrato (Miyazono y *col.*, 2009; Soon y *col.*, 2012) y por tanto, el bloqueo de la señalización por ABA.

Dada la importancia de la Trx01 en los procesos antioxidantes, nos planteamos si la interrelación entre la señalización hormonal y el metabolismo antioxidante ya ha sido documentada para algunos antioxidantes. Efectivamente, mutantes con bajos contenidos de ASC (vt1 y vt2) muestran un retardo del crecimiento y una acumulación de ABA en las hojas. Además, la acumulación de ABA se ha relacionado con un aumento de la actividad antioxidante en plántulas germinantes de trigo sometidas a un estrés hídrico moderado (Agarwal y *col.*, 2005). Por otro lado, el nivel de oxidación generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en procesos como la germinación, la respuesta a salinidad o la regulación del cierre estomático se relaciona también con las rutas de señalización de ABA y ácido giberélico (GA). La producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es activada por GA e inhibida por ABA en la capa de aleurona de cebada, lo que permite la germinación de la semilla. De hecho, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es capaz de restaurar la actividad de algunas enzimas inhibidas por ABA como la alfa-amilasa, e inhibir enzimas de la ruta de transducción de ABA como PP2Cs y SnRK2s. Durante la germinación en cebada, un tipo de SnRK2 (PKABA) es inactivada por inhibición de su capacidad de autofosforilación por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, lo que plantea un modo de reprimir la respuesta de ABA (Ishibasi, 2012). Sin embargo, durante el proceso de cierre estomático la generación de un medio oxidativo transitorio generado por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría tener otro efecto al inhibir de forma transitoria y reversible a algunas PP2C como ABI1, ABI2 y HAB1. Es más, en la fosfatasa HAB1 esta inactivación se debe a la oxidación de las cisteínas C186 y C274 que forman puentes disulfuro intermoleculares con otras HAB1 y de esta forma permanecen inactivas. El proceso es reversible ya que su activación se produce por reductores como GSH o el artificial DTT. Estos resultados plantean no solo la influencia del metabolismo oxidativo en la principal ruta de transducción de ABA, sino que las modificaciones oxidativas regulan los componentes de dicha ruta con los que interacciona el receptor PYR1. Sin embargo, se necesitan futuras investigaciones para llegar a conocer el mecanismo por el que PsTrx01 pudiera regular la actividad de PYR1.

## 2. Papel de AtTrxo1 durante la germinación

### 2.1. Análisis de expresión del gen *AtTrxo1* durante la germinación en condiciones control

La identificación del posible papel de una proteína a través del estudio de su expresión génica y localización es una aproximación muy frecuente utilizada en genética molecular. Con el fin de averiguar la posible función de *AtTrxo1* en la fisiología de *Arabidopsis*, se analizó el perfil de expresión en los distintos órganos de la planta. Los resultados indicaron la presencia homogénea de esta Trx en raíz, hoja, tallo, flor y fruto de *Arabidopsis*, con un incremento de un orden de magnitud, con respecto a los anteriores, en semilla seca y semilla embebida de 24 h. Estos resultados indicaron la especial importancia de esta tiorredoxina durante la maduración de la semilla y la germinación. La relación entre el proceso germinativo, el estrés oxidativo y las Trxs ya ha sido descrita por algunos autores, si bien, no existe información relativa a la participación de la *Trxo1* mitocondrial de *Arabidopsis* en este proceso. Atendiendo a estos preliminares decidimos analizar durante la germinación la expresión génica de *AtTrxo1* junto a la de algunos otros componentes del metabolismo antioxidante, incluyendo catalasa (*CAT2*), peroxirredoxina mitocondrial (*PrxIIIF*) y sulfirredoxina (*Srx*) mitocondrial y cloroplastídica, niveles de metabolitos antioxidantes e indicadores celulares de estrés oxidativo. Además, para llevar a cabo este objetivo, también se emplearon semillas mutantes KO *AtTrxo1*, lo que nos permitió establecer de forma más precisa la importancia de esta proteína redox en el proceso fisiológico de la germinación.

Los niveles de ROS, particularmente  $H_2O_2$ , varían de forma importante dependiendo del estado fisiológico de la semilla. La producción de  $H_2O_2$  aumenta durante la maduración de la semilla, y de hecho, la capacidad para germinar depende de una acumulación crítica de  $H_2O_2$  que permite la liberación de la latencia (Bailly, 2004; Bailly y col., 2008). Muchas semillas como las de *Arabidopsis* alcanzan esta concentración crítica tras un periodo de almacenamiento a una temperatura determinada en condiciones de baja humedad relativa (*After Ripening*). Sin embargo, este aumento de ROS en semilla seca es cuanto menos intrigante, debido a la ausencia de agua para llevar a cabo las reacciones químicas responsables de su generación (Oracz y col., 2007). En este sentido, se cree que la principal

fuente de ROS ocurre a través de reacciones no enzimáticas de tipo Maillard, aunque se especula acerca de la existencia de bolsillos hidratados en el interior de células o tejidos de semillas dormantes que permitirían cambios en la expresión génica y en las actividades de ciertas enzimas en el estado seco (Leubner-Metzger, 2004). En nuestros análisis, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en semilla seca madura fueron bastante elevados después del AR, lo que permitió a las semillas germinar con normalidad tras la imbibición en agua tal y como cabría esperar. Estos niveles fueron mayores en semilla seca del KO *AtTrxo1* que en el Wt, lo que se correlacionó con un mayor nivel de estrés oxidativo en las semillas mutantes, en términos de las proteínas carboniladas detectadas en ellas. Además, los niveles elevados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presentados en ambas líneas se correspondieron con una mínima expresión de *CAT2* asociada a una casi inexistente actividad enzimática. Estas diferencias entre contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y Cat son coherentes, y también se han observado en la literatura en otras semillas como las de girasol, que presentaron altos niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el AR, una baja capacidad detoxificadora catalasa y una disminución de transcritos *CAT1* (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008). Adicionalmente a estos resultados, en semilla seca se observaron altos niveles de expresión de *AtTrxo1*, *AtPrxIIIF* y *AtSrx* en el Wt, mientras que en ausencia de *Trxo1* los niveles de expresión de *AtPrxIIIF* y *AtSrx* disminuyeron de modo significativo. La disminución de la expresión *AtPrxIIIF* y *AtSrx* encontrada en las semillas mutantes podría ir acompañada de una menor actividad peroxidasa por parte de *AtPrxIIIF* y de una menor capacidad de regeneración de la forma activa de la misma a través de la acción reductora de *AtSrx*. En conclusión, estos resultados permiten suponer la participación del sistema redox *Trxo1/PrxIIIF/Srx* junto con Catalasa en la regulación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en semilla seca.

La participación del sistema redox Trx/Prx durante la maduración y desecación de la semilla ha sido previamente documentado para la Trxh citosólica de *Medicago truncatula* (Renard y col., 2011) y para la 1-Cys Prx de distintas especies vegetales. Estudios en *Medicago truncatula* muestran la expresión de *Trxh1*, *Trxh2* y *Trxh6* en semilla seca. De la misma forma, los genes de distintas 1-Cys Prxs en varias especies vegetales: BnPER1 de *Brassica napus* (Gao y col., 2002), pBS128 de *Bromus sp.* (Goldmark y col., 1992) Per1 en cebada (Aalenf y col., 1994), AtPER1 en *Arabidopsis* (Haslekas y col., 1998) y FePer1 de *Fagopyrum esculentum* (Lewis y col., 2000) presentaron una expresión elevada durante las

etapas de pérdida masiva de agua, tanto al final del desarrollo de la semilla como en semilla madura seca. En este sentido, se ha especulado que en general, la peroxirredoxina podría tener un papel en el mantenimiento de la viabilidad y/o dormancia debido probablemente a su participación en la reducción del estrés oxidativo que ocurre en este estado (Goldmark y col., 1992; Stacy y col., 1996; Haslekas y col., 1998; Gao y col., 2002). Sin embargo, aunque se ha demostrado la capacidad antioxidante de la Prx, su función en la dormancia no es del todo concluyente (Haslekas, 2003).

La imbibición en agua de la semilla seca en las condiciones óptimas después del AR favorece la germinación. Se ha descrito que la reactivación del metabolismo ligada a la imbibición de la semilla genera una cantidad importante de ROS, que necesita una correcta regulación para no comprometer el éxito del proceso germinativo. En este contexto, se han encontrado incrementos en los contenidos de diversos compuestos antioxidantes durante la germinación, incluyendo flavonoides y fenoles (Simontacchi y col., 1993; Andarwulan y col., 1999; Yang y col., 2001), niveles de ASC y GSH durante la imbibición temprana (De Gara y col., 1997; Yang y col., 2001; De Tullio y Arrigoni, 2003; Kranner y col., 2006) así como aumentos en la expresión y niveles de Trx, Prx y catalasa en algún momento del proceso germinativo (Gao y col., 2002; Mylona y col., 2007; Renard y col., 2011). El aumento de la expresión de genes que codifican enzimas implicados en el metabolismo redox, tales como peroxirredoxinas, tiorredoxinas o catalasas durante la imbibición, podría estar relacionado con el mantenimiento de la homeostasis redox en la semilla durante la germinación. Efectivamente, en este contexto, el perfil de expresión génico de *AtTrxo1* durante la germinación fue compatible con la de un posible regulador positivo del proceso, ya que su expresión aumentó de forma paralela al porcentaje de germinación alcanzando un máximo de expresión a las 36 h, momento en el que se produjo el 50% de germinación ( $t_{50}$ ). En consonancia con estos resultados, la presencia de *AtTrxo1* en semillas en germinación fue evaluada mediante el uso de líneas de *Arabidopsis* sobre-expresantes del gen reportero de la glucuronidasa (GUS) bajo el control del promotor de *AtTrxo1*. Estos ensayos indicaron un aumento de actividad GUS con el tiempo de imbibición en el embrión de la semilla llegando a ser esta expresión incluso mayor a las 48 h que a las 36 h. Ambos resultados sugirieron que *AtTrxo1* debía tener un papel importante durante la germinación, posiblemente a través de

la movilización de reservas desde el embrión a lo largo de este proceso. Además, estos resultados están en consonancia con los descritos para otras Trxs como las Trx *f*, Trx *m* en semillas de guisante y Trx *h* de trigo durante la germinación. En ellas, se observó un patrón de expresión similar al encontrado para *AtTrxo1*, coincidiendo con el aumento de ROS durante la germinación (Shahpiri y col., 2007; Fernández-Trijueque y col., 2012). Otros autores describen que las proteínas de reserva, proteasas, alfa-amilasas e inhibidores de estas mismas enzimas del endospermo amiláceo y el embrión, están fundamentalmente oxidadas en estado seco (S-S) y se reducen al estado sulfidrilo (SH) después de la imbibición (Kobrehel y col., 1992; Lozano y col., 1996; De Gara y col., 2003; Marx y col., 2003; Rhazi y col., 2003). El cambio conformacional ocasionado por la reducción del grupo disulfuro en las proteínas de reserva aumenta su solubilidad y en consecuencia su susceptibilidad a la proteólisis, lo que en conclusión genera una movilización de reservas carbonadas y nitrogenadas (Serrato y Cejudo, 2003) necesaria para el establecimiento de la plántula. Es más, en la dicotiledónea *Medicago truncatula*, y en las monocotiledóneas *Triticum sp.* y *Hordeum vulgare* se ha demostrado que la mayoría de las proteínas identificadas como susceptibles a modificaciones redox en el paso de semilla seca a embebida son dianas de Trxh (Marx y col., 2003; Wong y col., 2004; Alkhalfioui y col., 2007; Montrichard y col., 2009). Estas evidencias señalan que *AtTrxo1* podría tener un papel similar en la movilización de reservas al descrito para estas otras tiorredoxinas, como la Trx *h*, Trx *f* o Trx *m*, si bien, no se ha descrito el mecanismo por el que producirían estas modificaciones. A pesar de estas especulaciones y del hecho de que en *Arabidopsis* aún no se han identificado proteínas diana de *Trxo1* en semillas, es interesante resaltar que en hojas de guisante PrxIIIF, Srx y AOX, los componentes H y P del complejo fotorrespiratorio glicina descarboxilasa y proteínas implicadas en la síntesis de ATP, metabolismo del azufre y el factor de elongación Tu, se describieron como dianas mitocondriales de PsTrxo1 (Martí y col., 2009). De esta forma, no parece muy especulativo el considerar que junto a posibles nuevas dianas de *AtTrxo1* específicas de cotiledones de semilla, esta *AtTrxo1* pudiera actuar regulando el estado redox de las citadas dianas mitocondriales durante la germinación, entre otros procesos. A través del control redox, *AtTrxo1* permitiría la funcionalidad de los procesos mitocondriales en las que sus dianas están involucradas. Este aspecto es importante considerando la importancia

que en el desarrollo del embrión tiene el mantenimiento de una correcta funcionalidad mitocondrial.

El empleo de semillas KO *AtTrxo1* en los ensayos de germinación en agua mostró que, a pesar del mayor nivel de  $H_2O_2$  observado en semilla seca en comparación con el Wt, estas diferencias no se tradujeron en distintas capacidades para germinar, y el mutante *AtTrxo1* mostró una tasa y una dinámica de germinación similar a la observada por el Wt. Estos resultados indican que la ausencia de *AtTrxo1* no altera el desarrollo normal del proceso germinativo, por lo que esta ausencia podría estar compensada por otras oxidoreductasas de puentes disulfuro como Grxs u otras isoenzimas de la familia Trx. En este contexto, es posible que el gen parálogo de *AtTrxo1*, *AtTrxo2* pudiera compensar la función de *AtTrxo1*. Sin embargo, ensayos de expresión relativa no mostraron modificaciones en la expresión de *AtTrxo2* en las líneas analizadas, sugiriendo la implicación de otras Trxs como compensadoras de *AtTrxo1*.

El comportamiento encontrado en semillas mutantes de *AtTrxo1* durante la germinación, no se parece al observado para mutantes KO de Trxs consideradas en la bibliografía como reguladoras del proceso germinativo. Así, la ausencia de Trxs citosólicas de tipo *h* retrasó la germinación en cebada, mientras que la sobre-expresión de esta proteína aceleraba la germinación en relación con las semillas de fenotipo silvestre (Wong y col., 2002; Li y col., 2010), indicando una participación diferente de esta familia de Trxs durante este proceso fisiológico, que podría responder a su distinta localización tisular y/o celular, así como a sus distintas proteínas diana.

Dada la importancia sugerida para el  $H_2O_2$  en la regulación del proceso germinativo (Barba-Espín y col., 2012; Cembrowska-Lech y col., 2015) y la presencia de un patrón germinativo similar en la línea mutante y Wt, era de esperar que los niveles de  $H_2O_2$  variaran de forma similar en ambas líneas durante la germinación. Efectivamente, la imbibición en agua de la semilla seca provocó variaciones en los niveles de  $H_2O_2$  a lo largo de la germinación sin diferencias significativas entre la línea mutante y la silvestre. Durante las primeras 12 h y 24 h de imbibición en agua disminuyeron drásticamente los niveles de  $H_2O_2$ .

Este descenso fue coherente con un aumento en actividad Cat, siendo este aumento mayor en el Wt que en el mutante. El incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la fase más avanzada de la germinación (36 h) se correspondió con una disminución de actividad Cat y finalmente, a punto final (48 h), la tendencia a disminuir observada en el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se acompañó de un incremento de esta actividad fundamentalmente en el mutante. Estas variaciones en la actividad catalasa fueron congruentes con el control del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la germinación en *Arabidopsis* y están en línea con los datos obtenidos por varios autores (Gidrol y col., 1994; Hite y col., 1999; Gallardo y col., 2001; Leymarie y col., 2011) que describen un papel para esta enzima en la regulación de los niveles de peróxido de hidrógeno, no solo en semilla seca sino también durante la germinación.

A pesar de que CAT2 es la isoforma principal y mayoritaria en semillas, la relación entre expresión CAT2 y actividad Cat no estuvo del todo clara. La ausencia de AtTrx01 generó un aumento de expresión CAT2 que no se relacionó con los niveles teóricos de actividad, excepto a las 48 h. De la misma forma, en las semillas silvestres tampoco se observó correlación entre expresión y actividad Cat. Esta falta de correlación podría deberse a varios factores, como la presencia de otras isoenzimas de Cat que pudieran contribuir a la actividad total, o bien a un mecanismo de control post-transcripcional y/o post-traducciona l de CAT2 distinto en función de la presencia de AtTrx01. De hecho, en relación a enzimas antioxidantes, existe un amplio abanico de ejemplos describiendo la ausencia de correlación entre los cambios en el nivel de transcritos y los mostrados por las cantidades de proteína y niveles de actividad (Oelze y col., 2014).

La expresión génica de enzimas eliminadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con actividad peroxidasa como AtPrxIIIF y su reductor AtSrx durante la germinación fue similar en ambas líneas de semillas, independientemente de la ausencia de AtTrx01. Además el perfil de expresión observado para *AtPrxIIIF* y *AtSrx* fue paralelo, sugiriendo una regulación transcripcional similar en este proceso para ambas enzimas. La imbibición de las semillas en agua, disminuyó bruscamente los niveles de expresión de ambos genes, que se mantuvieron constantes a lo largo del proceso germinativo, con cierta tendencia a aumentar a tiempo final y coincidiendo con el aumento de actividad Cat y la disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados también permiten

conseguir la acción coordinada de estas proteínas junto a Cat en la regulación de los niveles de  $H_2O_2$ , y por tanto, una función antioxidante para las mismas. El papel de las Prxs en la germinación se ha descrito para la 1-Cys Prx de localización citosólica y/o nuclear, que presenta un aumento de su expresión durante la germinación de semillas de trigo, así como durante la última fase del desarrollo de la semilla de arroz (Lewis y col., 2000), al igual que ocurre en nuestro estudio. La distinta localización subcelular de las diferentes enzimas: peroxisomas y/o glioxisomas para Cat y mitocondrias y/o plastos para PrxIIIF y Srx, permitiría a estas dos proteínas redox actuar junto a Cat en la regulación de los niveles de  $H_2O_2$  y/o en la señalización por  $H_2O_2$  en los diferentes orgánulos celulares. De hecho, se ha demostrado que la PrxIIIF de *Medicago truncatula* es también diana de la Trxh de localización citosólica-mitocondrial (Alkhalfioui y col., 2007; Martí y col., 2009) implicada en la germinación, como comentamos anteriormente. La importancia de esta PrxIIIF en la percepción de cambios en el estado redox de la mitocondria y la necesidad celular de compensar su falta para mantener una apropiada homeostasis redox en la organela ha sido descrita en Arabidopsis (Finkemeier y col., 2005). Algunos estudios indican que Trx h citosólica, NTR y 1-Cys-Prx se acumulan en el núcleo de las células de la capa de aleurona y escutelo tanto durante el desarrollo de la semilla como durante la germinación, lo que se ha asociado a una función antioxidante para el sistema completo, llevando a cabo la reducción del peróxido de hidrógeno en este compartimento y protegiéndolo del estrés oxidativo (Pulido y col., 2009). Por otro lado, la participación de otras Prxs, como la Prx16 de *Lepidium sativum* (berro), y la PrxIIE cloroplastídica de Arabidopsis mostraron un aumento de su expresión en el endospermo en las fases finales de la germinación en presencia de ABA (Linkies y col., 2010).

La presencia de perfiles de expresión paralelos en los genes antioxidantes analizados AtTrxo1 y AtCAT2 con el nivel de  $H_2O_2$ , o entre la expresión de AtPrxIIIF y AtSrx plantean la posibilidad de circuitos reguladores comunes que podrían controlar la expresión de los distintos genes durante la germinación. Numerosos autores describen que el  $H_2O_2$  podría ser un intermediario en la regulación de la expresión de genes antioxidantes (de Pinto y col., 2013; Cembrowska-Lech y col., 2015). Este hecho se debe a la presencia de elementos conservados en los promotores de los genes que responden a estrés oxidativo como los motivos ARE (Antioxidant Response Elements), los motivos ABRE (Abcisic Response Element)

y los motivos TGA y TGACG (Tabla 22). La unión de TF activados vía redox a estos dominios podría favorecer la expresión de determinados genes antioxidantes ante la presencia de un estrés oxidativo. Además, la presencia de elementos ABRE en estos genes indica la influencia del *crossstalk* hormonas-ROS en la regulación de genes antioxidantes (El-Maarouf-Bouteau y Bailly, 2008; Bahin y col., 2011).

Un análisis *in silico* nos ha permitido identificar algunos de estos dominios en los promotores (p) de los genes analizados en este estudio: *AtTrxo1*, *AtPrxIIF*, *AtSrxIV*, *AtCAT2*. En la Tabla 22 se representan los principales elementos de respuesta a ROS y hormonas implicadas con ROS. Destaca la presencia de elementos ARE en el *pAtCAT2* y de TGACG en *pAtCAT2*, *pAtTrxo1* y *pAtSrxIV*. Además, la presencia de un elemento TGA también se observó en los promotores de *AtSrxIV* y *AtPrxIIF*, lo que podría sugerirnos una regulación común para ambos genes. Finalmente elementos ABRE se han encontrado en los promotores de *AtCAT2* y *AtSrx*.

En este sentido indicar que la regulación de algunas de estas enzimas por estrés oxidativo y hormonas, ya ha sido descrita por otros autores. Así, ciertas peroxirredoxinas presentan una expresión inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, entre ellas *AtPer1* o la *2-Cys-PrxA*, cuya expresión varía en función del nivel de estrés oxidativo. Así mismo, se ha descrito la regulación de la expresión de *CAT1*, *CAT2* y *CAT3* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y ABA durante la germinación en semillas de maíz (Mylona 2007; Polidoros y Scandalios, 1999).

**Tabla 22: Elementos en *cis* en el promotor de los genes antioxidantes de Arabidopsis *CAT2*, *Trxo1*, *PrxIIF* y *Srx*.** Extraído de Mylona 2007 y Mahalingam 2003. M = A/C (aMino); R = G/A (puRine); K = G/T; Y = T/C (pYrimidine (Keto)); W = A/T (Weak); B = G/T/C

Elemento	Secuencia	Gen				Responde a...
		<i>CAT2</i>	<i>Trxo1</i>	<i>PrxIIF</i>	<i>Srx</i>	
ARE	RTGACnnnGC	+	-	-	+	Antioxidante
TGACG	TGACG	+	+	-	+	ROS, MeJa, AIA, SA
TGA	AACGAC	-	-	+	+	ROS, AIA
ABRE-like	BACGTGKM	+	-	-	+	ABA

## 2.2. Análisis de expresión del gen *AtTrxo1* durante la germinación en condiciones de salinidad

La salinidad es uno de los estreses abióticos más frecuentes que afectan seriamente al rendimiento de los cultivos en zonas semiáridas, por lo que el conocimiento de los eventos fisiológicos, bioquímicos y moleculares que dirigen la germinación y el establecimiento de la planta es crucial para mejorar las expectativas de los cultivos en estas condiciones. La ocurrencia de un estrés abiótico en la primera fase de exposición de la semilla a agua puede retrasar o inhibir el proceso germinativo dependiendo del tiempo y la intensidad del estrés aplicado. En estas condiciones, las semillas tienen que superar el estrés abiótico a fin de garantizar la supervivencia de la próxima generación. Por otro lado, factores internos propios de cada especie y cada semilla como las condiciones de almacenamiento o las condiciones de la planta madre, determinarán en última instancia la sensibilidad o la resistencia específica al estrés (Almansouri *y col.*, 2001; Yamamoto *y col.*, 2005; Hakim *y col.*, 2011).

El efecto de la salinidad sobre semillas embebidas produce en general, un retraso en el proceso de germinación por el efecto osmótico y la toxicidad iónica específica de la sal (Garg, 2010; Luan *y col.*, 2014). Sin embargo, no está claro el efecto de cada uno de los componentes (iónico y osmótico) en las propiedades fisiológicas asociadas con la germinación y esta importancia relativa se mantiene a pesar del genotipo (Hakim *y col.*, 2011). Independientemente de la causa, en numerosas especies vegetales este retraso en la germinación en condiciones de estrés salino se ha asociado con un aumento de ROS, que a su vez puede inducir la activación de enzimas antioxidantes (Hernandez *y col.*, 2001; Yamamoto *y col.*, 2005), como ya hemos comentado.

Intensidades de estrés salino moderadas solo retrasan la germinación, mientras que altas intensidades tienen un impacto en los porcentajes finales alcanzados (Almansouri *y col.*, 2001). En nuestros ensayos de germinación la utilización de una concentración 100 mM de NaCl se correlacionó, en cuanto a su efecto osmótico, con un 10% de PEG y supuso una condición de estrés moderada. La germinación de semillas Wt de *Arabidopsis* en estas

condiciones de estrés mostró que el retraso observado en el proceso germinativo en estas condiciones se debió a un efecto iónico del NaCl más que a un efecto osmótico.

El papel de diferentes Trxs en respuesta a la salinidad ha sido descrito en un número concreto de plantas en distintos estados de desarrollo. Sin embargo, la información relativa a la respuesta de las Trxs a la germinación en condiciones de estrés salino es bastante escasa. Martí y col (2011) demostraron en plantas de guisante la influencia de PsTrx01 en la eliminación de ROS a través de la activación de PsPrxIIIF y de la vía respiratoria alternativa mediada por AOX, lo que podría proporcionar a la célula mecanismos de respuesta a la salinidad capaces de proteger a la mitocondria del estrés oxidativo en estas condiciones (Martí y col., 2011). En epicótilos de plántulas de guisante en condiciones de estrés salino, otras Trxs como la cloroplastídica PsTrxm1 presentó un aumento de su expresión (Fernández-Trijueque y col., 2012) similar al observado en el caso de la PsTrx01. El papel antioxidante frente al estrés salino de la Trx también ha sido demostrado en cepas de levadura deficientes que al ser complementadas con diferentes Trxs vegetales, concretamente las PsTrxf o PsTrxm1 de guisante eran capaces de crecer en altas concentraciones salinas y en presencia de tert-butil hidroperóxido (TBHP), una poderosa molécula oxidante. Por otro lado, estudios transcriptómicos en diversas especies vegetales del género *Populus* mostraron que la expresión de *Trxm*, *Trxh* y *TDX* aumentaba con un estrés salino a corto plazo (Ding y col., 2010).

Dadas estas evidencias y la participación de AtTrx01 durante la germinación discutida en el apartado anterior, nos resultó interesante el estudio de esta proteína durante la germinación en condiciones de salinidad.

Como hemos indicado, la adición de 100 mM de NaCl al medio de imbibición retrasó la germinación. Este retraso se produjo tanto en las semillas del fenotipo silvestre como en las semillas KO *AtTrx01*. Sin embargo, el retraso fue menos intenso en las semillas KO *AtTrx01*, que alcanzaron el  $t_{50}$  10 h antes que las Wt y además, completaron la germinación 24 h antes. El adelanto en la germinación del mutante con respecto al Wt sugiere que *AtTrx01* debe tener un papel en la regulación de la respuesta a la salinidad durante este proceso

fisiológico. De hecho, un comportamiento similar en condiciones de salinidad se ha descrito en mutantes con inserciones de T-DNA en genes que codifican enzimas antioxidantes, como la ascorbato oxidasa (AAO) simplástica y la 1-Cys Prx. La AAO es una enzima que cataliza la oxidación del ascorbato y se ha observado que semillas de líneas sobre-expresoras y de silenciamiento en este gen muestran un comportamiento germinativo normal en condiciones estándar, mientras que la aplicación de un estrés salino retrasa o adelanta la tasa germinativa, respectivamente. Este adelanto en la germinación del mutante silenciado en AAO en condiciones de salinidad estuvo relacionado con el aumento redox del par AsA/DHA en simplasto y apoplasto y con una disminución del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con respecto al Wt (Yamamoto 2005). En cuanto a la peroxirredoxina, se demostró que la sobre-expresión de la 1-Cys-Prx de Arabidopsis (AtPER1) en cebada adelantaba la germinación con respecto al Wt en sal, mientras que líneas de ARN interferente, casi desprovistas de la proteína AtPER1 y germinadas bajo estrés salino (10–175 mM NaCl) y osmótico (10–500 mM manitol) (Espelund y col., 1995), presentaban un adelanto en la germinación en varios días con respecto al Wt, mostrando además, mayores porcentajes de germinación a tiempo final (entre un 86-98% en mutantes frente a un 76% en Wt). Además, las líneas mutantes que carecían de AtPER1 se desarrollaron sin fenotipo bajo las condiciones estándar de crecimiento para cebada (Haslekas, 2003). Esta ausencia de fenotipo también se ha observado en nuestro laboratorio para los mutantes KO AtTrx01 crecidos en presencia y ausencia de sal (Ortiz-Espín y Iglesias-Fernandez, 2013).

El paralelismo encontrado durante la germinación en condiciones salinas en el comportamiento de los mutantes de las enzimas AAO y Prx descritos anteriormente y los de AtTrx01, podría apoyar la participación de estas enzimas como sensores de estrés jugando un papel en la ralentización de la germinación bajo condiciones desfavorables. Algunos de nuestros resultados pueden apoyar esta hipótesis, entre ellos el aumento de la expresión génica de AtTrx01 durante las primeras horas de la germinación en sal. Además, los ensayos de expresión estable también mostraron un aumento de actividad GUS con una intensidad proporcional al porcentaje de germinación en los cotiledones del embrión germinado, si bien con una intensidad menor que la presentada en ausencia de NaCl. Estos resultados están en línea con lo observado para otras especies vegetales donde se ha comprobado que el estrés

hídrico y salino limita la movilización de reservas amiláceas del endospermo (Bouaziz y Hicks, 1990; Yin *y col.*, 2009; Nagel *y col.*, 2014) en las que están implicadas ciertas Trxs. Sin embargo, el mecanismo exacto en el que AtTrxo1 estaría involucrada en este proceso de movilización de reservas necesita establecerse. Los resultados obtenidos en salinidad permiten plantear que AtTrxo1 podría actuar durante la germinación en condiciones salinas como sensor de estrés, regulando las condiciones óptimas para que la germinación se desarrolle con éxito.

En una primera aproximación para justificar las causas del adelanto observado en la tasa de germinación de la línea mutante con respecto al Wt, analizamos, al igual que en condiciones control, los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, así como la expresión de enzimas relacionadas con su eliminación, CAT2, Prx y Srx junto con el análisis de marcadores de estrés oxidativo.

Con respecto a los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto la línea silvestre como la mutante presentaron niveles máximos de acumulación en el inicio de la germinación (36 h), aunque el nivel de peróxido presentado por las semillas mutantes fue tres veces superior al observado en las semillas silvestres y esta diferencia se incrementó cuatro veces a las 48 h de la imbibición. Este aumento inicial en los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> coincide con lo descrito para otras especies vegetales en condiciones de salinidad (Puntarulo *y col.*, 1991; Hernandez *y col.*, 2001). En las fases más avanzadas de la germinación, los niveles de peróxido permanecieron bajos y muy similares en ambas líneas. Sin embargo, la diferencia inicial en el patrón de acumulación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entre el mutante y el Wt, que además coincide con un máximo de expresión del gen AtTrxo1, podría justificar el adelanto producido en la germinación del mutante. La adición de peróxido de hidrógeno adelanta la germinación en semillas de guisante (Barba-Espin *y col.*, 2010; Barba-Espín *y col.*, 2012) y semillas sometidas a estrés salino germinan antes bajo un tratamiento de peróxido de hidrógeno (Lin *y col.*, 2013).

Las diferencias en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no se tradujeron en un aumento de estrés oxidativo en la línea mutante con respecto a la línea silvestre. Es más, los cambios en los contenidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a lo largo de la germinación no produjeron diferencias suficientes en los

parámetros inductores de estrés oxidativo, esto es en los niveles de MDA y de carbonil proteínas.

El perfil de actividad catalasa durante la germinación en condiciones de estrés no presentó diferencias entre la línea mutante y la silvestre. El perfil de actividad fue aumentando con el tiempo de imbibición, lo que a su vez se correlacionaba con una disminución progresiva del contenido de  $H_2O_2$ . Sin embargo, la ausencia de diferencias en la fase inicial de la germinación en actividad Cat entre la línea mutante y la silvestre no pudo justificar completamente las diferencias en los niveles de  $H_2O_2$  observados entre líneas. Con respecto a los niveles de expresión del gen *CAT2*, las diferencias observadas entre líneas fueron evidentes únicamente a las 60 h y 72 h, donde la expresión *CAT2* en las semillas del silvestre estuvo incrementada con respecto a las mutantes. Sin embargo, tampoco en este caso se observó un paralelismo entre los niveles de expresión y actividad.

Con respecto al comportamiento de los genes *AtPrxIIIF* y *AtSrx*, tanto las semillas Wt como las mutantes presentaron perfiles de expresión paralelos para ambos genes, con un ligero aumento a las 48 h y 72 h de imbibición que como hemos indicado, coincidió con una disminución en los niveles de  $H_2O_2$ . El hecho de que la ausencia de *AtTrxo1* no modificara el perfil de expresión de estos genes a lo largo de la germinación con respecto al silvestre permite deducir que la expresión *AtPrxIIIF* no era suficiente para justificar las diferencias encontradas entre líneas en los niveles de peróxido en las fases tempranas de la germinación.

Estos resultados indican que la ausencia de *Trxo1* provoca un adelanto de la germinación durante el estrés salino, probablemente debido a su mediación en procesos redox de señalización. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que la ausencia de *AtTrxo1* conduce a un aumento inicial e importante de  $H_2O_2$ . Nuestros resultados indican que los niveles de expresión de *PrxIIIF* y actividad y expresión de *Cat* podrían justificar las diferencias entre semillas Wt y KO, si bien el mecanismo concreto que conduce a este aumento de  $H_2O_2$  no se ha determinado.

Finalmente destacar que estos resultados podrían tener ciertas implicaciones prácticas y podrían aplicarse a la hora de manejar semillas en ambientes o situaciones inductoras de estrés oxidativo donde se haga necesario adelantar su germinación, o en su caso sobreexpresar esta proteína y comprobar si se consigue un retraso que pueda ser conveniente en ciertas condiciones, algo que está ya estudiándose en nuestro laboratorio.

### 3. Regulación transcripcional de *AtTrxo1*

La ejecución de los procesos biológicos tales como el desarrollo, la proliferación, diferenciación y muerte celular requiere de unos elementos reguladores que permitan una expresión génica espacio-temporal adecuada, de forma que si conocemos cómo y dónde se regulan los genes, podremos actuar de una forma dirigida hacia la mejora del rendimiento de las cosechas o la tolerancia al estrés.

Para entender los mecanismos moleculares que gobiernan estos perfiles de expresión génica a escala global, es importante identificar los elementos reguladores a nivel transcripcional asociados con cada gen. De esta forma, la caracterización del sistema *cis-trans* (regulones) implicado en la expresión génica se convierte en un aspecto fundamental en el estudio de las rutas moleculares que gobiernan el funcionamiento de la célula.

La identificación inicial de estos elementos reguladores se basa en aproximaciones bioinformáticas y experimentales. Una aproximación bioinformática se basa en el principio de convergencia evolutiva y es que las secuencias importantes durante la evolución se conservan y por tanto, el alineamiento de las secuencias de los promotores de genes ortólogos nos puede ayudar a predecir los dominios en *cis* importantes para la regulación de un gen concreto. Experimentalmente estas secuencias deben ser validadas, normalmente a través del ensayo del gen reportero. En este ensayo, la posible región de ADN que regula la actividad del gen se clona en un plásmido aguas arriba de un gen reportero fácilmente identificable, tal como la beta-galactosidasa, la proteína verde fluorescente, la beta-glucuronidasa (GUS) o el gen de la luciferasa. Finalmente, la identificación de los reguladores en *trans* se puede analizar en el laboratorio a través de una búsqueda (*screening*) frente a una genoteca de TFs por ensayos de un híbrido en levadura (Y1H). Numerosos estudios han

descrito la presencia de regulones mediante estas estrategias como es el caso del gen *MAN7* en *A. thaliana* (Iglesias-Fernandez y col., 2014), el gen de una proteasa similar a la cathepsina 3 (Iglesias-Fernandez y col., 2013; Iglesias-Fernandez y col., 2014), la enzima lipasa 7 (Castrillo y col., 2011) y algunas Trxs.

La regulación transcripcional de tiorredoxinas vegetales no está muy estudiada, si bien se ha descrito una regulación circadiana de las Trxs cloroplastídicas de guisante *f* y *m1*, controlada por factores de transcripción CCA1 que se unen a elementos EE (Evening Element) en los promotores de sus genes. Además, CCA1 parece ser un regulador central en la coordinación entre la producción-eliminación de ROS en respuesta al estrés oxidativo (Lai y col., 2012). Este sistema proporciona un mecanismo de regulación adicional que podría estar relacionado con la regulación redox de proteínas diana dependientes de la luz (Barajas-Lopez y col., 2010). Los trabajos en ciclo circadiano controlado por Trx describen que la expresión relativa de *AtTrx-like5* (similar a Tiorredoxina 1 de mamíferos) y *AtTrxf2* responden de manera cíclica coincidiendo con los ciclos luz: oscuridad (Harmer y col., 2009) y que además de la luz, la expresión de *PsTrxf* y *m1* es regulada por glucosa, probablemente a través del TF DOF7, aunque las rutas de señalización redox conducentes a estos cambios en la expresión génica permanecen desconocidas (Barajas-López y col., 2012). En el presente trabajo de Tesis hemos identificado elementos de respuesta a luz y ritmo circadiano en el promotor de *AtTrxo1* (*pAtTrxo1*), así como reguladores en *trans* de estos elementos. Por ejemplo, destacamos la presencia de dominios en *cis* regulados por luz en *pAtTrxo1* como una G-box y la selección de proteínas de unión a estos elementos como el TF TOC1-like (Regulador 9 de pseudorespuesta), un TF que participa en la regulación del ciclo circadiano. Además, el homólogo a TOC1 like, TOC, que responde a glucosa, también interacciona con *pAtTrxo1*.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriormente descritas y la escasa información acerca de la regulación transcripcional de las Trxs nos dispusimos a analizar este aspecto en *AtTrxo1*. El análisis de la regulación en *cis* de *AtTrxo1* se realizó a través de la identificación de los ortólogos de este gen en distintas especies de Brasicáceas (*Capsella rubella*, *Eutrema salsugineum*, *Brassica rapa*, *Arabidopsis lyrata*) mediante un árbol filogenético, lo que nos

ayudó a caracterizar funcionalmente el promotor de *AtTrxo1*. El alineamiento de los ortólogos mediante sombra filogenética de *A. lyrata*, *C. rubella* y *A. thaliana* nos permitió identificar cuatro dominios en *cis* altamente conservados, denominados como A, B, C y D. De estos dominios, el elemento B localizado entre -622pb y -357pb del ATG, presentó un grado de conservación mayor, además de numerosas secuencias específicas y conservadas presentes en los promotores de distintos genes y descritas como de unión a TFs, entre las que destacaron los elementos de respuesta a luz (Gt-1, G-BOX) y de respuesta a estrés a/biótico (WRKY, NAC). Dado el grado de conservación y la longitud del dominio B, éste se dividió en tres subdominios B1, B2 y B3. El análisis de la actividad de todos estos dominios en la expresión de *AtTrxo1*, se realizó a través de delecciones seriadas de los mismos fusionadas transcripcionalmente al gen *GUS*. En los experimentos de expresión transitoria y estable, se observó una disminución progresiva de la actividad *GUS* paralela a la eliminación de los dominios conservados A, B1 y B2. Sin embargo, la eliminación adicional del dominio B3 produjo unos niveles de actividad comparables a los obtenidos al deleccionar los dominios A y B1, sugiriendo la presencia de un elemento represor de la actividad del gen *AtTrxo1* en el subdominio B3 (-439 a -357pb del ATG). Teniendo en cuenta estos resultados y en una primera aproximación en la búsqueda de posibles reguladores en *trans* de *AtTrxo1*, el subdominio conservado B2 fue utilizado como cebo en los experimentos de Y1H con TFs de *A. thaliana*. En estos experimentos se obtuvieron más de una veintena de posibles reguladores, la mayoría de los cuales pertenecían a miembros de seis familias de TFs distintas relacionadas con la respuesta al estrés y el desarrollo de la planta. La importancia discutida de la *AtTrxo1* en los procesos de germinación y estrés salino nos condujo a seleccionar dos familias en particular; la familia de los factores bZIP o cremallera básica de leucina y los C2H2 o en dedos de zinc, debido a su relevancia en los procesos fisiológicos mencionados.

### **3.1. Regulación transcripcional de *AtTrxo1* durante la germinación en condiciones control**

Para entender la regulación transcripcional de *AtTrxo1* en el proceso fisiológico de la germinación, es importante destacar cuáles son los principales reguladores transcripcionales

de este proceso. Las hormonas son ejecutores fundamentales que median en las respuestas fisiológicas de los vegetales y de hecho, la relación entre hormonas vegetales y agentes redox es de gran relevancia en la regulación génica de la planta, en su aclimatación al estrés y durante la germinación. Antioxidantes tales como GSH, GRX y TRX han sido descritos como reguladores redox centrales en las rutas de señalización hormonales (Foyer y Noctor, 2013), por lo que la participación de la *Trxo1* en dichas rutas regulando la germinación y la respuesta al estrés salino podría ser un aspecto interesante a considerar.

Diversas son las evidencias que tenemos del papel de la *AtTrxo1* durante la germinación. Según estudios de expresión estable el perfil de expresión de *AtTrxo1* aumentó con el tiempo de imbibición en el embrión de la semilla y en los cotiledones de plántulas, además, el mutante KO *AtTrxo1* no presentó variaciones en su tasa germinativa con respecto al silvestre en condiciones control. Estos resultados nos sugieren que la *AtTrxo1* debe estar participando en el desarrollo de la germinación, pero no de una forma imprescindible. De hecho, es posible que su ausencia esté compensada debido a la redundancia de otras Trxs presentes en la célula

El etileno y las giberelinas (GA) son importantes hormonas que regulan la salida de la latencia de la semilla y el desarrollo del proceso germinativo. De hecho, las rutas de señalización de estas hormonas contrarrestan las de ABA y favorecen que se induzca la germinación. Durante el proceso de dormición, sin embargo, el ABA limita la acción del etileno y GA reprimiendo su biosíntesis (Arc y col., 2013). La producción de etileno comienza en la fase de imbibición de la semilla e incrementa con el progreso de la germinación, si bien su expresión difiere entre especies (revisado en Kepczynski y Kepczynska, 1997; Matilla, 2000; Matilla y Matilla-Vázquez, 2008); además, la protrusión de la radícula a través de la cubierta seminal está siempre asociada con un pico de etileno. La respuesta transcripcional al etileno está mediada por elementos en *cis* del tipo AP2/EREF; estos elementos tienen un núcleo central GCC al que se unen numerosos factores de transcripción de la familia AP2/EREF como ERF (Ethylene Response Element). El elevado número de posibles TFs de tipo ERF en la unión en el promotor de *AtTrxo1* (*pAtTrxo1*) establecida en los ensayos de un

híbrido en levadura nos lleva a plantear la posible influencia del etileno en la regulación de la *AtTrxo1* durante la germinación.

Adicionalmente a estas observaciones, ciertos TFs de tipo bZIP (Basic Leucine Zipper), también se identificaron como posibles reguladores transcripcionales de *AtTrxo1*. De estos TFs destaca el bZIP9, un TF de la subfamilia C caracterizado por la presencia de hasta nueve heptámeros conservados en su extremo N-terminal y que cuenta con cuatro miembros en *A. thaliana* (Jakoby 2002). Este TF presentó una fuerte interacción con *pAtTrxo1* incluso en presencia de concentraciones elevadas, 100mM, del inhibidor 3AT. En este aspecto señalar la relación descrita para los factores de transcripción bZIP de las subfamilias C (bZIP 10 y bZIP25) y S (bZIP53) en la maduración de la semilla. Estos estudios revelan que bZIP53 heterodimeriza con bZIP10/bZIP25 y junto con ABI3 forman un complejo proteico que regula positivamente la expresión de genes que codifican proteínas de reserva en la semilla (SSPs: Seed Storage Proteins) como albúminas y cruciferinas durante la maduración de la misma (Alonso, 2009; Lara, 2003).

Si bien carecemos de datos concluyentes que avalen el modo en que bZIP9 regula la expresión de *AtTrxo1*, el paralelismo encontrado durante la germinación de la semilla en los perfiles de expresión de *AtbZIP9* y *AtTrxo1* por RtqPCR en condiciones control, sugiere un posible papel para bZIP9 como regulador positivo de la *AtTrxo1* durante este proceso. Además, el hecho de que *AtTrxo1* se exprese específicamente en el embrión de la semilla y los futuros cotiledones y el papel descrito para otros miembros de la familia C de bZIPs en la activación de SSPs podrían apoyar la hipótesis del papel de bZIP9 en la movilización de SSPs a través de la activación de *AtTrxo1*. Sin embargo, aunque este aspecto es interesante, se necesitan de estudios adicionales para poder confirmar esta hipótesis.

### **3.2. Regulación transcripcional de *AtTrxo1* durante la germinación en condiciones 100mM NaCl**

La condición de estrés salino retrasa la germinación en semillas de distintas especies vegetales de glicófitas, debido principalmente a un aumento en los contenidos de la hormona ABA (Weitbrecht y col., 2011). Esta hormona favorece la adaptación de la planta a

la salinidad antes de reiniciar el crecimiento. El adelanto de la germinación en condiciones salinas en el mutante KO *AtTrxo1* con respecto al Wt podría estar mediada por procesos regulados por esta hormona tal y como discutiremos a continuación. De hecho, la relación entre Trx y ABA ya se ha descrito para otras Trxs como la *Trxh1* citosólica de *Oryza sativa*, donde mutantes KO *Trxh1* adelantaron la germinación en respuesta a concentraciones crecientes de ABA, mientras que las semillas sobre-expresantes presentaron un fenotipo sensible a la sal y presentaron niveles disminuidos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Zhang 2011). Así mismo, mutantes KO de la Trx atípica TTL (Tetratricopeptide-Repeat Thioredoxin-Like 1) mostraron un adelanto en la tasa germinativa en presencia de altas concentraciones de NaCl, KCl y ABA, si bien, el desarrollo posterior de la planta se inhibió considerablemente (Rosado 2006).

Analizando los promotores de los genes más representativos inducibles por ABA se encontró que su expresión requiere de la presencia de múltiples elementos en *cis* (ABRE), que cuentan con la secuencia PyACGTGG/TC, o la combinación de un ABRE con un elemento acoplado (CE) (revisado en Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki 2006; Nakashima y *col.*, 2009). La mayoría de los CE conocidos son similares a ABREs y cuentan con un motivo A/GCGT (Hobo y *col.*, 1999). Estos elementos ABRE se han encontrado en los promotores de genes expresados en semillas (Nakabayashi y *col.*, 2005) y en genes inducibles por sequía y estrés abiótico (Maruyama y *col.*, 2012). De hecho, en los promotores de estos últimos genes son también frecuentes los elementos DRE (Dehydration Response Element)/ CRT (Tandem Repetition C). En nuestro análisis mediante búsquedas *in silico*, encontramos en el *pAtTrxo1*, elementos DRE pero no ABRE, por lo que es posible que *AtTrxo1* sea regulada por deshidratación pero no por ABA. De hecho, los TFs de unión a secuencias tipo DRE cuentan con un factor de respuesta a etileno ERF/AP2 con un dominio AP2 de unión al ADN (Stockinger y *col.*, 1997; Liu y *col.*, 1998). En este sentido, nuestros ensayos de Y1H revelaron la presencia de numerosos TFs ERF/AP2 como posibles reguladores de la expresión génica de *AtTrxo1* lo que apoyaría la regulación de la expresión génica de *AtTrxo1* por deshidratación.

La represión de genes regulados por ABA está menos estudiada que la activación, si bien Sakamoto y *col.*, (2004) describieron la presencia de una familia de TFs en dedos de zinc del

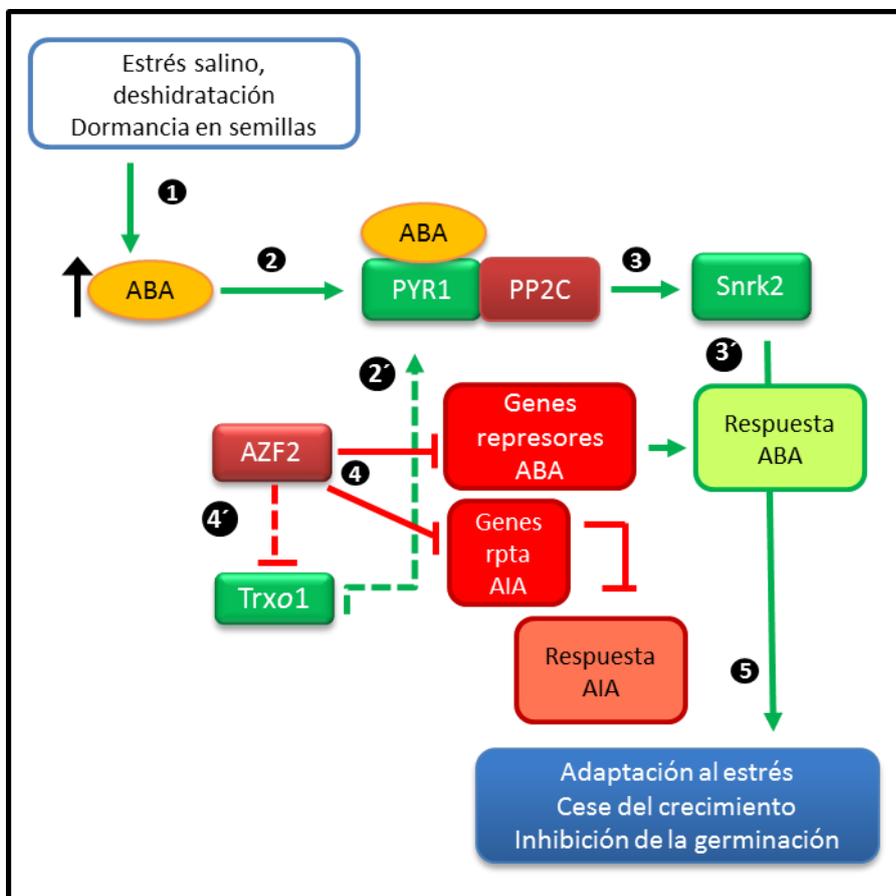
tipo C2H2 cuyos miembros AZF2 y STZ (Salt Tolerance Zinc Finger) se inducían fuertemente por deshidratación, salinidad, estrés por frío y tratamiento con ABA. Estos miembros se unían a los promotores de los genes que regulaban a través de unas secuencias consenso del tipo A(G/C)T. La relación de AZF2 y rutas mediadas por ABA fue estudiada a través de mutantes de una fosfatasa PP2C (*abi1*), que produce una respuesta desequilibrada de ABA y mutantes *aba* que son deficientes en la biosíntesis de la hormona. En comparación con el Wt, la inducción de AZF2 se redujo en mutantes *abi1* y *aba* sometidos a deshidratación pero no a estrés salino, indicando que una parte de la expresión de AZF2 debía ser inducida por deshidratación por una ruta dependiente de ABA mediada por ABI1, mientras que la expresión de AZF2 en respuesta a sal debía ser inducida por una ruta independiente de ABA. Posteriormente, Kodaira y col. (2011) describieron que AZF2 reprimía genes que inhibían la respuesta a ABA, así como genes de auxinas (SAUR: Small Auxin-up RNA). Estos resultados fueron determinantes en establecer que AZF2 y STZ actúan en la señalización por ABA y AIA en la respuesta a estrés osmótico encaminada a bloquear temporalmente el crecimiento de la planta y adaptarse al estrés.

En esta Tesis, el TF AZF2 se ha identificado como una proteína de unión a *pAtTrxo1* y por tanto, como un posible regulador transcripcional de su actividad. El AZF2 presentó un patrón de expresión durante la germinación de la semilla que podría ser compatible con el de un represor de *AtTrxo1* según los ensayos de expresión relativa que hemos realizado. Además, durante el estrés salino, su perfil de expresión seguía siendo compatible con el de un posible represor de la *AtTrxo1*, si bien estudios posteriores nos permitirán establecer el modo de actuación de este TF sobre la regulación *in vivo* de la expresión de *AtTrxo1* durante la germinación (Martí y col., 2011).

Los resultados encontrados para el receptor PYR1, identificado como posible proteína diana de PsTrxo1 en los experimentos realizados *in vitro* en este trabajo de Tesis; el descubrimiento de TFs reguladores de genes de ABA comunes a la regulación del gen *AtTrxo1* y el adelanto observado en la germinación en condiciones salinas en el mutante KO *AtTrxo1*, plantean la interrelación de Trxo1 con las rutas mediadas por ABA durante este proceso fisiológico. En este sentido, el grupo de Park y col. (2009) demostraron que la

pirabactina, un análogo del ABA, es capaz de inhibir la germinación en condiciones de estrés a través del receptor PYR1 (Iyer y *col.*, 2001; Zhao y *col.*, 2007; Radauer y *col.*, 2008; Toh y *col.*, 2008). Los mutantes PYR1 tenían una sensibilidad reducida a pirabactina pero no a ABA, indicando la presencia de rutas compensatorias. De hecho, de los diversos mutantes de la familia de receptores PYR/PYLs analizados en plantas, sólo el cuádruple mutante (pyr1/pyl1/pyl2/pyl4) mostró una desregulación significativa del cierre estomático y una germinación normal en concentraciones de ABA de hasta 0,9  $\mu$ M. Esta fuerte insensibilidad a ABA en la regulación del cierre estomático y la germinación se manifestó como una menor expresión del gen de respuesta a ABA Rd29 y una menor actividad quinasa (Park y *col.*, 2009). Estos datos apoyaron el hecho de que la ausencia de los receptores de ABA produce mutantes insensibles a ABA y a estrés salino/osmótico. Según estos datos, es posible que Trxo1 favorezca una regulación positiva del receptor ante un aumento en las concentraciones de la hormona. Estos hechos podrían explicar, al menos parcialmente, por qué la ausencia de AtTrxo1 en condiciones de estrés salino adelanta la germinación con respecto al Wt, ya que el comportamiento de los mutantes KO AtTrxo1 es similar al observado en mutantes con cierta insensibilidad a ABA. Sin embargo, la única activación de PYR1 por Trxo1 no podría explicar completamente el comportamiento durante la germinación, debido al efecto compensatorio que producirían otros receptores PYL (Park y *col.*, 2009). Ensayos que intenten validar la interacción de Trxo1 con receptores de ABA tanto *in vivo* como *in vitro* ya se han iniciado en nuestro laboratorio y junto con el estudio de la respuesta a ABA del mutante KO AtTrxo1, podríamos profundizar en las rutas moleculares que intervienen, pudiendo confirmar o rechazar el modelo de hipótesis que proponemos a continuación (Fig. 64). En este modelo se plantea un posible mecanismo de acción de respuesta a ABA durante la germinación en condiciones de salinidad, mediado por Trxo1 y AZF2. Los niveles de expresión de ambas proteínas permitirán un efecto positivo de la respuesta a ABA a través de distintas rutas. De esta forma, una baja expresión de AZF2 favorece un aumento de Trxo1 y por tanto la activación de la ruta de ABA a través de PYR1. En el caso contrario, un aumento en la expresión de AZF2 favorece la represión de Trxo1 y la activación de la ruta de ABA a través de la inhibición de genes represores de ABA. No obstante, es necesario considerar que otros TFs deben estar interviniendo en la regulación

de estas rutas y en la modulación de la respuesta a ABA, cuyo conocimiento exige de futuras investigaciones.



**Figura 64: Modelo de interrelación Trxo1 con las rutas de ABA.** Diversos estreses abióticos como salinidad, deshidratación y en el estado de dormancia de la semilla aumentan los niveles de ABA (1). Cuando ABA aumenta se une al receptor PYR1 que secuestra a PP2C dejando a la quinasa SnRK2 libre (2). Trxo1 podría favorecer la formación del complejo ternario mencionado (2'). SnRK2 libre puede activar genes de respuesta a ABA (3). El TF AZF2 es un represor de genes represores de ABA y genes de respuesta a auxinas (AIA) (4) lo que favorece la respuesta a ABA (5). Por otro lado AZF2 también reprime la expresión de Trxo1 (4'), lo que inhibiría la ruta de ABA. El nivel de expresión de cada uno de estos elementos AZF2/Trxo1 hará que predomine la ruta de activación de ABA por Trx o por AZF2. Las flechas verdes muestran la activación y en rojo la represión de los procesos destacados. Las flechas continuas indican los procesos que se conocen, en líneas discontinuas están los procesos que, en base a nuestros resultados, podrían estar funcionando en esta red de señalización. Cuadros rojos represores de la respuesta de ABA, cuadros verdes activadores de la respuesta de ABA.

#### 4. Papel de PsTrx01 en la respuesta al estrés oxidativo y PCD generado por distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

El uso de cultivos celulares constituye una aproximación metodológica rápida y adecuada para los estudios *in vivo* de rutas moleculares y/o bioquímicas, debido a la alta tasa de crecimiento y la presencia de células indiferenciadas. La diversidad de tipos celulares en cualquier planta que crece de forma natural hace difícil el estudio de fenómenos moleculares y bioquímicos. Así, esta metodología nos permite estudiar el funcionamiento de distintos sistemas biológicos *in vivo* superando las barreras propias del estudio en plantas, como son la diferenciación tisular o los ciclos de crecimiento demasiado largos. Dentro de los cultivos vegetales, el de células de tabaco BY-2 (TBY-2) es uno de los cultivos más utilizado en biología vegetal.

En esta Tesis, los cultivos de células TBY-2 se han utilizado con el fin de estudiar la participación de la proteína PsTrx01 en procesos relacionados con el estrés abiótico y la muerte celular. Para ello, se obtuvieron líneas celulares estables sobre-expresantes de la proteína madura PsTrx01 (Martí y *col.*; 2009) fusionada al promotor constitutivo 35S::CaVm (Cauliflower Mosaic Virus) y a la proteína verde fluorescente (GFP). También se obtuvieron líneas transformadas únicamente con el vector vacío conteniendo GFP y su correspondiente promotor que se utilizaron como controles experimentales de la transformación. El vector utilizado contenía un péptido señal que dirigía a la proteína GFP al retículo endoplásmico, lo que permitió la localización de la transformación mediante su visualización en el microscopio de fluorescencia. El uso de la GFP como un segundo marcador de transformación, además del antibiótico kanamicina, ha sido ampliamente descrito en la bibliografía por numerosos autores (Karimi y *col.*; 2002; Bui y *col.*; 2015). Este marcador facilita la selección de los callos transformados, a partir de los cuales se generarán los cultivos celulares.

Adicionalmente, la sobre-expresión de la proteína en las líneas transformadas con PsTrx01 se analizó por western-blot utilizando un anticuerpo dirigido contra un epítipo específico presente en el extremo carboxílico de la secuencia aminoacídica de PsTrx01 (Martí

y col., 2009). El análisis de diferentes fracciones subcelulares reveló la presencia de esta proteína en las células sobre-expresantes y no en las control GFP, principalmente en mitocondrias. Una señal de menor intensidad identificó a la proteína en plastos y núcleo, pero no en el citoplasma, confirmándonos que la proteína sintetizada por las células TBY-2 era capaz de importarse y acumularse en los mencionados orgánulos, al igual que se describió en hojas de guisante (Martí y col., 2009).

La utilización de dos líneas sobre-expresantes de PsTrx01 y una línea control GFP nos permitió identificar las posibles diferencias morfológicas y bioquímicas asociadas a la transformación y sobre-expresión. De esta forma, se observó que la presencia de PsTrx01 en los cultivos celulares de TBY-2 no modificó el estado oxidativo de lípidos, proteínas, el contenido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO ni los niveles de GSNO, así como la actividad de las enzimas antioxidantes del ciclo ASC-GSH. Sin embargo, la sobre-expresión de PsTrx01 produjo una menor actividad antioxidante catalasa junto con un menor contenido en GSH, lo que podría indicar una interrelación entre Trx01 y ROS que podría influir en la respuesta celular a una situación oxidativa como la que provoca un tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. De hecho, la relación entre GSH y Trx ya ha sido descrita en situaciones concretas en las que se ha establecido que el GSH podría participar como un reductor alternativo de Trxh3 (Reichheld y col.; 2007). Por otro lado, en células deficientes en Trx2 se ha descrito un aumento de ROS intracelular acompañado de un aumento de GSH y la aparición de apoptosis. Cuando estas células se trataron con BSO, un inhibidor de la síntesis de glutatión, aumentó la muerte celular, posiblemente aumentando el número de células necróticas (Tanaka y col.; 2002). Por otro lado, la ausencia de Trx1 citoplasmática y Trx2 mitocondrial en dobles mutantes de levadura, produjo un aumento en el contenido total de glutatión, principalmente de la forma oxidada, por un mecanismo desconocido subyacente de ajuste de niveles de glutatión en respuesta a la deficiencia de tiorredoxinas (Muller; 1996). De acuerdo con nuestros resultados, la sobre-expresión de PsTrx01 produjo una disminución del contenido en GSH celular que no se acompañó de niveles superiores de la forma oxidada GSSG ni de su conjugación con NO en forma de GSNO. Esto indica que la biosíntesis de glutatión podría estar afectada en las células sobre-expresantes quizás debido a la existencia de un mecanismo de

retroalimentación negativo que regularía la expresión de glutatión ante un exceso de poder reductor en la célula.

En este contexto se ha considerado que el GSH puede actuar como un regulador de la expresión génica de Trxs y Grxs y su contenido celular se ha relacionado con los niveles de actividad catalasa. Así, el análisis de mutantes de *Arabidopsis* que carecían de la forma fotorrespiratoria de catalasa (mutantes *CAT2*) y por tanto, deficientes en esta ruta de detoxificación de  $H_2O_2$ , mostraron una acumulación de GSH, lo que a su vez condicionaba la producción de  $H_2O_2$  a través de la fotorrespiración (Han *y col.*; 2013). En nuestras células sobre-expresantes de *PsTrx01*, la disminución en el contenido de glutatión en relación a las células control podría estar en consonancia con la menor actividad catalasa observada, como resultado de la sobre-expresión.

El  $H_2O_2$  puede actuar como un inductor de estrés oxidativo, pudiendo favorecer una muerte celular programada en células TBY-2 (Houot *y col.*; 2001). El tratamiento de las células con distintas concentraciones de  $H_2O_2$  reveló que la sobre-expresión de *PsTrx01* provocaba una respuesta distinta a la presentada por la línea control dependiendo de la concentración de  $H_2O_2$  utilizada. De esta manera, concentraciones de  $H_2O_2$  de 15 mM provocaron una disminución similar en la viabilidad de la línea control y líneas sobre-expresantes, mientras que concentraciones superiores a 35 mM  $H_2O_2$  provocaron un efecto diferenciador en la viabilidad de ambas líneas. Atendiendo a esta respuesta decidimos emplear dos concentraciones de  $H_2O_2$  con el fin de estudiar la influencia de la intensidad del estrés aplicado en el metabolismo antioxidante bajo una condición de sobre-expresión de *PsTrx01*. Además, el comportamiento paralelo observado para ambas líneas sobre-expresantes ante una misma condición de estrés (niveles bajos/elevados de  $H_2O_2$ ) nos permitió seleccionar una sola línea para continuar con el análisis experimental posterior.

Se ha descrito que la señalización por ROS está relacionada con las características químicas de la especie reactiva y la dosis, siendo el  $H_2O_2$  una de las especies reactivas particularmente implicada en la señalización, con una buena estabilidad relativa y una movilidad destacada entre compartimentos y células (Vranová *y col.*; 2002; op den Camp;

2003; Gadjev *y col.*; 2008). En general, dosis bajas de  $H_2O_2$  provocan una protección contra el estrés oxidativo producido durante el estrés abiótico, activando respuestas de defensa necesarias para el mantenimiento de la homeostasis redox celular, mientras que dosis más elevadas en rangos específicos de  $H_2O_2$  dependiendo de las especies y condiciones, provocan muerte celular programada (PCD). Finalmente, dosis muy altas pueden desbordar la capacidad antioxidante de la célula y provocar una necrosis (Houot *y col.*; 2001; de Pinto; 2002; Dat *y col.*; 2003; Laloï *y col.*; 2006; Van Breusegem; 2006). El óxido nítrico (NO) también se ha descrito como inductor de PCD. De hecho, ha sido demostrado que la respuesta hipersensible es activada por el balance NO/ $H_2O_2$  (Delledonne *y col.*; 2001). Esta relación podría incluso discriminar entre distintos fenotipos de muerte celular (Montillet; 2005), y a este respecto, se ha observado que en plantas y en células vegetales se ha observado que no existe un único tipo de PCD (Reape *y col.*; 2008). De entre estos tipos, se ha descrito un proceso de PCD similar a la apoptosis (AL-PCD, Appoptotic-Like Programmed Cell Death), con características morfológicas diferentes de la autofagia y la necrosis definidas en la PCD de sistemas animales. La condensación del protoplasto lejos de la pared celular, así como la fragmentación del ADN en múltiplos de 180 pb son característicos de AL-PCD y no de necrosis (Burbridge *y col.*; 2006). La fragmentación de ADN puede aparecer como una mancha difusa de alto peso molecular en el gel de agarosa (McCabe *y col.*; 1997), y parece ocurrir después de la degradación completa que normalmente tiene lugar en la necrosis inducida. Se ha descrito que el  $H_2O_2$  es capaz de provocar necrosis o PCD, aunque ambos tipos se consideran como dos extremos del mismo fenómeno, llamado por algunos autores necro-apoptosis (Casolo *y col.*; 2005).

En este trabajo de Tesis, el tratamiento con 15 mM de  $H_2O_2$  produjo un descenso en la viabilidad en torno a un 15% con respecto a la condición de no tratamiento tanto en la línea sobre-expresante como en la línea control. Además, el  $H_2O_2$  produjo en ambas líneas celulares la aparición de diferentes marcadores característicos de AL-PCD, especialmente en la línea sobre-expresante, lo que podría sugerirnos el papel de la PsTrx01 como proteína pro-apoptótica. En plantas no se ha descrito una función para Trxo en AL-PCD por lo que los resultados obtenidos brindan la posibilidad de investigar el papel de esta tiorredoxina en sistemas vegetales en situaciones inductoras de muerte celular. Sin embargo, en sistemas

animales, es bien conocida la implicación de Trx1 citosólica y Trx2 mitocondrial en la apoptosis, a través de la nitrosilación/denitrosilación de proteínas implicadas en rutas de PCD como caspasas. Estas actividades dependen además, del estado redox de la Trx implicada (Wu y *col.*; 2010; Sun y *col.*; 2013), por lo que Trx1 y Trx2 puede actuar como pro u anti-apoptótica, si bien el mecanismo molecular no está del todo establecido.

Analizando las consecuencias oxidativas del tratamiento de las células con 15 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el patrón observado de AL-PCD en ambas líneas estuvo acompañado por un mayor estrés oxidativo debido principalmente a aumentos en peroxidación lipídica y contenidos intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ante esta situación, el sistema antioxidante celular, al menos los contenidos totales en ASC y GSH, disminuyeron a favor de una oxidación en el estado redox del ASC fundamentalmente, ya que los pares redox GSH/GSSG no se modificaron tan fuertemente. Junto a esto, la disminución en Cat y APX, podrían contribuir al mayor estado oxidativo encontrado en ambas líneas en estas condiciones. Además, la actividad de los sistemas enzimáticos encargados de regenerar las formas oxidadas de ascorbato y glutatión, no se incrementaron lo que podrían también influir en la bajada generalizada de poder antioxidante observada tras el tratamiento. Todo ello conllevó el establecimiento del estado oxidativo a nivel celular que podría favorecer una AL-PCD moderada.

El efecto del tratamiento con una mayor concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como es 35 mM, produjo una respuesta diferencial entre las líneas. De este modo, en la línea control, 72 h después del tratamiento, no se detectó viabilidad alguna, mientras que en la línea sobre-expresante el 60% de las células aún permanecían viables. Estos resultados fueron congruentes con trabajos realizados en cultivos celulares de TBY-2, en los que se ha demostrado, que un aumento en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por encima de cierto nivel umbral produce la inducción de una muerte celular generalizada (Houot y *col.*; 2001; de Pinto; 2002; de Pinto y *col.*; 2006). De esta forma, en esta Tesis se presenta por vez primera, la participación de una Trx01 vegetal en la ralentización de una muerte celular inducida por una situación de estrés oxidativo. En nuestros cultivos, la exposición a 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó una constricción del citoplasma y una fragmentación del ADN, evidencias que describen el proceso de AL-PCD, si bien, el patrón de fragmentación del ADN mostró diferencias entre

ambas líneas. Mientras en la línea sobre-expresante se observaron evidencias de *laddering* a las 72 h de tratamiento, en las células de la línea control todo el ADN se encontró degradado mostrándose como una sola banda en torno a los 200 pb. Estas diferencias en la apariencia del ADN justificaban el desencadenamiento previo de una AL-PCD o necro-apoptosis en la línea control. Adicionalmente, en ambas líneas se observó también la presencia de núcleos pre-apoptóticos y micronúcleos, concretamente a las 48 h y 72 h respectivamente, similar a lo descrito por Houot y col. (2001) en células TBY-2. En conclusión, la sobre-expresión de PsTrxo1 provoca un retraso de tres días en la tasa de muerte bajo un tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones elevadas (35 mM), con respecto a la línea control, lo que indica que la Trxo1 podría estar protegiendo a la célula de un proceso de necrosis o de una PCD temprana. De hecho, a las 48 h después del tratamiento, mientras en la línea control aparecían células necro-apoptóticas, en la línea sobre-expresante, predominaba un menor porcentaje de células muertas con un aspecto apoptótico y una constricción muy evidente del citoplasma. Los datos permiten concluir que la intensidad del estrés oxidativo aplicado afecta al porcentaje de viabilidad celular, si bien el mecanismo que desencadena esta muerte celular parece ser distinto entre las líneas analizadas: mientras en la línea control se produce una muerte por el estrés oxidativo provocado por una baja concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 mM), una muerte por necro-apoptosis parece suceder a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 mM). La sobre-expresión de PsTrxo1 promueve una muerte por AL-PCD de intensidad moderada, dependiendo de la dosis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

La posible relación entre estos comportamientos y el metabolismo antioxidante se analizó utilizando los parámetros anteriormente descritos para el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 15 mM fundamentalmente marcadores de estrés oxidativo, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO, GSNO, junto a los principales eliminadores de peróxido de hidrógeno en la célula: Cat, APX y Prx.

El análisis del estrés oxidativo inducido por el tratamiento, reveló que 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocaba una respuesta similar entre ambas líneas en términos de oxidación proteica por carbonilación, pero una menor oxidación lipídica en la línea sobre-expresante a partir de las 24 h, lo que además era congruente con los menores niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontrados en esta línea. Los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la línea control aumentaron de forma significativa desde el

inicio del tratamiento hasta el final del mismo (72 h), mientras que en la línea sobre-expresante el aumento en  $H_2O_2$  sólo fue evidente en las primeras horas, estando compensado posteriormente. El perfil de los niveles endógenos de peróxido, observado en la línea sobre-expresante era compatible con los niveles de viabilidad y reflejan una mayor capacidad protectora frente al estrés oxidativo en estas células. Estos resultados están de acuerdo con lo descrito por otros autores que demuestran que un cierto nivel de  $H_2O_2$  y la acumulación de hidroperóxidos causa procesos de PCD en cultivos de células vegetales (Houot *y col.*; 2001; Montillet; 2005; de Pinto *y col.*; 2006). Así mismo, también se ha descrito que el nivel de peroxidación lipídica permanece constante en la PCD inducida por narciclasina y aumenta tras tratamientos por choque de calor en células TBY-2. En este caso, la acumulación de hidroperóxidos aumenta con el tiempo de tratamiento, sugiriendo que la acumulación de peróxidos lipídicos, determinada como contenido en MDA, está relacionada con la muerte celular (Locato *y col.*; 2008; Lu *y col.*; 2012). Estos resultados justifican, en nuestro caso, que la pérdida de viabilidad celular en la línea control se produjera con anterioridad y fuese más significativa a la presentada en la línea sobre-expresante.

La capacidad para resistir una muerte inducida por  $H_2O_2$  en TBY-2 parece depender de un aumento de la capacidad antioxidante de la célula (Kiraly *y col.*; 2002). El ciclo ASC-GSH forma parte del sistema antioxidante encargado del control de los niveles de  $H_2O_2$  y se ha descrito como implicado en la transducción de señales en PCD, en la que, no solo los ROS, sino también el NO juegan un papel esencial (de Pinto *y col.*, 2002). Algunos trabajos subrayan que las ROS activan la síntesis de NO y viceversa, y que existe una sinergia entre estas dos especies reactivas en la inducción de la muerte celular programada (Delledonne *y col.*; 2001; de Pinto *y col.*; 2012). En el caso de PCD inducida por tratamientos simultáneos de NO y  $H_2O_2$ , se ha observado que se requiere la disminución de la actividad APX y una alteración en el estado redox y en los niveles de ASC y GSH hacia las formas oxidadas (de Pinto; 2002; de Pinto *y col.*; 2006; de Pinto *y col.*; 2013). Cuando se analizaron los niveles de ASC y GSH observamos una disminución del estado redox de ambos antioxidantes, concretamente de las formas reducidas y a un aumento de las formas oxidadas, tal y como señalan otros autores (de Pinto; 2002; de Pinto *y col.*; 2006; de Pinto *y col.*; 2013), si bien, en

la línea sobre-expresante el estado redox del GSH estuvo mejor balanceado a pesar de su menor contenido inicial.

Junto a estos cambios, recientemente se ha descrito un aumento de agentes S-nitrosilantes como GSNO y NO en condiciones similares. Además, la inactivación de APX por S-nitrosilación, lo que probablemente constituía un marcaje de ubiquitinación para su eliminación por el sistema de proteasas (de Pinto y *col.*, 2013), es un ejemplo de la posible función señalizadora ejercida por este aumento de radicales del nitrógeno. El análisis del contenido de NO y GSNO en nuestra célula, mostró que los niveles de NO aumentaron en mayor medida en la línea control que en la sobre-expresante lo que unido al mayor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> descrito apoyaría el papel señalizador de NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la inducción de PCD. A su vez, el GSNO mostró modificaciones muy significativas en sus niveles en ambas líneas celulares, principalmente en las primeras 4 h del tratamiento, con un aumento de aproximadamente 40 veces con respecto a los contenidos en células no tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estas diferencias en los niveles de GSNO se hicieron menos importantes en tiempos posteriores de tratamiento, llegando a alcanzar valores similares a los de las células no tratadas, en ambas líneas celulares.

El equilibrio redox celular depende en cierta medida tanto del sistema ASC-GSH como del formado por Trx/Prx, ambos regulan el contenido de ROS en la célula y directa o indirectamente, el estado redox de metabolitos celulares. La oxidación de residuos cisteína en el sitio activo de una enzima, es una de las modificaciones post-traduccionales que se producen en situaciones de estrés oxidativo y que afectan a la actividad de la proteína, sin embargo, la alteración de la actividad enzimática podría también ocurrir si la Cys oxidada está localizada en una parte importante para la conformación estructural de la proteína (Cys estructural), (Holmgren; 1995; Holmgren y Bjornstedt; 1995). La Trxo1 de guisante carece de Cys estructurales y por esta razón, se considera más resistente que otras proteínas al estrés oxidativo, incluyendo las Trxs procariontas y la Trx mitocondrial de mamíferos, Trx2 (Miranda-Vizuet y *col.*; 1997; Spyrou y *col.*; 1997). Además, también se ha descrito que la expresión elevada de ARNm de Trx2 de levadura, mediada por YAP1, confería resistencia al peróxido

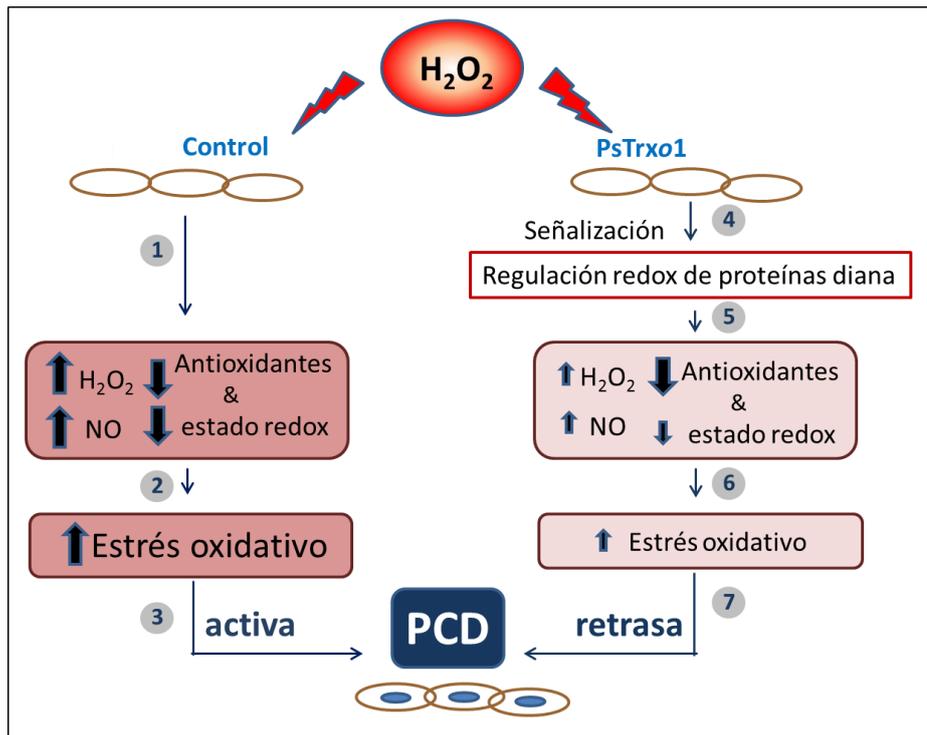
de hidrógeno, señalando a esta tiorredoxina como una parte crucial de la respuesta al estrés oxidativo (Kuge *y col.*; 1997) similar a lo encontrado en nuestro trabajo para PsTrx01.

Junto con peroxidasa como la APX, otro eliminador importante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es la enzima catalasa. El estudio de la actividad de ambas enzimas en las condiciones inductoras de PCD descritas, reveló que la actividad APX disminuyó fuertemente en ambas líneas a lo largo de todo el periodo de estudio analizado, justificando su participación en el desequilibrio redox producido en esta situación, tal y como se traduce del cociente redox analizado de ASC y GSH. Esta observación apoya los resultados de otros autores que describieron una respuesta temprana en la actividad APX frente a una condición inductora de PCD (de Pinto *y col.*; 2006; Locato; 2006; Locato *y col.*; 2008; Locato *y col.*; 2009; Lu *y col.*; 2012). Interessantemente, la actividad catalasa pero no la de APX fue diferente entre las dos líneas celulares no tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con una actividad inferior en la línea sobre-expresante, lo que podría sugerir que en estas condiciones, la menor actividad catalasa podría estar compensada por otros sistemas antioxidantes. Tras el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la disminución en esta actividad en células control, fue compatible con el aumento del contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que ocurre en estas células; de modo similar el aumento de la actividad catalasa en las células sobre-expresantes PsTrx01 fue compatible con la disminución en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que se producía en ellas. Estos datos señalan a catalasa como una enzima fundamental en el control de los niveles endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en una condición inductora de PCD.

Otra proteína implicada en el control de hidroperóxidos, incluyendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, es la peroxirredoxina mitocondrial (PrxIIIF), una de las proteínas diana de PsTrx01 (Dietz *y col.*, 2006; Martí *y col.*, 2009). Los cambios en esta proteína mitocondrial en ambas líneas fueron diferentes tras el tratamiento, disminuyendo un 71% en la línea control con respecto a un 41% de la línea sobre-expresante. En este sentido, el análisis proteómico de los cambios inducidos en cultivos de células TBY-2 sometidas a PCD, bajo un tratamiento de 50 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Vannini *y col.*; 2012), mostró un descenso generalizado de distintas Prxs así como de Trx *h* citosólica. Este patrón se relacionó con un aumento de la oxidación celular y una disminución de la estabilidad proteica debido a una inhibición de la función peroxidasa y chaperona de Prx y Trx respectivamente. Considerando los resultados anteriores, la sobre-

expresión de PsTrx01 en células TBY-2, podría modular la actividad de sus proteínas diana, entre las que se encuentra PrxIIIF y, en este sentido, favorecer su actividad peroxidasa y/o chaperona contribuyendo de este modo a la tolerancia de las células sobre-expresantes al tratamiento oxidativo, lo que les permitiría mantener su viabilidad por más tiempo. Sin embargo, no podemos excluir la posibilidad de que otras enzimas reguladoras de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estén participando en la regulación de los niveles endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las células sobre-expresantes.

En conclusión, un tratamiento de 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provocó un mayor estrés oxidativo en la línea control que murió tres días antes que la línea sobre-expresante. La línea control presentó un mayor contenido intracelular de peróxidos lipídicos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una disminución en la actividad catalasa y PrxIIIF además un mayor contenido en NO, lo que junto al nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> podría favorecer el desarrollo de la muerte celular temprana. La respuesta diferencial de ambas líneas al tratamiento oxidativo se puede relacionar con el control ejercido en la línea sobre-expresante por antioxidantes como GSH y PrxIIIF, que mostraron cambios menos acusados con el tratamiento, además del aumento en la actividad catalasa. La Trx01 podría actuar a través de una señalización redox sobre distintas proteínas diana, favoreciendo la regulación del estrés oxidativo en la célula y las rutas de PCD, lo que favorecería el retraso en la muerte celular provocada por el tratamiento exógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fig. 64). Todo el trabajo que podamos hacer en un futuro en esta dirección nos dará la oportunidad de profundizar en el mecanismo molecular por el que la PsTrx01 ejerce esta función ralentizando la PCD y por tanto contribuirá a establecer nuevas funciones para esta proteína redox en plantas.



**Figura 64: Modelo integrador de la influencia de PsTrxo1 en la muerte celular programada (PCD) de células TBY-2 tratadas con 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Un tratamiento con una dosis elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoca una respuesta diferencial entre células control y sobre-expresantes de PsTrxo1. **(1)** En las células control, se produce una bajada en los niveles de antioxidantes (APX y CAT) y del estado redox del glutatión (GSH/GSht) y del ascorbato (ASC/ASCt), acompañado por un aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO. Esta situación provoca un estado elevado de estrés oxidativo en la célula con un aumento de peroxidación lipídica **(2)**, lo que desencadena una PCD, muriendo el 100% de las células tras tres días **(3)**. En las células sobre-expresantes PsTrxo1 el tratamiento favorece mecanismos de señalización que implican la regulación redox de proteínas diana **(4)**. Esta situación provoca una bajada en el nivel de antioxidantes como APX, una bajada muy leve en PrxIIIF y una subida en el nivel de CAT. También se observó una bajada en el redox del ascorbato fundamentalmente, ya que el redox del glutatión se vio mucho menos afectado **(5)**. Este panorama contribuye a un menor estrés oxidativo evidenciado por cambios de menor intensidad en NO y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular con respecto a las células control y menores niveles de peroxidación lipídica **(6)**. Sin embargo, como consecuencia de este contexto antioxidante y redox, la PCD no se vió inhibida sino retrasada en el tiempo y el 100% de células sobre-expresante mueren por PCD tres días después que las células control **(7)**.

# **CONCLUSIONES**



1. La identificación de las posibles proteínas diana de PsTrxo1 en núcleos de hojas de guisante indicó que esta Trx interacciona con PCNA (Proliferative Cell Nuclear Antigen), por lo que podría estar implicada en procesos fundamentales como la replicación del ADN, la reparación de mutaciones y el ciclo celular. Además, su interacción con el receptor de la hormona ABA (PYR1: Pyrabactine Resistance) sugiere la participación de esta Trx en las rutas de transducción de ABA durante el estrés abiótico y/o la germinación.
2. Los estudios de expresión de *AtTrxo1* mediante microarrays (estudio *in silico*), RTqPCR y ensayos de actividad  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) nos permiten señalar un papel para la Trxo1 en el desarrollo y en la germinación de la semilla de Arabidopsis. La localización de Trxo1 en el embrión y cotiledones de semillas germinantes sugiere su participación en la movilización de reservas, por similitud a lo descrito para otras tiorredoxinas en este proceso.
3. Los ensayos de germinación sustentaron la participación de Trxo1 en este proceso. El similar patrón de germinación presentado por las semillas de mutantes KO *AtTrxo1* y las del fenotipo silvestre, indican la existencia de mecanismos compensatorios, que podrían incluir otras Trxs, debido a la redundancia de estas proteínas en semilla.
4. Bajo una condición de estrés salino, las semillas del mutante adelantaron la germinación con respecto a las del fenotipo silvestre. El adelanto en la germinación estuvo acompañado de un incremento importante en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y una baja expresión de catalasa (*CAT2*) y peroxirredoxina (*PrxIIIF*), lo que podría contribuir a este comportamiento.
5. La caracterización por vez primera del promotor de una Trx mitocondrial, concretamente, la *Trxo1* de Arabidopsis, ha permitido la identificación de seis dominios conservados en cis con actividad reguladora sobre la expresión del gen denominados A, B1, B2, B3, C y D. De estos dominios, el dominio B3 ejercía una regulación negativa sobre la expresión de *AtTrxo1*, mientras que el resto tenían una regulación positiva.

6. Los ensayos de un híbrido en levadura (Y1H) permitieron identificar un número considerable de posibles factores de transcripción reguladores de la expresión de *AtTrxo1*, entre los que se seleccionaron el factor bZIP9 y AZF2 por su fuerte interacción con el promotor y por estudios *in silico* de su respuesta en estrés salino y germinación. El perfil de expresión de bZIP9 apoyó su posible papel como activador de la expresión de esta tiorredoxina durante la germinación en condiciones control, en tanto que AZF2 parece actuar como un represor durante la germinación, tanto en condiciones control como salinas.
7. Los ensayos de función con células TBY-2 controles y sobre-expresantes de PsTrxo1 durante una condición de estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mostraron una respuesta dependiente de la dosis aplicada. Concentraciones bajas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujeron en ambas líneas una disminución leve en la viabilidad celular y un estrés oxidativo similar a juzgar por los niveles de peróxidos lipídicos y peróxido de hidrogeno y a los descensos de los componentes del sistema antioxidante ASC-GSH. La pérdida de viabilidad estuvo acompañada de algunos parámetros indicativos de una AL-PCD.
8. La sobreexpresión de PsTrxo1 condujo a diferencias significativas en la respuesta de las células TBY-2 a concentraciones altas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consistentes en una elevada y mantenida viabilidad en las células sobre-expresantes, en tanto que la línea control presentó un descenso severo de la viabilidad y un acusado estrés oxidativo, con una muerte celular generalizada a los tres días del inicio del tratamiento. En las células sobre-expresantes, el aumento en actividad catalasa, el mantenimiento del estado redox del glutatión y los niveles de PrxIIIF y Trxo1, podrían sustentar el retraso en muerte celular (AL-PCD) en relación con las células control.

# **SUMMARY AND CONCLUSIONS**



## SUMMARY

Thioredoxins (Trxs) are ubiquitous small proteins with a molecular mass of around 12 to 14 kD directly involved in the reduction of disulfide bonds of other proteins. Trxs contain a conserved active site (WCG/PPC) and a low redox potential, enabling reductive properties that can regulate specifically targeted proteins. Animals have only two types of Trxs that have been well studied by scientists, one cytoplasmic and one mitochondrial. Both are involved in numerous regulatory mechanisms, such as the reduction of peroxiredoxins (Prxs), activation of transcription factors and signaling of apoptosis. On the other hand, plants have at least ten families of Trxs with more than 40 members present in almost all the cellular compartments. More specifically: chloroplasts contain typical Trx *f*, *m*, *x*, *y* and *z*. The cytosol usually contains Trx *h* type, although this type of Trx has been also localized in the nucleus of germinating cereal seeds, in poplar mitochondria (*Populus tremula* x *Populus alba*) and rice (*Oryza sativa*) apoplast. Besides, In Arabidopsis, a Trx *h* type has been described in the endoplasmic reticulum and Golgi as well as in the plasma membrane. In mitochondria, other Trx have been found apart from PtTrx*h*, such as Trx*o1* type which has been described in Arabidopsis and pea (*Pisum sativum*) leaves. Besides, PsTrx*o1* has been co-localized in the nucleus as well.

Growing evidence identifying Trx targets suggests the involvement of these redox proteins in many cellular events. In this Thesis we have carried out a detailed analysis in order to study in greater depth some of the possible functions of the Trx*o1* in plant cells through different experimental approaches. We have used diverse plant materials, like pea plants, where we describe for the first time the mitochondrial/nuclear localization of PsTrx*o1*. Arabidopsis plants have been used due to the facility for functional and genomic studies, and finally tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells, as a model system for over-expression of the PsTrx*o1*.

Our knowledge of mitochondrial Trx in plants is less limited than 12 years ago. The advances in the methodology for the identification of Trx*o1* targets has led to the identification in our laboratory of several processes in which pea PsTrx*o1* is involved. These processes include; photorespiration, mitochondrial protein translation, ATP synthesis and

processing, sulfur metabolism, regulation of the alternative oxidase and functions related to stress response reactions. In fact, one role for this Trxo1 as a component of the defence system induced by NaCl in pea mitochondria was reported. This provides the cell with a mechanism by which it can respond to the changing environment and thus protect mitochondria from oxidative stress together with Mn-SOD, AOX, and mitochondrial PrxII F.

The presence of typical Trxs in the nucleus in plants had been described only in specific oxidant conditions like germination when a cytosolic Trx *h5* translocates to the nucleus. More recently, our group localized PsTrxo1 in the nucleus of pea leaves under basal conditions. This discovery extends the role of these redox proteins to the nuclear metabolism in plants. In fact, the nuclear location is consistent with the large body of evidence indicating that members of the mammalian Trx family play key roles in transcriptional regulation. Moreover, the presence of PsTrxo1 in the nuclear heterochromatin could be related to the involvement of the mammalian mitochondrial/peroxisomal Prx PRDX5 in protecting the genome against oxidation and controlling transcription of noncoding DNA. However, the specific targets of plant Trxo in the nucleus are currently unknown. In this Thesis we identified specific potential targets of PsTrxo1 using affinity chromatographic techniques with monocysteinic TrxC35S mutant recombinant protein and highly purified nuclear preparations from pea leaves. The resulting eluted protein heterodisulfide complexes have been separated by 2D electrophoresis and analyzed by mass spectrometry. As new potential targets of pea Trxo1 in the nucleus, we have identified PCNA (the proliferating cell nuclear antigen) and the pyrabactin resistance 1 (PYR1) regulatory component of abscisic acid (ABA) receptor. PCNA has been found in the nuclei of yeast, plant and animal cells that undergo cell division. PCNA exerts a tripartite function by operating as a sliding clamp during DNA synthesis, a polymerase switch factor and a recruitment factor. Most of its functions are mediated by interactions with several proteins involved in DNA synthesis, repair and recombination, as well as in the regulation of the cell cycle and chromatid cohesion. Thus, the link between PCNA and PsTrxo1 opens the possibility of the participation of this Trx in a large number of important cellular events. The regulation of the ABA receptor PYR1 extends the role of PsTrxo1 towards hormonal metabolism and stress response. ABA controls seed development and it is involved in

maintaining dormancy and inhibition of germination. Under abiotic stress, such as drought and high salinity, ABA levels have been shown to increase in the plant, initiating adaptative responses. Therefore, the PsTrx01-PYR1 link opens an interesting line of research in the control of seed germination and in the response of unfavorable conditions.

In addition, previous results in animal and plant systems also link Trxs with several processes related to plant development, germination, apoptosis and stress response among others. In this Thesis we decided to determine the possible participation of Trx01 in a subset of these processes.

Several reports address the role of Trxs in seed germination, particularly for Trxh type, which is mainly involved in the regulation of the redox state of storage proteins in cereals. This Thesis reports the role of Trx01 in germination for the first time. We validate this hypothesis using several approaches, including RTqPCR analysis, stable assays by means of the generation of Arabidopsis lines carrying constructs corresponding to the *AtTrx01* promoter fused to GUS, analysis of arrays extracted from the web data base and analysis of KO *AtTrx01* during germination. The analysis of *AtTrx01* mRNA expression revealed the presence of similar levels of *AtTrx01* in leaf, stem, root, flower, and siliques. However, a higher level was found in dry seed and 24h-imbibed seed. The analysis of the relative expression of *AtTrx01* during germination showed an increase with the germination process up to  $t_{50}$  point (50% of germination). The stable expression assays also revealed an increased expression along germination progress with the highest level in the seed embryo, which will constitute the future cotyledons. All these experiments pointed to the involvement of *AtTrx01* in the seed germination process and suggest its likely involvement in storage proteins mobilization. However, the role of *AtTrx01* did not seem to be essential under these conditions. The analysis of the KO *AtTrx01* mutants showed that mutant plants did not present any phenotype and they developed and germinated normally under standard growth conditions, implying a possible compensatory mechanism when this *AtTrx01* is absent.

Taking into account the described role for PsTrx01 and the response to salinity stress conditions described by our group, we decided to carry out some germination assays in the presence of NaCl in KO *AtTrx01* and Wt lines. We observed that salt stress produced a much longer delay in wild type seed germination than in the mutant line. Actually, the mutant reached  $t_{50}$  10h before Wt, and  $t_{100}$  24h before, suggesting that *AtTrx01* could be involved in mechanisms of response to harsh environments. Trx redox and antioxidant properties could be involved in this response so, in order to check this, we analyzed different oxidative markers. Analysis of oxidative markers in germinating seeds showed no changes in lipid peroxidation or protein carbonylation during germination in either control or salinity conditions, in both WT and KO *AtTrxo* lines. However, under salinity, great differences were found in hydrogen peroxide content between both lines (but, only in the first stage of germination). At this point,  $H_2O_2$  content was significantly higher in mutant than Wt seeds. Besides, the absence of *AtTrx01* modified the expression of catalase, an enzyme involved in  $H_2O_2$  scavenging, while it did not modify the expression of peroxiredoxin IIF (a *Trx01* target peroxidase) or sulfiredoxin (in charge of regeneration of the over-oxidised PrxII F). All these results lead us to assume that *AtTrx01* has an essential role during germination under stress conditions. The role of *AtTrx01* seems to be related to the  $H_2O_2$  control, which is well-known as a key point of regulation in the germination process. Thus, *AtTrx01* could be related to the hormonal control exerted by ABA in germination. Indeed, the relation of PsTrx01 with the ABA receptor PYR1 found as PsTrx01 target is in agreement with this hypothesis.

Transcriptional regulation is an important mechanism underlying gene expression with a crucial role in evolution. To reveal the complexity of gene transcriptional regulation it is necessary to identify all functionally relevant regulatory elements, *cis* regulatory code in gene promoters, as well as the TFs that interact with them (regulators in *trans*). The scarce information on transcriptional regulation of plant Trxs leads us to search for these *cis-trans* elements in the *AtTrx01* promoter. A phylogenetic shadowing approach with *AtTrx01* gene was used to identify functionally relevant *cis*-elements in the gene promoter. *In silico* analyses of several Brassicaceae and Leguminosae *AtTrx01* orthologous promoters from several related species identified five highly conserved sequences. To further analyse the importance of these domains, serial deletions of *AtTrx01* promoter were transcriptionally

fused to the reporter *uidA* gene which encodes a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) enzyme and the constructions were used to generate unstable transgenic lines of *Nicotiana benthamiana* as well as stable transgenic lines of *Arabidopsis*. The GUS histochemical staining revealed the presence of three feasible activator domains and a repressor domain of *AtTrxo1* gene expression. One of these domains was chosen for further assays. Thus, by using a 1.200 *A. thaliana* library of TF open reading frames (ORFs), and by means of yeast one hybrid (Y1H) screening procedure, more than 30 TFs from six different families were identified as possible regulators. Two of them, bZIP9 (Basic Leucine Zipper 9) and AZF2 (*Arabidopsis* Zinc Finger 2) were chosen for further analysis of their possible role in the germination process under control and salinity stress conditions. bZIP9 showed a strong interaction with *pAtTrxo1* and it was shown as a positive regulator during germination according to RTqPCR experiments. Besides, AZF2, a Zinc Finger TF strongly related with salinity response, was identified as a possible repressor during germination.

Finally, this Thesis initiates functional studies of the potential role of the mitochondrial and nuclear PsTrxo1 in processes related to cell death. Actually, in animal systems the involvement of the mitochondrial Trx2 in apoptosis has been already described. Although the antioxidant metabolism has been studied in plants PCD, the functional involvement of plant Trxs in this process is unknown to date. To this aim we used TBY-2 cell cultures overexpressing PsTrxo1 and an inductor of PCD: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Transgenic TBY2 cells were treated with different H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations and the percentage of death versus living cells (viability) was monitored over time. In this way, concentrations of 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> provoked a drop of 15% in viability at 48h after treatment without differences between lines, whereas concentrations above 35 mM caused a differentiating effect on the viability of both lines. In order to study the mechanism involved in this phenomenon, we decided to study the influence of stress intensity in an antioxidant metabolism.

A 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration provoked a similar decrease in viability between lines. This stress caused an slight oxidative stress and some symptoms of cell death. The mutant line showed several cytological markers of PCD underlying the pro-apoptotic role of Trx in these conditions. However, the level of oxidative stress found under these circumstances was

similar between lines. The effect of 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment caused a delay of several days in cell death of the mutant compared to the control. At this higher concentration, both lines showed some cytological markers of PCD, such as shrinkage, DNA-laddering or micronuclei. Besides, the oxidative stress was found to be similar in terms of protein oxidation, although lipid peroxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> contents were higher in the control line. This differential response to the oxidative treatment may be exerted by the control of antioxidants like GSH, ASC, APX, catalase and PrxIIIF. Actually, antioxidants such as GSH, PrxIIIF and catalase suffered fewer changes with 35 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in overexpressing than in control cells over time. In conclusion, these findings point to PsTrx01 being involved in the higher tolerance towards the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, but this protein did not prevent a PCD process and, on the contrary, lower concentration stimulated the pro-apoptotic action of Trx.

To summarize, in this Thesis we have identified new functions for Trx01 in a plethora of cellular events. Several approaches have allowed us to demonstrate that Trx01 participate in DNA metabolism, hormonal response, germination, stress response and PCD, although further analyses are necessary to complete the specific mechanisms involved.

## MAIN CONCLUSIONS

1. The identification of the possible target proteins of PsTrx01 in nuclei of pea leaves indicated that this Trx interacts with PCNA (Nuclear Proliferative Cell Antigen), and thus, it might be involved in fundamental processes as DNA replication, the repair of mutations and cell cycle. In addition, its interaction with the ABA receptor PYR1 (Pyrabactine Resistance) suggests the participation of this Trx in the ABA transduction pathways during the abiotic stress and/or germination.
2. Studies on *AtTrxo1* expression by means of microarrays (*in silico*), RTqPCR and activity assays of  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) allowed us to indicate a role for Trxo1 in the germination of the Arabidopsis's seed. The location of Trxo1 in the embryo and cotyledons of germinating seeds suggests its participation in the mobilization of reserves, similar to other thioredoxins described in this process.
3. The germination assays supported the participation of Trxo1 in this process. The similar germination rate presented by the KO *AtTrxo1* mutants' seeds and those of the wild type phenotype indicates the existence of compensatory mechanisms, which include other Trxs, due to the redundancy of these proteins in seeds.
4. Under salt stress conditions, seeds of the mutant presented an earlier germination than those of the wild type phenotype. The anticipation in the germination was accompanied by an important increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content and a lower gene expression of catalase (CAT2) and peroxirredoxin (*PrxIIIF*), which might justify this behavior.
5. The characterization for the first time of the promoter of a mitochondrial Trx, particularly, Arabidopsis *Trxo1*, has allowed the identification of six conserved domains *in cis* with regulatory activity on the expression of the gene named B1, B2, B3, C and D. Among these domains, the domain B3 exerted a negative regulation on the expression whereas the rest of domains had a positive regulation.
6. The assay of yeast one-hybrid (Y1H) allowed the identification of a considerable number of possible regulatory transcription factors involved in the gene expression of *AtTrxo1*

and among them, we selected bZIP9 and AZF2 for their high response in abiotic stress processes and germination. The bZIP9 gene expression supported its possible role as activator of the expression of this thioredoxin during seed germination in control conditions, while AZF2 seems to be a repressor during germination in both, control and salinity conditions.

7. Functional studies using control and over-expressing PsTrxo1 TBY-2 cells during a stress condition induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> showed a dose-dependent response. Low concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced in both lines a slight decrease in the cell viability and a similar oxidative stress as indicated by the lipid peroxidation and hydrogen peroxide levels and the decrease in components of the ASC-GSH antioxidant system. Loss in viability was accompanied by some indicative parameters of AL-PCD.
8. The over-expression of PsTrxo1 caused significant differences in the response of the TBY-2 cells to high concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, consisting in a higher and maintained viability in the over-expressing cells while the control line presented a severe decrease in viability and a marked oxidative stress, with a generalized cell death after three days of the treatment. In the over-expressing cells, the increase in catalase activity, the maintenance of the glutathione redox state and the level of PrxIIIF and Trxo1 might sustain the delay in cell death (AL-PCD) in relation to control cells.

**ANEXO**



FIG. S1

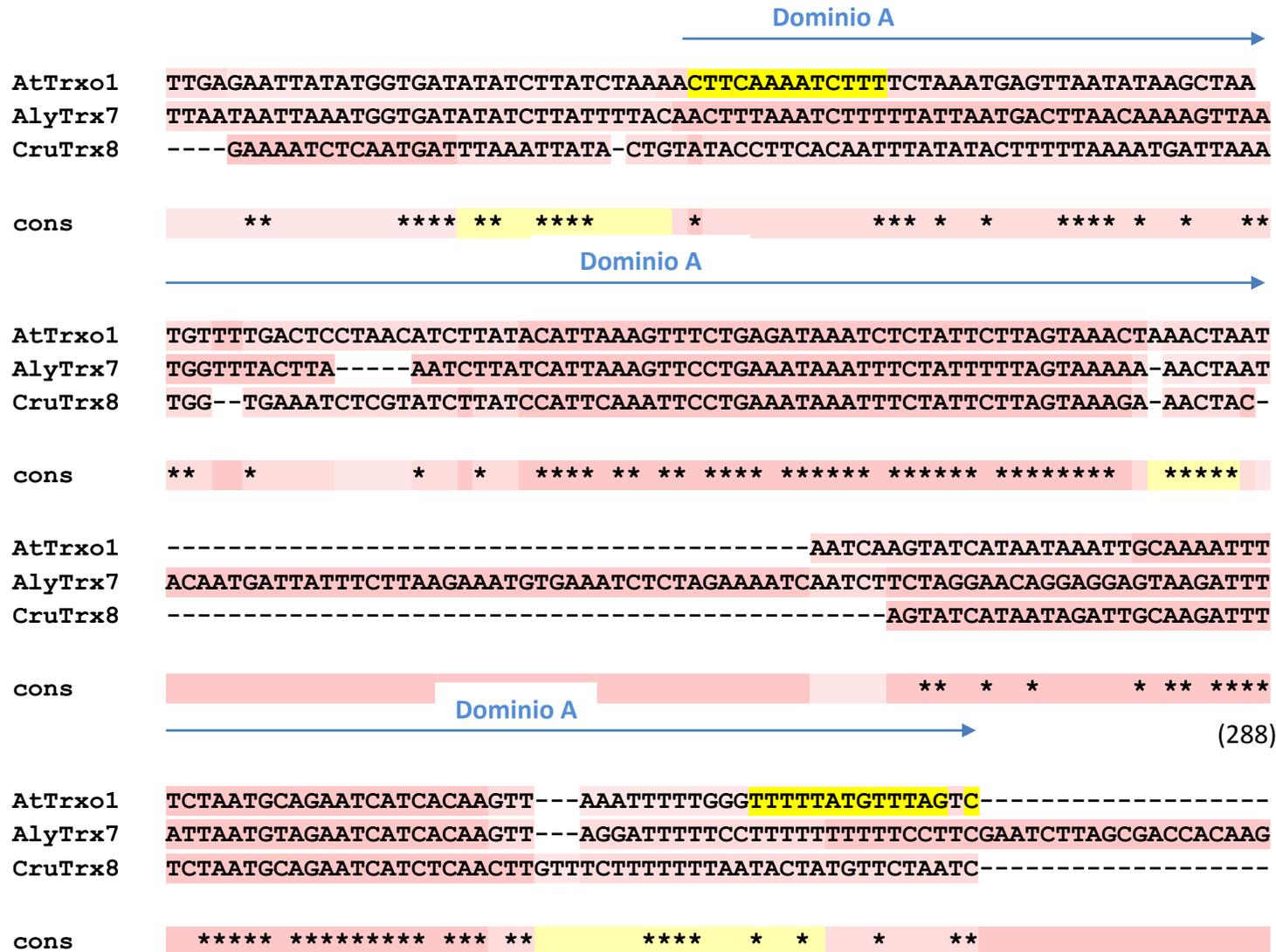
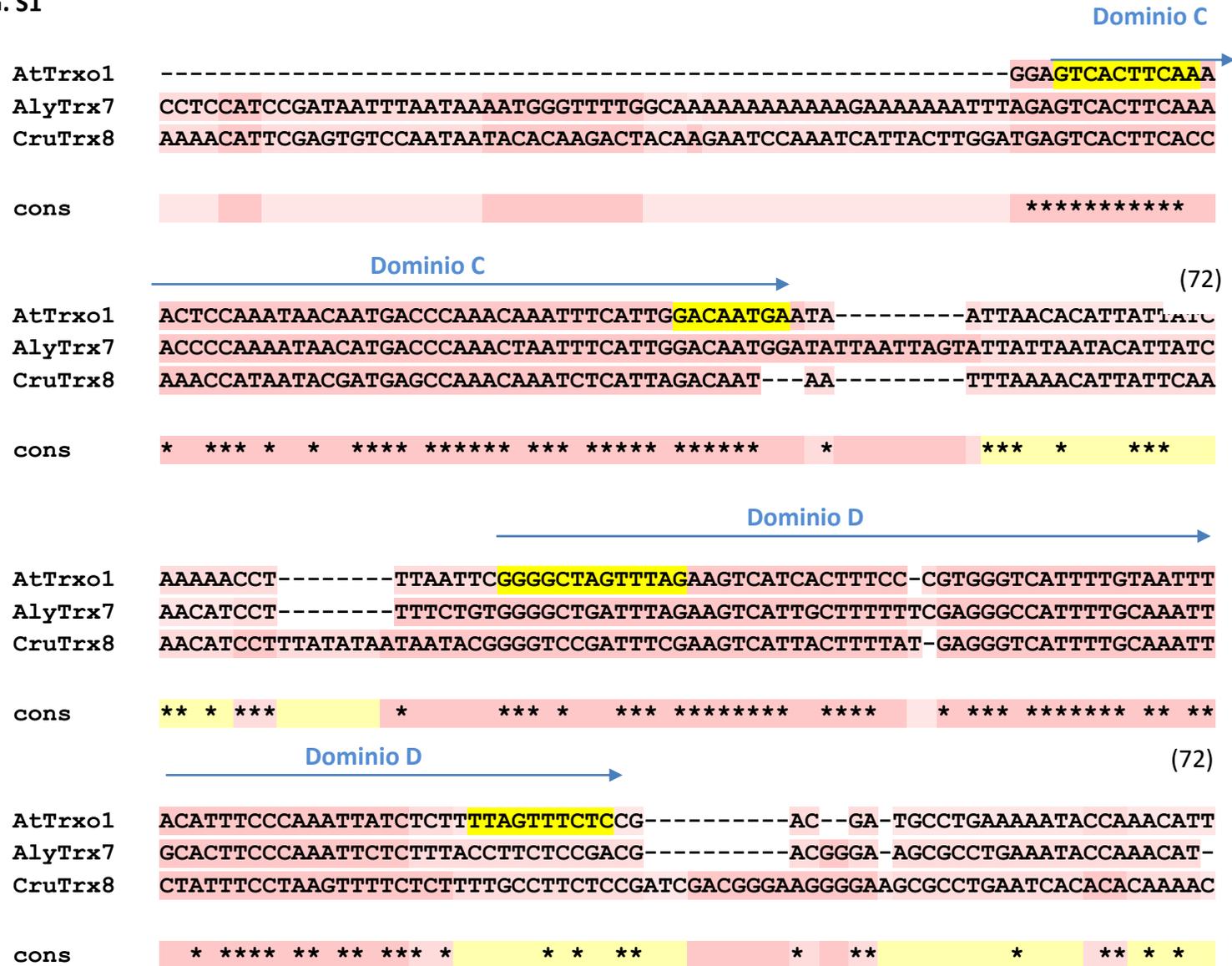


FIG. S1



FIG. S1



**Figura suplementaria 1: Dominios conservados en el promotor de AtTrxo1 mediante alineamiento con los promotores de los ortólogos de AtTrxo1: AlyTrx7 y CruTrx8.** En rojo se representa un alto nivel de conservación, en amarillo un nivel de conservación media. Los asteriscos representan bases comunes. El nivel de conservación predicho por el programa fue un 85% para AtTrxo1, un 89% para AlyTrx7 y un 91% para CruTrx3. En amarillo están sombreados los nucleótidos flanqueantes de los distintos dominios, representados con flechas. Entre paréntesis las posiciones delecionadas del alineamiento. Las construcciones pAtTrxo1::uidA se hicieron en base a construcciones delecionadas de estos dominios. Con estos El Dominio A. (B) Dominios B. (C) Dominios C y D. El programa utilizado para el alineamiento es T-coffee: <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:procoffee>, (Erb y col., 2012).

Fig. S2

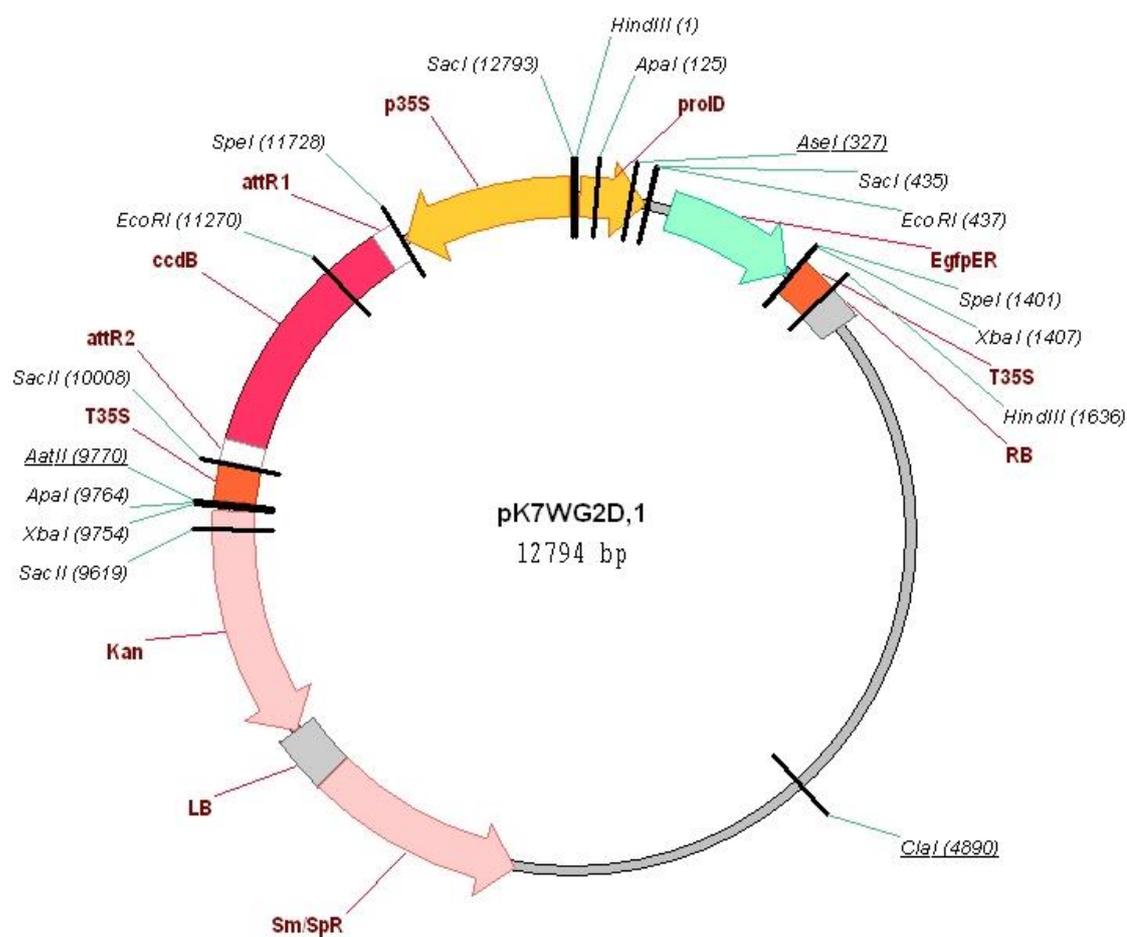


Figura suplementaria 2: Vector de destino (Gateway) utilizado para sobre-expresar la proteína PsTrxo1 en células de tabaco TBY-2.

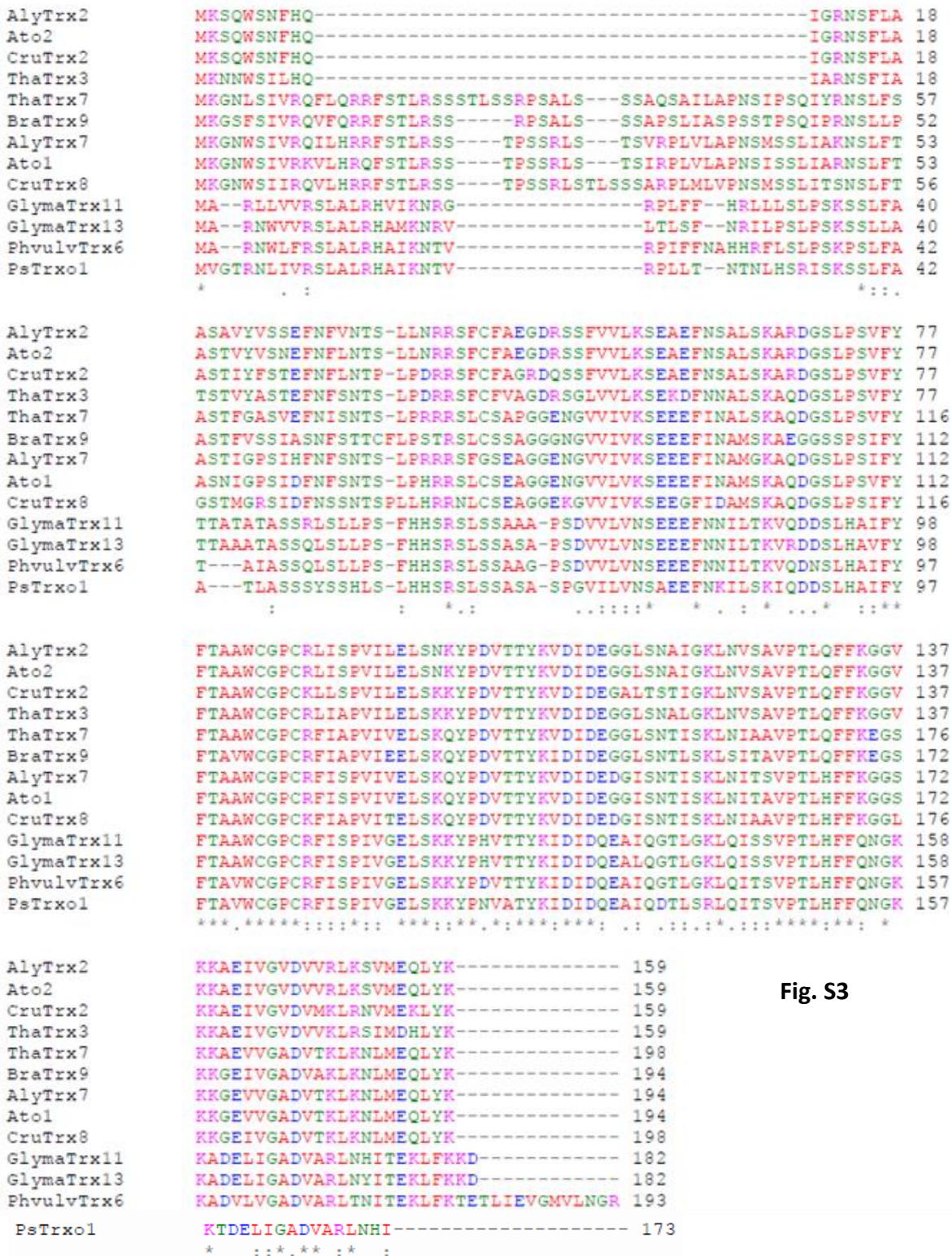


Fig. S3

Figura suplementaria 3: Alineamiento de las secuencias proteicas de los ortólogos de AtTrxo1. Los asteriscos representan aminoácidos comunes. Los dos puntos, aminoácidos del mismo grupo. Realizado con el programa ClustalW: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, (Larkin y col., 2007; Goujon y col., 2010)

**Tabla S1: Oligonucleótidos (Primers) utilizados.** Abreviaturas: FW: forward primer, RV: reverse primer, LP: Left Primer, RP: Right Primer, ADNg: ADN genómico, KO: knock-out, Y1HYB: Yeast One HYBrid, ARNm: ARN mensajero.

NOMBRE PRIMER	LOCUS	SECUENCIAS 5´-3´	UTILIDAD
<b>Primers clonaje</b>			
FW-pAtTrxo1	<b>At2g35010</b>	CTTCAAATCTTTCTAAATGAG	Clonación promotor en pGEM
RV-pAtTrxo1	<b>At2g35010</b>	GGAGAGTGGAGAACTGGCG	Clonación promotor en pGEM
FW-pAtTrxo1-S1-attB1	<b>At2g35010</b>	AAAAAAGCAGGCTTCCTTCAAATCTTTCTAAATGAG	Clonación promotor en Gateway
RV-pAtTrxo1-S1-attB2	<b>At2g35010</b>	CAAGAAAGCTGGGTCCTTCATCACTCGAGCTTTTAG	Clonación promotor en Gateway
FW-S2-GUS/Pro-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	AAAAAAGCAGGCTTCGTATTATCTCTAACCATT	Clonación promotor en Gateway
FW-S3-GUS/Pro-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	AAAAAAGCAGGCTTCCAATCGACGTATGTAAATC	Clonación promotor en Gateway
FW-S4-GUS/Pro-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	AAAAAAGCAGGCTTCCACAAGATCCAATCATTAC	Clonación promotor en Gateway
RV-GUS/Pro-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	CAAGAAAGCTGGGTCCTTCATCACTCGAGCTTTTAG	Clonación promotor en Gateway
attB1	GATEWAY	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC	Colas GATEWAY
attB2	GATEWAY	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC	Colas GATEWAY
FW-pAtTrxo1-B1-Xma1	<b>At2g35010</b>	AGCCCGGGCCATAAAACGAGTATTATCTC	Ensayo Y1HYB
RV-pAtTrxo1-B1-Mlu1	<b>At2g35010</b>	TCACGCGTTTTCTTGCTTTGTCTAGATA	Ensayo Y1HYB
FW-pAto1-B2-XmaI	<b>At2g35010</b>	AGCCCGGGTATCAATTGACATCGTGACA	Ensayo Y1HYB
RV-pAto1-B2-XbaI	<b>At2g35010</b>	TCTCTAGATTTACATACGTCGATTGGAT	Ensayo Y1HYB
FW-pAtTrxo1-B3-Xma1	<b>At2g35010</b>	AGCCCGGGCATCATCGTTGACTTGCC	Ensayo Y1HYB
RV-pAtTrxo1-B3-Xba1	<b>At2g35010</b>	TCTCTAGACCGTCAATGTTTCTATTTAA	Ensayo Y1HYB

Continuación Tabla 1

NOMBRE PRIMER	LOCUS	SECUENCIAS 5'-3'	UTILIDAD
<b>Primers genotipado</b>			
LP-SALK_042792	<b>At2g35010</b>	TCGAGTGATGAAGGGAAATTG	Compobación línea KO (SALK)
RP-SALK_042792	<b>At2g35010</b>	AAATCCCGCCCTACAGATATG	Compobación línea KO (SALK)
LP-SALK_143294	<b>At2g35010</b>	AATCATCATCGTTGACTTGCC	Compobación línea KO (SALK)
RP-SALK_143294	<b>At2g35010</b>	ACACATCCACTTAGCGTGAGG	Compobación línea KO (SALK)
LB1.3-SALK_143294	<i>Left border primer</i>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Compobación línea KO (SALK)
LP-SALK_132562C	<b>At3g19580</b>	TTGTTGCTAACAAGCATGTGC	Compobación línea KO (SALK)
RP-SALK_132562C	<b>At3g19580</b>	GCCAGAATCAAAGAACCTTCC	Compobación línea KO (SALK)
LB1.3-SALK_132562C	<i>Left border primer</i>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC	Compobación línea KO (SALK)
FW-Tubulin 8	<b>At5g23860</b>	ATCACAGCAATACAGAGCCTTAACC	Contaminación ADNg en extracción ARNm
RV-Tubulin 8	<b>At5g23860</b>	GCTGTTGTTATTGCTCCTCCTGCA	Contaminación ADNg en extracción ARNm
<b>Primers RTqPCR</b>			
FW-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	CAAGTGAAGACCTAATCCGTTT	Expresión ARNm
RV-AtTrxo1	<b>At2g35010</b>	TGTTGAAAAAGGAAGCAAGAA	Expresión ARNm
FW-AZF2	<b>At3g19580</b>	CCTGAACTCAGCCTTCATCA	Expresión ARNm
RV-AZF2	<b>At3g19581</b>	TGACTTGGTTCGTGATCGGTC	Expresión ARNm
FW-bZIP9	<b>At5g24800</b>	CATCTGGCCATGACTCTCTTT	Expresión ARNm
RV-bZIP9	<b>At5g24801</b>	AACGAACATGCTGCTTTCAT	Expresión ARNm
FW-Actin8	<b>At1g49240</b>	GGTCGTACAACCGGTATTGT	Expresión ARNm gen constitutivo
RV-Actin8	<b>At1g49240</b>	GAAGAGCATACCCCTCGTA	Expresión ARNm gen constitutivo

# **REFERENCIAS**



- Aalenf RB, Opsahl-Ferstad H-G, Linnestad C, Olsen O-A** (1994). Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *The Plant Journal* **5**(3): 385-396.
- Aebi H** (1984) Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* **105**: 121-126.
- Agarwal S, Sairam RK, Srivastava GC, Meena RC** (2005). Changes in antioxidant enzymes activity and oxidative stress by abscisic acid and salicylic acid in wheat genotypes. *Biología Plantarum* **49**: 541–550.
- Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F** (2008). A Novel Type of Thioredoxin Dedicated to Symbiosis in Legumes. *Plant Physiology* **148**(1): 424-435.
- Alkhalfioui F, Renard M, Montrichard F** (2007). Unique properties of NADP-thioredoxin reductase C in legumes. *Journal of Experimental Botany* **58**(5): 969-978.
- Alkhalfioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB, Montrichard F** (2007). thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology* **144**(3): 1559-1579.
- Almansa MS, Palma JM, Yanez J, del Rio LA, Sevilla F** (1991). Purification of an iron-containing superoxide dismutase from a citrus plant, *Citrus limonum* R. *Free Radical Research Communications* **12-13 Pt 1**: 319-328.
- Almansouri M, Kinet JM, Lutts S** (2001). Effect of salt and osmotic stresses on germination in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). *Plant and Soil* **231**(2): 243-254.
- Alonso R, Onate-Sanchez L, Weltmeier F, Ehlert A, Diaz I, Dietrich K, Vicente-Carbajosa J, Droge-Laser W** (2009). A pivotal role of the basic leucine zipper transcription factor bZIP53 in the regulation of arabidopsis seed maturation gene expression based on heterodimerization and protein complex formation. *The Plant Cell Online* **21**(6): 1747-1761.}
- Andarwulan N, Fardiaz D, Wattimena GA, Shetty K** (1999). Antioxidant activity associated with lipid and phenolic mobilization during seed germination of *Pangium edule* Reinw. *Journal of Agricultural Food Chemistry* **47**(8): 3158-3163.
- Andronis EA, Roubelakis-Angelakis KA** (2010). Short-term salinity stress in tobacco plants leads to the onset of animal-like PCD hallmarks in planta in contrast to long-term stress. *Planta* **231**(2): 437-448.
- Apel K, Hirt H** (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**(1): 373-399.
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A** (2013). ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* **4**.
- Arner ES** (2009). Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**(6): 495-526.
- Arrigoni D, de Gara L, Tommas I, Liso R** (1991). Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiology* **99**: 235-238.
- Arrigoni O, Dipierro S, Borraccino G** (1981). Ascorbate free radical reductase, a key enzyme of the ascorbic acid system. *FEBS Letters* **125**(2): 242-244.
- Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W, Bornke F** (2010). Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in Arabidopsis and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **22**(5): 1498-1515.

- Ashley RH** (2003). Challenging accepted ion channel biology: p64 and the CLIC family of putative intracellular anion channel proteins (Review). *Molecular Membrane Biology* **20**(1): 1-11.
- Aviv DH, Rusterucci C, Holt BF, 3rd, Dietrich RA, Parker JE, Dangl JL** (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *Isd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant Journal* **29**(3): 381-391.
- Bahin E, Bailly C, Sotta B, Kranner I, Corbineau F, Leymarie J** (2011). Crosstalk between reactive oxygen species and hormonal signalling pathways regulates grain dormancy in barley. *Plant, Cell & Environment* **34**(6): 980-993.
- Baier M, Dietz K-J** (1996). Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Molecular Biology* **31**(3): 553-564.
- Bailey TL, Williams N, Misleh C, Li WW** (2006). MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Research* **34** (suppl 2): W369-W373.
- Bailly C** (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*. **14**(2): 93-107.
- Bailly C, Bogatek-Leszczynska R, Côme D, Corbineau F** (2002). Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. *Seed Science Research* **12**(01): 47-55.
- Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H, Corbineau F** (2008). From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* **331**(10): 806-814.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T** (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**(4): 483-495.
- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF** (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Letters* **463**(1-2): 151-154.
- Ball KL, Lane DP** (1996). Human and plant proliferating-cell nuclear antigens have a highly conserved binding site for the p53-inducible gene product p21WAF1. *European Journal of Biochemistry* **237**: 854-861.
- Balmer Y, Koller A, del Val G, Manieri W, Schürmann P, Buchanan BB** (2003). Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **100**: 370-375.
- Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schürmann P, Droux M, Buchanan BB** (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **101**(8): 2642-2647.
- Balsera M, Uberegui E, Schürmann P, Buchanan BB** (2014). Evolutionary development of redox regulation in chloroplasts. *Antioxidants and Redox Signaling* **21**(9): 1327-1355.
- Barajas-López JdD, Serrato AJ, Cazalis R, Meyer Y, Chueca A, Reichheld JP, Sahrawy M** (2011). Circadian regulation of chloroplastic f and m thioredoxins through control of the CCA1 transcription factor. *Journal of Experimental Botany*. **62**(6): 2039-2051.
- Barajas-López JdD, Tezycka J, Travaglia CN, Serrato AJ, Chueca A, Thormählen I, Geigenberger P, Sahrawy M** (2012). Expression of the chloroplast thioredoxins f and m is linked to short-term changes in the sugar and thiol status in leaves of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany*. **63**(13): 4887-4900.
- Barba-Espín G, Hernández JA, Diaz-Vivancos P** (2012). Role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea seed germination. *Plant Signaling & Behavior* **7**(2): 193-195.
- Barkley KB, Gregory EM** (1990). Tetrameric manganese superoxide dismutases from anaerobic *Actinomyces*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **280**(1): 192-200.

- Barranco-Medina S, Krell T, Bernier-Villamor L, Sevilla F, Lázaro J-J, Dietz K-J** (2008). Hexameric oligomerization of mitochondrial peroxiredoxin PrxII F and formation of an ultrahigh affinity complex with its electron donor thioredoxin Trx-o. *Journal of Experimental Botany* **59**(12): 3259-3269.
- 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.
- Barranco-Medina S, Lázaro J-J, Dietz K-J** (2009). The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function. *FEBS Letters* **583**(12): 1809-1816.
- Bartoli CG, Guamet JJ, Kiddle GUY, Pastori GM, Di Cagno R, Theodoulou FL, Foyer CH** (2005). Ascorbate content of wheat leaves is not determined by maximal l-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GalLDH) activity under drought stress. *Plant, Cell & Environment* **28**(9): 1073-1081.
- Baty JW, Hampton MB, Winterbourn CC** (2002). Detection of oxidant sensitive thiol proteins by fluorescence labeling and two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* **2**: 1261-1266.
- Bauer GA, Burgers PM** 1988. The yeast analog of mammalian cyclin/proliferating-cell nuclear antigen interacts with mammalian DNA polymerase delta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **85**:7506–7510.
- Baumann U, Juttner J** (2002). Plant thioredoxins: the multiplicity conundrum. *Cellular and Molecular Life Science* **59**: 1042-1057.
- Baxter I, Vinegar B, Winter D, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007). An electronic fluorescent pictograph browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**(8): e718.
- Becana M, Paris FJ, Sandalio LM, Del Rio LA** (1989). Isoenzymes of Superoxide Dismutase in Nodules of *Phaseolus vulgaris* L., *Pisum sativum* L., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Plant Physiology* **90**(4): 1286-1292.
- Beer SM, Taylor ER, Brown SE, Dahm CC, Costa NJ, Runswick MJ, Murphy MP** (2004). glutaredoxin 2 catalyzes the reversible oxidation and glutathionylation of mitochondrial membrane thiol proteins: implications for mitochondrial redox regulation and antioxidant defense. *Journal of Biological Chemistry* **279**(46): 47939-47951.
- Beers EP, McDowell JM** (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(6): 561-567.
- Berger F, Hamamura Y, Ingouff M, Higashiyama T** (2008). Double fertilization – caught in the act. *Trends in Plant Science* **13**(8): 437-443.
- Berndt C, Lillig CH, Holmgren A** (2007). Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology: Heart Circulatory Physiology* **292**(3): H1227-1236.
- Bernier-Villamor L** (2004). Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* **55**(406): 2191-2199.
- Besse I and Buchanan BB** (1997) Thioredoxin-linked plant and animal processes: the new generation. *Botanical Bulletin Academia Sinica Taipei* **38**: 1–11.
- Bethke P, Gubler F, Jacobsen J, Jones R** (2004). Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* **219**(5).
- Bewley JD** (1997). Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* **9**(7): 1055-1066.

- Bhattacharyya S, Habibi-Nazhad B, Amegbey G, Slupsky CM, Yee A, Arrowsmith C, Wishart DS** (2002). Identification of a novel archaeobacterial thioredoxin: determination of function through structure. *Biochemistry* **41**(15): 4760-4770.
- Biteau B, Labarre J, Toledano MB** (2003). ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin. *Nature* **425**(6961): 980-984.
- Boruc J, Van den Daele H, Hollunder J, Rombauts S, Mylle E, Hilson P, Inzé D, den Veylder L, Russinova E** (2010). Functional modules in Arabidopsis core cell cycle binary protein-protein interaction network. *The Plant Cell* **22**: 1264-1280.
- Bouaziz A, Hicks DR** (1990). Consumption of wheat seed reserves during germination and early growth as affected by soil water potential. *Plant and Soil* **128**(2): 161-165.
- Brenner C, Cadiou H, Vieira HL, Zamzami N, Marzo I, Xie Z, Leber B, Andrews D, Duclouhier H, Reed JC, Kroemer G** (2000). Bcl-2 and Bax regulate the channel activity of the mitochondrial adenine nucleotide translocator. *Oncogene* **19**(3): 329-336.
- Broin M** (2002). The Plastidic 2-Cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *The Plant Cell Online* **14**(6): 1417-1432.
- Broin M** (2003). Potato Plants Lacking the CDSP32 Plastidic Thioredoxin Exhibit Overoxidation of the BAS1 2-Cysteine Peroxiredoxin and Increased Lipid Peroxidation in Thylakoids under Photooxidative Stress. *Plant Physiology* **132**(3): 1335-1343.
- Broin M, Cuine S, Eymery F, Rey P** (2002). The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* **14**(6): 1417-1432.
- Broin M, Cuiné S, Peltier G, Rey P** (2000). Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants. *FEBS Letters* **467**(2-3): 245-248.
- Bryk R, Griffin P, Nathan C** (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature* **407**(6801): 211-215.
- Buchanan B, Schürmann P, Wolosiuk R, Jacquot J-P** (2002). The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthesis Research* **73**(1-3): 215-222.
- Buchanan BB** (1991). Regulation of CO<sub>2</sub> assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **288**: 1-9.
- Buchanan BB, Balmer Y** (2005). Redox regulation: a broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 187-220.
- Buege JA, Aust SD** (1972). Microsomal lipid peroxidation. *Methods of Enzymology* **52**: 302-310.
- Bueno P, Varela J, Gimenez-Gallego G, del Río LA** (1995). Peroxisomal copper, zinc superoxide dismutase. Characterization of the isoenzyme from watermelon cotyledons. *Plant Physiology* **108**(3): 1151-1160.
- Bui VN, Nguyen TTH, Bettarel Y, Nguyen THT, Pham TL, Hoang TY, Nguyen VTT, Nghiem NM, Wölfl S** (2015). Genotoxicity of Chemical Compounds Identification and Assessment by Yeast Cells Transformed With GFP Reporter Constructs Regulated by the PLM2 or DIN7 Promoter. *International Journal of Toxicology* **34**(1): 31-43.
- Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NS, Venter JC** (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**(5278): 1058-1073.

- Burbridge E, Diamond M, Dix PJ, McCabe PF** (2006). Use of cell morphology to evaluate the effect of a peroxidase gene on cell death induction thresholds in tobacco. *Plant Science* **171**(1): 139-146.
- Cacas JL** (2010). Devil inside: does plant programmed cell death involve the endomembrane system? *Plant Cell and Environment* **33**(9): 1453-1473.
- Caliskan M, Cuming AC** (1998). Spatial specificity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *Plant Journal* **15**(2): 165-171.
- Camejo D, Lázaro JJ, Romero-Puertas MC, 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.
- Camejo D, Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM, Lázaro JJ, Jiménez A, Sevilla F.** (2013). Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *Journal of Proteomics* **79**, 87-99.
- Camier S., Ma E., Leroy C., Pruvost A., Toledano M., Marsolier-Kergoat M. C.** (2007). Visualization of ribonucleotide reductase catalytic oxidation establishes thioredoxins as its major reductants in yeast. *Free Radical Biology and Medicine* **42**: 1008-1016.
- Caro A, Puntarulo S** (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radical Research* **31 Suppl**: S205-212.
- Casolo V, Petrusa E, Krajnakova J, Macri F, Vianello A** (2005). Involvement of the mitochondrial K(+)ATP channel in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures. *Journal of Experimental Botany* **56**(413): 997-1006.
- Castrillo G, Turck F, Leveugle M, Lechary A, Carbonero P, Coupland G, Paz-Ares J, Oñate-Sánchez L** (2011). Speeding cis-trans regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of Arabidopsis transcription factors. *PLoS One.* **6**(6): e21524.
- Cejudo FJ, Meyer A, Reichheld J-P, Rouhier N, Traverso JA** (2014). Thiol-based redox homeostasis and signalling. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Celis JE, Madsen P, Celis A, Hielsen HV, Gesser B.** (1987). Cyclin (PCNA, auxiliary protein of DNA polymerase delta) is a central component of the pathway(s) leading to DNA replication and cell division. *FEBS Letters* **220**: 1-7.
- Cembrowska-Lech D, Koprowski M, Kępczyński J** (2015). Germination induction of dormant *Avena fatua* caryopses by KAR1 and GA3 involving the control of reactive oxygen species (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and enzymatic antioxidants (superoxide dismutase and catalase) both in the embryo and the aleurone layers. *Journal of Plant Physiology* **176**: 169-179.
- Chae HJ, Ke N, Kim HR, Chen S, Godzik A, Dickman M, Reed JC** (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast. *Gene* **323**: 101-113.
- Chae HZ, Chung SJ, Rhee SG** (1994). Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *Journal of Biological Chemistry* **269**(44): 27670-27678.
- Chae HZ, Kim IH, Kim K, Rhee SG** (1993). Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **268**(22): 16815-16821.
- Chang TS, Jeong W, Woo HA, Lee SM, Park S, Rhee SG** (2004). Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine. *Journal of Biological Chemistry.* **279**(49): 50994-51001.
- Cheeseman JM** (2006). Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. *Journal of Experimental Botany* **57**: 2435-2444.

- Chen J, Song Y, Zhang H, Zhang D** (2013). Genome-Wide Analysis of Gene Expression in Response to Drought Stress in *Populus simonii*. *Plant Molecular Biology Reporter* **31**(4): 946-962.
- Cheong N, Choi Y, Lee K, Kim W, Jung B, Chi Y, Jeong J, Kim K, Cho M, Lee S** (1999). Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2Cys-peroxiredoxin in Chinese cabbage. *Plant Molecular Biology* **40**(5): 825-834.
- Chew O, Whelan J, Millar AH** (2003). Molecular Definition of the Ascorbate-Glutathione Cycle in Arabidopsis Mitochondria Reveals Dual Targeting of Antioxidant Defenses in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **278**(47): 46869-46877.
- Chiu KY, Chen CL, Sung JM** (2002). Effect of priming temperature on storability of primed sh-2-sweet corn seed. *Crop Science* **42**: 1993-2003.
- Choi H-J, Kang SW, Yang C-H, Rhee SG, Ryu S-E** (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology* **5**(5): 400-406.
- Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M** (2003). The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *Journal of Biological Chemistry* **278**(26): 23747-23752.
- Collin V, Lamkemeyer P, Miginiac-Maslow M, Hirasawa M, Knaff DB, Dietz KJ, Issakidis-Bourguet E** (2004). Characterization of plastidial thioredoxins from Arabidopsis belonging to the new  $\gamma$ -type. *Plant Physiology* **136**(4): 4088-4095.
- Considine MJ, Daley DO, Whelan J** (2001). The expression of alternative oxidase and uncoupling protein during fruit ripening in mango. *Plant Physiology* **126**(4): 1619-1629.
- Couturier J, Koh CS, Zaffagnini M, Winger AM, Gualberto JM, Corbier C, Decottignies P, Jacquot JP, Lemaire SD, Didierjean C, Rouhier N** (2009). Structure-function relationship of the chloroplastic glutaredoxin S12 with an atypical WCSYS active site. *Journal of Biological Chemistry* **284**(14): 9299-9310.
- Cregan SP, Fortin A, MacLaurin JG, Callaghan SM, Cecconi F, Yu SW, Dawson TM, Dawson VL, Park DS, Kroemer G, Slack RS** (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *Journal of Cell Biology* **158**(3): 507-517.
- D'Autreaux B, Toledano MB** (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**(10): 813-824.
- Daidoji H, Takasaki Y, Nakene PK** (1992). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) in plant proliferating cells: immunohistochemical and quantitative analysis using autoantibody and murine monoclonal antibodies to PCNA. *Cell Biochemistry and Function* **10**:123-132.
- Dalton DA, Baird LM, Langeberg L, Taugher CY, Anyan WR, Vance CV, Sarath G** (1993). Subcellular localization of oxygen defense enzymes in soybean (*Glycine max* L. Merr.) root nodules. *Plant Physiology* **102**: 481-489.
- Danon A, Delorme V, Mailhac N, Gallois P** (2000). Plant programmed cell death: A common way to die. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**(9): 647-655.
- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**(5): 779-795.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van De Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F** (2003). Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal* **33**(4): 621-632.
- Davis, E. J. Lachaud, C.; Appleton, P.; MacArtney, T.J.; Nathke, Inke; Rouse, J.** (2012). DVC1 (C1orf124) recruits the p97 protein segregase to sites of DNA damage. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**: 1093-1100.

- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R** (2005). The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **139**(2): 847-856.
- Davletova S, Schlauch K, Coutu J, Mittler R** (2005). The Zinc-Finger Protein Zat12 Plays a Central Role in Reactive Oxygen and Abiotic Stress Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **139**(2): 847-856.
- De Gara L, de Pinto MC, Arrigoni O** (1997). Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* **100**(4): 894-900.
- De Gara L, de Pinto MC, Moliterni VM, D'Egidio MG** (2003). Redox regulation and storage processes during maturation in kernels of *Triticum durum*. *Journal of Experimental Botany* **54**(381): 249-258.
- de Pinto MC** (2002). Changes in the Antioxidant Systems as Part of the Signaling Pathway Responsible for the Programmed Cell Death Activated by Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant Physiology* **130**(2): 698-708.
- de Pinto MC, Locato V, De Gara L** (2012). Redox regulation in plant programmed cell death. *Plant, Cell & Environment* **35**(2): 234-244.
- de Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas MdC, Gadaleta C, Delledonne M, De Gara L** (2013). S-Nitrosylation of Ascorbate Peroxidase Is Part of Programmed Cell Death Signaling in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiology* **163**(4): 1766-1775.
- de Pinto MC, Paradiso A, Leonetti P, De Gara L** (2006). Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death. *The Plant Journal* **48**(5): 784-795.
- de Tullio M, Arrigoni O** (2003). The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Science Research*. **13**: 249–260.
- del Río L, Sandalio L, Corpas F, Romero-Puertas M, Palma J** (2009). Peroxisomes as a Cellular Source of ROS Signal Molecules. *Reactive Oxygen Species in Plant Signaling*. L. A. Rio and A. Puppo, Springer Berlin Heidelberg: 95-111.
- del Río LA, Sandalio LM, Altomare DA, Zilinskas BA** (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*. **54**(384): 923-933.
- del Río LA, Sandalio LM, Palma JM, Bueno P, Corpas FJ** (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radical Biology and Medicine* **13**(5): 557-580.
- del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA** (1998). The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. *Plant Physiology*. **116**(4): 1195-1200.
- del Río LA, Pastori GM, Palma JM, Sandalio LM, Sevilla F, Corpas FJ, Jiménez A, López-Huertas E, Hernández JA** (1998). The Activated Oxygen Role of Peroxisomes in Senescence. *Plant Physiology* **116**(4): 1195-1200.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(23): 13454-13459.
- Desikan R, Neill SJ, Hancock JT** (2000). Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana. *Free Radical Biology and Medicine* **28**(5): 773-778.
- Diaz Vivancos P, Wolff T, Markovic J, Pallardó FV, Foyer CH** (2010). A nuclear glutathione cycle within the cell cycle. *Biochemical Journal* **431**(2): 169-178.
- Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C, Dangl JL** (1997). A Novel Zinc Finger Protein Is Encoded by the Arabidopsis LSD1 Gene and Functions as a Negative Regulator of Plant Cell Death. *Cell* **88**(5): 685-694.

- Dietz K-J** (2003). Redox Control, Redox Signaling, and Redox Homeostasis in Plant Cells. *International Review of Cytology*, Academic Press **Volume 228**: 141-193.
- Dietz K-J, Jacob S, Oelze M-L, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SMN, Baier M, Finkemeier I** (2006). The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1697-1709.
- Ding M, Hou P, Shen X, Wang M, Deng S, Sun J, Xiao F, Wang R, Zhou X, Lu C, Zhang D, Zheng X, Hu Z, Chen S** (2010). Salt-induced expression of genes related to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and ROS homeostasis in leaves of salt-resistant and salt-sensitive poplar species. *Plant Molecular Biology* **73**(3): 251-269.
- Ditt RF, Gentile A, Tavares RG, Camargo SR, Fernandez JH, Silva MJd, Menossi M** (2011). Analysis of the stress-inducible transcription factor SsNAC23 in sugarcane plants. *Scientia Agricola* **68**: 454-461.
- Domínguez F, Cejudo FJ** (2014). Programmed cell death (PCD) an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in Plant Science*. **5**.
- Domínguez F, Cejudo FJ** (2014). Programmed cell death (PCD) an essential process of cereal seed development and germination. *Frontiers in Plant Science* **5**.
- Douce R, Bourguignon J, Neuburger M, Rébeillé F** (2001). The glycine decarboxylase system: a fascinating complex. *Trends in Plant Science* **6**(4): 167-176.
- Droillard MJ, Bureau D, Paulin A, Daussant J** (1989). Identification of different classes of superoxide dismutase in carnation petals. *Electrophoresis*. **10**(1): 46-48.
- Duchêne A-M, Giegé P** (2012). Dual localized mitochondrial and nuclear proteins as gene expression regulators in plants? *Frontiers in Plant Science*. **3**.
- Dudkina NV, Heinemeyer J, Sunderhaus S, Boekema EJ, Braun H-P** (2006). Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends in Plant Science* **11**(5): 232-240.
- Duke MV, Salin ML** (1985). Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **243**(1): 305-314.
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U** (2008). Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochemical Journal* **414**(1): 53-61.
- Edwards EA, Rawsthorne S, Mullineaux PM** (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta* **180**: 278-284.
- El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C** (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signaling & Behavior* **3**(3): 175-182.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S** (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. **391**(6662): 43-50.
- Erb I, Gonzalez-Vallinas JR, Bussotti G, Blanco E, Eyra E, Notredame C** (2012). Use of ChIP-Seq data for the design of a multiple promoter-alignment method. *Nucleic Acids Research* **40**(7): e52-e52.
- Espelund M, Debedout JA, Outlaw WH, Jakobsen KS** (1995) Environmental and hormonal-regulation of barley late-embryogenesis-abundant (*Lea*) messenger-RNAs is via different signal-transduction pathways. *Plant Cell and Environment* **18**: 943-949.
- Fath A, Bethke P, Lonsdale J, Meza-Romero R, Jones R** (2000). Programmed cell death in cereal aleurone. Programmed cell death in higher plants. E. Lam, H. Fukuda and J. Greenberg, Springer Netherlands: 11-22.
- Feng H, Guan D, Sun K, Wang Y, Zhang T, Wang R** (2013). Expression and signal regulation of the alternative oxidase genes under abiotic stresses. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **45**(12): 985-994.

- Fernández-Trijueque J, de Dios Barajas-López J, Chueca A, Cazalis R, Sahrawy M, Serrato AJ** (2012). Plastid thioredoxins f and m are related to the developing and salinity response of post-germinating seeds of *Pisum sativum*. *Plant Science* **188-189**: 82-88.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G** (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytology* **171**(3): 501-523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C** (2008). Molecular Aspects of Seed Dormancy\*. *Annual Review of Plant Biology* **59**(1): 387-415.
- Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ** (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.
- Flores-Rozas H, Clark D, Kolodner RD** (2000). Proliferating cell nuclear antigen and Msh2p-Msh6p interact to form an active mismatch recognition complex. *Nature Genetics* **26**: 375-378.
- Florez-Sarasa I, Flexas J, Rasmusson AG, Umbach AL, Siedow JN, Ribas-Carbo M** (2011). In vivo cytochrome and alternative pathway respiration in leaves of *Arabidopsis thaliana* plants with altered alternative oxidase under different light conditions. *Plant Cell and Environment* **34**(8): 1373-1383.
- Florez-Sarasa ID, Bouma TJ, Medrano H, Azcon-Bieto J, Ribas-Carbó M** (2007). Contribution of the cytochrome and alternative pathways to growth respiration and maintenance respiration in *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **129**: 143-151.
- Flowers TJ** (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental Botany* **55**(396): 307-319.
- Foyer C, Halliwell B** (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* **133**(1): 21-25.
- Foyer CH, Bloom AJ, Queval G, Noctor G** (2009). Photorespiratory Metabolism: Genes, Mutants, Energetics, and Redox Signaling. *Annual Review of Plant Biology* **60**(1): 455-484.
- Foyer CH, Noctor G** (2003). Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**(3): 355-364.
- Foyer CH, Noctor G** (2005). Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell Online* **17**(7): 1866-1875.
- Foyer CH, Noctor G** (2008). Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* **11**(4): 861-905.
- Foyer CH, Noctor G** (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid Redox Signal*. **11**(4): 861-905.
- Foyer CH, Noctor G** (2013). Redox Signaling in Plants. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**(16): 2087-2090.
- Frazer KA, Pachter L, Poliakov A, Rubin EM, Dubchak I** (2004). VISTA: computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Research* **32**, W273-W279.
- Fridovich I** (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 97-112.
- Fridovich I** (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. *Journal of Experimental Biology* **201**(8): 1203-1209.
- Fujii H, Verslues PE, Zhu JK** (2007). Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 485-494.
- Fukuda H** (2000). Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. *Plant Molecular Biology* **44**(3): 245-253.

- Gadjev I, Stone JM, Gechev TS** (2008). Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. *International Review of Cell and Molecular Biology* **270**: 87-144.
- Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev TS, Laloi C, Minkov IN, Shulaev V, Apel K, Inzé D, Mittler R, Van Breusegem F** (2006). Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. *Plant Physiology* **141**(2): 436-445.
- Gallardo K, Job C, Groot SP, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D** (2001). Proteomic analysis of arabidopsis seed germination and priming. *Plant Physiology* **126**(2): 835-848.
- Gao Y-P, Bonham-Smith PC, Gusta LV** (2002). The role of peroxiredoxin antioxidant and calmodulin in ABA-primed seeds of Brassica napus exposed to abiotic stresses during germination. *Journal of Plant Physiology* **159**(9): 951-958.
- Gapper C, Dolan L** (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant Physiology* **141**(2): 341-345.
- Garfin DE** (1990). One-dimensional gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* **182**: 425-441.
- Garg G** (2010). Response in germination and seedling growth in *Phaseolus mungo* under salt and drought stress. *Journal of Environmental Biology* **31**(3): 261-264.
- Gaude T, Cabrillac D** (2001). Self-incompatibility in flowering plants: the Brassica model. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences III* **324**(6): 537-542.
- Gechev T, Minkov I, Hille J** (2005). Hydrogen Peroxide-induced Cell Death in Arabidopsis: Transcriptional and Mutant Analysis Reveals a Role of an Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Gene in the Cell Death Process. *IUBMB Life* **57**(3): 181-188.
- Gechev TS, Van Breusegem F, Stone JM, Denev I, Laloi C** (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays* **28**(11): 1091-1101.
- Gelhaye E, Rouhier N, Gerard J, Jolivet Y, Gualberto J, Navrot N, Ohlsson PI, Wingsle G, Hirasawa M, Knaff DB, Wang H, Dizengremel P, Meyer Y, Jacquot JP** (2004). A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(40): 14545-14550.
- Gendron JM, Pruneda-Paz JL, Doherty CJ, Gross AM, Kang SE, Kay SA** (2012). Arabidopsis circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(8): 3167-3172.
- Gidrol X, Lin WS, Dégoussée N, Yip SF, Kush A** (1994). Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *European Journal of Biochemistry* **224**(1): 21-28.
- Gietz RD, Woods RA** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology* **350**: 87-96.
- Gill SS, Tuteja N** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**(12): 909-930.
- Giraud E, Ho LH, Clifton R, Carroll A, Estavillo G, Tan YF, Howell KA, Ivanova A, Pogson BJ, Millar AH, Whelan J** (2008). The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in Arabidopsis results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* **147**(2): 595-610.
- Go YM, Jones DP** (2008). Redox compartmentalization in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**(11): 1273-1290.

- Go YM, Park H, Koval M, Orr M, Reed M, Liang Y, Smith D, Pohl J, Jones DP** (2010). A key role for mitochondria in endothelial signaling by plasma cysteine/cystine redox potential. *Free Radical Biology and Medicine* **48**(2): 275-283.
- Gogol EP, Young MC, Kubasek WL, Jarvis TC, von Hippel PH** (1992). Cryoelectron microscopic visualization of functional subassemblies of the bacteriophage T4 DNA replication complex. *Journal of Molecular Biology* **224**: 395-412.
- Goldmark P, Curry J, Morris C, Walker-Simmons MK** (1992). Cloning and expression of an embryo-specific mRNA up-regulated in hydrated dormant seeds. *Plant Molecular Biology* **19**(3): 433-441.
- Gómez JM, 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.
- Goodstein DM, Shu S, Howson R, Neupane R, Hayes RD, Fazo J, Mitros T, Dirks W, Hellsten U, Putnam N, Rokhsar DS** (2011). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research* **40**(Database issue): D1178-D1186.
- Goujon M, McWilliam H, Li W, Valentin F, Squizzato S, Paern J, Lopez R** (2010). A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research* **38** (Web Server): W695-W699.
- Graeber K, Linkies A, Wood ATA, Leubner-Metzger G** (2011). A Guideline to Family-Wide Comparative State-of-the-Art Quantitative RT-PCR Analysis Exemplified with a Brassicaceae Cross-Species Seed Germination Case Study. *The Plant Cell* **23**(6): 2045-2063.
- Guex N, Peitsch MC** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15): 2714-2723.
- Gupta B, Huang B** (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics* **14**: 1-18.
- Hakim MA, Juraimi AS, Hanafi MM, Selamat A, Ismail MR, Karim SM** (2011). Studies on seed germination and growth in weed species of rice field under salinity stress. *Journal of Environmental Biology* **32**(5): 529-536.
- Halliwell B** (2006). Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiology* **141**(2): 312-322.
- Han Y, Chaouch S, Mhamdi A, Queval G, Zechmann B, Noctor G** (2013). Functional analysis of Arabidopsis mutants points to novel roles for glutathione in coupling H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to activation of salicylic acid accumulation and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling* **18**(16): 2106-2121.
- Harmer SL** (2009). The Circadian System in Higher Plants *Annual Review of Plant Biology* **60**: 357-377
- Haslekas C** (2003). Seed 1-Cysteine Peroxiredoxin Antioxidants Are Not Involved in Dormancy, But Contribute to Inhibition of Germination during Stress. *Plant Physiology* **133**(3): 1148-1157.
- Haslekas C, Stacy RP, Nygaard V, Culiáñez-Macià F, Aalen R** (1998). The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in Arabidopsis thaliana is seed-specific and related to dormancy. *Plant Molecular Biology* **36**(6): 833-845.
- Hata S, Kouchi H, Tanaka Y, Minami E, Matsumoto T, Suzuka I, Hashimoto J** (1992). Identification of carrot cDNA clones encoding a second putative proliferating cell nuclear antigen, DNA polymerase d auxiliary protein. *European Journal of Biochemistry* **203**: 367-371.
- Hernández JA, Almansa MS** (2002). Short-term effects of salt stress on antioxidant systems and leaf water relations of pea leaves. *Physiologia Plantarum* **115**(2): 251-257.

- Hernández JA, Ferrer MA, Jiménez A, Barceló AR, Sevilla F** (2001). Antioxidant systems and  $O_2^-/H_2O_2$  production in the apoplast of pea leaves. its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology* **127**(3): 817-831.
- Hilhorst HWM** (2007). Definitions and hypotheses of seed dormancy. *Annual Plant Reviews Volume 27: Seed Development, Dormancy and Germination*, Blackwell Publishing Ltd: 50-71.
- Hirota K, Nakamura H, Masutani H, Yodoi J** (2002). Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Annals of the New York Academy of Science* **957**: 189-199.
- Hite DR, Auh C, Scandalios JG** (1999). Catalase activity and hydrogen peroxide levels are inversely correlated in maize scutella during seed germination. *Redox Reports* **4**(1-2): 29-34.
- Hofmann B, Hecht HJ, Flohé L** (2002). Peroxiredoxins. *Biological Chemistry* **383**: 347.
- Hohfeld J, Minami Y, Hartl FU** (1995). Hip, a novel cochaperone involved in the eukaryotic Hsc70/Hsp40 reaction cycle. *Cell* **83**(4): 589-598.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJJ** (2008). Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* **179**(1): 33-54.
- Holmgren A** (1979). Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *Journal of Biological Chemistry* **254**(18): 9113-9119.
- Holmgren A** (1985). Thioredoxin. *Annual Review of Biochemistry* **54**(1): 237-271.
- Holmgren A** (1995). Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. *Structure* **3**(3): 239-243.
- Holmgren A, Bjornstedt M** (1995). Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods in Enzymology* P. Lester, Academic Press. Volume **252**: 199-208.
- Horling F** (2003). Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**(1): 317-325.
- Horling F, König J, Dietz K-J** (2002). Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**(6-8): 491-499.
- Hossain MA, Asada K** (1984). Inactivation of ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts on dark addition of hydrogen peroxide: Its protection by ascorbate. *Plant Cell Physiology* **25**: 1285-1295.
- Houot V, Etienne P, Petitot AS, Barbier S, Blein JP, Suty L** (2001). Hydrogen peroxide induces programmed cell death features in cultured tobacco BY-2 cells, in a dose-dependent manner. *Journal of Experimental Botany* **52**(361): 1721-1730.
- Huang Z** (2000). Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* **19**(56): 6627-6631.
- Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Lazaro-Payo A, Lopez-Jaramillo FJ, Sevilla F, Lazaro JJ** (2010). Characterization of plant sulfiredoxin and role of sulphinic form of 2-Cys peroxiredoxin. *Journal of Experimental Botany* **61**(5): 1509-1521.
- Iglesias-Baena I, Barranco-Medina S, Sevilla F, Lazaro JJ** (2011). The dual-targeted plant sulfiredoxin retroreduces the sulfenic form of atypical mitochondrial peroxiredoxin. *Plant Physiology* **155**(2): 944-955.
- Iglesias-Fernandez R, Barrero-Sicilia C, Carrillo-Barral N, Onate-Sanchez L, Carbonero P** (2013). Arabidopsis thaliana bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene AtMAN7. *Plant Journal* **74**(5): 767-780.

- Iglesias-Fernández R, Wozny D, Iriondo-de Hond M, Oñate-Sánchez L, Carbonero P, Barrero-Sicilia C** (2014). The AtCathB3 gene, encoding a cathepsin B-like protease, is expressed during germination of *Arabidopsis thaliana* and transcriptionally repressed by the basic leucine zipper protein GBF1. *Journal Experimental Botany* **65**(8): 2009-2021.
- Iida T, Suetake I, Tajima S, Morioka H, Ohta S, Obuse C, Tsurimoto T.** (2002). PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells* **7**(10): 997-1007.
- Ishibashi Y, Tawaratsumida T, Kondo K, Kasa S, Sakamoto M, Aoki N, Zheng SH, Yuasa T, Iwaya-Inoue M.** (2012). Reactive oxygen species are involved in gibberellin/abscisic acid signaling in barley aleurone cells. *Plant Physiology* **158**(4): 1705-1714.
- Issakidis-Bourguet E, Mouaheb N, Meyer Y, Miginiac-Maslow M** (2001). Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *The Plant Journal* **25**(2): 127-135.
- Ito-Inaba Y, Hida Y, Inaba T** (2009). What is critical for plant thermogenesis? Differences in mitochondrial activity and protein expression between thermogenic and non-thermogenic skunk cabbages. *Planta* **231**(1): 121-130.
- Iyer LM, Koonin EV, Aravind L** (2001). Adaptations of the helix-grip fold for ligand binding and catalysis in the START domain superfamily. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **43**(2): 134-144.
- Jacquot J-P, Vidal J, Gadal P, Schürmann P** (1978). Evidence for the existence of several enzyme-specific thioredoxins in plants. *FEBS Letters* **96**(2): 243-246.
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosa J, Tiedemann J, Kroj T, Parcy F.** (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* **3**: 106-111.
- James RA, Blake C, Byrt CS, Munns R** (2011). Major genes for Na<sup>+</sup> exclusion, Nax1 and Nax2 (wheat HKT1;4 and HKT1;5), decrease Na<sup>+</sup> accumulation in bread wheat leaves under saline and waterlogged conditions. *Journal of Experimental Botany* **62**(8): 2939-2947.
- Jaspers P, Kangasjärvi J** (2010). Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum* **138**(4): 405-413.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW.** (1978). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**(13): 3901-3907.
- Jeng M-F, Reymond MT, Tennant LL, Holmgren A, Dyson HJ** (1998). NMR characterization of a single-cysteine mutant of *Escherichia coli* thioredoxin and a covalent thioredoxin-peptide complex. *European Journal of Biochemistry* **257**(2): 299-308.
- Jensen Michael K, Kjaersgaard T, Nielsen Michael M, Galberg P, Petersen K, O'Shea C, Skriver K** (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* **426**(2): 183-196.
- Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeven M, Mullineaux P** (2002). Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. *Planta* **214**(5): 751-758.
- Jiménez A, Hernández JA, del Río LA, Sevilla F** (1997). Ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves: Changes induced by leaf senescence. *Free Radicals* **37**(3): 101-108.
- Jiménez A, Hernández JA, Del Río LA, Sevilla F.** (1997). Evidence for the presence of the ascorbate–glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Plant Physiology* **114**, 275–284.
- Jiménez A, Hernández JA, Pastori G, del Río LA, Sevilla F** (1998). Role of the Ascorbate-Glutathione Cycle of Mitochondria and Peroxisomes in the Senescence of Pea Leaves. *Plant Physiology* **118**(4): 1327-1335.

- Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H** (2002). Complexity, Cross Talk and Integration of Plant MAP Kinase Signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(5): 415-424.
- Jones HD, Kurup S, Peters NC, Holdsworth MJ** (2000). Identification and analysis of proteins that interact with the *Avena fatua* homologue of the maize transcription factor VIVIPAROUS 1. *Plant Journal* **21** (2): 133-142.
- Jonsson TJ, Lowther WT** (2007). The peroxiredoxin repair proteins. *Subcellular Biochemistry* **44**: 115-141.
- Jonsson TJ, Murray MS, Johnson LC, Lowther WT** (2008). Reduction of cysteine sulfinic acid in peroxiredoxin by sulfiredoxin proceeds directly through a sulfinic phosphoryl ester intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **283**(35): 23846-23851.
- Joshi CP, Zhou H, Huang X, Chiang VL** (1997). Context sequences of translation initiation codon in plants. *Plant Molecular Biology* **35**: 993-1001.
- Kagawa T, Hatch MD** (1977). Regulation of C4 photosynthesis: characterization of a protein factor mediating the activation and inactivation of NADP-malate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* **184**(1): 290-297.
- Kaminaka H, Nake C, Eppele P, Dittgen J, Schutze K, Chaban C, Holt BF, 3rd, Merkle T, Schafer E, Harter K, Dangl JL** (2006). bZIP10-LSD1 antagonism modulates basal defense and cell death in Arabidopsis following infection. *EMBO Journal* **25**(18): 4400-4411.
- Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG** (1998). Mammalian Peroxiredoxin Isoforms Can Reduce Hydrogen Peroxide Generated in Response to Growth Factors and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* **273**(11): 6297-6302.
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *TRENDS in Plant Science* **7**(5).
- Karpinska B, Karlsson M, Schinkel H, Streller S, Suss KH, Melzer M, Wingsle G** (2001). A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiology* **126**(4): 1668-1677.
- KeÇpczyński J, KeÇpczyńska E** (1997). Ethylene in seed dormancy and germination. *Physiologia Plantarum* **101**(4): 720-726.
- Kelman Z, O'Donnell M.** (1995). Structural and functional similarities of prokaryotic and eukaryotic DNA polymerase sliding clamps. *Nucleic Acids Research* **23**(18): 3613-3620.
- Kesarwani M, Yoo J, Dong X** (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiology* **144**(1): 336-346.
- Kim H-R, Lee G-H, Ha K-C, Ahn T, Moon J-Y, Lee B-J, Cho S-G, Kim S, Seo Y-R, Shin Y-J, Chae S-W, Reed JC, Chae H-J** (2008). Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent Regulator of Ca<sup>2+</sup> Channel Activity in the Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **283**(23): 15946-15955.
- Kim K, Kim IH, Lee KY, Rhee SG, Stadtman ER** (1988). The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O<sub>2</sub> mixed-function oxidation system. *Journal of Biological Chemistry* **263**(10): 4704-4711.
- Kimura S, Suzuki T, Yanagawa Y, Yamamoto T, Nakagawa H, Tanaka I, Hashimoto J, Sakaguchi K** (2001). Characterization of plant proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and flap endonuclease-1 (FEN-1), and their distribution in mitotic and meiotic cell cycles. *The Plant Journal* **28**: 643-653.
- Kiraly Z, Barna B, Kecskes A, Fodor J** (2002). Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radical Research* **36**(9): 981-991.

- Kirchsteiger K, Ferrández J, Pascual MB, González M, Cejudo FJ** (2012). NADPH Thioredoxin Reductase C Is Localized in Plastids of Photosynthetic and Nonphotosynthetic Tissues and Is Involved in Lateral Root Formation in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **24**(4): 1534-1548.
- Kobrehel K, Wong JH, Balogh A, Kiss F, Yee BC, Buchanan BB** (1992). Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin *h*. *Plant Physiology* **99**(3): 919-924.
- Koc A, Mathews CK, Wheeler LJ, Gross MK, Merrill G F** (2006). Thioredoxin is required for deoxyribonucleotide pool maintenance during S phase. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 15058-15063.
- Kodaira KS, Qin F, Tran LSP, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2011). Arabidopsis Cys2/His2 Zinc-Finger Proteins AZF1 and AZF2 Negatively Regulate Abscisic Acid-Repressive and Auxin-Inducible Genes under Abiotic Stress Conditions. *Plant Physiology*. **157**(2): 742-756.
- Kodama H, Ito M, Ohnishi N, Suzuka I, Komamine A.** (1991). Molecular cloning of the gene for plant proliferating cell nuclear antigen and expression of this gene during cell cycle in synchronized cultures of *Catharanthus roseus* cells. *European Journal of Biochemistry* **197**: 495-503.
- Kong XP, Onrust R, O'Donnell M, Kuriyan J.** (1992). Three-dimensional structure of the beta subunit of *E. coli* DNA polymerase III holoenzyme: a sliding DNA clamp. *Cell* **69**: 425-437.
- Koprivova A, Mugford S, Kopriva S** (2010). Arabidopsis root growth dependence on glutathione is linked to auxin transport. *Plant Cell Reports* **29**(10): 1157-1167.
- Koukalová Be, Kovarčík A, Fajkus J, Šíroky J** (1997). Chromatin fragmentation associated with apoptotic changes in tobacco cells exposed to cold stress. *FEBS Letters* **414**(2): 289-292.
- Koundrioukoff, S; Jonsson, ZO; Hasan, S; de Jong, RN; van der Vliet, PC; Hottiger, MO; Hubscher, U.** (2000). A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **30**(275): 22882-22887.
- Kovtun Y, Chiu W-L, Tena G, Sheen J** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(6): 2940-2945.
- Koyama T, Furutani M, Tasaka M, Ohme-Takagi M** (2007). TCP transcription factors control the morphology of shoot lateral organs via negative regulation of the expression of boundary-specific genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**(2): 473-484.
- Kranner I, Birtic S, Anderson KM, Pritchard HW** (2006). Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology and Medicine* **40**(12): 2155-2165.
- Kroemer G, Reed JC** (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nature Medicine* **6**(5): 513-519.
- Kuge S, Jones N, Nomoto A** (1997). Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO Journal* **16**: 1710-1720.
- Kwon SJ, Park JW, Choi WK, Kim IH, Kim KW** (1994). Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **201**(1): 8-15.
- Lacomme C, Santa Cruz S** (1999). Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A* **96**(14): 7956-7961.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Laloi C** (2004). The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-Box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*. **134**(3): 1006-1016.

- Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP** (2004). The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology* **134**(3): 1006-1016.
- Laloi C, Przybyla D, Apel K** (2006). A genetic approach towards elucidating the biological activity of different reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1719-1724.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y** (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(24): 14144-14149.
- Lamb C, Dixon RA** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**(1): 251-275.
- Laquel P, Litvak S, Castroviejo M** (1993). Mammalian proliferating cell nuclear antigen stimulates the processivity of two wheat embryo DNA polymerases. *Plant Physiology* **102**: 107-114.
- Lara P, Onate-Sanchez L, Abraham Z, Ferrandiz C, Diaz I, Carbonero P, Vicente-Carbajosa J** (2003). Synergistic Activation of Seed Storage Protein Gene Expression in Arabidopsis by ABI3 and Two bZIPs Related to OPAQUE2. *Journal of Biological Chemistry* **278**(23): 21003-21011.
- Lariguet P, Ranocha P, De Meyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C** (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta* **238**(2): 381-395.
- Lariguet P, Ranocha P, De Meyer M, Barbier O, Penel C, Dunand C** (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta* **238**(2): 381-395.
- Laughner BJ, Sehne PC, Ferl RJ** (1998). A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily. *Plant Physiology* **118**(3): 987-996.
- Laurent TC, Moore EC, Reichard P** (1964). Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **239**: 3436-3444.
- Lázaro JJ, Jiménez A, Camejo D, Iglesias-Baena I, Martí MdC, 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**.
- Lee MY** (2005). Induction of thioredoxin is required for nodule development to reduce reactive oxygen species levels in soybean roots. *Plant Physiology* **139**(4): 1881-1889.
- Lee SP, Hwang YS, Kim YJ, Kwon KS, Kim HJ, Kim K, Chae HZ** (2001). Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity. *Journal of Biological Chemistry* **276**(32): 29826-29832.
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M** (2009). NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**(4): 451-458.
- Lemaire SD, Collin V, Keryer E, Quesada A, Miginiac-Maslow M** (2003). Characterization of thioredoxin  $\gamma$ , a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Letters* **543**(1-3): 87-92.
- Lescot M, Déhais P, Moreau Y, De Moor B, Rouzé P, Rombauts S** (2002). PlantCARE: A database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research* **30**: 325-327.
- Leubner-Metzger G** (2004).  $\beta$ -1,3-Glucanase gene expression in low-hydrated seeds as a mechanism for dormancy release during tobacco after-ripening. *The Plant Journal* **41**(1): 133-145.

- Levine AJ** (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**(3): 323-331.
- Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amice A, Climent I, Lenz AG, Ahn B, Shaltiel S, Stadtman ER** (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* **186**: 464-478.
- Lewis ML, Miki K, Ueda T** (2000). FePer 1, a gene encoding an evolutionarily conserved 1-Cys peroxiredoxin in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), is expressed in a seed-specific manner and induced during seed germination. *Gene* **246**(1-2): 81-91.
- Leymarie J, Vitkauskaitė G, Hoang HH, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, Corbineau F, El-Maarouf-Bouteau H, Bailly C** (2011). Role of reactive oxygen species in the regulation of Arabidopsis seed dormancy. *Plant and Cell Physiology* **53**: 96-106.
- Li J, Wang D-Y, Li Q, Xu Y-J, Cui K-M, Zhu Y-X** (2004). PPF1 inhibits programmed cell death in apical meristems of both G2 pea and transgenic Arabidopsis plants possibly by delaying cytosolic Ca<sup>2+</sup> elevation. *Cell Calcium* **35**(1): 71-77.
- Li Q-y, Niu H-b, Yin J, Shao H-b, Niu J-s, Ren J-p, Li Y-c, Wang X** (2010). Transgenic barley with overexpressed PTRx increases aluminum resistance in roots during germination. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. **11**(11): 862-870.
- Licausi F, Ohme-Takagi M, Perata P** (2013). APETALA2/Ethylene responsive factor (AP2/ERF) transcription factors: mediators of stress responses and developmental programs. *New Phytologist* **199**(3): 639-649.
- Lim MJ, Chae HZ, Rhee SG, Yu D-Y, Lee K-K, Yeom YI** (1998). The type II peroxiredoxin gene family of the mouse: molecular structure, expression and evolution. *Gene* **216**(1): 197-205.
- Lin C C and Kao C H** (1995) NaCl stress in rice seedlings: starch mobilization and the influence of gibberellic acid on seedling growth. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **36**: 169-173.
- Lin Y, Yang L, Paul M, Zu Y, Tang Z** (2013). Ethylene promotes germination of Arabidopsis seed under salinity by decreasing reactive oxygen species: Evidence for the involvement of nitric oxide simulated by sodium nitroprusside. *Plant Physiology and Biochemistry* **73**: 211-218.
- Lindahl M, Florencio FJ** (2004). Systematic screening of reactive cysteine proteomes. *Proteomics* **4**: 448-450.
- Linkies A, Graeber K, Knight C, Leubner-Metzger G** (2010). The evolution of seeds. *New Phytology* **186**(4): 817-831.
- Liu A, Gao F, Kanno Y, Jordan MC, Kamiya Y, Seo M, Ayele BT** (2013). Regulation of wheat seed dormancy by after-ripening is mediated by specific transcriptional switches that induce changes in seed hormone metabolism and signaling. *PLoS One* **8**(2): e56570.
- Liu P-P, Koizuka N, Homrichhausen TM, Hewitt JR, Martin RC, Nonogaki H** (2005). Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *The Plant Journal* **41**(6): 936-944.
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **10**(8): 1391-1406.
- Liu XP, Liu XY, Zhang J, Xia ZL, Liu X, Qin HJ, Wang DW** (2006). Molecular and functional characterization of sulfiredoxin homologs from higher plants. *Cell Research* **16**(3): 287-296.
- Liu Y, Ye N, Liu R, Chen M, Zhang J** (2010). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* **61**(11): 2979-2990.

- Locato V** (2006). Reduced expression of top1 gene induces programmed cell death and alters ascorbate metabolism in *Daucus carota* cultured cells. *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1667-1676.
- Locato V, de Pinto MC, De Gara L** (2009). Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses. *Physiologia Plantarum* **135**(3): 296-306.
- Locato V, Gadaleta C, De Gara L, De Pinto MC** (2008). Production of reactive species and modulation of antioxidant network in response to heat shock: a critical balance for cell fate. *Plant, Cell & Environment* **31**(11): 1606-1619.
- López I, Khan S, Vazquez-Ramos J, Hussey PJ** (1995). Molecular cloning of a maize cDNA clone encoding a putative proliferating cell nuclear antigen. *Biochimica et Biophysica Acta* **1260**: 119-121.
- Lotem J, Peled-Kamar M, Groner Y, Sachs L** (1996). Cellular oxidative stress and the control of apoptosis by wild-type p53, cytotoxic compounds, and cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(17): 9166-9171.
- Love AJ, Milner JJ, Sadanandom A** (2008). Timing is everything: regulatory overlap in plant cell death. *Trends in Plant Science* **13**(11): 589-595.
- Lozano R, Wong J, Yee B, Peters A, Kobrehel K, Buchanan B** (1996). New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta* **200**(1): 100-106.
- Lu H, Wan Q, Wang H, Na X, Wang X, Bi Y** (2012). Oxidative stress and mitochondrial dysfunctions are early events in narciclasine-induced programmed cell death in tobacco Bright Yellow-2 cells. *Physiologia Plantarum* **144**(1): 48-58.
- Lu J, Holmgren A** (2009). Selenoproteins. *Journal of Biological Chemistry* **284**(2): 723-727.
- Luan Z, Xiao M, Zhou D, Zhang H, Tian Y, Wu Y, Guan B, Song Y** (2014). Effects of salinity, temperature, and polyethylene glycol on the seed germination of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *The Scientific World Journal* 2014: 1-9.
- Maeda K, Finnie C, Svennson B** (2004). Cy5 maleimide-labeling of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochemical Journal* **378**: 497-507.
- Marchal C, Delorme-Hinoux V, Bariat L, Siala W, Belin C, Saez-Vasquez J, Riondet C, Reichheld JP** (2014). NTR/NRX define a new thioredoxin system in the nucleus of *Arabidopsis thaliana* cells. *Molecular Plant* **7**(1): 30-44.
- Marchand C, Le Maréchal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P** (2004). New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**: 2696-2706.
- Marinho HS, Real C, Cyrne L, Soares H, Antunes F** (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology* **2**(0): 535-562.
- Mark DF, Richardson CC** (1976). Escherichia coli thioredoxin: a subunit of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **73**(3): 780-784.
- Markley NA, Bonham-Smith PC, Moloney MM** (1993). Molecular cloning and expression of a cDNA encoding the proliferating cell nuclear antigen from *Brassica napus* (oilseed rape) *Genome* **36**: 459-466.
- Martí MC, Florez-Sarasa I, Camejo D, Pallol B, Ortíz A, Ribas-Carbó M, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A** (2012). Response of mitochondrial antioxidant system and respiratory pathways to reactive nitrogen species in pea leaves. *Physiologia Plantarum* **147**: 194-206.

- Martí MC, Olmos E, Calvete JJ, Díaz I, Barranco-Medina S, Whelan J, Lázaro JJ, 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.
- Martin MN, Tarczynski MC, Shen B, Leustek T** (2005). The role of 5'-adenylylsulfate reductase in controlling sulfate reduction in plants. *Photosynthesis Research* **86**(3): 309-323.
- Martín-Trillo M, Cubas P** (2010). TCP genes: a family snapshot ten years later. *Trends in Plant Science* **15**(1): 31-39.
- Marx C, Wong JH, Buchanan BB** (2003). Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* **216**(3): 454-460.
- Mateo A, Muhlenbock P, Rusterucci C, Chang CC, Miszalski Z, Karpinska B, Parker JE, Mullineaux PM, Karpinski S** (2004). LESION SIMULATING DISEASE 1 is required for acclimation to conditions that promote excess excitation energy. *Plant Physiology* **136**(1): 2818-2830.
- Matilla AJ, Matilla-Vázquez MA** (2008). Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Science* **175**(1-2): 87-97.
- Matsumoto T, Hata S, Suzuka I, Hashimoto J** (1994). Expression of functional proliferating-cell nuclear antigen from rice (*Oryza sativa*) in *Escherichia coli*. Activity in association with human DNA polymerase delta. *European Journal of Biochemistry* **223**: 179-187.
- Maxwell DP, Nickels R, McIntosh L** (2002). Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant Journal* **29**(3): 269-279.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**(14): 8271-8276.
- McCabe PF, Valentine TA, Forsberg LS, Pennell RI** (1997). Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell* **9**(12): 2225-2241.
- McCord JM, Fridovich I** (1969). Superoxide Dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *Journal of Biological Chemistry* **244**(22): 6049-6055.
- Meneguzzo S, Sgherri CLM, Navari-Izzo F, Izzo R** (1998). Stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in NaCl-treated wheat. *Physiologia Plantarum* **104**(4): 735-740.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB** (2010). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(8): 3900-3905.
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA** (2002). Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **277**(44): 41987-42002.
- Mestres-Ortega D, Meyer Y** (1999). The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**(2): 307-316.
- Meyer Y, Belin C, Delorme-Hinoux V, Reichheld J-P, Riondet C** (2012). Thioredoxin and glutaredoxin systems in plants: molecular mechanisms, crosstalks, and functional significance. *Antioxidants & Redox Signaling* **17**(8): 1124-1160.
- Meyer Y, Reichheld J, Vignols F** (2005). Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research* **86**(3): 419-433.

- Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F, Reichheld JP** (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* **1783**(4): 589-600.
- Millar AH** (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiology* **133**(2): 443-447.
- Millar AH, Whelan J, Soole KL, Day DA** (2011). Organization and regulation of mitochondrial respiration in plants. *Annual Review in Plant Biology* **62**: 79-104.
- Millenaar FF, Gonzalez-Meler MA, Siedow JN, Wagner AM, Lambers H** (2002). Role of sugars and organic acids in regulating the concentration and activity of the alternative oxidase in *Poa annua* roots. *Journal of Experimental Botany* **53**(371): 1081-1088.
- Millenaar FF, Lambers H** (2003). The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biology* **5**(1): 2-15.
- Miller G, Mittler R** (2006). Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Annals of Botany* **98**(2): 279-288.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R** (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signalling* **2**: ra45-ra45.
- Minakuchi K, Yabushita T, Masumura T, Ichihara Ki, Tanaka K** (1994). Cloning and sequence analysis of a cDNA encoding rice glutaredoxin. *FEBS Letters* **337**(2): 157-160.
- Miranda-Vizuet A, Damdimopoulos AE, Gustafsson J, Spyrou G** (1997). Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **272**(49): 30841-30847.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N** (2006). Signaling through MAP kinase networks in plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **452**(1): 55-68.
- Mitsuhara I, Malik KA, Miura M, Ohashi Y** (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-x(L) and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current Biology* **9**(14): 775-778.
- Mittler R** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**(9): 405-410.
- Mittler R, Feng X, Cohen M** (1998). post-transcriptional suppression of cytosolic ascorbate peroxidase expression during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *The Plant Cell Online* **10**(3): 461-473.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**(10): 490-498.
- Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Gollery M, Shulaev V, Van Breusegem F** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science* **16**(6): 300-309.
- Miyazono, K., Miyakawa, T., Sawano, Y., Kubota, K., Kang, H.J., Asano, A., Miyauchi, Y., Takahashi, M., Zhi, Y., Fujita, Y., Yoshida T, Kodaira KS, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M** (2009). Structural basis of abscisic acid signalling. *Nature* **462**: 609-614.
- Mochizuki M, Kwon YW, Yodoi J, Masutani H** (2009). Thioredoxin regulates cell cycle via the ERK1/2-cyclin D1 pathway. *Antioxidant Redox Signaling* **11**(12): 2957-2971.
- Møller IM** (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**(1): 561-591.
- Møller IM, Sweetlove LJ** (2010). ROS signalling specificity is required. *Trends in Plant Science* **15**(7): 370-374.

- Montillet JL** (2005). Fatty Acid Hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the Execution of Hypersensitive Cell Death in Tobacco Leaves. *Plant Physiology* **138**(3): 1516-1526.
- Montrichard F, Alkhalifioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009). Thioredoxin targets in plants: The first 30 years. *Journal of Proteomics* **72**(3): 452-474.
- Morohashi Y** (2002). Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. *Journal of Experimental Botany* **53**(374): 1643-1650.
- Moseyko N, Zhu T, Chang H-S, Wang X, Feldman LJ** (2002). Transcription profiling of the early gravitropic response in *Arabidopsis* using high-density oligonucleotide probe microarrays. *Plant Physiology* **130**(2): 720-728.
- Motohashi K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T** (2001). Comprehensive survey of protein targeted by chloroplast thioredoxin. *Proceedings of National Academy of Science USA* **98**: 11224-11229.
- Mou Z Fan W, Dong X** (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**(7): 935-944.
- Mouaheb N, Thomas D, Verdoucq L, Monfort P, Meyer Y** (1998). *In vivo* functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(6): 3312-3317.
- Muller EG** (1991). Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* **266**(14): 9194-9202.
- Muller EG** (1996). A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell* **7**(11): 1805-1813.
- Müller K, Tintelnot S, Leubner-Metzger G** (2006). Endosperm-limited brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **47**(7): 864-877.
- Munns R** (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* **25**(2): 239-250.
- Munns R** (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* **167**(3): 645-663.
- Munns R, Tester M** (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**(1): 651-681.
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473.
- Mylona PV, Polidoros AN, Scandalios JG** (2007). Antioxidant gene responses to ROS-generating xenobiotics in developing and germinated scutella of maize. *Journal of Experimental Botany*. **58**(6): 1301-1312.
- Nagel M, Navakode S, Scheibal V, Baum M, Nachit M, Röder MS, Börner A** (2014). The genetic basis of durum wheat germination and seedling growth under osmotic stress. *Biologia Plantarum* **58**(4): 681-688.
- Nakabayashi K, Okamoto M, Koshiha T, Kamiya Y, Nambara E** (2005). Genome-wide profiling of stored mRNA in *Arabidopsis thaliana* seed germination: epigenetic and genetic regulation of transcription in seed. *The Plant Journal* **41**(5): 697-709.
- Nakano Y, Asada K** (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* **22**(5): 867-880.
- Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009). Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases,

SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in aba signaling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant and Cell Physiology* **50**(7): 1345-1363.

**Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2014). The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Frontiers in Plant Science* **5**.

**Nakashima T, Sekiguchi T, Kuraoka A, Fukushima K, Shibata Y, Komiyama S, Nishimoto T** (1993). Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Molecular and Cellular Biology* **13**(10): 6367-6374.

**Nakashima, K., Fujita, Y., Kanamori, N. Katagiri T, Umezawa T, Kidokoro S, Maruyama K, Yoshida T, Ishiyama K, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2009). Three Arabidopsis SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signalling are essential for the control of seed development and dormancy. *Plant and Cell Physiology* **50**: 1345–1363.

**Ndamukong I, Abdallat AA, Thurow C, Fode B, Zander M, Weigel R, Gatz C** (2007). SA-inducible Arabidopsis glutaredoxin interacts with TGA factors and suppresses JA-responsive PDF1.2 transcription. *The Plant Journal* **50**(1): 128-139.

**Ng L, Prelich G, Anderson CW, Stillman B, Fisher PA** (1990). Drosophila proliferating cell nuclear antigen. Structural and functional homology with its mammalian counterpart. *The Journal of Biological Chemistry* **265**: 11948–11954.

**Nishida M, Harada S, Noguchi S, Satow Y, Inoue H, Takahashi K** (1998). Three-dimensional structure of Escherichia coli glutathione S-transferase complexed with glutathione sulfonate: catalytic roles of Cys10 and His106. *Journal of Molecular Biology* **281**(1): 135-147.

**Noctor G, De Paepe R, Foyer CH** (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* **12**(3): 125-134.

**Noctor G, Foyer CH** (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**(1): 249-279.

**Nogueira FTS, Schlögl PS, Camargo SR, Fernandez JH, De Rosa Jr VE, Pompermayer P, Arruda P** (2005). SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Science* **169**(1): 93-106.

**Notredame C., Higgins D. G., Heringa J** (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* **302**: 205-217

**O'Neill JS, Reddy AB** (2011). Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* **469**(7331): 498-503.

**Obroucheva NV, Antipova OV** (1997). Physiology of the initiation of seed germination. *Russian Journal of Plant Physiology* **44**: 250-264.

**Oelze M-L, Muthuramalingam M, Vogel M, Dietz K-J** (2014). The link between transcript regulation and de novo protein synthesis in the retrograde high light acclimation response of Arabidopsis thaliana. *BMC Genomics* **15**(1): 320.

**Ogawa Ki, Kanematsu S, Asada K** (1996). Intra- and extra-cellular localization of cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and Cell Physiology* **37**(6): 790-799.

**Ogawa Ki, Kanematsu S, Takabe K, Asada K** (1995). Attachment of Cu,Zn-superoxide dismutase to thylakoid membranes at the site of superoxide generation (PSI) in spinach chloroplasts: detection by immuno-gold labeling after rapid freezing and substitution method. *Plant and Cell Physiology* **36**(4): 565-573.

- Ohgishi M, Saji K, Okada K, Sakai T** (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(8): 2223-2228.
- Okamoto M, Peterson FC, Defries A, Park SY, Endo A, Nambara E, Volkman BF, Cutler SR** (2013). Activation of dimeric ABA receptors elicits guard cell closure, ABA-regulated gene expression, and drought tolerance. *Proceedings of National Academy of Science USA* **110**(29): 12132-12137.
- Olsen OA** (2004). Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16** Suppl: S214-227.
- Onda Y, Kato Y, Abe Y, Ito T, Morohashi M, Ito Y, Ichikawa M, Matsukawa K, Kakizaki Y, Koiwa H, Ito K** (2007). Functional coexpression of the mitochondrial alternative oxidase and uncoupling protein underlies thermoregulation in the thermogenic florets of skunk cabbage. *Plant Physiology* **146**(2): 636-645.
- op den Camp RGL** (2003). Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **15**(10): 2320-2332.
- Oracz K, Bouteau HE-M, Farrant JM, Cooper K, Belghazi M, Job C, Job D, Corbineau F, Bailly C** (2007). ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *The Plant Journal* **50**(3): 452-465.
- Oracz K, El-Maarouf-Bouteau H, Kranner I, Bogatek R, Corbineau F, Bailly C** (2009). The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* **150**(1): 494-505.
- Oracz K, Voegelé A, Tarkowska D, Jacquemoud D, Tureckova V, Urbanova T, Strnad M, Sliwinska E, Leubner-Metzger G** (2011). Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant and Cell Physiology* **53**(1): 81-95.
- Ortiz-Espín A, Iglesias-Fernández R, Calderón A, Sevilla F, Carbonero P, Jiménez A** 2013. Mitochondrial *AtTrxo1*: its transcriptional regulation and role under salt-stress. In: *Proceedings of the VIII Meeting of the Spanish Group of Research on Free Radicals*, Valencia, Spain.
- Palma JM** (2006). Antioxidative enzymes from chloroplasts, mitochondria, and peroxisomes during leaf senescence of nodulated pea plants. *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1747-1758.
- Park S-C, Park E-H, Cho JW** (1999). Nucleotide sequence of a tobacco cDNA clone encoding a homolog of proliferating cell nuclear antigen (Accession No. AF038875). *Plant Physiology* **119**: 806.
- Park SG** (2000). Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **275**(8): 5723-5732.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow Tff, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR** (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**: 1068-1071.
- Pérez-Pérez ME, Florencio FJ, Lindahl AM** (2006). Selecting Thioredoxins for disulphide proteomics: target proteomes of three thioredoxins from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proteomics* **6**: S186-S195.
- Pérez-Ruiz JM, Gonzalez M, Spinola MC, Sandalio LM, Cejudo FJ** (2009). The quaternary structure of NADPH thioredoxin reductase C is redox-sensitive. *Molecular Plant* **2**(3): 457-467.
- Pérez-Ruiz JM, Spinola MC, Kirchsteiger K, Moreno J, Sahrawy M, Cejudo FJ** (2006). Rice NTRC is a high-efficiency redox system for chloroplast protection against oxidative damage. *Plant Cell* **18**(9): 2356-2368.

- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS** (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* **20**: 3551-3567.
- Pesaresi P, Masiero S, Eubel H, Braun H-P, Bhushan S, Glaser E, Salamini F, Leister D** (2006). Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *The Plant Cell Online* **18**(4): 970-991.
- Pfalz J, Liere K, Kandlbinder A, Dietz KJ, Oelmüller R** (2006). pTAC2, -6, and -12 are components of the transcriptionally active plastid chromosome that are required for plastid gene expression. *Plant Cell* **18**(1): 176-197.
- Pineau B, Layoune O, Danon A, De Paeppe R** (2008). L-Galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*. **283**(47): 32500-32505.
- Polle A** (2001). Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway in chloroplasts by metabolic modeling. computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiology* **126**(1): 445-462.
- Posmyk MM, Corbineau F, Vinel D, Bailly C, Côme D** (2001). Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. *Physiologia Plantarum* **111**(4): 473-482.
- Potters G, De Gara L, Asard H, Horemans N** (2002). Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiology and Biochemistry* **40**(6-8): 537-548.
- Prasad BD, Goel S, Krishna P** (2010). *In silico* identification of carboxylate clamp type tetratricopeptide repeat proteins in Arabidopsis and rice as putative co-chaperones of Hsp90/Hsp70. *PLoS One* e12761.
- Przybyla D, Göbel C, Imboden A, Hamberg M, Feussner I, Apel K** (2008). Enzymatic, but not non-enzymatic, 1O<sub>2</sub>-mediated peroxidation of polyunsaturated fatty acids forms part of the EXECUTER1-dependent stress response program in the flu mutant of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **54**(2): 236-248.
- Puli MR, Raghavendra AS** (2012). Pyrabactin, an ABA agonist, induced stomatal closure and changes in signalling components of guard cells in abaxial epidermis of *Pisum sativum*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1349-1356.
- Pulido P, Cazalis R, Cejudo FJ** (2009). An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. *The Plant Journal* **57**(1): 132-145.
- Pulido P, Spinola MC, Kirchsteiger K, Guinea M, Pascual MB, Sahrawy M, Sandalio LM, Dietz KJ, Gonzalez M, Cejudo FJ** (2010). Functional analysis of the pathways for 2-Cys peroxiredoxin reduction in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *Journal of Experimental Botany* **61**(14): 4043-4054.
- Puntarulo S, Galleano M, Sanchez RA, Boveris A** (1991). Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects* **1074**(2): 277-283.
- Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R** (2009). Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS Genetics* **5**(8): e1000621.
- Radauer C, Lackner P, Breiteneder H** (2008). The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC Evolutionary Biology* **8**(1): 286.
- Rahnama A, James RA, Poustini K, Munns R** (2010). Stomatal conductance as a screen for osmotic stress tolerance in durum wheat growing in saline soil. *Functional Plant Biology* **37**(3): 225-263.
- Rao M, Davis K** (2001). The physiology of ozone induced cell death. *Planta* **213**(5): 682-690.

- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC, Bressendorff S, Friis P, Costantino P, Bones AM, Nielsen HB, Mundy J** (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **161**(4): 1783-1794.
- Rasmusson AG, Wallstrom SV** (2010). Involvement of mitochondria in the control of plant cell NAD(P)H reduction levels. *Biochemical Society Transactions* **38**(2): 661-666.
- Reape TJ, Molony EM, McCabe PF** (2008). Programmed cell death in plants: distinguishing between different modes. *Journal of Experimental Botany* **59**(3): 435-444.
- Reichheld J-P, Meyer E, Khafif M, Bonnard G, Meyer Y** (2005). AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **579**(2): 337-342.
- Reichheld JP, 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. *The Plant Cell Online* **19**(6): 1851-1865.
- Relán-Alvarez R, Hernández LE, Abadía J, Álvarez-Fernández A** (2006). Direct and simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione and homogluthathione by liquid chromatography-electrospray/ mass spectrometry in plant tissue extracts. *Analytical Biochemistry* **356**: 254-264
- Renard M, Alkhalfioui F, Schmitt-Keichinger C, Ritzenthaler C, Montrichard F** (2011). Identification and Characterization of Thioredoxin h Isoforms Differentially Expressed in Germinating Seeds of the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **155**(3): 1113-1126.
- Rey P, Cuiñé S, Eymery F, Garin J, Court M, Jacquot J-P, Rouhier N, Broin M** (2005). Analysis of the proteins targeted by CDSP32, a plastidic thioredoxin participating in oxidative stress responses. *The Plant Journal* **41**(1): 31-42.
- Rey P, Pruvot G, Becuwe N, Eymery F, Rumeau D, Peltier G** (1998). A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *The Plant Journal* **13**(1): 97-107.
- Rhazi L, Cazalis R, Aussenac T** (2003). Sulfhydryl-disulfide changes in storage proteins of developing wheat grain: influence on the SDS-unextractable glutenin polymer formation. *Journal of Cereal Science* **38**(1): 3-13.
- Rhee SG, Jeong W, Chang TS, Woo HA** (2007). Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance. *Kidney International Supplements* **106**: S3-S8.
- Rhee SG, Kang SW, Chang TS, Jeong W, Kim K** (2001). Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life* **52**(1): 35-41.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS** (2005). Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling* **7**(5-6): 619-626.
- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN** (1998). Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria: identification of the cysteine residue involved in keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *Journal of Biological Chemistry* **273**(46): 30750-30756.
- Ribas-Carbó M** (2005). Effects of water stress on respiration in soybean leaves. *Plant Physiology* **139**(1): 466-473.
- Ribas-Carbó M, Robinson SA, Giles L** (2005). The application of the oxygen-isotope technique to assess respiratory pathway partitioning. In: *Advances in Photosynthesis and Respiration. Plant Respiration: from Cell to Ecosystem*, eds H. Lambers and M. Ribas-Carbó (The Netherlands, Springer) **18**: 31-42.

- Richards SL, Wilkins KA, Swarbreck SM, Anderson AA, Habib N, Smith AG, McAinsh M, Davies JM** (2014). The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093/jxb/eru398.
- Rivas S, Rougon-Cardoso A, Smoker M, Schauser L, Yoshioka H, Jones JD** (2004). CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence. *EMBO Journal* **23**(10): 2156-2165.
- Rizhsky L** (2004). When defense pathways collide. the response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**(4): 1683-1696.
- Robson CA, Vanlerberghe GC** (2002). Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and -independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiology* **129**(4): 1908-1920.
- Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas MC, Zabalza A, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation *in vivo*. *Plant, Cell & Environment* **29**(8): 1532-1544.
- Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Rodríguez-Serrano M, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2007). Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *Journal of Plant Physiology* **164**(10): 1346-1357.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M (2007). S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**(12): 4120-4130.
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM** (2004). Cadmium-induced subcellular accumulation of  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$  in pea leaves. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1122-1134.
- Rosado A, Schapire AL, Bressan RA, Harfouche AL, Hasegawa PM, Valpuesta V, Botella MA** (2006). The Arabidopsis tetratricopeptide repeat-containing protein ttl1 is required for osmotic stress responses and abscisic acid sensitivity. *Plant Physiology* **142**(3): 1113-1126.
- Rouhier N** (2010). Plant glutaredoxins: pivotal players in redox biology and iron-sulphur centre assembly. *New Phytologist* **186**(2): 365-372.
- Rouhier N, Gelhaye E, Jacquot JP** (2002). Glutaredoxin-dependent Peroxiredoxin from Poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *Journal of Biological Chemistry* **277**(16): 13609-13614.
- Rouhier N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Fay E, Meyer Y, Jacquot JP** (2001). Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiology* **127**(3): 1299-1309.
- Roussel X, Bechade G, Kriznik A, Van Dorselaer A, Sanglier-Cianferani S, Branlant G, Rahuel-Clermont S** (2008). Evidence for the formation of a covalent thiosulfinate intermediate with peroxiredoxin in the catalytic mechanism of sulfiredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **283**(33): 22371-22382.
- Rozema J, Flowers T** (2008). Crops for a salinized world. *Science* **322**(5907): 1478-1480.
- Russel M, Model P** (1985). Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proceedings of National Academy of Science USA* **82**(1): 29-33.
- Sakamoto H** (2004). Arabidopsis Cys2/His2-type Zinc-finger proteins function as transcription repressors under drought, cold, and high-salinity stress conditions. *Plant Physiology* **136**(1): 2734-2746.
- Sakata Y, Komatsu K, Takezawa D** (2014). ABA as a universal plant hormone. In: Leuttge U, Wolfgang B, Cushman J, eds. *Progress in Botany* **75**. Berlin, Germany: Springer, 57-96.

- Salin ML, Bridges SM** (1980). Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **201**(2): 369-374.
- Sambrook J, Russell DW** (2001). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santos R, Bocquet S, Puppo A, Touati D** (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **181**(15): 4509-4516.
- Sanz-Barrio R, Fernández-San Millán A, Carballeda J, Corral-Martínez P, Seguí-Simarro JM, Farran I** (2012). Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins *f* and *m*. *Journal of Experimental Botany* **63**: 365–379.
- Sarath G, Hou G, Baird LM, Mitchell RB** (2007). ABA, ROS and NO are Key Players During Switchgrass Seed Germination. *Plant Signaling Behavior* **2**(6): 492-493.
- Scandalios JG** (1987). The antioxidant enzyme genes Cat and Sod of maize: regulation, functional significance, and molecular biology. *Isozymes Current Topics in Biology and Medicine Research* **14**: 19-44.
- Scandalios JG** (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **38**: 995-1014.
- Schmidt M, Grief J, Feierabend J** (2006). Mode of translational activation of the catalase (*cat1*) mRNA of rye leaves (*Secale cereale* L.) and its control through blue light and reactive oxygen. *Planta* **223**(4): 835-846.
- Schopfer P** (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *Plant Journal* **28**(6): 679-688.
- Schürmann P, Jacquot JP** (2000). Plant thioredoxin system revisited. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 371–400.
- Seemann S, Hainaut P** (2005). Roles of thioredoxin reductase 1 and APE/Ref-1 in the control of basal p53 stability and activity. *Oncogene* **24**(24): 3853-3863.
- Serrato A, Cejudo F** (2003). Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**(3): 392-399.
- Serrato A, Crespo J, Florencio F, Cejudo F** (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.
- Serrato AJ, Cejudo FJ** (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**: 392-399.
- Serrato AJ, Pérez-Ruiz JM, Spínola MC, Cejudo FJ** (2004). A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **279**(42): 43821-43827.
- Setya A, Murillo M, Leustek T** (1996). Sulfate reduction in higher plants: molecular evidence for a novel 5'-adenylylsulfate reductase. *Proceedings of National Academy of Science USA* **93**(23): 13383-13388.
- Sevilla F, López-Gorgé J, del Río LA** (1982). Characterization of a manganese superoxide dismutase from the higher plant *Pisum sativum*. *Plant Physiology* **70**(5): 1321-1326.
- Shahpiri A, Svensson B, Finnie C** (2007). The NADPH-dependent thioredoxin reductase/thioredoxin system in germinating barley seeds: gene expression, protein profiles, and interactions between isoforms of thioredoxin h and thioredoxin reductase. *Plant Physiology* **146**(2): 789-799.

- Shao N, Beck C, Lemaire S, Krieger-Liszka A** (2008). Photosynthetic electron flow affects H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling by inactivation of catalase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **228**(6): 1055-1066.
- Sherr CJ, Roberts JM** (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes and Development* **9**: 1149-1163.
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M** (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* **68**: 850-858.
- Shikanai T, Takeda T, Yamauchi H, Sano S, Tomizawa K-I, Yokota A, Shigeoka S** (1998). Inhibition of ascorbate peroxidase under oxidative stress in tobacco having bacterial catalase in chloroplasts. *FEBS Letters* **428**(1-2): 47-51.
- Simontacchi M, Caro A, Fraga CG, Puntarulo S** (1993). Oxidative stress affects [alpha]-tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiology* **103**(3): 949-953.
- Sirichandra C, Gu D, Hu H.-C, Davature M, Lee S, Djaoui M, Valot B, Zivy M, Leung J, Merlot S, Jkwaket JM** (2009). Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters* **583**: 2982-2986.
- Smirnoff N** (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**: 437-467.
- Soon FF, Ng LM, Zhou XE, West GM, Kovach A, Tan MH, Suino-Powell KM, He Y, Xu Y, Chalmers MJ, Brunzelle JS, Zhang H, Yang H, Jiang H, Li J, Yong EL, Cutler S, Zhu JK, Griffin PR, Melcher K, Xu HE** (2012). Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science* **335**(6064): 85-88.
- Spinola MC, Perez-Ruiz JM, Pulido P, Kirchsteiger K, Guinea M, Gonzalez M, Cejudo FJ** (2008). NTRC new ways of using NADPH in the chloroplast. *Physiologia Plantarum* **133**(3): 516-524.
- Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson J** (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **272**(5): 2936-2941.
- Stacy RP, Munthe E, Steinum T, Sharma B, Aalen R** (1996). A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy-related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. *Plant Molecular Biology* **31**(6): 1205-1216.
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF** (1997). Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 1035-1040.
- Storz G, Jacobson FS, Tartaglia LA, Morgan RW, Silveira LA, Ames BN** (1989). An alkyl hydroperoxide reductase induced by oxidative stress in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*: genetic characterization and cloning of ahp. *Journal of Bacteriology* **171**(4): 2049-2055.
- Streller S, Wingsle G** (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular Cu,Zn superoxide dismutase. *Planta* **192**(2): 195-201.
- Strzalka W, Kaczmarek A, Naganowska B, Ziemienowicz A** (2010). Identification and functional analysis of PCNA1 and PCNA-like1 genes of *Phaseolus coccineus*. *Journal of Experimental Botany* **61**: 873-888.
- Strzalka W, Oyama T, Tori K, Morikawa K** (2009). Crystal structures of the Arabidopsis thaliana proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 proteins complexed with the human p21 C-terminal segment. *Protein Science* **18**: 1072-1080.
- Strzalka W, Ziemienowicz A** (2007). Molecular cloning of *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding proliferating cell nuclear antigen. *Journal of Plant Physiology* **164**: 209-213.

- Sun N, Hao JR, Li XY, Yin XH, Zong YY, Zhang GY, Gao C** (2013). GluR6-FasL-Trx2 mediates denitrosylation and activation of procaspase-3 in cerebral ischemia/reperfusion in rats. *Cell Death and Disease* **4**(8): e771.
- Sun Y-L, Zhao Y, Hong X, Zhai Z-H** (1999). Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants. *FEBS Letters* **462**(3): 317-321.
- Suzuka I, Daidoji H, Matsuoka M, Kadowaki K, Takasaki Y, Nakane PK, Moriuchi T** (1989). Gene for proliferating-cell nuclear antigen (DNA polymerase delta auxiliary protein) is present in both mammalian and higher plant genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **86**: 3189-3193.
- Szarka A, Horemans N, Kovács Z, Gróf P, Mayer M, Bánhegyi G** (2007). Dehydroascorbate reduction in plant mitochondria is coupled to the respiratory electron transfer chain. *Physiologia Plantarum* **129**(1): 225-232.
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X** (2008). plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**(5891): 952-956.
- Talla S, Riazunnisa K, Padmavathi L, Sunil B, Rajsheel P, Raghavendra AS** (2011). Ascorbic acid is a key participant during the interactions between chloroplasts and mitochondria to optimize photosynthesis and protect against photoinhibition. *Journal of Biosciences* **36**(1): 163-173.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S** (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* **24**(8): 1596-1599.
- Tanaka T, Hosoi F, Yamaguchi-Iwai Y, Nakamura H, Masutani H, Ueda S, Nishiyama A, Takeda S, Wada H, Spyrou G, Yodoi J** (2002). Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *EMBO Journal* **21**(7): 1695-1703.
- Tartaglia LA, Storz G, Brodsky MH, Lai A, Ames BN** (1990). Alkyl hydroperoxide reductase from *Salmonella typhimurium*. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfide oxidoreductases. *Journal of Biological Chemistry* **265**(18): 10535-10540.
- Taylor ER, Hurrell F, Shannon RJ, Lin T-K, Hirst J, Murphy MP** (2003). reversible glutathionylation of Complex I increases mitochondrial superoxide formation. *Journal of Biological Chemistry* **278**(22): 19603-19610.
- Thompson JD, DG Higgins, Gibson TJ** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680.
- Toh S, Imamura A, Watanabe A, Nakabayashi K, Okamoto M, Jikumaru Y, Hanada A, Aso Y, Ishiyama K, Tamura N, Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Nambara E, Kawakami N** (2008). High temperature-induced abscisic acid biosynthesis and its role in the inhibition of gibberellin action in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiology* **146**(3): 1368-1385.
- Toledo-Ortiz G** (2003). The *Arabidopsis* Basic/Helix-Loop-Helix Transcription Factor Family. *The Plant Cell Online* **15**(8): 1749-1770.
- Tommasi F, Paciolla C, de Pinto MC, Gara LD** (2001). A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* **52**(361): 1647-1654.
- Tonissen KF, Di Trapani G** (2009). Thioredoxin system inhibitors as mediators of apoptosis for cancer therapy. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**(1): 87-103.
- Tovar-Mendez A, Matamoros MA, Bustos-Sanmamed P, Dietz KJ, Cejudo FJ, 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.

- Tran NQ, Lee SJ, Akabayov B, Johnson DE, Richardson CC** (2012). Thioredoxin, the processivity factor, sequesters an exposed cysteine in the thumb domain of bacteriophage T7 DNA polymerase. *Journal of Biological Chemistry* **287**: 39732–39741.
- Tsukamoto S** (2005). A novel cis-element that is responsive to oxidative stress regulates three antioxidant defense genes in rice. *Plant Physiology* **137**(1): 317-327.
- Turrens JF** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* **552**(Pt 2): 335-344.
- Tuteja N** (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods in Enzymology* H. Dieter and S. Helmut, Academic Press. Vol **428**: 419-438.
- Tyburski J, Dunajska K, Tretyn A** (2009). Reactive oxygen species localization in roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant Growth Regulation* **59**(1): 27-36.
- Uberti-Manassero NG, Lucero LE, Viola IL, Vegetti AC, Gonzalez DH** (2012). The class I protein AtTCP15 modulates plant development through a pathway that overlaps with the one affected by CIN-like TCP proteins. *Journal of Experimental Botany* **63**(2): 809-823.
- Ueno M, Masutani H, Arai RJ, Yamauchi A, Hirota K, Sakai T, Inamoto T, Yamaoka Y, Yodoi J, Nikaido T** (1999). thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *Journal of Biological Chemistry* **274**(50): 35809-35815.
- Umbach AL, Ng VS, Siedow JN** (2006). Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim Biophys Acta* **1757**(2): 135-142.
- Vacca RA** (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **134**(3): 1100-1112.
- Vacca RA** (2006). Cytochrome c is released in a reactive oxygen species-dependent manner and is degraded via caspase-like proteases in tobacco Bright-Yellow 2 cells en route to heat shock-induced cell death. *Plant Physiology* **141**(1): 208-219.
- Vacca RA, De Pinto MC, Valenti D, Passarella S, Marra E, De Gara L** (2004). Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in Tobacco Bright-Yellow 2 Cells. *Plant Physiology* **134**(3): 1100-1112.
- Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J** (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* **2**(6): 1310-1324.
- Van Breusegem F** (2006). Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiology* **141**(2): 384-390.
- van Doorn WG, Beers EP, Dangl JL, Franklin-Tong VE, Gallois P, Hara-Nishimura I, Jones AM, Kawai-Yamada M, Lam E, Mundy J, Mur LAJ, Petersen M, Smertenko A, Taliansky M, Van Breusegem F, Wolpert T, Woltering E, Zhitovskiy B, Bozhkov PV** (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation* **18**(8): 1241-1246.
- Vannini C, Marsoni M, Cantara C, De Pinto MC, Locato V, De Gara L, Bracale M** (2012). The soluble proteome of tobacco Bright Yellow-2 cells undergoing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced programmed cell death. *Journal of Experimental Botany* **63**(8): 3137-3155.
- Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L** (1998). The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression. *EMBO Journal* **17**(16): 4668-4679.

- Verdoucq L** (1999). *In vivo* characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *Journal of Biological Chemistry* **274**(28): 19714-19722.
- Vieira Dos Santos C, Laugier E, Tarrago L, Massot V, Issakidis-Bourguet E, Rouhier N, Rey P** (2007). Specificity of thioredoxins and glutaredoxins as electron donors to two distinct classes of Arabidopsis plastidial methionine sulfoxide reductases B. *FEBS Letters* **581**(23): 4371-4376.
- Viola IL, Güttlein LN, Gonzalez DH** (2013). Redox modulation of plant developmental regulators from the class I TCP transcription factor family. *Plant Physiology* **162**(3): 1434-1447.
- Volk S, Feierabend J** (1989). Photoinactivation of catalase at low temperature and its relevance to photosynthetic and peroxide metabolism in leaves. *Plant, Cell & Environment* **12**(7): 701-712.
- Vranová E, Inzé D, Van Breusegem F** (2002). Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**(372): 1227-1236.
- Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B** (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* **369**: 574-578.
- Wang Y, Yun B-W, Kwon E, Hong JK, Yoon J, Loake GJ** (2006). S-Nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**(8): 1777-1784.
- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH** (2008). Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **148**(3): 1201-1211.
- Wangensteen OS, Chueca A, Hirasawa M, Sahrawy M, Knaff DB, López Gorgé J** (2001). Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase-thioredoxin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**(1): 156-166.
- Weitbrecht K, Muller K, Leubner-Metzger G** (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany* **62**(10): 3289-3309.
- Wilkins HM, Marquardt K, Lash LH, Linseman DA** (2012). Bcl-2 is a novel interacting partner for the 2-oxoglutarate carrier and a key regulator of mitochondrial glutathione. *Free Radical Biology and Medicine* **52**(2): 410-419.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997). Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C3 plants. *EMBO Journal* **16**: 4806-4816.
- Wimmelbacher M, Börnke F** (2014). Redox activity of thioredoxin z and fructokinase-like protein 1 is dispensable for autotrophic growth of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **65**(9): 2405-2413.
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ** (2007). An 'Electronic Fluorescent Pictograph' browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* **2**, e718.
- Wolosiuk RA, Crawford NA, Yee BC, Buchanan BB** (1979). Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *Journal of Biological Chemistry* **254**(5): 1627-1632.
- Wong JH, Cai N, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2004). Thioredoxin reduction alters the solubility of proteins of wheat starchy endosperm: an early event in cereal germination. *Plant Cell Physiol* **45**(4): 407-415.
- Wong JH, Kim YB, Ren PH, Cai N, Cho MJ, Hedden P, Lemaux PG, Buchanan BB** (2002). Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(25): 16325-16330.

- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang KS, Kang SW, Kim K, Rhee SG** (2003). Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* **300**(5619): 653-656.
- Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG** (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry* **280**(5): 3125-3128.
- Woo HA, Jeong W, Chang TS, Park KJ, Park SJ, Yang JS, Rhee SG** (2005). Reduction of cysteine sulfinic acid by sulfiredoxin is specific to 2-cys peroxiredoxins. *Journal of Biological Chemistry* **280**(5): 3125-3128.
- Wu C, Liu T, Chen W, Oka S-i, Fu C, Jain MR, Parrott AM, Baykal AT, Sadoshima J, Li H** (2010). Redox regulatory mechanism of transnitrosylation by thioredoxin. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* **9**(10): 2262-2275.
- Wu HM, Cheun AY** (2000). Programmed cell death in plant reproduction. *Plant Molecular Biology* **44**(3): 267-281.
- Wu K, Yang W, Zhu C, Ma X, Li G, Gan L, Ng D, Xia K** (2013). Hydrogen Peroxide Is a Second Messenger in the Salicylic Acid-Triggered Adventitious Rooting Process in Mung Bean Seedlings. *PLoS One* **8**(12): e84580.
- Xing Y, Jia W, Zhang J** (2008). AtMKK1 mediates ABA-induced CAT1 expression and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production via AtMPK6-coupled signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal* **54**(3): 440-451.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D** (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**: 701-704.
- Xiong Y, Zhang H, Beach D** (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**: 505-514.
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D** (2008). Activation of MAPK Kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **283**(40): 26996-27006.
- Xu Y, Hanson MR** (2000). Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiology* **122**(4): 1323-1333.
- Xu Z, Mayer A, Muller E, Wickner W** (1997). A heterodimer of thioredoxin and IB2 cooperates with Sec18p (NSF) to promote yeast vacuole inheritance. *The Journal of Cell Biology* **136**(2): 299-306.
- 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
- Yamamoto A, Bhuiyan MNH, Waditee R, Tanaka Y, Esaka M, Oba K, Jagendorf AT, Takabe T** (2005). Suppressed expression of the apoplastic ascorbate oxidase gene increases salt tolerance in tobacco and Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany* **56**(417): 1785-1796.
- Yang F, Basu TK, Ooraikul B** (2001). Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *International Journal of Food Science Nutrition* **52**(4): 319-330.
- Yano H, Kuroda S, Buchanan BB** (2002). Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure. *Proteomics* **2**: 1090-1096.
- Yano H, Wong JH, Lee YM, Cho MJ, Buchanan BB** (2001). A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 4794-4799.
- Yao N, Eisefelder BJ, Marvin J, Greenberg JT** (2004). The mitochondrion--an organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **40**(4): 596-610.
- Yin YG, Kobayashi Y, Sanuki A, Kondo S, Fukuda N, Ezura H, Sugaya S, Matsukura C** (2009). Salinity induces carbohydrate accumulation and sugar-regulated starch biosynthetic genes in tomato (*Solanum lycopersicum* L.

- cv. 'Micro-Tom') fruits in an ABA- and osmotic stress-independent manner. *Journal of Experimental Botany* **61**(2): 563-574.
- Yip JY, Vanlerberghe GC** (2001). Mitochondrial alternative oxidase acts to dampen the generation of active oxygen species during a period of rapid respiration induced to support a high rate of nutrient uptake. *Physiologia Plantarum* **112**(3): 327-333.
- Young T, Gallie D** (2000). Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* **42**(2): 397-414.
- Zaffagnini M, Bedhomme M, Lemaire SD, Trost P** (2012). The emerging roles of protein glutathionylation in chloroplasts. *Plant Science* **185-186**: 86-96.
- Zaffagnini M, Michelet L, Massot V, Trost P, Lemaire SD** (2008). Biochemical characterization of glutaredoxins from *Chlamydomonas reinhardtii* reveals the unique properties of a chloroplastic CGFS-type glutaredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **283**(14): 8868-8876.
- Zago E** (2006). Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* **141**(2): 404-411.
- Zhang Y, Chen B, Xu Z, Shi Z, Chen S, Huang X, Chen J, Wang X** (2014). Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *Journal of Experimental Botany* **65**(12): 3189-3200.
- Zhao J, Yi H** (2014). Genome-wide transcriptome analysis of *Arabidopsis* response to sulfur dioxide fumigation. *Molecular Genetics and Genomics* **289**(5): 989-999.
- Zhao Y** (2012). A chemical genetics method to uncover small molecules for dissecting the mechanism of ABA responses in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Signalling Networks*. Z.-Y. Wang and Z. Yang, Humana Press **876**: 107-116.
- Zhu Y, Lu J, Wang J, Chen F, Leng F, Li H** (2011). Regulation of thermogenesis in plants: the interaction of alternative oxidase and plant uncoupling mitochondrial protein. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**(1): 7-13.
- Zou H, Li Y, Liu X, Wang X** (1999). An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *Journal of Biological Chemistry* **274**(17): 11549-11556.