



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA

# **AUTOFAGIA EN EL ESTRÉS E INTERACCIONES CON LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC)**

**EFFECTO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA  
PROTEÍNA SOBRE SU ESTABILIDAD Y SU RECLUTAMIENTO A LA  
VÍA AUTOFÁGICA**

**Tesis doctoral presentada por  
Guillermo Baena Vaca  
Sevilla, 2019**



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA**

**AUTOFAGIA EN EL ESTRÉS E INTERACCIONES CON  
LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC)**

**EFECTO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA  
SOBRE SU ESTABILIDAD Y SU RECLUTAMIENTO A LA VÍA AUTOFÁGICA**

**Tesis doctoral presentada por  
GUILLERMO BAENA VACA  
para optar al Grado de Doctor en Biología  
Sevilla, 2019**

Dirigida por:  
Dra. Sofía García-Mauriño Ruiz-Berdejo  
Dr. José Antonio Monreal Hermoso

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA  
ÁREA DE FISIOLOGÍA VEGETAL

**AUTOFAGIA EN EL ESTRÉS E INTERACCIONES CON  
LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPC)**

**EFFECTO DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LA PROTEÍNA  
SOBRE SU ESTABILIDAD Y SU RECLUTAMIENTO A LA VÍA AUTOFÁGICA**

Tesis doctoral presentada por GUILLERMO BAENA VACA  
para optar al Grado de Doctor en Biología. Sevilla, 2019

Guillermo Baena Vaca

Directores:

Dra. Sofía García-Mauriño Ruiz-Berdejo

Dr. José Antonio Monreal Hermoso

*A Tati*

*"...All we have to decide  
is what to do with the  
time that is given to us."*

*Gandalf the Grey (J.R.R. Tolkien)*

*"...Lo único que podemos  
decidir es qué hacer con el  
tiempo que se nos ha dado."*

*Gandalf el Gris (J.R.R. Tolkien)*



Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Área de Fisiología Vegetal, de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

La tesis doctoral ha sido realizada como parte del proyecto de investigación de excelencia de la Consejería de Economía e Innovación de la Junta de Andalucía: *Reciclar o morir: autofagia, ubiquitina y PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa) en estrés nutricional, hídrico/salino y oxidativo (P12-FQM-489)*, siendo el doctorando beneficiario del contrato predoctoral de tres años (diciembre 2015 – diciembre 2018) para el personal investigador en formación asociado al anterior proyecto.

Además, la financiación de la tesis doctoral fue complementada con cargo a los siguientes proyectos y ayudas:

- Proyecto de investigación fundamental del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España: *Gene expression and protein regulation of PEPC, PEPC-kinase and peptide-dependent PEPC protease: role in development and germination of sorghum seed and salt resistance (AGL2012-35708)*.
- Proyecto I+D de excelencia del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España: *Control autofágico de elementos claves del metabolismo: la fosfoenolpiruvato carboxilasa de sorgo en estrés y en semillas (AGL2016-75413-P)*.
- Ayudas de la Junta de Andalucía a grupos PAI: grupo de investigación *Fosforilación de proteínas y metabolismo del carbono (BIO298)*.



Durante la realización de la tesis doctoral, el doctorando llevó a cabo dos estancias de investigación en el extranjero:

- Estancia de 90 días (1 de septiembre de 2016 – 29 de noviembre de 2016) en el grupo de *Abiotic stress* del *Centre for Tropical Crops and Biocommodities (CTCB)*, *Queensland University of Technology (QUT)*, Brisbane, Australia. Aprendizaje de métodos para la detección de la activación de la autofagia en sorgo. Directores: Dr. Brett Williams y Dr. Sagadevan Mundree. Financiación: proyecto P12-FQM-489 (mencionado anteriormente).
- Estancia de 90 días (1 de septiembre de 2017 – 29 de noviembre de 2017) en el grupo de *The role of autophagy in plant development and stress tolerance* del *Gregor Mendel Institute (GMI)*, Viena, Austria. Aprendizaje de técnicas de autofagia en plantas y de interacción con proteínas autofágicas. Director: Dr. Yasin Dagdas. Financiación: ayuda para movilidad internacional del personal dedicado a la investigación (I.3A1 – VIPPIT-US).

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis han dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

**Publicaciones:**

- **Baena G, Feria AB, Echevarría C, Monreal JA, García-Mauriño S** (2017). Salinity promotes opposite patterns of carbonylation and nitrosylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves. **Planta** **246**, 1203-1214.

**Comunicaciones a congresos:**

- **Baena G, López-Álvarez M, Arias-Baldrich C, Monreal JA, García-Mauriño S** (2015). Interplay between carbonylation and S-nitrosylation of C<sub>4</sub> PEPC in sorghum leaves. Póster presentado al **XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**; 14-17 de junio de 2015; Toledo, España.
- **Baena G, López-Álvarez M, Arias-Baldrich C, Echevarría C, Monreal JA, García-Mauriño S** (2016). S-nitrosylation protects C<sub>4</sub> PEPC from carbonylation in sorghum leaves. Póster presentado al **Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress**; 26-30 de junio de 2016; Praga, República Checa.
- **Baena G, de la Osa C, Feria AB, Echevarría C, Monreal JA, García-Mauriño S** (2017). Expression markers of autophagy in sorghum. Póster presentado a la reunion **Plant Autophagy: improving crop and energy production (Transautophagy COST-CA 15138)**; 23-24 de marzo de 2017; Madrid, España.
- **Baena G, Williams B, Liu N, Mundree S, Monreal JA, García-Mauriño S** (2017). Methods for detection of autophagy in *Sorghum bicolor* L. Comunicación oral presentada al **XV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**; 26-29 de junio de 2017; Barcelona, España.
- **Rodríguez-Muro AM, Baena G, Monreal JA, García-Mauriño S, Feria AB** (2017). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity and its posttranslational modifications in two SALK t-DNA lines of genes related to autophagy in stress conditions. Póster presentado al **XV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**; 26-29 de junio de 2017; Barcelona, España.
- **Baena G, Feria AB, de la Osa C, Gandullo J, Monreal JA, García-Mauriño S** (2018). Is phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) processed by selective autophagy? Póster presentado al **Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress**; 18-21 de junio de 2018; Copenhague, Dinamarca.
- **Monreal JA, Ruiz-Ballesta I, Arias-Baldrich C, Baena G, de la Osa C, Feria AB, García-Mauriño S** (2018). Post-translational modifications (PTMs) in plant proteins: phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) as a case of study. Póster presentado al **Plant Biology Europe FESPB/EPSO Congress**; 18-21 de junio de 2018; Copenhague, Dinamarca.

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	12
<b>ABREVIATURAS</b>	15
<b>I. RESUMEN</b>	19
<b>II. ABSTRACT</b>	23
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	27
<b>1. Modificaciones postraduccionales</b>	27
1.1. Fosforilación	27
1.2. Modificaciones lipídicas	28
1.3. Óxido nítrico y <i>S</i> -nitrosilación	30
1.3.1. Síntesis de NO	30
1.3.2. Reacciones y modificaciones de proteínas basadas en NO	31
1.3.3. La <i>S</i> -nitrosilación como modificación postraducciona	32
1.4. Especies reactivas de oxígeno y carbonilación de proteínas	37
1.4.1. Generación de grupos carbonilos en proteínas	38
1.4.2. Carbonilación de proteínas en plantas	39
1.4.3. Interacción entre el NO y la carbonilación	41
1.5. Ubiquitinación de proteínas	42
1.5.1. Modificadores <i>ubiquitin-like</i>	44
<b>2. La fosfoenolpiruvato carboxilasa</b>	44
2.1. Estructura	45
2.2. Familia génica de la PEPC	47
2.3. Funciones de la PEPC	49
2.3.1. Reacción enzimática de la PEPC	49
2.3.2. La PEPC en la fotosíntesis de tipo $C_4$ y CAM	49
2.3.3. La PEPC en otros contextos metabólicos	51
2.4. Regulación de la actividad PEPC	54
2.4.1. Regulación transcripcional	54
2.4.2. Regulación postraducciona	55
2.5. Degradación de la PEPC	63
<b>3. Autofagia en plantas</b>	64
3.1. La maquinaria autofágica	65
3.1.1. Inducción	66
3.1.2. Reclutamiento de membrana	67
3.1.3. Nucleación de la vesícula	68
3.1.4. Expansión del fagóforo	70
3.1.5. Transporte y fusión del autofagosoma a la vacuola	71
3.1.6. Degradación del autofagosoma	72
3.2. Autofagia selectiva	72
3.2.1. NBR1	73
3.2.2. Tipos de autofagia selectiva	74
3.3. Métodos de monitorización de la autofagia en plantas	79
3.3.1. Métodos de microscopía	79
3.3.2. Métodos bioquímicos	82
3.3.3. Inhibidores de la autofagia	84
3.4. La autofagia en el desarrollo, metabolismo y respuesta a estrés	86
3.5. Interés en el estudio de la implicación de la autofagia y las PTMs en la degradación de la PEPC	89

<b>IV. OBJETIVOS</b>	92
<b>V. OBJECTIVES</b>	94
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	96
<b>1. Material vegetal y condiciones de cultivo</b>	96
1.1. <i>Sorghum bicolor</i>	96
1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	97
1.3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	97
1.3.1. Plantas	97
1.3.2. Cultivos de células	98
<b>2. Obtención de extractos crudos</b>	98
<b>3. Purificación de proteínas</b>	99
3.1. Purificación de la PEPC C <sub>4</sub> de hojas de sorgo	99
3.2. Producción y purificación de ATG8a recombinante a partir de <i>E. coli</i>	100
3.3. Producción y purificación de GST-NBR1 recombinante a partir de <i>E. coli</i>	101
<b>4. Ensayos enzimáticos</b>	101
4.1. Determinación de la actividad PEPC	101
<b>5. Técnicas analíticas</b>	102
5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	102
5.2. Tinción con azul de Coomassie	102
5.3. Preparación y detección de proteínas carboniladas	102
5.4. Detección de proteínas S-nitrosiladas	103
5.4.1. El método de <i>biotin switch</i>	103
5.4.2. Purificación de proteínas nitrosiladas	103
<b>6. Métodos inmunológicos</b>	104
6.1. Tipos de anticuerpos utilizados en este trabajo	104
6.2. Inmunoblot	105
6.3. Purificación de anticuerpos	106
6.4. Inmunoprecipitación de la PEPC	106
6.5. Coinmunoprecipitaciones	107
6.5.1. Coinmunoprecipitación con GST-NBR1	107
6.5.2. Coinmunoprecipitación con GFP-ATG8	107
<b>7. Técnicas moleculares</b>	108
7.1. Extracción de ARN	108
7.2. Extracción de ADN	108
7.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc	108
7.4. Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	108
7.4.1. PCR a tiempo final	108
7.4.2. PCR a tiempo real (qPCR)	109
7.5. Clonaciones y construcciones	110
7.5.1. GST-NBR1	110
7.5.2. mCherry-PPC3	111
7.5.3. BFP-NBR1	112
7.5.4. mCherry-βC1	112
7.5.5. GFP-ATG8	113
7.5.6. EV-mCherry y EV-GFP	114

7.6. Termoforesis a microescala (MST)	114
<b>8. Microscopía</b>	114
8.1. Microscopía confocal	114
8.2. Detección de autofagosomas por microscopía electrónica	115
<b>9. Otros métodos</b>	115
9.1. Infiltración de hojas de <i>N. benthamiana</i> con <i>A. tumefaciens</i>	115
9.2. Cuantificación de proteínas y medidas de pH	116
<b>10. Software informático</b>	116
<b>VII. RESULTADOS</b>	118
<b>1. Salinity promotes opposite patterns of carbonylation and nitrosylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in sorghum leaves</b>	118
1.1. PEPC is carbonylated <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	118
1.2. PEPC is S-nitrosylated <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>	122
1.3. Interplay between nitrosylation and carbonylation of PEPC	123
<b>2. Métodos de detección de autofagia en sorgo</b>	127
2.1. Marcadores de expresión de la autofagia en sorgo	127
2.2. Visualización de autofagosomas de sorgo por microscopía confocal	130
2.3. Visualización de autofagosomas de sorgo por microscopía electrónica	132
2.4. Inmunodetección del aducto ATG8-PE en plantas de sorgo	132
<b>3. Análisis de la interacción de la proteína vírica <math>\beta</math>C1 con las proteínas ATG8 de arabidopsis</b>	136
3.1. Colocalización por microscopía confocal	136
3.2. Coimmunoprecipitación de proteínas	138
3.3. Termoforesis a microescala (MST)	140
<b>4. Estudio de la degradación de la PEPC mediante autofagia</b>	142
4.1. Expresión de marcadores de autofagia en sorgo ARN <sub>i</sub> -SbPPC3	142
4.2. Estudio de la PEPC en líneas SALK de arabidopsis deficientes en proteínas autofágicas	143
4.3. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1	144
4.4. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GFP-ATG8a	147
4.5. Colocalización por microscopía confocal	147
4.6. Degradación de la PEPC en células de <i>N. benthamiana</i> y raíces de sorgo	149
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	154
<b>1. La salinidad induce patrones opuestos de carbonilación y nitrosilación de la PEPC en hojas de sorgo</b>	155
<b>2. Detección y monitorización de la autofagia en sorgo</b>	157
<b>3. Estudio de la utilidad de la proteína vírica <math>\beta</math>C1 como herramienta para estudios de autofagia</b>	160
<b>4. La PEPC se degrada parcialmente por autofagia</b>	161
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	166
<b>X. CONCLUSIONS</b>	169
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b>	172
<b>XII. AGRADECIMIENTOS</b>	210

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

---

**Figuras**

Fig. 1	Principios básicos de la S-nitrosilación	33
Fig. 2	Representación esquemática de la técnica de <i>biotin switch</i> para la detección de proteínas modificadas por S-nitrosilación	37
Fig. 3	Estructura tridimensional del homotetrámero de PEPC C <sub>4</sub> de maíz	46
Fig. 4	Filogenia de la familia génica de la PEPC	48
Fig. 5	Representación química del mecanismo de reacción de la PEPC	49
Fig. 6	Representación de la vía fotosintética C <sub>4</sub> de tipo NADP-ME	51
Fig. 7	Interacciones entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno	53
Fig. 8	Representación esquemática de los pasos conocidos o propuestos en autofagia	69
Fig. 9	Diagrama de las principales vías que exportan material cloroplastídico para su degradación en la vacuola	76
Fig. 10	Visualización de la proteína de fusión GFP-ATG8 en el microscopio confocal	80
Fig. 11	Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica	83
Fig. 12	Alineamiento de secuencia del extremo C-terminal de homólogos de NBR1 de plantas superiores	111
Fig. 13	Vectores de expresión utilizados en este trabajo	113
Fig. 14	Monoubiquitination of root and seed sorghum PEPC (C <sub>3</sub> isoforms) that is absent in leaf PEPC (C <sub>4</sub> isoform)	118
Fig. 15	<i>In vitro</i> carbonylation of PEPC causes activity loss	119
Fig. 16	The supply of MV to sorghum excised leaves promotes PEPC carbonylation and loss of activity	120
Fig. 17	MV promotes the carbonylation of PEPC without causing the cleavage of the enzyme	121
Fig. 18	Effect of MG132 and concA on the accumulation of inactive PEPC in MV-treated leaves	121
Fig. 19	Nitrosylation of PEPC	123
Fig. 20	Interplay between S-nitrosylation and carbonylation of PEPC	124
Fig. 21	The protective effect of CSNO against the inactivation of PEPC caused by ascorbate and Cu requires preincubation	125
Fig. 22	Salt shock promotes the carbonylation of PEPC	125
Fig. 23	S-nitrosilación of PEPC in sorghum plants under salt shock	126
Fig. 24	Relaciones filogenéticas entre genes <i>ATG6</i> eucarióticos	128
Fig. 25	Relaciones filogenéticas entre genes <i>ATG18a</i> eucarióticos	128
Fig. 26	Análisis de qPCR de los genes <i>SbATG18a</i> , <i>SbATG6a</i> y <i>SbATG6b</i> bajo estrés abiótico	129
Fig. 27	Análisis de qPCR de los genes <i>SbATG18a</i> , <i>SbATG6a</i> y <i>SbATG6b</i> bajo choque salino	130
Fig. 28	Visualización de autofagosomas por microscopía confocal mediante tinción con MDC en sorgo	131



Fig. 29	Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión en sorgo	133
Fig. 30	Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión en sorgo	134
Fig. 31	Densidad de autofagosomas visualizados por microscopía electrónica de transmisión en sorgo	134
Fig. 32	Análisis por inmunoblot del aducto ATG8-PE en hojas de sorgo	135
Fig. 33	Colocalización de GFP-ATG8a de arabidopsis y mCherry- $\beta$ C1 por microscopía confocal	137
Fig. 34	Coinmunoprecipitación de $\beta$ C1 con ATG8a de arabidopsis	139
Fig. 35	Coinmunoprecipitación de $\beta$ C1 <sup>1-40</sup> con las isoformas ATG8 de arabidopsis	139
Fig. 36	Coinmunoprecipitación de GFP-ATG8a y mCherry- $\beta$ C1 <sup>1-40</sup> con un aumento en la concentración de sales y detergente	140
Fig. 37	Purificación de la proteína ATG8a de arabidopsis	141
Fig. 38	Termoforesis a microescala de la unión de $\beta$ C1 <sup>30-40</sup> y PexRD54 a ATG8a	141
Fig. 39	Análisis de qPCR de los genes <i>SbATG18a</i> , <i>SbATG6a</i> y <i>SbATG6b</i> en el mutante <i>Sbppc3</i>	143
Fig. 40	Análisis de la cantidad de PEPC en líneas SALK de arabidopsis deficientes en proteínas autofágicas y bajo tratamiento con trehalosa	143
Fig. 41	Análisis de la ubiquitinación de la PEPC en líneas SALK de arabidopsis deficientes en proteínas autofágicas	144
Fig. 42	Coinmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en sorgo	145
Fig. 43	Coinmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en líneas SALK de arabidopsis	146
Fig. 44	Coinmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en líneas SALK de arabidopsis tratadas con inhibidores	147
Fig. 45	Coinmunoprecipitación de la PEPC con GFP-ATG8a de arabidopsis en <i>N. benthamiana</i>	148
Fig. 46	Colocalización de GFP-ATG8a de arabidopsis y BFP-NBR1 y mCherry-PPC3 de sorgo por microscopía confocal	149
Fig. 47	Efecto de inhibidores de autofagia sobre la PEPC de cultivos de células de <i>N. benthamiana</i> y raíces de sorgo	151
Fig. 48	Coinmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en células de <i>N. benthamiana</i> tratadas con inhibidores	152
<b>Tablas</b>		
Tabla 1	Inhibidores y activadores comúnmente usados en el estudio de la autofagia en plantas	85
Tabla 2	Composición del medio de cultivo de sorgo	96
Tabla 3	Composición del medio de cultivo de arabidopsis	97
Tabla 4	Cebadores utilizados en este trabajo	109
Tabla 5	Predicted S-nitrosylation sites on sorghum C <sub>4</sub> PEPC	122

# ABREVIATURAS

---

Las abreviaturas y siglas utilizadas en este trabajo se especifican a continuación. Para los nombres y símbolos utilizados se ha elegido el Sistema Internacional de Unidades. Los compuestos químicos han sido denominados conforme al sistema de nomenclatura de la IUPAC.

3-MA	3-metiladenina
3-PGA	Ácido 3-fosfoglicérico
ABA	Ácido abscísico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
AIM	<i>ATG8-interacting motif</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNi	ARN interferente
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ATG	Relacionado con la autofagia
ATP	Adenosina trifosfato
BFP	<i>Blue fluorescent protein</i>
BLAST	<i>Basic linear alignment sequencing tool</i>
BTPC	PEPC de tipo bacteriano
C <sub>3</sub>	Metabolismo vegetal cuyo primer producto fotosintético estable posee tres átomos de carbono
C <sub>4</sub>	Metabolismo vegetal cuyo primer producto fotosintético estable posee cuatro átomos de carbono
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CC	Control de carga
CCV	<i>CV-containing vesicle</i>
CDPK	Proteína quinasa dependiente de calcio
concA	Concanamicina A
CSNO	Nitrosocisteína
C-terminal	Carboxilo terminal
CV	<i>Chloroplast vesiculation</i>
DNP	2,4-dinitrofenol
DNPB	2,4-dinitrofenilhidracina
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenglicoltetracético
E64	Ácido (1S, 2S)-2-(((S)-1-((4-guanidinobutil)amino)-4-metil-1-oxopentan-2-il)carbamoil)ciclopropanocarboxílico

FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Fuerza g
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSNO	Nitrosoglutación
GST	Glutación S-transferasa
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-il]etanosulfónico
IP	Inmunoprecipitado
K <sub>d</sub>	Constante de disociación
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Constante de inhibición
K <sub>M</sub>	Constante de Michaelis-Menten
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MDC	Monodansilcadaverina
MDH	Malato deshidrogenasa
MG132	Bencil N-[(2S)-4-metil-1-[[[(2S)-4-metil-1-[[[(2S)-4-metil-1-oxopentano-2-il]amino]-1-oxopentano-2-il]amino]-1-oxopentano-2-il]carbamato
MST	Termoforesis a microescala
MV	Metil viológeno
NAD(P)(H)	Nicotina adenina dinucleótido (fosfato) (reducido)
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
NBR1	<i>Neighbor of BRCA1 gene 1 protein</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NOS	Óxido nítrico sintasa
NR	Nitrato reductasa
N-terminal	Amino terminal
OAA	Oxalacetato
p107	Polipéptido de PEPC de 107 kDa
p110	Polipéptido de PEPC de 110 kDa
PA	Ácido fosfatídico
PAR	Radiación fotosintéticamente activa
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPC	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa
P <sub>i</sub>	Fosfato inorgánico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PI3P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
Pl. D	Fosfolipasa D

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPC	Isoforma/isogen de PEPC
PPCK	Isoforma/isogen de PEPCCK
PTM	Modificación postraduccional
PTPC	PEPC de tipo planta
p/v	Relación peso/volumen
qPCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
RCB	<i>Rubisco-containing bodies</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rubisco	Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa
SAV	<i>Senescence-associated vacuoles</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
SN	Sobrenadante
S-NO	S-nitrosotiol
SNP	Nitroprusiato sódico
SnRK1	<i>Sucrose non-fermenting 1-related kinase 1</i>
SSLG	<i>Small starch-like granules</i>
TBS	Tampón tris salino
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetrametiletildiamina
TGM	Tampón tris glicina metanol
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Tris	2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
Tyr-nitración	Nitración de tirosina
U	Unidad de actividad enzimática
UBA	Dominio de unión a ubiquitina
V <sub>max</sub>	Velocidad máxima de reacción enzimática
v/v	Relación volumen/volumen

# RESUMEN

---

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima citosólica multifuncional que está implicada en procesos clave del metabolismo del carbono y del nitrógeno. Esta enzima está regulada por distintas modificaciones postraduccionales (PTMs), las cuales modifican la enzima y modulan su actividad de forma compleja. En cuanto a su degradación, una fracción de la cantidad total de PEPC se degrada por el sistema ubiquitina-proteasoma, pero no se ha descrito una ruta alternativa de degradación ni mecanismos de regulación de la misma. Este trabajo profundiza en los elementos reguladores de la estabilidad de la PEPC C<sub>4</sub> fotosintética de sorgo, así como de las isoformas C<sub>3</sub> de la misma. Para ello, se ha analizado la repercusión de las PTMs sobre la estabilidad de la proteína, y se ha estudiado el papel de la autofagia, selectiva y masiva, en la degradación de la PEPC.

Numerosas evidencias experimentales muestran que existe una interacción entre la oxidación proteica, derivada de las especies reactivas de oxígeno (ROS), y la S-nitrosilación de proteínas, derivada del óxido nítrico (NO). Previamente se había descrito que el NO incrementaba la actividad de la fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK) en hojas de sorgo, fomentando la fosforilación de la PEPC fotosintética. En este trabajo, se ha encontrado en hojas de sorgo una interacción, *in vitro* e *in vivo*, entre la carbonilación de la PEPC C<sub>4</sub>, que la inactivaba, y la S-nitrosilación de la misma, que aumentaba la resistencia a la posterior carbonilación y, por tanto, preservaba su actividad. Además, en plantas sometidas a un choque salino, la carbonilación de la PEPC aumentó a la vez que la S-nitrosilación disminuyó. A continuación, se detectó un aumento de la S-nitrosilación de la PEPC acompañado de un descenso en la carbonilación. Estos resultados sugieren que la S-nitrosilación puede contribuir a mantener la actividad de la PEPC C<sub>4</sub> en hojas de sorgo estresadas por sal. De este modo, la síntesis de NO inducida por la salinidad protegería a la PEPC fotosintética de la inactivación oxidativa. Al mismo tiempo, al promover su fosforilación, garantizaría el funcionamiento óptimo de la enzima en condiciones subóptimas.

En plantas C<sub>3</sub> existen varias rutas de degradación de componentes cloroplastídicos en la vacuola. Algunas de estas rutas están relacionadas con la autofagia y otras no. En ellas, la rubisco y otras proteínas son incluidas en vesículas que posteriormente se transportan a la vacuola y se degradan para reciclar el nitrógeno. Por otro lado, el ácido fosfatídico (PA) provoca la exposición del extremo C-terminal de la PEPC de tipo C<sub>4</sub>, reconocido por una proteasa. Cuando el PA se une a la proteína, induce el reclutamiento de ésta a membrana, acompañado de su inactivación. En maíz, la PEPC de tipo C<sub>4</sub> se une a la membrana del cloroplasto al mismo tiempo que pierde su actividad. Esto sugiere que en plantas C<sub>4</sub> la PEPC puede estar relacionada con las vías de degradación vacuolar de componentes del cloroplasto, ya que, al igual que la rubisco, constituye una fuente importante para el reciclaje de nitrógeno.

La autofagia es un proceso muy conservado que se encarga de la degradación, masiva o selectiva, de componentes celulares a través de su encapsulación en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, y posterior degradación en la vacuola. La autofagia, al igual que la PEPC, tiene un papel principal en el metabolismo del carbono y el nitrógeno. Además, esta vía se activa en respuesta a la deficiencia de estos dos elementos. Como la actividad PEPC está estrictamente controlada postraduccionalmente, es probable que su degradación también se encuentre muy regulada. La autofagia selectiva constituye una vía de degradación precisa y controlada, y su regulación es dirigida por receptores de cargo como NBR1, cuyo principal sustrato de reconocimiento es la ubiquitina. La PEPC es monoubiquitinada *in vivo*, pero su función fisiológica aún no está clara. Esta PTM aumenta en raíces estresadas por amonio y en semillas en germinación, y éstos son procesos en los que la autofagia está implicada. En este trabajo, en primer lugar, se han desarrollado métodos para la detección y el estudio de la autofagia en sorgo; y, en segundo lugar, se ha investigado la degradación autofágica de la PEPC y su relación con la monoubiquitinación de la proteína de tipo C<sub>3</sub>.

En sorgo, la autofagia se activó en condiciones de estrés salino, nutricional y oxidativo, y la visualización de autofagosomas mediante microscopía confocal y electrónica constituyó un método efectivo para monitorizarla. Las medidas de expresión de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* permitieron detectar la activación de la autofagia en condiciones de estrés oxidativo y estrés nutricional por deficiencia de carbono y fósforo, pero no por deficiencia de nitrógeno y hierro. El desarrollo de estos métodos abre la puerta al estudio de procesos relacionados con la autofagia en sorgo. Por el contrario, se encontró que la proteína vírica  $\beta$ C1 mostró interacciones inespecíficas que hacen que no sea una herramienta idónea para estudios de autofagia. Además, el péptido que contiene el dominio de unión a ATG8 de  $\beta$ C1 no interaccionó *in vitro* con la proteína ATG8a de *arabidopsis*, presumiblemente por requerir algún elemento adicional, como la fosforilación, para ello. Por lo tanto, tampoco es una herramienta útil para la detección de autofagosomas *in vivo*.

Diversos resultados experimentales demostraron que una fracción de la proteína PEPC se procesa por la vía autofágica. Por un lado, se observó una disminución de la cantidad de PEPC en raíces de sorgo con déficit de nitrógeno y en células de *Nicotiana benthamiana* con déficit de carbono, condiciones en las que se activa la autofagia. El uso de inhibidores de la autofagia en estas condiciones bloqueó dicha degradación. Además, en líneas SALK de *arabidopsis* deficientes en proteínas autofágicas (líneas *atg2* y *atg5*) se observó un aumento de la cantidad total de PEPC. Estos resultados sugieren que una parte del total de proteína PEPC es degradada por autofagia, siendo la primera ocasión en que se observa este tipo de degradación para la PEPC.



En cuanto a la monoubiquitinación de la PEPC, disminuyó tras el uso de un activador de la autofagia, la trehalosa, en plantas de *arabidopsis*, y aumentó en plantas de *arabidopsis atg2* y *atg5*. En células de *N. benthamiana*, donde la PEPC se encuentra principalmente desubiquitinada, el uso del 3-MA (inhibidor de la formación de autofagosomas) provocó un aumento significativo de esta PTM. Estos resultados sugieren que la monoubiquitinación de la PEPC sirve como marcaje para su degradación por autofagia, lo que constituiría la primera función descubierta para la monoubiquitinación de la PEPC que la relaciona con una ruta de señalización, en este caso degradativa.

Por otro lado, la proteína NBR1, un receptor de cargo que participa en la autofagia, se unió a la PEPC en hojas de sorgo, en plantas de *arabidopsis atg5*, y en células de *N. benthamiana* en las que la autofagia se había inhibido con 3-MA. Además, NBR1 también interaccionó con una PEPC parcialmente degradada en hojas, raíces y semillas de sorgo, hojas y raíces de *arabidopsis* y células de *N. benthamiana*. Estos resultados implican a NBR1 como elemento conector entre la PEPC y la vía autofágica.

Los resultados expuestos en este trabajo ponen de manifiesto una implicación de la S-nitrosilación en mantener la estabilidad de la PEPC de tipo C<sub>4</sub> de hojas de sorgo, así como evidencian la degradación de la PEPC de tipo C<sub>3</sub> vía autofagia. De forma similar, la PEPC C<sub>4</sub> también podría degradarse por autofagia, aunque en este caso, la proteína no se monoubiquitina. Futuros experimentos podrán determinar si la interacción con el PA y el reclutamiento a membrana están relacionados con la inclusión de la proteína en vesículas de degradación vacuolar, al igual que la rubisco, para reciclar el nitrógeno.

# ABSTRACT

---

Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC; EC 4.1.1.31) is a multifunctional, cytosolic enzyme implicated in key processes in carbon and nitrogen metabolism. The diversity of its post-translational regulation is remarkable, as PEPC can be modified by numerous post-translational modifications (PTMs), meaning that its functions can be tightly regulated. The degradation of a portion of total PEPC is carried out by the ubiquitin-proteasome system. However, neither an alternative pathway of PEPC degradation nor a regulation system has been described to date. This work investigates the mechanisms that regulates the stability of sorghum photosynthetic C<sub>4</sub> PEPC, as well as C<sub>3</sub> isoforms. To achieve this, the implications of PTMs on PEPC stability, and the role of both bulk and selective autophagy in the degradation of the protein, were analyzed.

There is increasing evidence demonstrating interplay between ROS-based protein oxidation and nitric oxide (NO)-based protein S-nitrosylation. Previous work had shown that NO increased PEPC kinase (PEPCK) activity, promoting the phosphorylation of PEPC in sorghum leaves. The present work evidences interplay between PEPC carbonylation -which inactivated the protein- and S-nitrosylation *in vitro* and *in vivo*. S-nitrosylated PEPC displayed increased resistance towards subsequent carbonylation. Under salt shock, carbonylation of PEPC increased in parallel with decreased S-nitrosylation of the enzyme. Subsequent increase of S-nitrosylation was accompanied by decreased carbonylation. Taken together, the results suggest that S-nitrosylation could contribute to maintain C<sub>4</sub> PEPC activity in salt-stressed sorghum plants. Therefore, salt-induced NO synthesis would protect photosynthetic PEPC activity from oxidative inactivation while promoting its phosphorylation, which will guarantee its optimal functioning in suboptimal conditions.

In C<sub>3</sub> plants, several pathways of vacuolar degradation of chloroplast components -autophagic or not- have been described. In these mechanisms, rubisco, membrane-binding proteins, and other chloroplastic proteins are included in vesicles which are eventually transported into the vacuole. Phosphatidic acid (PA) is a phospholipid and signaling molecule that triggers the exposition of the C-terminus domain of PEPC, which is then recognized by a protease. The binding of PA to PEPC also recruits the protein to membranes. In maize, C<sub>4</sub> PEPC can bind chloroplast membranes, which is accompanied by loss of activity. This suggests that PEPC degradation could be related to vacuolar degradation pathways of chloroplastic components in C<sub>4</sub> plants since PEPC constitutes an important source for nitrogen recycling in these plants, in a similar manner to rubisco.

Autophagy is a highly conserved process that is used for the bulk and selective cleavage and recycling of cellular components, following encapsulation in double-membrane vesicles, termed autophagosomes, and later degraded in the vacuole. Both

autophagy and PEPC have a central role in carbon and nitrogen metabolism. Moreover, the autophagic pathway is activated in response to stress induced by carbon and nitrogen starvation. PEPC is tightly regulated by post-translational modifications, which may also act to control its degradation. Selective autophagy constitutes a precise and controlled degradation pathway, with its regulation controlled by cargo receptors such as NBR1, which principally recognizes ubiquitinated proteins. PEPC is monoubiquitinated *in vivo* but its physiological function is not clear. PEPC monoubiquitination increases during ammonium stress and in germinating seeds; processes in which autophagy is implicated. In this work, methods to detect and study autophagy in sorghum were developed, and subsequently the autophagic degradation of PEPC, and its relation to monoubiquitination of this protein, was investigated.

In sorghum, autophagy was activated under salt stress, nutritional stresses and oxidative stress, and visualization of autophagosomes by confocal and electron microscopy constituted an effective method to monitor the autophagic process. Measuring the expression levels of *SbATG18a*, *SbATG6a* and *SbATG6b* genes allowed the detection of autophagy activation under oxidative stress as well as carbon and phosphorus deficiencies, but not under nitrogen or iron deficiencies. The development of these methods allows the study of processes related to autophagy in sorghum plants. Notably, viral protein  $\beta$ C1 showed unspecific interactions, meaning that it is not a suitable tool for autophagy studies. The peptide containing the ATG8-binding domain of this protein did not interact *in vitro* with arabidopsis ATG8a. This is presumably caused by the requirement of an additional element, such as phosphorylation, to facilitate the interaction. Therefore, this peptide would not be useful as a tool for autophagosome detection *in vivo*.

Results showed a decrease in the amount of PEPC in sorghum roots under nitrogen starvation, and in *Nicotiana benthamiana* cells under sucrose starvation. Both are conditions in which autophagy is activated. The use of autophagy inhibitors under these conditions blocked the degradation of PEPC. Moreover, an increase in total amount of PEPC was observed in arabidopsis SALK lines deficient in autophagic proteins (*atg2* and *atg5*). These results suggest that a portion of total PEPC is processed by autophagy. This is the first time this type of degradation has been observed for PEPC.

Monoubiquitination of PEPC decreased after the use of trehalose, an activator of autophagy, in arabidopsis plants. The level of monoubiquitination steadily increased in arabidopsis *atg2* and *atg5*. In *N. benthamiana* cells, where PEPC is found to be mostly deubiquitinated, the use of 3-MA (an inhibitor of the formation of autophagosomes) triggered a significant increase in PEPC monoubiquitination. This suggests that monoubiquitination of PEPC is tagging the protein for selective autophagy. This would

be the first function described for monoubiquitinated PEPC in relation to a signaling pathway.

Furthermore, the NBR1 protein interacted with PEPC in sorghum leaves, arabidopsis *atg5* plants, and 3-MA-treated *N. benthamiana* cells. NBR1 also interacted with a partially degraded PEPC in sorghum leaves, roots and shoots, arabidopsis shoots and roots, and *N. benthamiana* cells. These findings implicate NBR1 as a link between PEPC and autophagy.

Results presented in this work demonstrate a role for S-nitrosylation in maintaining the stability of sorghum leaf C<sub>4</sub> PEPC, and also evidence the degradation of C<sub>3</sub> PEPC by autophagy. C<sub>4</sub> PEPC may also be degraded by autophagy. Future experiments will seek to determine if the interaction with PA and subsequent recruitment to membranes are related to the inclusion of PEPC, as occurs with rubisco, in vesicles that are eventually transported into the vacuole for degradation as part of nitrogen recycling.

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES

La modificación postraduccional (PTM) de una proteína consiste en la adición de un grupo químico, u otra proteína, a uno o a varios de sus aminoácidos, alterando sus propiedades (Deribe *et al.*, 2010). Las PTMs de proteínas están entre las respuestas más rápidas y tempranas de las plantas a cambios en el ambiente, por lo que sus mecanismos y dinámicas constituyen un importante campo dentro de la ciencia (Arsova *et al.*, 2018). Aparte del *splicing* alternativo del ARNm como fuente de diversidad de proteínas, las PTMs pueden modular y expandir el rango de funciones proteicas posibles a través de la unión covalente de pequeñas moléculas a aminoácidos concretos (Duan y Walther, 2015). Son especialmente importantes en respuestas a estreses ambientales ya que pueden ajustar la función de las proteínas, localización, vida media o interacciones con otras moléculas con el objetivo de mitigar el posible daño producido por el estrés (Hashiguchi y Komatsu, 2016).

Más de 200 tipos de PTMs han sido identificadas, y están implicadas en muchos aspectos de las funcionalidades celulares tales como el metabolismo, la transducción de señales y la estabilidad de las proteínas (Deribe *et al.*, 2010). Aunque existen otras modificaciones con gran relevancia en plantas como la glucosilación o la acetilación entre muchas otras, este manuscrito se centrará en la fosforilación, modificaciones lipídicas, modificaciones mediadas por óxido nítrico, carbonilación y ubiquitinación, y especialmente se enfocará a las que posean algún rol en la estabilidad de las proteínas.

### 1.1. Fosforilación

La fosforilación de proteínas consiste en la unión covalente de un grupo fosfato a residuos de aminoácidos de una proteína. Constituye la PTM más ampliamente conocida y estudiada en la biología vegetal. Se trata de un regulador clave en los procesos biológicos intracelulares, una modificación reversible que afecta tanto al plegamiento o conformación de la proteína como a la regulación de las actividades enzimáticas, las especificidades por los sustratos, la localización, la formación de complejos o incluso la degradación (Reinders y Sickmann, 2005; Thingholm *et al.*, 2009). La relevancia de esta modificación se destaca aún más por el gran número de genes implicados en procesos de fosforilación.

La regulación de la fosforilación se encuentra bajo un estricto control por parte de dos enzimas: las proteínas quinasas y las fosfatasa, que unen grupos fosfato a residuos de aminoácidos y los eliminan, respectivamente. Además, la variedad de funciones que pueden cumplir las proteínas fosforiladas depende del número y los sitios de fosforilación, ya que dentro de una proteína puede haber múltiples residuos que sean fosforilados por quinasas diferentes. De este modo, múltiples sitios de fosforilación permiten a una proteína adaptarse a diferentes funciones, dependiendo de qué sitio de fosforilación es el que se encuentra fosforilado. Hay múltiples opciones, incluso existen

fosforilaciones en residuos específicos que conllevan un cambio conformacional que a su vez expone a otros residuos de la misma proteína a su fosforilación, o bien todo lo contrario, que el cambio conformacional prevenga a aminoácidos cercanos de ser fosforilados (Paradela y Albar, 2008).

Los cuatro tipos de grupos fosfatos que se encuentran en los aminoácidos son: O-fosfatos, N-fosfatos, S-fosfatos y acil-fosfatos. Los O-fosfatos son los más comunes, y normalmente se unen a serina, treonina o tirosina, siendo las dos primeras más frecuentes que la tirosina. Las N-, S- y acil-fosforilaciones son mucho menos comunes. Los N-fosfatos se unen a residuos de histidina y lisina, los S-fosfatos a cisteína y los acil-fosfatos se unen mayormente a residuos de aspártico y glutámico (Sickmann y Meyer, 2001).

No obstante, las fosfoproteínas se encuentran presentes en la célula en cantidad relativamente baja, y la mayoría de proteínas son fosforiladas sólo temporalmente, lo que hace su detección y análisis más dificultosos (Bond *et al.*, 2011).

En plantas, la fosforilación adquiere una relevancia aún mayor si cabe. Las proteínas quinasas constituyen alrededor del 5,5% del genoma de arabidopsis [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.] (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), siendo este porcentaje casi el doble que en mamíferos (Manning *et al.*, 2002), lo que sugiere una red compleja y con alta especificidad de fosforilación en estos organismos. Además de su típica función que aumenta la actividad de las proteínas, se han descrito varios casos en donde la fosforilación de proteínas en plantas afecta a la estabilidad de éstas, conduciéndolas a su degradación (Nelson y Millar, 2015).

## 1.2. Modificaciones lipídicas

La modificación de proteínas a través de la adición de un motivo lipídico ha sido descrita en un amplio rango de organismos y puede ser subdividido en distintos tipos de modificaciones en función de la naturaleza del lípido, y cada tipo tiene sus propias enzimas que se encargan de la biosíntesis y formación de la modificación (Bond *et al.*, 2011).

La miristoilación consiste en la unión de una cadena de 14 carbonos ( $C_{14}H_{26}O$ ), derivada del ácido mirístico, a residuos de glicina dentro de la estructura proteica, aunque también pueden unirse a lisina y arginina. Un segundo tipo de modificación es la adición de un grupo palmitoíl ( $C_{16}H_{30}O$ ), derivado del ácido palmítico, a residuos de cisteína de la proteína, generalmente a través de átomo de sulfuro de la cadena lateral del residuo. Esta modificación de proteínas normalmente se denomina palmitoilación o S-acilación. Por otro lado, la prenilación es el resultado de añadir o bien un grupo farnesil ( $C_{15}H_{25}$ ) o un grupo geranilgeranil isoprenoide ( $C_{20}H_{33}$ ) a la proteína. Esta modificación ocurre en un motivo conservado que se encuentra en el extremo C-



terminal de las proteínas prenilables, CAAX, donde C es un residuo de cisteína (y el C-terminal), A es un aminoácido alifático y X puede ser cualquier aminoácido (Bond *et al.*, 2011).

El ácido fosfatídico (PA) es un intermediario bien conocido de la ruta de biosíntesis de lípidos (Athenstaedt y Daum, 1999). Sin embargo, también es considerado un importante lípido señal que actúa como segundo mensajero en varias cadenas de señalización, tanto en plantas como en animales, pudiéndose unir a proteínas. El PA puede desempeñar un amplio abanico de funciones según el tipo de organismo o el proceso donde intervenga. En plantas se conoce que la síntesis de PA, que puede ocurrir por dos vías diferentes que incluyen fosfolipasas, es inducida por un amplio rango de estreses, entre los que se encuentran el frío, estrés hídrico, salinidad, heridas o patógenos (Testerink y Munnik, 2005), y también en la interacción de las leguminosas con rizobios (Den Hartog *et al.*, 2001).

La modificación por lípidos se ha visto implicada en diversos roles biológicos, pero su función principal reside en la unión a membrana y en las proteínas cuya diana es la membrana. Además, la prenilación de proteínas ha sido ampliamente estudiada en mamíferos debido a su implicación en el desarrollo del cáncer (Wang y Sebti, 2005).

Aparte de los múltiples casos en los que las modificaciones lipídicas participan en la unión de proteínas a membrana, se han descrito diversas situaciones en las que las distintas modificaciones lipídicas cumplen una función. La prenilación ha sido vinculada con la quelación de metales, la degradación de proteínas, la proliferación celular, el sistema de defensa de la planta y un factor de transcripción (Maurer-Stroh *et al.*, 2007; Bond *et al.*, 2011). La palmitoilación y la miristoilación se han asociado al desarrollo de la célula, la señalización en el cierre estomático inducido por ABA, la señalización por calcio y quinasas (Sorek *et al.*, 2007; Batistic *et al.*, 2008), los sistemas de defensa de la planta (Kim *et al.*, 2005) y la tubulina (Caron *et al.*, 2001).

La función más relevante del PA también consiste en el reclutamiento de proteínas a membrana, actuando a veces junto a otros mensajeros secundarios lipídicos. El efecto de la unión de la proteína a la membrana a través del PA puede cambiar la conformación de ésta, o afectar a su actividad o estabilidad. Aparte de esta función, se ha descrito que el PA puede participar tanto en la activación de algunas proteínas como en la inactivación y consiguiente degradación de otras (Testerink y Munnik, 2005). Ambos procesos también pueden ocurrir en proteínas que ya se encuentran en la membrana (Testerink y Munnik, 2005). Precisamente una de las proteínas que interactúan con el PA es la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), y esta interacción hace que se inactive la enzima y sea susceptible a ser degradada. Se ha propuesto que este mecanismo esté relacionado con la unión a membrana de la proteína (Monreal *et al.*, 2010b)

### 1.3. Óxido nítrico y S-nitrosilación

El óxido nítrico (NO) o monóxido de nitrógeno es un gas, radical libre, que a partir de 1987 adquirió importancia en la comunidad científica al descubrirse que actuaba como molécula señalizadora en mamíferos, en concreto como vasodilatador (Palmer *et al.*, 1987; Furchgott, 1989). Para entonces, también se conocía que las plantas eran capaces de producir NO (Klepper, 1978), pero no fue hasta 1995 cuando se describió la primera señalización por NO en éstas (Pfeiffer *et al.*, 1995).

#### 1.3.1. Síntesis de NO

En mamíferos, el NO es generado principalmente por la óxido nítrico sintasa (NOS), que cataliza la oxidación dependiente de NADPH de L-arginina a L-citrulina y NO (Stuehr *et al.*, 2004). Desde que se descubrió la fuente de origen y la función del NO en animales, la búsqueda de una enzima similar a la NOS en el reino vegetal ha sido una línea de investigación principal durante los últimos 20 años. No obstante, la posibilidad de que una enzima de tales características pueda catalizar la síntesis de NO en plantas ha generado mucha controversia (Santolini *et al.*, 2017). Por un lado, existen evidencias de extractos proteicos provenientes de tejidos vegetales, cultivos de células y orgánulos purificados que poseen una actividad NOS-like (Durner *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2002; Corpas *et al.*, 2004; Corpas *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2009b; Du *et al.*, 2016); se demostró que algunos inhibidores de la NOS de animales funcionaban al disminuir la producción de NO en plantas (Delledonne *et al.*, 1998; Lamotte *et al.*, 2004; Corpas *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2011); y se detectaron en inmunoblots y experimentos de inmunolocalización proteínas que reaccionaban con inhibidores de NOS de mamíferos (Barroso *et al.*, 1999; Ribeiro Jr *et al.*, 1999; Modolo *et al.*, 2002). Además de en los peroxisomas, estos candidatos inmunorreactivos también se localizaron en el citosol, el núcleo y las células guarda, a nivel subcelular (Ribeiro Jr *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2007).

Por otro lado, las proteínas propuestas como candidatas a NOS-like hasta la fecha no tienen una actividad NOS demostrada y, en general, los intentos de identificar una enzima concreta que muestre una actividad NOS han fracasado hasta la fecha (Santolini *et al.*, 2017). Tischner y colaboradores pusieron de manifiesto que el ensayo basado en L-citrulina, comúnmente usado para medir actividad NOS en extractos de plantas es propenso a generar artefactos (Tischner *et al.*, 2007). Además, se realizó un estudio de transcriptómica con más de 1000 especies de plantas incluyendo angiospermas, gimnospermas, helechos, musgos y algas buscando homologías con el gen de NOS neuronal de humanos (*nNOS*), y no se encontraron secuencias típicas NOS-like de mamíferos, ni siquiera en las especies en las que se habían reportado actividad NOS y/o efectos de los inhibidores de NOS de mamíferos (Jeandroz *et al.*, 2016).

Este último estudio (Jeandroz *et al.*, 2016) minimiza fehacientemente la posibilidad de que las plantas terrestres produzcan NO usando una enzima NOS-like y cuestiona la identidad de la/s proteína/s que mostraban una actividad NOS-like y que eran dianas para los inhibidores de NOS de mamíferos. Si existe tal enzima en plantas, su estructura tiene que ser muy diferente a la de las típicas NOS de mamíferos (Santolini *et al.*, 2017).

No obstante, sí se conocía desde los años 80 que en plantas podía producirse NO a través de la reducción del nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por la nitrato reductasa (NR). En general, la NR reduce el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a  $\text{NO}_2^-$  con gasto de NADPH (Crawford, 1995). Sin embargo, mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* se estableció que la NR también era capaz de reducir el  $\text{NO}_2^-$  a NO y su derivado peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (Dean y Harper, 1988; Rockel *et al.*, 2002). Por lo tanto, actualmente se considera que la actividad de la NR es la principal fuente de NO en plantas.

### 1.3.2. Reacciones y modificaciones de proteínas basadas en NO

El NO es una molécula sin carga y de vida relativamente corta en su forma radical ya que tiene un electrón desapareado en su orbital externo y puede interactuar con una amplia variedad de moléculas (Toledo y Augusto, 2012). Perteneciendo a la familia de las especies reactivas de nitrógeno, el NO puede reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Hong *et al.*, 2008; Corpas *et al.*, 2011). La reacción entre el NO y el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) genera el potente oxidante  $\text{ONOO}^-$ . El oxígeno atmosférico ( $\text{O}_2$ ) también puede interactuar con el NO para formar dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ). Además,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  se producen por la oxidación del NO por  $\text{O}_2^-$  (Fancy *et al.*, 2017). Merece la pena señalar que el NO reacciona rápidamente con otros radicales, y que todos los demás radicales producidos en condiciones fisiológicas son oxidantes más potentes comparados con el NO (Toledo y Augusto, 2012), haciéndolos menos apropiados para servir como moléculas señalizadoras. De hecho, al ser capaz de eliminar radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y complejos de metales de alta valencia, cuando el NO se encuentra a bajas concentraciones se le confiere la propiedad de antioxidante (Wink *et al.*, 2001). También se conoce que es un gran inhibidor de la peroxidación de lípidos y de la oxidación de proteínas (Fancy *et al.*, 2017).

Una característica importante del NO es su rol en las PTMs. En este contexto, el NO puede unirse a la mayoría de metales de transición en sus formas iónicas, tales como el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{3+}$ ), el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) o el zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ), para formar complejos metal-nitrosilo (M-NO), un proceso denominado metal-nitrosilación (Leitner *et al.*, 2009). La metal-nitrosilación puede bloquear la peroxidación del metal, previniendo así la producción de especies reactivas de oxígeno (Wink *et al.*, 2001). Además, el NO puede producir la nitración de tirosina (Tyr-nitración), mediada por  $\text{ONOO}^-$ , en la que se añade un grupo nitro ( $\text{NO}_2^+$ ) a un residuo de tirosina en una cadena lateral (Radi, 2004;

Rubbo y Radi, 2008). No obstante, la más importante de las modificaciones mediadas por NO es la S-nitrosilación, la unión covalente de un grupo NO a un grupo tiol de un residuo proteico de cisteína para formar un S-nitrosotiol (S-NO) (Spadaro *et al.*, 2010).

Asimismo, el NO es soluble en agua y aún más soluble en solventes hidrofóbicos. Por lo tanto, esta molécula puede pasar a través de la doble membrana hidrofóbica por difusión simple, sin necesidad de ningún transportador de membrana especializado, lo que confiere al NO propiedades biológicas únicas como molécula señalizadora (Fancy *et al.*, 2017).

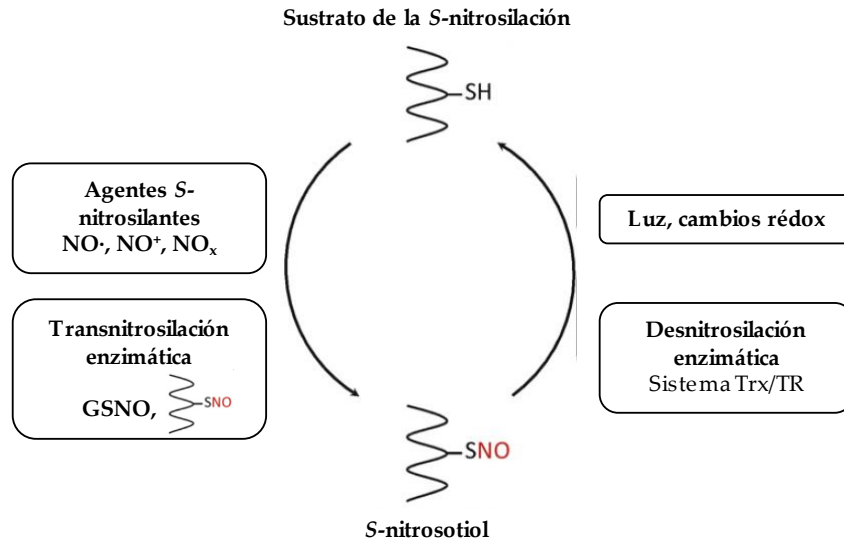
#### *Tyr-nitración de proteínas*

Como se ha mencionado anteriormente, en general la unión de un grupo  $\text{NO}_2^+$  a la cadena lateral de un residuo de tirosina se conoce como Tyr-nitración. En teoría, la Tyr-nitración debería ser reversible para poder influenciar la transducción de señales independientemente de la fosforilación (Kolbert *et al.*, 2017). En un principio, se consideraba una modificación termodinámicamente estable e irreversible, pero posteriormente se describieron mecanismos desnitradores (Kuo *et al.*, 1999) y actividad desnitrasa (Deeb *et al.*, 2013) en animales, y se puso de manifiesto una desnitración no enzimática en el caso del 8-Nitro-cGMP (Akaike *et al.*, 2010). Sin embargo, en plantas no se ha descubierto ninguna enzima desnitrasa hasta el momento, así que la reversibilidad de la Tyr-nitración continúa incierta.

Se ha descrito que la Tyr-nitración aumenta la susceptibilidad de las proteínas a la proteólisis (Souza *et al.*, 2000), funcionando como un mecanismo de señalización que puede ser activado en condiciones de estrés (Corpas *et al.*, 2009a; Leitner *et al.*, 2009). Aun así, existen algunos ejemplos en los que esta modificación no afecta a la actividad (Kolbert *et al.*, 2017). Otra consecuencia de la Tyr-nitración es la posible interacción con la fosforilación de tirosinas, aunque no hay ninguna evidencia convincente hasta la fecha, más allá de una función redundante de ambas modificaciones en la  $\alpha$ -tubulina (Kolbert *et al.*, 2017).

#### **1.3.3. La S-nitrosilación como modificación postraduccional**

La S-nitrosilación consiste en la reacción del NO con el átomo de sulfuro de un residuo de cisteína para formar una unión covalente S-NO (**Fig. 1**). Esta modificación requiere previamente que el NO reaccione con el  $\text{O}_2$  a través de la formación de óxidos con alto nitrógeno, principalmente  $\text{N}_2\text{O}_3$ , que luego se va a disociar en  $\text{NO}^+$ . Por eso, convencionalmente, el término S-nitrosilación se refiere al ataque electrofílico del  $\text{NO}^+$  sobre el tiolato. Si bien, también hay evidencias de que la formación de la unión S-NO resulta del ataque nucleofílico al sulfuro del residuo de cisteína, que es relativamente electropositivo, por parte de NO; o bien de la reacción entre el radical tiolo ( $\text{RS}\cdot$ ) y el  $\text{NO}\cdot$  (Wang *et al.*, 2006; Lindermayr y Durner, 2009).



**Figura 1. Principios básicos de la S-nitrosilación.** La S-nitrosilación ocurre en residuos de cisteína específicos y está mediada por especies reactivas de nitrógeno como el NO·, NO<sup>+</sup> o N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, así como por agentes transnitrosiladores como el nitrosoglutatión (GSNO). Una vez formados, los S-nitrosotioles son muy lábiles y sensibles a la luz y a los cambios redox. Además, la desnitrosilación puede ser catalizada enzimáticamente por el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TR) (Astier *et al.*, 2011).

Aparte de estos mecanismos, la transnitrosilación parece ser un proceso importante para explicar la nitrosilación de residuos de cisteína que no presentan tioles en condiciones óptimas (**Fig. 1**). La transnitrosilación consiste en el cambio directo de NO<sup>+</sup> de una proteína S-nitrosilada al tiolato de otra proteína. Este proceso envuelve S-nitrosotioles con bajo peso molecular como el nitrosoglutatión (GSNO), el cual se forma primariamente mediante la S-nitrosilación del glutatión, un regulador principal del estado redox celular. Por lo tanto, el GSNO es un S-NO de bajo peso molecular importante que sirve como reservorio endógeno de NO para la S-nitrosilación en células (Wang *et al.*, 2006).

Aunque la mayoría de proteínas contienen residuos de cisteína, solo algunas de ellas son reguladas específicamente por S-nitrosilación *in vivo*. Esta especificidad se rige por varios factores. En primer lugar, la formación de S-NO puede estar favorecidas en residuos de cisteína más ionizables, como los que están rodeados por residuos de aminoácidos ácidos y básicos (Astier *et al.*, 2011). Basándose en esta observación, Stamler y colaboradores definieron un motivo consenso para la S-nitrosilación (Stamler *et al.*, 1997). De hecho, para que sea un motivo S-nitrosilable vale con que los residuos ácidos o básicos sean adyacentes a la cisteína reactiva en la secuencia primaria, o bien con que se encuentren próximos a ella en la estructura tridimensional de la proteína (Liu *et al.*, 2010).

En segundo lugar, los compartimentos hidrofóbicos dentro de las proteínas promueven la S-nitrosilación de los residuos de cisteína que se encuentran en ellos. Este concepto se basa en el hecho de que los centros hidrofóbicos en las proteínas

tienen la capacidad de concentrar NO y O<sub>2</sub> y habilitar así la formación de agentes S-nitrosilantes (Seth y Stamler, 2010). Igualmente, a partir de este hecho se desarrolló un novedoso software para la predicción de sitios S-nitrosilables (Xue *et al.*, 2010). Más generalmente, cualquier factor que aumente la nucleofilia del átomo de sulfuro de los residuos de cisteína, incluyendo el plegamiento o regulación alostérica de la proteína, tienen a fomentar la S-nitrosilación. Aparte de los aspectos intramoleculares, la colocalización de las proteínas con las fuentes de NO también se asume que contribuye a la especificidad de la S-nitrosilación (Astier *et al.*, 2011).

Como la mayoría de las PTMs de proteínas, la S-nitrosilación es un mecanismo reversible. La unión S-NO que se forma es lábil y sensible a la luz y al estado redox (Fig. 1). En consecuencia, el S-NO puede perderse por la acción de agentes reductores intracelulares como el glutatión, el ascorbato o incluso iones metálicos reducidos. No obstante, atendiendo a la importancia de la S-nitrosilación en numerosos procesos biológicos, la desnitrosilación de proteínas debe estar sujeta a una regulación precisa y controlada. En este sentido, se ha descrito actividad desnitrosilasa en varias enzimas animales, siendo el sistema tiorredoxina/tiorredoxina reductasa (Trx/TR) particularmente relevante (Benhar *et al.*, 2009). En plantas también se ha descrito una actividad desnitrosilasa por parte de tiorredoxinas en *arabidopsis* (Despres *et al.*, 2003; Tada *et al.*, 2008; Kneeshaw *et al.*, 2014) así como por parte de una enzima denominada GSNO reductasa (GSNOR), siendo en este último caso la desnitrosilación específica para el GSNO, lo que conlleva una reducción de los niveles de GSNO y, por tanto, un descenso en el nivel de S-nitrosilación celular total (Malik *et al.*, 2011). Con respecto a GSNOR, recientemente se ha demostrado que puede ser modificada oxidativamente o S-nitrosilada (Kovacs *et al.*, 2016; Guerra *et al.*, 2016), y que estas modificaciones están reguladas por especies reactivas de oxígeno, existiendo de este modo una intercomunicación entre las especies reactivas de oxígeno y las de nitrógeno (Lindermayr, 2017).

#### *Función de la S-nitrosilación en proteínas*

Se han identificado proteínas S-nitrosiladas que participan en un amplio rango de funciones celulares como el metabolismo, señalización, respuestas a estrés, defensa ante patógenos, homeostasis redox y arquitectura celular (Astier *et al.*, 2011).

Cuando la hemoglobina no simbiótica (AHb1) de *arabidopsis* es S-nitrosilada, ésta participa activamente en la eliminación de NO durante el estrés nitrosativo de la planta cuando es sometida a hipoxia, sin embargo, esta función no la realiza en otros estreses, lo que indica que es específica de algunos estreses concretos (Perazzolli *et al.*, 2004). La peroxirredoxina II E (PrxIIIE) posee actividad ONOO<sup>-</sup> reductasa y su S-nitrosilación *in vitro* hace que pierda su función. *In planta*, la S-nitrosilación de PrxIIIE hace que aumenten los niveles de Tyr-nitración, lo que revela un rol de la modificación

de esta enzima en controlar los niveles endógenos de ONOO<sup>-</sup> (Romero-Puertas *et al.*, 2007). La proteína de unión a ácido salicílico 3 (SABP3) es una enzima cloroplastídica que, como su nombre indica, se une a ácido salicílico y además tiene actividad anhidrasa carbónica, lo que contribuye a la respuesta de defensa a patógenos. La S-nitrosilación de esta proteína disminuye tanto la unión a ácido salicílico como su actividad, lo que hace que la planta sea más sensible al patógeno (Wang *et al.*, 2009b).

NPR1 y TGA1 son reguladores clave, controlados por rédox, de la resistencia sistémica adquirida en plantas. Los monómeros de NPR1 interactúan con la forma reducida de TGA1, que es un factor de transcripción que activa promotores de genes de defensa. La conformación de TGA1 está organizada por cuatro residuos de cisteína. En condiciones oxidantes, TGA1 forma puentes disulfuro entre sus cisteínas, derivando a una conformación inactiva. Sin embargo, cuando TGA1 es S-nitrosilada su conformación es alterada y no se inactiva, pudiendo unirse al ADN y llevando a cabo su función activadora. Además, NPR1 también puede ser S-nitrosilada, y esto hace que la interacción entre ambas proteínas sea más efectiva, lo cual es necesario para que TGA1 lleve a cabo su función (Lindermayr *et al.*, 2010). También hay otros factores de transcripción en *Arabidopsis*, como MYB2 y VND7, de los cuales se ha demostrado justo lo contrario, la S-nitrosilación inhibe la unión al ADN de éste (Serpa *et al.*, 2007; Kawabe *et al.*, 2018).

La enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) es inhibida mediante S-nitrosilación *in vitro* en *Arabidopsis* y tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) (Holtgreffe *et al.*, 2008; Wawer *et al.*, 2010). También se ha descrito un aumento rápido y pasajero de la S-nitrosilación de la GADPH en respuesta a estrés salino (Wawer *et al.*, 2010). Otras enzimas de las que se ha descrito su inhibición por S-nitrosilación son la S-adenosil-metionina sintetasa 1 (SAMS1), la glicina descarboxilasa (GDC), la ribulosa bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (rubisco), la fructosa-1,6-bisfosfatasa y la fosfoinosítido-dependiente quinasa 1 (PDK1) (Astier *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017a; Serrato *et al.*, 2018).

ABI5 es un factor de transcripción, regulado por ácido abscísico (ABA), que mantiene reprimido el crecimiento de la semilla en germinación de *Arabidopsis*. La S-nitrosilación de ABI5 facilita su degradación y estimula la germinación (Albertos *et al.*, 2015), lo que establece un vínculo entre el NO y la hormona ABA. En el caso de GSNOR, descrita previamente, se ha puesto de manifiesto que cuando es S-nitrosilada en respuesta a hipoxia su conformación cambia y su motivo AIM o motivo de interacción con ATG8 (proteína relacionada con la autofagia 8) se hace accesible para la maquinaria autofágica, de manera que se induce su degradación por autofagia selectiva (Zhan *et al.*, 2018). Del mismo modo, este estudio establece un vínculo entre la señalización por NO y la autofagia.

Otra enzima regulada por S-nitrosilación es la NR, de modo que el propio NO producido por ésta puede regularla negativamente. De este modo, Fu y colaboradores establecieron una conexión entre la S-nitrosilación de la NR y la biosíntesis de NO durante ataques de patógenos y estreses abióticos (Fu *et al.*, 2018). Por último, en el caso de la ascorbato peroxidasa (APX) la S-nitrosilación, mediada por estrés salino, aumenta su actividad mientras que la Tyr-nitración la inactiva (Begara-Morales *et al.*, 2014).

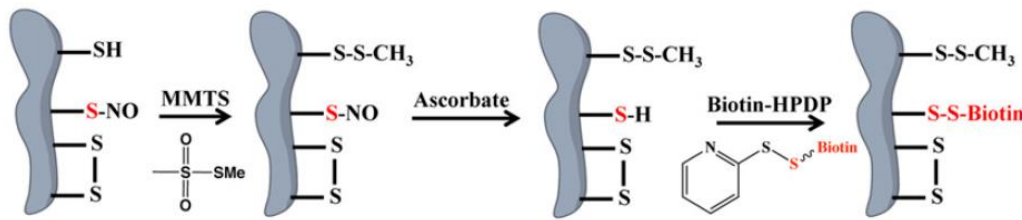
En general, la S-nitrosilación es una PTM que participa en un amplio rango de procesos metabólicos, de desarrollo, de señalización y de respuesta a estrés en las plantas y sus efectos en las proteínas diana son diversos, pudiendo encontrar efectos opuestos en dos proteínas diferentes. Los ejemplos mencionados muestran que la S-nitrosilación de proteínas puede inhibir o aumentar la actividad enzimática, y favorecer su degradación por diferentes vías o impedir su oxidación irreversible, dependiendo de la proteína (Astier *et al.*, 2012).

#### *Detección e identificación de proteínas S-nitrosiladas*

Como se ha mencionado anteriormente, la S-nitrosilación es una modificación covalente muy lábil, lo que dificulta notablemente su detección. Una opción es medir el nivel de NO liberado por la proteína de interés, una vez inmunoprecipitada a partir de extractos proteicos (Mannick y Schonhoff, 2008), aunque la técnica más usada actualmente es la de *biotin switch*, que ha probado ser una técnica muy eficiente para detectar proteínas S-nitrosiladas *in vivo* (Jaffrey y Snyder, 2001). La ventaja de este método es que evita el hándicap de la labilidad inherente de los grupos S-NO de las proteínas. En general, la estrategia consiste en reemplazar el grupo S-NO de la proteína S-nitrosilada por una biotina. En el primer paso, se utiliza metil-metano tiosulfonato (MMTS) sobre los extractos de proteínas para éste bloquee las cisteínas libres de las proteínas mediante S-metilolación. Esto se hace en presencia de sodio dodecil sulfato y calor (50 °C) para favorecer la desnaturalización de las proteínas y así tener acceso a todos los grupos tiol de todas las cisteínas. En el segundo paso, luego de eliminar el exceso de MMTS, se tratan los extractos con ascorbato, que reduce todas las cisteínas S-nitrosiladas, dejando sus grupos tiol libres. En el último y tercer paso, los nuevos tioles libres, que originalmente eran los que estaban S-nitrosilados, son biotinilados con un agente biotinilante específico de sulfhidrilos, que normalmente es N-[6-(biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio)propionamida (biotina-HPDP) (**Fig. 2**). Es importante que los pasos 2 y 3 se lleven a cabo simultáneamente, para permitir un marcaje con biotina inmediato una vez que los tioles son liberados del NO. Una vez eliminado el exceso de ascorbato y biotina-HPDP, las proteínas biotiniladas resultantes pueden detectarse mediante inmunoblot con anticuerpos anti-biotina, o bien para llevar a cabo un análisis más preciso, pueden ser purificadas para detectar una proteína en concreto y/o para ser analizadas mediante espectrometría de masas. Este paso de



purificación puede hacerse mediante resinas de neutravidina o estreptavidina, que son proteínas de unión a biotina, a partir de las cuales se puede eluir por reducción usando  $\beta$ -mercaptoetanol o DTT (Jaffrey y Snyder, 2001; Astier *et al.*, 2011, Lamotte *et al.*, 2015).



**Figura 2. Representación esquemática de la técnica de *biotin switch* para la detección de proteínas modificadas por S-nitrosilación.** Los tioles libres de las proteínas son bloqueados con MMTS, las uniones S-NO son reducidas con ascorbato para formar nuevos tioles libres, que finalmente son ligados a biotina mediante el agente biotinizante biotina-HPDP para formar proteínas marcadas con biotina (Aroca *et al.*, 2015).

#### 1.4. Especies reactivas de oxígeno y carbonilación de proteínas

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas que contienen oxígeno y son químicamente reactivas. El oxígeno es la fuente principal de daños oxidativos en plantas (Apel y Hirt, 2004), y las principales ROS son el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ), el anión hidroxilo ( $OH^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), siendo todos producidos en diversos procesos biológicos (Foyer y Noctor, 2003). Por lo tanto, la respiración aeróbica está indudablemente asociada con la producción de ROS. En condiciones fisiológicas, esta producción es compensada por la detoxificación por parte de antioxidantes. Un aumento de estrés oxidativo sin que haya un incremento paralelo de antioxidantes desencadena inequívocamente daños a componentes celulares como proteínas, lípidos y ADN. Un estrés oxidativo prolongado y por lo tanto acumulación de modificaciones oxidativas en las biomoléculas se vincula con alteraciones en el metabolismo e inducción de apoptosis y muerte celular (Curtis *et al.*, 2013). Existen PTMs de proteínas por parte de numerosas ROS, y se trata de un grupo de modificaciones cuyo descubrimiento es relativamente reciente y que tiene relevancia suficiente como para considerarlo cuando se realiza un análisis proteómico. No obstante, el campo de estudio de la proteómica redox es complejo precisamente debido al gran número de diversas ROS que pueden formar PTMs y el amplio rango de aminoácidos que son susceptibles a éstas (Bond *et al.*, 2011).

Entre las macromoléculas que son sensibles a las ROS, las proteínas son las que más tienden a oxidarse, sobre todo vía carbonilación (Davies, 2005). Esta PTM está considerada un marcador de la oxidación de proteínas y, por lo tanto, del estrés oxidativo. Es originada por la oxidación directa de prolina, lisina, arginina o treonina, siendo la lisina el residuo más propenso a la carbonilación (Rao y Møller, 2011).

El efecto inicial de la carbonilación sobre las proteínas consiste en la pérdida de función, y posteriormente desemboca en procesos de degradación de la proteína

oxidada (Nyström, 2005). En esta degradación participa, como es común, el proteasoma, y parece que ocurre a través del proteasoma 20S sin mediación de ATP ni ubiquitina, en vez del proteasoma 26S (Polge *et al.*, 2009; Kastle y Grune, 2011). Además, las proteínas carboniladas pueden degradarse vía autofagia (Xiong *et al.*, 2007). Como es obvio, estas vías de degradación no sólo eliminan proteínas carboniladas, aunque la vía del proteasoma 20S parece degradar preferentemente proteínas oxidadas antes que proteínas no modificadas (Polge *et al.*, 2009). Por lo tanto, la carbonilación podría representar una vía alternativa para enviar a ciertas proteínas hacia su degradación proteolítica, como por ejemplo proteínas mal traducidas, aberrantes, dañadas, o incluso proteínas que ya no se requieren en las células vegetales (Nyström, 2005). Así, esta modificación podría tener un rol principal en el mantenimiento de la calidad proteica y en la dinámica del proteoma. De este modo, la inducción de mecanismos proteolíticos como la vía del proteasoma 20S en contextos fisiológicos concretos propensos a la carbonilación terminaría reciclando aminoácidos y eliminando proteínas no necesarias más que causando daños oxidativos.

Como ya se ha dicho, existen diversos estudios que sugieren que la carbonilación de proteínas podría participar en la transducción de señales. En este sentido, en animales se ha sugerido la existencia de un mecanismo de descarbonilación a través de reducción dependiente de tiol (Wong *et al.*, 2010). Otra hipótesis sería que los péptidos que resultan de la degradación de proteínas carboniladas participaran en la señalización por ROS, actuando como mensajeros secundarios (Møller y Sweetlove, 2010). Sin embargo, tales procesos aún se encuentran sin probar en plantas.

#### 1.4.1. Generación de grupos carbonilos en proteínas

Los derivados carbonilo se forman por el ataque oxidativo catalizado por metales a las cadenas laterales de los aminoácidos nombrados anteriormente. Además, se pueden formar grupos carbonilo en residuos de lisina, cisteína e histidina a través de reacciones secundarias con compuestos de carbonilo que son reactivos sobre carbohidratos (productos de glicosilación), lípidos o los productos finales de la glucosilación o la lipoxidación avanzadas (Nyström, 2005). Cuantitativamente, los productos más importantes de la reacción de carbonilación son el semialdehído glutámico desde arginina y prolina, y el semialdehído aminoalifático desde lisina (Requena *et al.*, 2003). Comparado con otras modificaciones oxidativas, los grupos carbonilo son relativamente difíciles de inducir y se trata de un proceso oxidativo irreversible (Dalle-Donne *et al.*, 2003). Por eso, la forma que tienen las células de deshacerse de las proteínas carboniladas es mediante degradación.

La carbonilación inducida por estrés no afecta a todo el proteoma por igual, sino que existe un patrón general de especificidad de carbonilación entre las proteínas de diferentes organismos (Nyström, 2005). Aunque la base molecular de esta especificidad

de algunas proteínas aún no está documentada, es obvio que la oxidación catalizada por metales es un problema intrínseco para proteínas que contienen metales de transición. Por otro lado, algunas proteínas se han clasificado como sensibles a la oxidación principalmente porque se localizan en las proximidades de sitios de generación de ROS (Nyström, 2005).

Existen diferentes métodos para detectar y cuantificar grupos carbonilo en las proteínas, y la mayoría de ellos incluyen la derivatización del grupo carbonilo con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) (Dixon, 1964) y la posterior inmunodetección de la hidrazona resultante con anticuerpos (Levine, 2002).

#### 1.4.2. Carbonilación de proteínas en plantas

En plantas no se conoce mucho acerca de la carbonilación de proteínas y su rol en los procesos fisiológicos de las plantas. Aun así, esta PTM se ha identificado en todas las etapas del ciclo de vida de la planta (Lounifi *et al.*, 2013). Entre las proteínas de plantas que mostraron una alta sensibilidad a la carbonilación se encuentran la rubisco y las proteínas de almacenamiento en semillas 12S-crucíferinas (Johansson *et al.*, 2004; Job *et al.*, 2005). Varias proteínas carboniladas previamente caracterizadas en mamíferos, levaduras y bacterias también se encontraron carboniladas en plantas, lo que apoya la hipótesis de que la carbonilación de proteínas es algo más que un proceso aleatorio, y que participa en el control de funciones biológicas comunes a diferentes organismos (Lounifi *et al.*, 2013).

Varios estudios se han enfocado en la biología de la semilla, descubriendo una implicación de la carbonilación en las transiciones fisiológicas de ésta. En concreto, se ha descrito un aumento de proteínas carboniladas en semillas en germinación en comparación con las semillas latentes, siendo este aumento paralelo a un incremento de ROS (Job *et al.*, 2005; Oracz *et al.*, 2007, Arc *et al.*, 2011). De hecho, si se trata a semillas latentes con donadores de ROS, la dormancia se ve suavizada (Oracz *et al.*, 2007; Leymarie *et al.*, 2012), y mutantes deficientes en actividad NADPH oxidasa producen más semillas latentes que el fenotipo silvestre (Leymarie *et al.*, 2012).

La carbonilación de proteínas también parece ser un buen marcador del envejecimiento de semillas, que es lo que les ocurre cuando se exponen a un almacenamiento prolongado y se ven deterioradas. En semillas de arabidopsis y arroz (*Oryza sativa* L.), se ha descrito que la acumulación de proteínas carboniladas incrementa progresivamente, paralelamente a la pérdida de la capacidad de germinar (Tesnier *et al.*, 2002; Rajjou *et al.*, 2008; Kalemba y Pukacka, 2014). Después de la imbibición, la germinación de las semillas de arabidopsis conlleva cambios drásticos en los patrones de carbonilación. La mayoría de proteínas carboniladas presentes en semillas secas muestran una menor carbonilación en esta etapa (Job *et al.*, 2005; El-Maarouf Bouteau y Bailly, 2008), mientras que otras proteínas abundantes y no

carboniladas en semillas secas incrementan su grado de carbonilación, probablemente como parte del cambio metabólico que tiene lugar durante la germinación (Job *et al.*, 2005).

Posteriormente a la germinación, el grado de carbonilación de proteínas parece aumentar a medida que las hojas de la roseta de *Arabidopsis* se hacen más viejas hasta el final del desarrollo vegetativo (Johansson *et al.*, 2004) y también se ha encontrado un aumento en la carbonilación durante la maduración del fruto del kiwi (Minas *et al.*, 2012), hechos que indican que la carbonilación podría actuar como señal en las transiciones fisiológicas en plantas.

Otra implicación de la carbonilación se ha visto en el ciclo de Calvin, donde modifica a ciertas enzimas inactivándolas bajo condiciones de estrés, pudiendo participar en la adaptación de las plantas al estrés a través de la inactivación del ciclo de Calvin (Lounifi *et al.*, 2013). También se ha descrito una mayor cantidad de proteínas carboniladas en la mitocondria que en cloroplastos o peroxisomas, lo que sugiere que éstas son más susceptibles al daño oxidativo (Lounifi *et al.*, 2013).

En cuanto a la especificidad, aunque en general se piensa que esta modificación afecta a las proteínas indiscriminadamente, se han encontrado mediante análisis de secuencia motivos preferenciales de carbonilación. Según estos autores, la carbonilación ocurriría principalmente en regiones que posean al menos tres residuos arginina, lisina, prolina o treonina dentro de un grupo de cuatro aminoácidos, o bien cuatro de ellos dentro de un grupo de siete (Maisonneuve *et al.*, 2009; Rao y Møller, 2011). En *Arabidopsis*, todas las proteínas carboniladas identificadas poseen al menos un motivo que concuerda con el descrito (Rao y Møller, 2011). Sin embargo, la conformación de la proteína también puede influir en la susceptibilidad de la proteína y se ha caracterizado que en una misma proteína, la carbonilación ocurre preferentemente en un tipo de subunidad a pesar de que todos los tipos contengan el motivo de carbonilación (Job *et al.*, 2005; Rajjou *et al.*, 2008).

Se conoce que tanto el estrés abiótico como el biótico inducen la producción de ROS en plantas, y por tanto ambos conllevan un posterior estrés oxidativo (Apel y Hirt, 2004). Por lo tanto, una respuesta temprana de la planta al estrés se asocia con un estallido oxidativo que desemboca en la carbonilación de proteínas (Oracz *et al.*, 2007; Xiong *et al.*, 2007). Se ha descrito un aumento en la carbonilación de proteínas en condiciones de estrés hídrico, salinidad, toxicidad por metales pesados, elevado CO<sub>2</sub>, radiación gamma y estreses bióticos (Lounifi *et al.*, 2013; Mano *et al.*, 2014). Además, el grado de carbonilación está directamente correlacionado con el tiempo de exposición al estrés y la cantidad de ROS generadas, por lo cual se puede considerar a esta PTM como un importante indicador de la severidad del estrés oxidativo en plantas (Lounifi *et al.*, 2013).

En definitiva, la carbonilación actúa como indicador del equilibrio entre el estrés oxidativo y la capacidad de la planta de contrarrestarlo. Inicialmente, esta modificación se encarga de inactivar las proteínas que no son esenciales para sobrevivir. Sin embargo, si las enzimas detoxificadoras se ven sobrepasadas, la acumulación de ROS va progresivamente apagando las actividades enzimáticas que queden y, en último lugar, contribuyen a la muerte celular.

#### 1.4.3. Interacción entre el NO y la carbonilación

En primer lugar, la cisteína se encuentra entre los residuos susceptibles de ser tanto S-nitrosilados como carbonilados, por lo tanto las ROS y el NO podrían competir por los residuos de cisteína y por eso es probable que existe un vínculo entre la oxidación y la nitrosilación. En mamíferos se ha observado que la oxidación podía debilitar la plasticidad sináptica mediante la inhibición de la S-nitrosilación de manera competitiva (Kakizawa *et al.*, 2012).

Del mismo modo, hay evidencia de que esta interacción también ocurre en plantas. Por ejemplo, una aplicación de NO exógeno o bien antes o durante el estrés abiótico previene la carbonilación inducida por el estrés. En las semillas de *Antiaris toxicaria* Lesch. el NO mejora su resistencia a deshidratación mediante la activación de enzimas de la vía ascorbato-glutación, lo que impide la acumulación de ROS y fomenta la S-nitrosilación frente a la carbonilación (Bai *et al.*, 2011). De forma similar, en hojas de cítricos tratadas con sal, el incremento observado en proteínas carboniladas se previno con un pretratamiento tanto de donadores de NO como de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tanou *et al.*, 2009, 2012), y se han localizado en estas plantas varias proteínas –implicadas en fotosíntesis, defensa y energía– que pueden ser modificadas por ambos tratamientos, lo que indica un fuerte solapamiento entre estas dos respuestas (Tanou *et al.*, 2010). Tanou y colaboradores sugirieron que los cambios conformacionales inducidos en ciertas proteínas por la S-nitrosilación podrían bloquear la estructura de éstas en un estado en el que no sería sensible a la carbonilación irreversible inducida por ROS (Tanou *et al.*, 2009). Esta hipótesis coincide con los resultados existentes en células humanas que muestran que la S-nitrosilación puede aportar protección en las proteínas contra el estrés oxidativo (Sun *et al.*, 2007).

Una explicación alternativa sería que la S-nitrosilación impide la producción de ROS y esto suprime la carbonilación. En este sentido, se ha puesto de manifiesto que el NO puede detoxificar el radical ·OH, la ROS más perjudicial (Beligni y Lamattina, 2002). Otra opción, que no excluye a las demás, es que la S-nitrosilación pueda actuar como un sistema de defensa antioxidante en plantas ya que muchas enzimas antioxidantes contienen cisteínas activas, tales como la catalasa, la glutatión peroxidasa, la glutatión reductasa, la ascorbato peroxidasa y la tiorredoxina (Netto *et*

*al.*, 1996; Guttman y Powell, 2012) que son sensibles a la S-nitrosilación (Lindermayr *et al.*, 2005; Ortega-Galisteo *et al.*, 2012; Begara-Morales *et al.*, 2014).

### 1.5. Ubiquitinación de proteínas

La ubiquitina es una proteína de 76 aminoácidos altamente conservada que puede unirse covalentemente a proteínas diana mediante un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo C-terminal de la ubiquitina (glicina 76) y un grupo amino épsilon de una lisina de la proteína diana (Ciechanover, 2005). Este proceso se denomina ubiquitinación o ubiquitilación. Los fragmentos de ubiquitina son unidos por una cascada de enzimas E1, E2 y E3 (Pickart y Eddins, 2004; Staub y Rotin, 2006) del siguiente modo: la enzima activadora E1 forma un enlace tioéster entre su sitio activo y el grupo carboxilo C-terminal de la ubiquitina, transfiriendo de este modo a la ubiquitina a la enzima conjugadora E2, que también forma el enlace tioéster con ésta. Una enzima ubiquitina ligasa E3 se une a la enzima E2 y reconoce a la proteína diana y entre las enzimas E2 y E3 unen a la ubiquitina a la proteína. Mientras que el genoma humano contiene dos enzimas E1, 37 enzimas E2 y más de 600 enzimas E3 (Bond *et al.*, 2011), *arabidopsis* contiene dos enzimas E1, entre 34 y 37 enzimas E2 y cientos de enzimas E3 (Kraft *et al.*, 2005). La ubiquitinación es una modificación reversible, existiendo enzimas desubiquitinadoras (Komander *et al.*, 2009).

Las proteínas pueden ser monoubiquitinadas, multiubiquitinadas o poliubiquitinadas. En el caso de la multiubiquitinación, son varios los residuos de lisina a los que se une una molécula de ubiquitina. Para la poliubiquitinación, una segunda molécula de ubiquitina se une a un residuo de lisina de la primera molécula de ubiquitina unida a la proteína diana, formando una cadena de poliubiquitina donde se pueden unir aún más moléculas de ubiquitina. Existen siete residuos de lisina diferentes en la molécula de ubiquitina: lisinas 6, 11, 27, 29, 33, 48 y 63. Por lo tanto, hay siete tipos diferentes de cadenas de poliubiquitina, y todas están presentes en las células (Xu *et al.*, 2009). Las cadenas de ubiquitina bifurcadas son posibles, conteniendo una mezcla de tipos de cadena (Kim *et al.*, 2007). El tipo de modificación por ubiquitina más estudiado es cadena de ubiquitina de lisina 48. Una cadena de cuatro o más ubiquitinas unidas de esta forma marca a la proteína diana para su destrucción por el proteasoma (Ciechanover, 2005).

En plantas, los estudios proteómicos han identificado al menos mil proteínas de *arabidopsis* que son modificadas por ubiquitina, lo que, al haber un número parecido de enzimas ligasas E3, sugiere que cada una es específica de una proteína diana (Vierstra, 2012). Esta lista de proteínas sustratos incluye proteínas nucleares envueltas en la estructura de la cromatina, la transcripción y el procesamiento del ARN, enzimas que controlan pasos limitantes en el metabolismo, proteínas ribosómicas, factores de señalización y transportadores de la membrana plasmática (Vierstra, 2012).

En concordancia con la enorme cantidad de proteínas diana, las consecuencias de la modificación por ubiquitina son también muy diversas. La más común es la degradación por parte del proteasoma 26S, una maquinaria proteolítica cuya estructura está muy conservada entre los eucariotas. Consta de dos partes: un centro con actividad proteasa 20S formado por 28 subunidades, y un complejo regulador 19S formado por 18 subunidades o más (Wen y Klionsky, 2016). El centro reactivo es un cilindro hueco que aloja en su interior a los sitios activos, y el acceso a este centro se produce por un canal axial que restringe la entrada a sólo aquellas proteínas que se despliegan y se enhebran en el canal (Finley, 2009). El complejo regulador posee un juego de receptores de unión a ubiquitina (RPN1, RPN10 y RPN13) que reconocen a los sustratos apropiados, especialmente los que estén marcados con cadenas de poliubiquitina de lisina 48 y lisina 11. También se asocian con proteínas desubiquitinadoras que recolectan los fragmentos de ubiquitina antes de la degradación, y con un anillo hexamérico de actividad ATPasa AAA que abre el canal del centro reactivo y despliega e introduce a las proteínas sustrato. Además, hay varias proteínas accesorias que ayudan al ensamblaje del proteasoma 26S, al reclutamiento de las proteínas diana y participan en la regulación de su actividad proteolítica (Finley, 2009).

A través del sistema ubiquitina-proteasoma 26S, la ubiquitina controla múltiples facetas del crecimiento de las plantas, desarrollo y mantenimiento citoplasmático y nuclear. Entre los ejemplos de procesos controlados se encuentran la mayoría de hormonas vegetales, el ciclo celular, los ritmos circadianos, la fotomorfogénesis, la estructura foliar y floral, la autoincompatibilidad, la defensa ante patógenos y la respuesta a estrés abiótico (Vierstra, 2012).

Pero la ubiquitina también puede actuar como molécula señalizadora, independientemente del proteasoma 26S y de una forma más similar a la fosforilación, siendo reconocida por al menos 20 tipos de dominios de unión a ubiquitina (Hurley *et al.*, 2006). La ubiquitina tiene muchos roles diferentes en la célula. La monoubiquitinación participa en el control transcripcional a través de la modificación de histonas (Feng y Shen, 2014) y, junto con la multiubiquitinación, se requieren para la entrada de ciertas proteínas en vesículas en diferentes pasos de la ruta secretora/endocítica (Mukhopadhyay y Riezman, 2007). También se ha descrito una implicación de la monoubiquitinación en el reconocimiento de proteínas para su degradación por autofagia selectiva (Svenning *et al.*, 2011). En cuanto a la poliubiquitinación, se ha puesto en evidencia su implicación en la reparación del ADN, la señalización celular y el tráfico de membranas (Bond *et al.*, 2011).

### 1.5.1. Modificadores *ubiquitin-like*

Existen otros elementos intracelulares que poseen ciertos parecidos químicos con la ubiquitina, y que también funcionan como modificadores de proteínas. En plantas, estos modificadores *ubiquitin-like* incluyen a SUMO (*small ubiquitin-like modifier*), RUB (*related to ubiquitin*), ATG8 (*autophagy-related 8*) y ATG12, MUB (*membrane-anchored ubiquitin-fold protein*), UFM1 (*ubiquitin-related modifier 1*), URM1 (*ubiquitin-related modifier 1*), HUB1 (*homology to ubiquitin 1*) y una gran variedad de proteínas que albergan pliegues estructuralmente relacionados con la ubiquitina y que están fusionados a otros dominios proteicos (Vierstra, 2012).

Entre ellos, el más relevante es SUMO, una proteína pequeña de unos 12 kDa que se encuentra presente en todos los eucariotas y que participa en una PTM reversible de proteínas celulares denominada sumoilación (Park y Yun, 2013). Tiene poca homología de secuencia con la ubiquitina pero ambas tienen estructuras tridimensionales similares (Friso y van Wijk, 2015). Del mismo modo que la ubiquitina, es unido a residuos de lisina de las proteínas a través de la acción de las enzimas E1, E2 y E3. La sumoilación está implicada también en un amplio rango de funciones que incluyen la respuesta a estrés abiótico, regulación transcripcional, señalización hormonal, desarrollo y división celular y tráfico de proteínas (Friso y van Wijk, 2015).

Las proteínas ATG8 y ATG12 también han adquirido notable relevancia debido a su implicación en la autofagia, y serán descritas posteriormente, en el apartado de autofagia.

## 2. LA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA

La fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC; EC 4.1.1.31) es una enzima fijadora de CO<sub>2</sub> que está presente en todos los organismos fotosintéticos —como son las plantas, algas verdes, cianobacterias y bacterias fotosintéticas— y también en la mayoría de bacterias no fotosintéticas, arqueas y protozoos, pero está ausente en animales, hongos y levaduras (Izui *et al.*, 2004). Aunque existe una isoenzima cloroplastídica en arroz (Masumoto *et al.*, 2010), se trata de una enzima citosólica que tiene un papel clave en el metabolismo de las plantas (Chollet *et al.*, 1996).

La PEPC cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> para formar oxalacetato y fosfato inorgánico (P<sub>i</sub>), usando Mg<sup>2+</sup> como cofactor. Posteriormente, el oxalacetato es rápidamente convertido en malato, siendo éste considerado el primer compuesto estable de la reacción (Chollet *et al.*, 1996; Lepiniec *et al.*, 1994).

La reacción que cataliza la PEPC fue inicialmente caracterizada a partir de hojas de espinaca (*Spinacia oleracea* L.) en 1953, considerándose como una enzima carboxilasa con una función secundaria respecto a la rubisco (Bandurski y Greiner, 1953). No



obstante, el descubrimiento de la vía fotosintética C<sub>4</sub> y la implicación de una isoenzima específica de PEPC (PEPC C<sub>4</sub>) en esta ruta aumentaron considerablemente el interés por esta enzima (Hatch y Slack, 1966; Slack y Hatch, 1967; Kluge, 1983).

## 2.1. Estructura

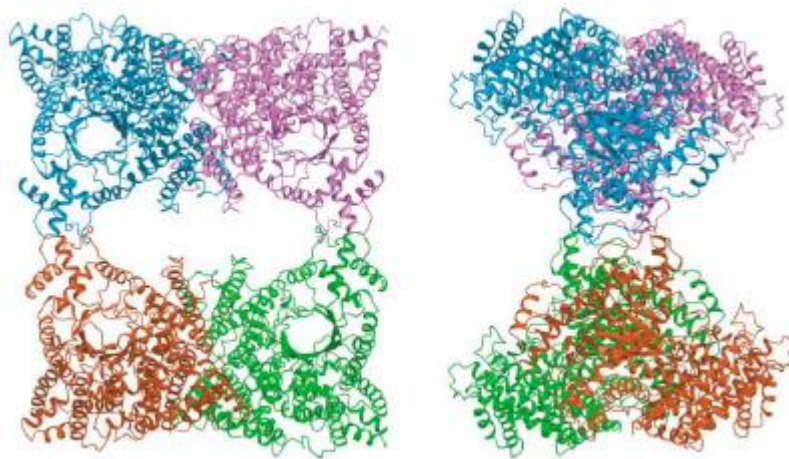
La primera secuencia de aminoácidos perteneciente a la PEPC fue inferida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *ppc* clonado en *Escherichia coli* (Fujita *et al.*, 1984). El tamaño del polipéptido de PEPC varía dependiendo del tipo de organismo; el número aproximado de residuos aminoácidos es de 870 (100 kDa) en bacterias, 970 (110 kDa) en plantas, 1010 (116 kDa) en cianobacterias y 1150 (134 kDa) en protozoos (Izui *et al.*, 2004). Además, también se ha descrito una PEPC de tipo arquea en los organismos hipertermófilos *Methanopyrus kandleri*, *Sulfolobus acidocaldarius* y *Sulfolobus solfataricus* que posee una subunidad de sólo 60 kDa que no afecta a su actividad pero que carece de regulación alostérica (Sako *et al.*, 1996; Sako *et al.*, 1997; Ettema *et al.*, 2004).

En plantas vasculares, las isoformas de PEPC se pueden agrupar en dos tipos: las PEPCs de tipo planta (PTPCs) y las PEPCs de tipo bacteriano (BTPC), debiéndose el nombre de la última a su origen bacteriano (Sánchez y Cejudo, 2003; Xu *et al.*, 2006). Las PTPCs están constituidas por polipéptidos que contienen un dominio de fosforilación en una serina localizada en el extremo N-terminal de la proteína, dentro de la secuencia conservada ácido-base-XX-SIDAQLR (Budde y Chollet, 1986; Nimmo *et al.*, 1987; Terada *et al.*, 1990; Lepiniec *et al.*, 1994; Vidal y Chollet, 1997; O'Leary *et al.*, 2011b). Además, estos polipéptidos de PTPC también poseen un tetrapéptido crítico en el extremo C-terminal con una secuencia (QNTG) muy conservada (Dong *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006). Las PTPCs se encuentran normalmente como un homotetrámero de unos 440 kDa (Rivoal *et al.*, 1996; Rivoal *et al.*, 2001; O'Leary *et al.*, 2011b), aunque *in vitro* pueden presentarse también en forma de dímero o monómero (Stiborová y Leblová, 1986) siendo la forma tetramérica la más abundante y activa catalíticamente mientras que el dímero tiene menor actividad y el monómero carece de ella (Walker *et al.*, 1986; McNaughton *et al.*, 1989; Jawali 1990; Willeford *et al.*, 1990). La PEPC de clase 2 tiene una estructura diferente y contiene subunidades de BTPC (ver más adelante).

Las estructuras tridimensionales de la PEPC de *E. coli* (Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002), de la PEPC de tipo C<sub>4</sub> de maíz (*Zea mays* L.) (Matsumura *et al.*, 2002) y de *Flaveria trinervia* (Spreng.) C. Mohr y de la PEPC de tipo C<sub>3</sub> de *Flaveria pringlei* Gand. (Paulus *et al.*, 2013) fueron obtenidas mediante cristalografía de rayos X, permitiendo conocer, en combinación con mutagénesis dirigida, varias relaciones estructura-función en diferentes regiones de la enzima.

En primer lugar, existe un residuo de arginina en posición 438 en la PEPC de *E. coli* que resulta esencial para el mantenimiento de la estructura tetramérica. Además, la

unión entre dos de las parejas de subunidades es más cercana que la de las otras dos parejas, por lo cual se describe mejor la estructura como un *dímero de dímeros*. En segundo lugar, la estructura monomérica se compone de un barril  $\beta$  de ocho cadenas acompañado de abundantes hélices  $\alpha$  (**Fig. 3**) (Kai *et al.*, 1999). El aspartato y el malato, reguladores negativos de la actividad de la enzima, interacciona con las hélices  $\alpha$  cercanas al extremo C-terminal del barril  $\beta$ , formando puentes con sendos residuos de lisina y argininas muy conservados entre las PEPC de tipo  $C_3$  (Kai *et al.*, 1999; Matsumura *et al.*, 2002). En la PEPC  $C_4$ , el residuo de arginina ha sido sustituido por glicina, siendo este cambio responsable de su mayor tolerancia a los inhibidores (Paulus *et al.*, 2013). El centro de reacción de la enzima se localiza en el extremo C-terminal del barril  $\beta$ , y en la isoforma  $C_4$  incluye un cambio en el sitio de unión al sustrato de una alanina por una serina que hace que aumente considerablemente la eficiencia cinética de la enzima (Kai *et al.*, 1999; Bläsing *et al.*, 2000; Paulus *et al.*, 2013). Por último, el extremo C-terminal de la PEPC está formado por una larga  $\alpha$ -hélice de 19 aminoácidos seguido de la secuencia QNTG mencionada anteriormente. 14 de los 19 residuos de la hélice son hidrofóbicos, lo que convierte al extremo C-terminal en altamente hidrofóbico, provocando que se encuentre embebido en una región hidrofóbica de la subunidad de PEPC. Cuando este extremo C-terminal es expuesto hacia fuera de la proteína, la conformación de ésta cambia, su actividad se ve inhibida y es más susceptible a la degradación (Kai *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2003; Gandullo, 2010).



**Figura 3. Estructura tridimensional del homotetrámero de PEPC  $C_4$  de maíz.** Vista frontal (izquierda) y vista lateral (derecha) generadas por cristalografía. Cada color representa una subunidad (adaptado de Matsumura *et al.*, 2002).

Las BTPCs carecen del clásico motivo de fosforilación en serina en el N-terminal que las PTPC sí poseen (Sánchez *et al.*, 2006). Sin embargo, Bill Plaxton y colaboradores describieron tres sitios de fosforilación en la BTPC de semillas de ricino: uno en una treonina en el extremo N-terminal y otros dos en sendas serinas en posición 425 y 451 (Uhrig *et al.*, 2008a; O'Leary *et al.*, 2011c; Dalziel *et al.*, 2012). Las BTPCs se encuentran normalmente en semillas de ricino formando un complejo heterooctamérico. Este

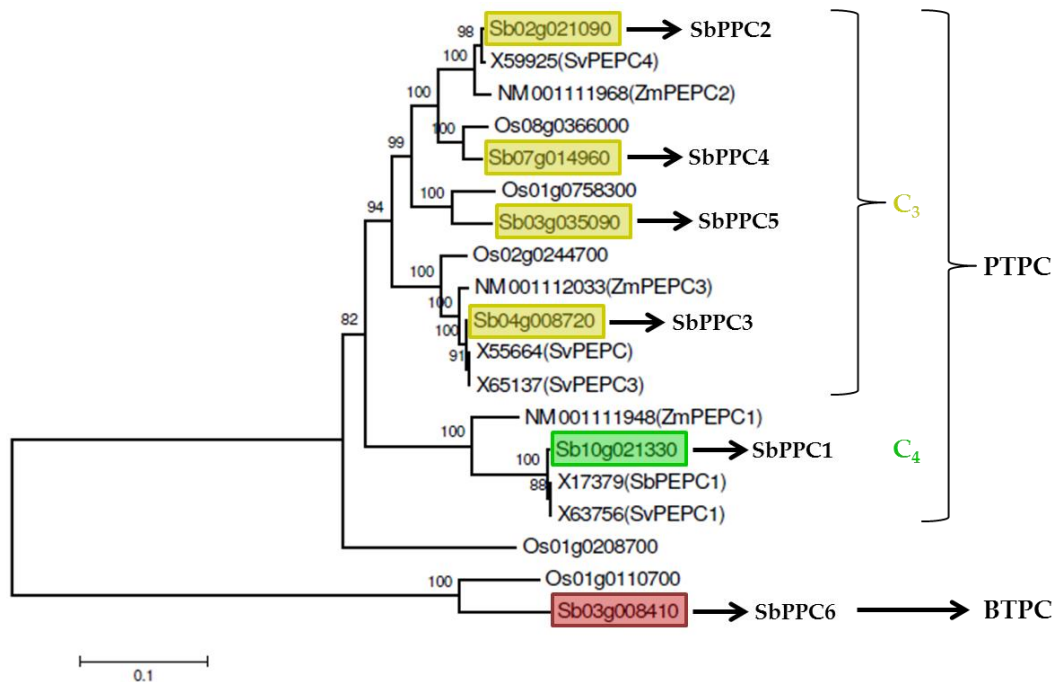
complejo consiste en cuatro subunidades de PTPC formando un homotetrámero como en la PEPC de clase 1, pero con la adición de cuatro subunidades de BTPC asociadas sumando un total de aproximadamente 910 kDa. Esta forma de PEPC nativa se denomina PEPC de clase 2 (Blonde y Plaxton, 2003; Gennidakis *et al.*, 2007).

## 2.2. Familia génica de la PEPC

Los genes que codifican PEPC pertenecen a una pequeña familia multigénica que refleja la diversidad funcional de la enzima. En plantas vasculares, la primera división filogenética crearía dos grupos de PEPC: las PEPCs de tipo planta (PTPCs) y la PEPC de tipo bacteriano (BTPC). Luego, dentro del grupo de las PTPCs, se puede diferenciar entre las isoenzimas de tipo C<sub>3</sub> o no fotosintéticas y la isoenzima PEPC C<sub>4</sub>, que sólo se encuentra en plantas con fotosíntesis de tipo C<sub>4</sub> o CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas) (Lepiniec *et al.*, 1993; Lepiniec *et al.*, 1994; Toh *et al.*, 1994; O'Leary *et al.*, 2011b). El origen evolutivo tanto de las PTPCs como de las BTPCs proviene de un linaje ancestral de gamma-proteobacterias, a partir del que hubo un evento de transferencia horizontal hacia el ancestro común eucariota de plantas, protistas y mohos mucilaginosos celulares. Además, se han identificado varios procesos de transferencia genética horizontal durante la evolución de la PEPC, en dos de los casos incluso hacia animales (Peng *et al.*, 2012). El elevado número de eventos de transferencia horizontal exitosos probablemente se debe a que se trata de un gen operacional, esto es, un gen que puede ser funcional y aportar eficacia biológica sin necesidad de interacción con otros genes. De este modo, la PEPC implementada en un nuevo organismo puede participar en varias vías implicadas en su metabolismo y desarrollo sin necesitar genes asociados (Peng *et al.*, 2012).

El genoma del sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] fue secuenciado completamente y se describieron seis genes que codifican para diferentes isoenzimas de PEPC (**Fig. 4**) (Paterson *et al.*, 2009). Ruiz-Ballesta y colaboradores (2016) asignaron una nomenclatura numérica a los seis diferentes genes atendiendo a su función y la nomenclatura de sus ortólogos en otras especies cercanas. El gen *SbPPC1* codifica la isoenzima C<sub>4</sub> o fotosintética (Crétin *et al.*, 1990, Wang *et al.*, 2009a) y el gen *SbPPC6* codifica la isoenzima de tipo bacteriano (Wang *et al.*, 2009a). Los cuatro genes restantes codifican enzimas de tipo C<sub>3</sub>. Dos de estos cuatro están bien caracterizados: el gen *SbPPC2*, que se expresa constitutivamente (Lepiniec *et al.*, 1993; Lepiniec *et al.*, 1994); y el gen *SbPPC3*, que codifica una PEPC específica de raíz cuya expresión es inducible (Crétin *et al.*, 1991; Lepiniec *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1998; Lepiniec *et al.*, 2003). Los otros dos genes, *SbPPC4* y *SbPPC5*, tienen homología con sendos genes de arroz (**Fig. 4**). Se ha descrito un aumento de expresión de *SbPPC4* en la fase de celularización de la etapa de desarrollo en la semilla, así como en la etapa de germinación (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016). En cuanto a *SbPPC5*, no se ha detectado expresión en hojas ni raíces (Arias-

Baldrich *et al.*, 2017), y su expresión en semillas es muy baja aunque se ha detectado la presencia del transcrito en ellas (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016).



**Figura 4. Filogenia de la familia génica de la PEPC.** “Sb” indica genes de *Sorghum bicolor*, “Sv” indica genes de *Sorghum vulgare*, “Os” indica genes de *Oryza sativa* y “Zm” indica genes de *Zea mays*. Las topologías fueron generadas como consenso de 100 réplicas de alineamientos por *bootstrap* usando el programa MEGA (adaptado de Paterson *et al.*, 2009).

Las PTPCs de sorgo caracterizadas hasta el momento tienen estructuras primarias y propiedades funcionales y reguladoras similares, por lo que las diferencias entre ellas se establecen a nivel de expresión en los distintos órganos de la planta y en respuesta a diferentes estímulos (Lepiniec *et al.*, 1993). Por el contrario, es la BTTPC la que presenta mayor divergencia respecto a sus homólogas, tanto estructural como funcional (O’Leary *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2012; Ting *et al.*, 2017).

La familia génica que codifica PEPC en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* está compuestas por cuatro genes. Según el análisis de la secuencia, los genes *AtPPC1*, *AtPPC2* y *AtPPC3* codifican una PTPC, mientras que *AtPPC4* codifica una BTTPC (Sánchez y Cejudo, 2003; Sánchez *et al.*, 2006). Los genes de PEPC en *Arabidopsis* muestran una expresión diferencial en función del órgano de la planta, y también en respuesta a estreses ambientales. De esta manera, el transcrito de *AtPPC1* se encuentra en todos los órganos y *AtPPC2* y *AtPPC3* se expresan mayoritariamente en hojas y raíces, respectivamente. Sin embargo, la expresión de *AtPPC4* se localiza en flores y silicuas, y es prácticamente indetectable en hojas y raíces (Sánchez y Cejudo, 2003; Feria *et al.*, 2016), aunque en sí se ha descrito un aumento de su expresión en raíces en condiciones de estrés salino e hídrico (Sánchez *et al.*, 2006).

## 2.3. Funciones de la PEPC

### 2.3.1. Reacción enzimática de la PEPC

La PEPC cataliza la  $\beta$ -carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato (PEP) en presencia de  $\text{HCO}_3^-$  para formar oxalacetato y fosfato inorgánico ( $\text{P}_i$ ), usando  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor. Posteriormente, el oxalacetato es rápidamente convertido en malato mediante la enzima malato deshidrogenasa. El malato es considerado el primer compuesto estable de la reacción, siendo una molécula de gran interés al transportar carbono y poder reductor (Chollet *et al.*, 1996; Lepiniec *et al.*, 1994). El mecanismo de reacción más aceptado consta de tres fases (Fig. 5). En la primera fase, se produce anión enolato de piruvato y carboxifosfato a partir de PEP y  $\text{HCO}_3^-$  en una reacción parcialmente reversible. En la segunda fase, el anión enolato se isomeriza y el carboxifosfato es descompuesto en dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y  $\text{P}_i$  dentro del sitio activo de la enzima. En la tercera y última fase, el  $\text{CO}_2$  realiza un ataque electrofílico al anión enolato para formar el oxalacetato, liberándose el  $\text{P}_i$  irreversiblemente (Andreo *et al.*, 1987; Janc *et al.*, 1992; Chollet *et al.*, 1996; Izui *et al.*, 2004).

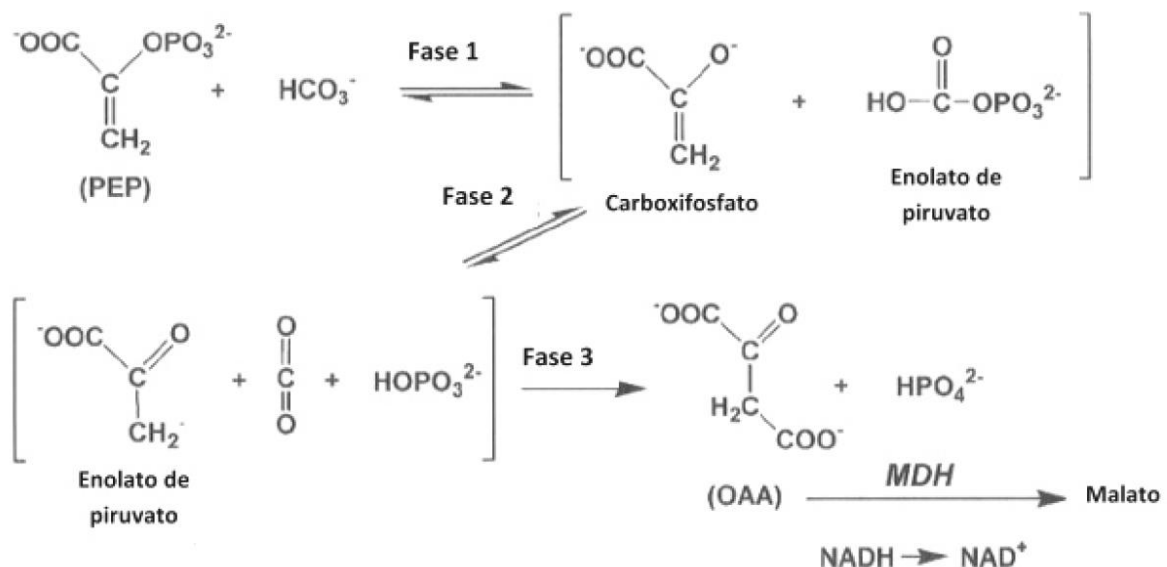


Figura 5. Representación química del mecanismo de reacción de la PEPC. OAA: oxalacetato; MDH: malato deshidrogenasa (adaptada de Izui *et al.*, 2004).

### 2.3.2. La PEPC en la fotosíntesis de tipo $\text{C}_4$ y CAM

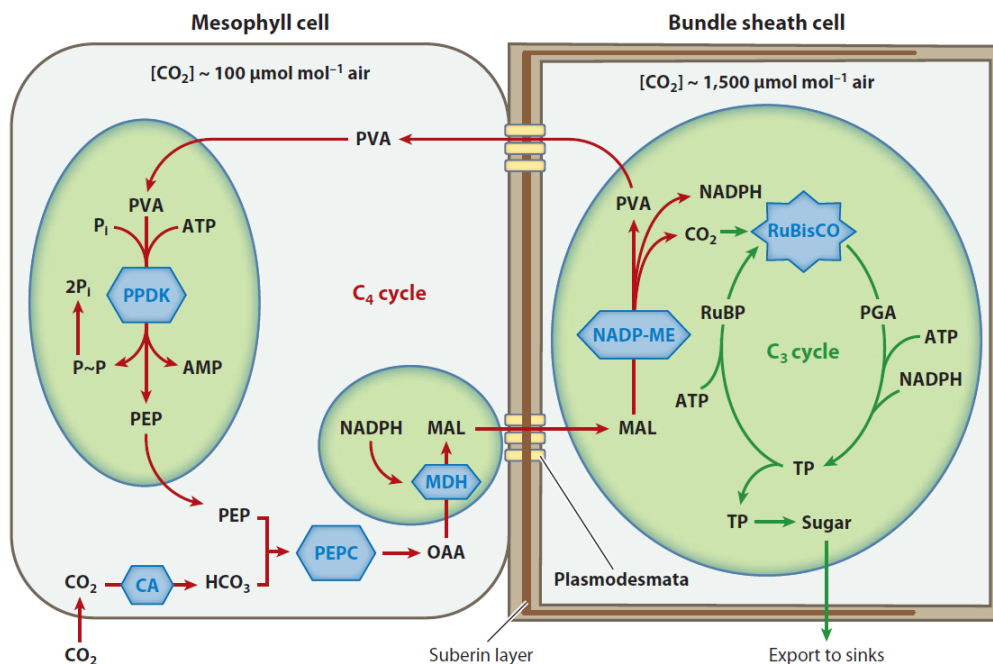
Todos los eucariotas fotosintéticos reducen el  $\text{CO}_2$  fotosintético a carbohidratos mediante el ciclo de Calvin o ciclo  $\text{C}_3$ , cuya primera reacción está catalizada por la rubisco, generando como primer producto estable un compuesto de tres átomos de carbono denominado ácido 3-fosfoglicérico (3-PGA) (Hatch y Slack, 1970). En el caso de las plantas  $\text{C}_4$  y CAM, se produce un ciclo adicional con nuevas rutas bioquímicas, donde la enzima clave y responsable de la fijación inorgánica del carbono es la PEPC,

desarrollando así un exitoso mecanismo concentrador de CO<sub>2</sub> alrededor de la rubisco. Las plantas C<sub>4</sub> y CAM han evolucionado convergentemente para adaptarse a una reducción de CO<sub>2</sub> en el medioambiente (Christin *et al.*, 2007; Raven *et al.*, 2008; Christin *et al.*, 2014), y aunque los mecanismos concentradores de cada planta son diferentes, los ciclos bioquímicos son similares (Osmond, 1978; Hatch, 1987). De esta manera, estas plantas reducen la fotorrespiración y el gasto energético asociado, consiguiendo un mayor rendimiento fotosintético y una mayor eficiencia en el uso del agua y los nutrientes (Nimmo, 2000; Edwards *et al.*, 2001).

En la primera fase de la asimilación fotosintética del CO<sub>2</sub>, la isoenzima fotosintética de la PEPC, que se encuentra en concentraciones muy altas en el citosol de las células del mesófilo de las plantas C<sub>4</sub> y CAM, cataliza la reacción de carboxilación produciendo un ácido de 4 átomos de carbono que posteriormente es descarboxilado generando un compuesto de 3 átomos de carbono y CO<sub>2</sub> libre. Este último CO<sub>2</sub> será el que servirá de sustrato para fijación secundaria por parte de la rubisco (Gil, 1995; Sage *et al.*, 2012). En las plantas CAM se produce una separación temporal entre ambas carboxilaciones, mientras que en las plantas C<sub>4</sub> la separación es espacial puesto que las carboxilaciones suceden en tipos celulares distintos: las células de la vaina, en las que se localiza la rubisco; y las células del mesófilo, que se disponen en una corona concéntrica a su alrededor y donde se localiza la PEPC. Esto da lugar a una anatomía foliar característica de las plantas C<sub>4</sub> denominada anatomía Kranz o en corona (Haberlandt, 1884; Sage *et al.*, 2012).

En la ruta C<sub>4</sub>, el oxalacetato es rápidamente reducido a malato por la enzima NADP<sup>+</sup>-malato deshidrogenasa en los cloroplastos de la célula del mesófilo, o transaminado a aspartato en el citosol por la aspartato transaminasa, en función de la especie C<sub>4</sub>. Posteriormente, los ácidos C<sub>4</sub> (malato o aspartato) son transportados a las células de la vaina donde son descarboxilados a piruvato o alanina, liberándose el CO<sub>2</sub> en el interior de estas células. La reacción de descarboxilación pueden llevarla a cabo tres enzimas distintas que definen los tres subtipos fisiológicos de plantas C<sub>4</sub>: la enzima málico dependiente de NADP<sup>+</sup> (tipo NADP-ME), la enzima málico dependiente de NAD<sup>+</sup> (tipo NAD-ME) o la PEP-carboxiquinasa (tipo PCK) (Azcón-Bieto y Talón, 2008; Sage *et al.*, 2012). En el sorgo, la descarboxilación del malato la realiza la enzima málico dependiente de NADP<sup>+</sup>. El CO<sub>2</sub> liberado en la reacción es fijado por la rubisco, y el piruvato regresa a los cloroplastos de las células del mesófilo para regenerar el aceptor primario, el PEP, por acción de la piruvato ortofosfato diquinasa (PPDK) (**Fig. 6**). Estas modificaciones en el metabolismo fotosintético confieren a las plantas C<sub>4</sub> una serie de propiedades que, en conjunto, se denominan síndrome Kranz. Entre estas propiedades destacan unos bajos niveles de fotorrespiración, un punto de compensación de CO<sub>2</sub> mínimo, insensibilidad de la fotosíntesis a las variaciones en las concentraciones de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> del medio e insaturación de las tasas fotosintéticas por la intensidad lumínica.

Además, sus enzimas tienen elevados óptimos térmicos y son plantas con una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno y del agua en comparación con las plantas  $C_3$  (Gil, 1995).



**Figura 6. Representación de la vía fotosintética  $C_4$  de tipo NADP-ME.** El  $CO_2$  entra en la célula del mesófilo y genera  $HCO_3^-$  a través de la anhidrasa carbónica en el ambiente acuoso del citosol. Mediante la PEPC, el ion bicarbonato reacciona con el PEP para formar un ácido de cuatro carbonos ( $C_4$ ), el oxalacetato (OAA). Éste es convertido mediante la málico deshidrogenasa (MDH) en un segundo ácido  $C_4$ , el malato, que es transportado a la célula de la vaina. Allí, el malato es descarboxilado por la NADP-ME y el  $CO_2$  liberado es fijado por la rubisco en el ciclo de Calvin. El ácido  $C_3$  (piruvato) producido en la descarboxilación del malato se transporta de vuelta a la célula del mesófilo para regenerar el PEP (Sage *et al.*, 2012).

En el metabolismo fotosintético CAM, durante la noche cuando las tasas de evapotranspiración son bajas, la PEPC cataliza la fijación del  $CO_2$  atmosférico y/o respiratorio en el citosol. El producto final es el ácido málico que se almacena en la gran vacuola central. Durante el día, los estomas están cerrados y la rubisco fija el  $CO_2$  que se genera en la descarboxilación del málico sintetizado por la PEPC durante la noche (Borland y Taybi, 2004). El cierre estomático diurno confiere a estas plantas una altísima eficiencia en el uso del agua.

### 2.3.3. La PEPC en otros contextos metabólicos

En plantas superiores, la PEPC se localiza en hojas, raíces, semillas y nódulos (O'Leary, 1982). Esta naturaleza ubicua de la enzima se justifica, probablemente, por la naturaleza de su producto final estable, el malato, que puede ser usado como fuente de carbono y poder reductor en numerosas vías metabólicas.

Debido a la baja  $K_m$  de la PEPC por el sustrato bicarbonato (en el rango de  $\mu\text{M}$ ), esta enzima interviene, como norma general, en la economía del carbono de la célula. La PEPC participa en multitud de contextos fisiológicos incluyendo el movimiento estomático (Outlaw, 1990), la homeostasis del pH celular y la absorción y transporte de iones en las raíces (Ben-Zioni *et al.*, 1970). También interviene en la fijación de nitrógeno atmosférico por leguminosas, en la interacción del tubo polínico y el estilo, en la maduración y germinación de la semilla y en la maduración del fruto (Chollet *et al.*, 1996; Echevarría y Vidal, 2003; Izui *et al.*, 2004; O'Leary *et al.*, 2011b; Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014, 2016). Además, la PEPC tiene una función anaplerótica consistente en la reposición de intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs, especialmente cuando la demanda de esqueletos carbonados para la biosíntesis de aminoácidos es alta (Huppe y Turpin, 1994; Sweetlove *et al.*, 2010). Esta función es especialmente importante en tejidos no fotosintéticos (Latzko y Kelly, 1983), tanto de plantas  $C_3$  como  $C_4$  (Giordano, 2001). Durante la síntesis de aminoácidos, los ácidos orgánicos procedentes del ciclo de Krebs son transportados desde la mitocondria al estroma del cloroplasto o al citosol para la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  en el ciclo GS/GOGAT, disminuyendo la tasa de regeneración de oxalacetato y/o malato en la mitocondria (Champigny y Foyer, 1992). En este sentido, la reacción catalizada por la PEPC puede ser considerada como el inicio de una rama de la ruta glucolítica (**Fig. 7**).

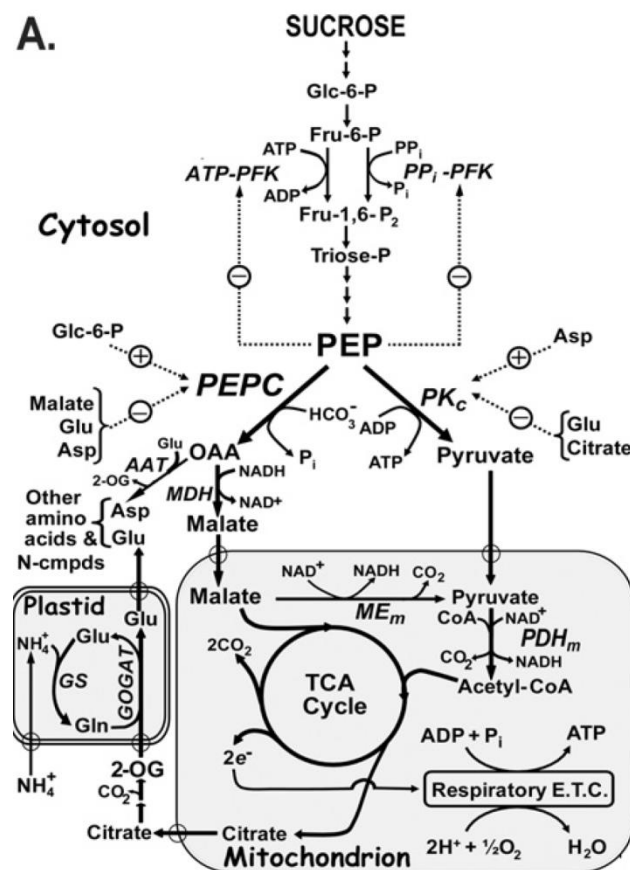
Durante la reducción del nitrato, que consume protones, la actividad PEPC aumenta el contenido de ácidos orgánicos, lo que reduce la alcalinización y contribuye a la homeostasis del pH citosólico. Además, el oxalacetato producido por la PEPC puede ser usado para transportar hasta el citosol el poder reductor requerido por la nitrato reductasa, a través de la bomba oxalacetato/malato que se encuentra entre el cloroplasto y el citosol (Oaks, 1994). También se observa una clara relación entre la actividad PEPC y la actividad glutamina sintetasa, estando esta última controlada por los niveles de glutamina (Dever *et al.*, 1995), y la expresión de la PEPC coordinada con la nitrato reductasa (Müller *et al.*, 2001). Todo esto pone en evidencia una coordinación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno regulada de forma precisa para mantener una adecuada relación carbono/nitrógeno.

Por otro lado, la PEPC contribuye a facilitar una rápida carboxilación anaplerótica del PEP para ayudar en la síntesis y exudación masiva de ácidos orgánicos. Estos ácidos orgánicos son necesarios en el metabolismo de las raíces de esta planta cuando se ven sometidas a estrés por deficiencia de fósforo, hierro y toxicidad por aluminio (López-Millán *et al.*, 2000; Shane *et al.*, 2013; Arias-Baldrich *et al.*, 2015; Feria *et al.*, 2016; Doshi *et al.*, 2017).

Diversos trabajos de investigación de nuestro grupo han aportado información referente a las funciones de las diversas isoenzimas PEPC en contextos metabólicos distintos de la fotosíntesis. En relación con las respuestas al déficit de fósforo, el



análisis de líneas SALK de arabisopsis carentes de isoenzimas PEPC o PEPCK específicas ha puesto de manifiesto que la respuesta en raíces está relacionada con las isoenzimas PPC3 y PPCK2 (Feria *et al.*, 2016). Tanto en salinidad (Pérez-López *et al.*, 2018) como en estrés por amonio (Arias-Baldrich *et al.*, 2017) la actividad PEPC aumentó en las raíces de sorgo, y esa respuesta está relacionada específicamente con la isoenzima PPC3. Esa misma isoenzima tiene una gran relevancia durante el desarrollo y germinación de las semillas de sorgo (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016). Además, en arabisopsis la carencia de isoenzimas PEPC específicas causó alteraciones del metabolismo del carbono y el nitrógeno, acumulación de nitrato y aminoácidos, disminución de proteínas, descenso del peso de las semillas, retraso en la germinación, reducción de intermediarios del ciclo de Krebs y decremento de la relación ácidos grasos poli-insaturados/no poli-insaturados (Sánchez *et al.*, 2015).



**Figura 7. Interacciones entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno.** El esquema destaca el importante papel de dos enzimas al final de la glucólisis citosólica de las plantas, la PEPC y la piruvato quinasa citosólica (PK<sub>c</sub>), al controlar las provisiones de sustratos respiratorios para la mitocondria así como para generar los intermediarios requeridos para la asimilación de amonio en la vía GS/GOGAT de los plástidos y para la aspartato amino transferasa en el citosol. El control coordinado de la PEPC mediante efectores alostéricos constituye un mecanismo para la regulación del flujo glucolítico y el reparto de PEP durante la asimilación de amonio. Además, también se señala la capacidad del PEP de controlar la glucólisis (O'Leary *et al.*, 2011b).

Los cambios en el reparto del carbono en el punto de ramificación del PEP son cruciales para permitir a las células vegetales sincronizar su metabolismo con las variaciones en las condiciones ambientales. El control de la actividad PEPC ocurre a niveles transcripcionales/traduccionales y postraduccionales. Diferentes estudios han puesto en evidencia que un suplemento de azúcares exógenos, y el fosfato y el nitrógeno disponibles influyen en la abundancia y el estado de fosforilación de la PEPC en diferentes plantas (Duff *et al.*, 1995; Sima *et al.*, 2001; Nakagawa *et al.*, 2003; Rajagopalan *et al.*, 2004; Murmu *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008; Feria *et al.*, 2008; Gregory *et al.*, 2009; O'Leary *et al.*, 2011b).

#### 2.4. Regulación de la actividad PEPC

En la regulación de la actividad PEPC se establecen principalmente dos niveles de control, uno a nivel transcripcional y otro a nivel postraduccionales.

##### 2.4.1. Regulación transcripcional

A nivel transcripcional, la PEPC está regulada por varios factores destacando la luz como uno de los principales y mejor conocidos. Esta respuesta, que se da tanto en plantas C<sub>4</sub> (Thomas *et al.*, 1994; Lepiniec *et al.*, 2003) como en plantas C<sub>3</sub> (Matsuoka y Yamamoto, 1989), está mediada por el fitocromo y se produce en la transición de planta etiolada a planta verde. La luz también afecta a la fluctuación circadiana de los niveles de ARNm de PEPC. Sin embargo, estas fluctuaciones no se ven reflejadas en la cantidad de proteína, que se mantiene constante (Thomas *et al.*, 1990). El fitocromo también participa en la expresión de la PEPC en la planta CAM facultativa *Mesembryanthemum crystallinum* L. (Cushman y Bohnert, 1999). Otros factores ambientales como temperatura, salinidad, estrés hídrico o la aplicación exógena de ABA aumenta la expresión de la PEPC en esta planta (Herppich *et al.*, 1992).

En sorgo, se han descrito aumentos de expresión de la PEPC en estrés hídrico, salinidad y estrés por amonio (Buchanan *et al.*, 2005; Arias-Baldrich *et al.*, 2017). En plantas de tipo C<sub>3</sub> como en la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el estrés salino y el ABA reducen la asimilación de CO<sub>2</sub>, el contenido en clorofilas, proteínas y la actividad rubisco y, por el contrario, se estimula la actividad PEPC (Popova *et al.*, 1995). En plántulas de trigo (*Triticum aestivum* L.), la salinidad y el estrés por LiCl, además de otros estreses como hipoxia o frío, también provocan un aumento en la expresión de la PEPC en la raíz, aunque se desconoce si el ABA interviene en este efecto (González *et al.*, 2003). En arábidopsis, la salinidad y la deficiencia de P inducen un aumento en la expresión de la PEPC, siendo este aumento más marcado en raíces que en parte aérea (Feria *et al.*, 2016). Finalmente, otras hormonas como las citoquininas, en conjunción o no con el balance de nitrógeno de la planta, también pueden modificar la expresión de la PEPC (Peters *et al.*, 1997).

## 2.4.2. Regulación postraduccional

### *Regulación alostérica*

La mayoría de las PTPCs están sujetas a regulación alostérica por una amplia variedad de metabolitos. Sin embargo, las propiedades cinéticas y alostéricas específicas de la enzima son variables y parecen estar adaptadas a las funciones fisiológicas de cada isoenzima. Un buen ejemplo de esta adaptación es que en las PEPCs de clase 1 de las plantas C<sub>4</sub> los valores de  $IC_{50}$  (malato) y  $K_m$  (PEP) son mayores con respecto a los de las enzimas de las plantas C<sub>3</sub> (Svensson *et al.*, 2003; O'Leary *et al.*, 2011b). En maíz, si se compara una PEPC de tipo C<sub>3</sub> de raíz con la fotosintética, esta última tiene unos valores de  $K_m$ , a pH 7,3, que es 30 veces superior a la de raíz para el PEP, 10 veces superior para el Mg<sup>2+</sup> y el doble para el HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Dong *et al.*, 1998).

Generalmente las PTPCs de dicotiledóneas son activadas alostéricamente por glucosa-6-fosfato e inhibidas por malato o aspartato, especialmente a valores de pH subóptimos (del orden de 7,1 a 7,3) que se aproximan al valor del pH citosólico (Andreo *et al.*, 1987; Echevarría *et al.*, 1994). La glucosa-6-fosfato incrementa la  $V_{max}$  de la PEPC, produciendo una bajada de la  $K_m$  para el PEP y reduciendo la sensibilidad de la enzima al inhibidor malato (Echevarría *et al.*, 1994). Su lugar de unión se encuentra en un bolsillo en la estructura cercano al sitio activo y que contiene un sulfato de unión que interacciona con 4 aminoácidos, siendo uno de ellos perteneciente a la subunidad adyacente (Izui *et al.*, 2004). El sitio de unión para el malato y aspartato, sin embargo, se encuentra cerca del extremo C-terminal del barril  $\beta$ , interaccionando directamente con cuatro aminoácidos, entre los que se encuentran una arginina que es esencial para el sitio activo, una asparagina que forma parte de la cola C-terminal de la enzima y una arginina que en PEPCs de tipo C<sub>4</sub> se encuentra sustituida por glicina de modo que la inhibición es menor (Matsumura *et al.*, 2002; Paulus *et al.*, 2013).

En plantas monocotiledóneas, además de los metabolitos citados anteriormente, aminoácidos neutrales como glicina, alanina y serina también son activadores alostéricos (Nishikido y Takanashi, 1973; Stiborová y Leblová, 1985; Garson y Gray, 1991; Bandarian *et al.*, 1992; Tovar-Méndez *et al.*, 2000; Izui *et al.*, 2004; Güemez-Toro *et al.*, 2012). Recientemente se ha descrito que la interacción de estos aminoácidos neutrales tiene lugar en un lugar cercano pero diferente al sitio de unión de la glucosa-6-fosfato y que interactúa a la vez con dos subunidades de un dímero dentro del tetrámero. Esta interacción sólo ocurre en la PEPC C<sub>4</sub> de plantas monocotiledóneas, específicamente en el aminoácido en posición 100 que puede ser una serina o una glicina, mientras que en plantas dicotiledóneas se trata de una lisina. Además, en condiciones fisiológicas donde el Mg<sup>2+</sup> y el PEP se encuentran por debajo de la concentración de saturación, la activación alostérica por glicina o serina parece ser crucial para que se alcancen los niveles típicos de una PEPC C<sub>4</sub> ya que son capaces de

activar llevar a la enzima a los mismos niveles de actividad que la glucosa-6-fosfato, e incluso contrarrestar el efecto inhibitor del malato en un grado mayor que la glucosa-6-fosfato (González-Segura *et al.*, 2018).

Por el contrario, la PEPC de *E. coli* presenta una regulación más compleja, siendo activada por acetil-coenzima A, fructosa-1,6-bisfosfato, ácidos grasos de cadena larga y guanosina-3'-difosfato-5'-difosfato, e inhibida por aspartado o malato (Izui *et al.*, 1981, 2004). La PEPC de clase 2, y por lo tanto las BTPCs tiene distintas propiedades ya que es bastante menos sensible a los inhibidores alostéricos comparada con la PEPC de Clase 1 (O'Leary *et al.*, 2009; O'Leary *et al.*, 2011; Ting *et al.*, 2017).

Existe un modelo propuesto de activación competitiva de la PEPC, en donde los activadores alostéricos como la glucosa-6-fosfato se unen al sitio activo de una subunidad, induciendo un cambio conformacional y activando posteriormente a las demás subunidades (Tovar-Méndez *et al.*, 1998; Schlieper *et al.*, 2014).

La afinidad de la enzima por el PEP y el  $Mg^{2+}$  es notablemente mayor a un pH entre 7 y 8, siendo el pH óptimo *in vitro* de 8 (Gadal *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 1996). Por lo tanto, *in vivo*, la enzima va a depender del balance entre los efectores negativos y positivos y de la modulación por el pH citosólico (Gadal *et al.*, 1996). La mayoría de factores que interaccionan y actúan en la regulación de la PEPC son opuestos al efecto negativo ejercido por el malato y el aspartato (Jeanneau *et al.*, 2002). La regulación de la actividad de la PEPC está influenciada por el estado oligomérico de la enzima, siendo el tetramero la conformación óptima (Chollet *et al.*, 1996). Los cambios en el estado de oligomerización *in vitro* se asocian a factores tales como la dilución de la enzima, cambios en la concentración de sales en el medio de ensayo, la concentración de malato o baja temperatura. Sin embargo, la contribución real de esta regulación a la actividad de la enzima *in vivo* no se conoce. Sí hay evidencias de que en plantas CAM es la conformación tetramérica la que se encuentra actuando durante la fase nocturna de fijación de  $CO_2$  (Chollet *et al.*, 1996).

Además, la PEPC podría estar sometida a una regulación redox (Iglesias y Andreo, 1984; Chardot y Wedding, 1992) debido a la abundancia de cisteínas, algunas altamente conservadas, en todas las PEPCs (Chollet *et al.*, 1996). No obstante, hasta la fecha no se ha descrito ninguna cascada de óxido-reducción tipo ferredoxina-tiorredoxina implicada en la regulación de la PEPC. También se ha descrito que compuestos como el ditiotreitól (DTT),  $\beta$ -mercaptoetanol o glutatión cambian débilmente la sensibilidad al malato *in situ*. Sin embargo, ninguno de estos compuestos tiene efecto *in vitro*. Este efecto no se debe a ningún proceso mediado por tiorredoxina o dependiente de fosforilación. Se ha propuesto que el glutatión podría contribuir a la protección de la enzima frente al malato debido a que es un compuesto tiólico

fisiológico que se encuentra en el citosol, principalmente en estado reducido (Pierre *et al.*, 2004).

#### *Regulación por fosforilación reversible*

El fenómeno de fosforilación reversible de la PEPC se puso en evidencia por primera vez en la planta CAM *Bryophyllum fedtschenkoi* (Raym.-Hamet & H. Perrier) Lauz. (Nimmo *et al.*, 1984), y posteriormente en maíz (Budde y Chollet, 1986) y sorgo (Guidici-Ortoni *et al.*, 1988). Todas las PTPCs, fotosintéticas y no fotosintéticas, están sometidas a regulación por fosforilación reversible en un residuo de serina localizado en el extremo N-terminal de la proteína. La fosforilación la lleva a cabo una pequeña proteína con actividad quinasa denominada fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK), de la que hay varias isoformas según la especie vegetal, y conlleva una activación enzimática a pH fisiológico gracias a que disminuye la sensibilidad de la PEPC a sus inhibidores alostéricos a la par que aumenta su afinidad por el PEP y la sensibilidad a sus activadores alostéricos (Echevarría y Vidal, 2003; Nimmo, 2003). La serina fosforilable se encuentra en el motivo E/DR/KxxS\*IDAQL/MR, común a todas las PTPCs secuenciadas hasta la fecha, pero ausente en las BTPCs y en la PEPC de *E. coli* (Lepiniec *et al.*, 1994; Chollet *et al.*, 1996; Kai *et al.*, 1999; Sánchez y Cejudo, 2003; O'Leary *et al.*, 2011b). Los múltiples estudios realizados sobre dicha PTM, incluyendo la clonación de la PEPCK de plantas C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub> y CAM, han contribuido a que la regulación por fosforilación reversible de la PEPC sea, hasta la fecha, uno de los ejemplos mejor conocidos de regulación por fosforilación de una enzima en el reino vegetal.

La fosforilación de la PEPC fotosintética de sorgo produce un débil efecto sobre la  $K_m$  de la enzima pero duplica la  $V_{max}$ , aumenta siete veces la  $K_i$  para su inhibidor malato y 4,5 veces la  $K_a$  para la glucosa-6-fosfato en condiciones de pH y concentración de PEP subóptimos (Echevarría *et al.*, 1994; Duff y Chollet, 1995).

La PEPC es desfosforilada por una proteína fosfatasa de tipo 2A (PP2A) (Carter *et al.*, 1990). Las variaciones en el estado de fosforilación de la PEPC parecen ser consecuencia de fluctuaciones en la actividad PEPCK, ya que los niveles de actividad fosfatasa se mantienen relativamente constantes en las transiciones luz-oscuridad (Echevarría *et al.*, 1990).

Existen diferentes estudios de mutagénesis dirigida para estudiar esta fosforilación. En la PEPC C<sub>4</sub> recombinante de sorgo se puso de manifiesto que el efecto de la fosforilación puede ser simulado por la introducción de una carga negativa sustituyendo el residuo de serina del extremo N-terminal de la enzima por ácido aspártico. La incorporación de dicha carga negativa se traduce igualmente en un aumento en la velocidad catalítica y una disminución de la sensibilidad al malato (Wang *et al.*, 1992; Duff y Chollet, 1995; Chollet *et al.*, 1996). Otras mutaciones como la sustitución de un residuo básico de lisina, situado 3 aminoácidos antes de la serina

fosforilable, por asparagina (Ueno *et al.*, 1997) o el truncamiento del péptido N-terminal mediante enteroquinasa en el residuo 33 (Izui *et al.*, 2004), ambos en la PEPC C<sub>4</sub> de maíz, simulan parcialmente los efectos de la fosforilación. En la misma línea se ha comprobado que si al ensayo de actividad PEPC se añaden anticuerpos específicos dirigidos contra un péptido sintético de 20 aminoácidos del extremo N-terminal, que contiene la secuencia del sitio de fosforilación de la enzima C<sub>4</sub> de hojas de sorgo, se modifican las propiedades cinéticas y funcionales de la PEPC, lo que sugiere que dicho anticuerpo provoca un cambio conformacional en la molécula que simula la fosforilación (Pacquit *et al.*, 1995).

Las isoenzimas PEPC no fotosintéticas también están sometidas a una regulación por fosforilación reversible, de forma similar a las isoenzimas C<sub>4</sub> y CAM (Chollet *et al.*, 1996; Vidal y Chollet, 1997; Gousset-Dupont *et al.*, 2005). Diversos estudios *in vivo* con <sup>32</sup>P han demostrado la presencia de fosforilación de la PEPC en una gran variedad de plantas y tejidos donde solamente se localizan las isoenzimas no fotosintéticas, como por ejemplo en nódulos de raíces de soja (*Glycine max* L.) (Zhang *et al.*, 1995), semillas de trigo y cebada (Osuna *et al.*, 1996, 1999; Feria *et al.*, 2008), estomas (Du *et al.*, 1997), frutos (Law y Plaxton, 1997; Walker *et al.*, 2016), hojas de trigo de plántulas deficientes en nitrógeno (Van Quy *et al.*, 1991; Duff y Chollet, 1995), e incluso en la planta acuática *Egeria densa* (Planch.) Casp. (Casati *et al.*, 2000; Lara *et al.*, 2001).

Además, estudios *in vitro* han detectado la existencia de actividad PEPCK en nódulos de raíces de soja y alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Schuller y Werner, 1993; Vance *et al.*, 1994), hojas de trigo y tabaco (Wang y Chollet, 1993a; Duff y Chollet, 1995), semillas de cebada (Feria *et al.*, 2008), semillas en desarrollo de ricino (Murmu y Plaxton, 2007; O'Leary *et al.*, 2011b) y en semillas y raíces de sorgo (Pacquit *et al.*, 1993; Nhiri *et al.*, 2000), demostrándose así la similitud de dicha actividad quinasa con la de plantas C<sub>4</sub> y CAM respecto a su independencia del Ca<sup>2+</sup>, propiedades cromatográficas y subunidad catalítica (Pacquit *et al.*, 1993; Wang y Chollet, 1993b; Duff y Chollet, 1995).

En hojas de plantas C<sub>3</sub>, esta actividad PEPCK está modulada *in vivo* de forma reversible por una interacción compleja entre fotosíntesis y metabolismo del nitrógeno, o bien por el requerimiento de suministro de fotosintatos a los nódulos de raíces fijadoras de nitrógeno (Duff y Chollet, 1995). La inducción de la actividad PEPCK en hojas iluminadas de plantas C<sub>3</sub> tiene características comunes a las de las plantas C<sub>4</sub> (Duff y Chollet, 1995; Chollet *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Gousset-Dupont *et al.*, 2005), lo que sugiere la existencia de vías de señalización similares en ambos tipos de plantas.

Al igual que en el caso de la PEPC C<sub>4</sub>, la fosforilación podría ejercer un efecto protector que contrarrestaría la inhibición alostérica de la PEPC. Por lo tanto, el control por metabolitos y la modulación por regulación covalente de la enzima en presencia de luz podría actuar en un bucle de retroalimentación que aseguraría que el control del

flujo de esqueletos carbonados a través del ciclo anaplerótico y de la ruta de síntesis de aminoácidos de la familia del aspartato se lleve a cabo de forma muy precisa (Gousset-Dupont *et al.*, 2005). En el caso de las plantas C<sub>3</sub>, la PEPC tiene un papel crucial en la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno. Por lo tanto, la función de la fosforilación reversible de la enzima en oposición a la inhibición alostérica puede aplicarse en cualquier contexto fisiológico donde la concentración del metabolito sea alta; en el caso de la PEPC C<sub>3</sub>, durante el flujo anaplerótico del carbono (Vidal *et al.*, 2002).

Aparte de la luz, que es el principal componente en la regulación de la fosforilación, existen otros factores que influyen en el control de la fosforilación de la PEPC. En plantas CAM, la fosforilación ocurre de noche y está controlada por un oscilador circadiano (Nimmo, 2003). El estrés salino en plantas C<sub>4</sub> (Echevarría *et al.*, 2001), la falta de CO<sub>2</sub> en plantas CAM y el estrés oxidativo (Izui *et al.*, 2004) también pueden controlar la fosforilación de la PEPC.

#### *La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa*

La fosfoenolpiruvato carboxilasa quinasa (PEPCK) es una proteína quinasa de serina/treonina que utiliza ATP como donador de fosfato. Fosforila a la PEPC en el residuo mencionado anteriormente y se trata de una proteína altamente específica que pertenece a la familia de las quinasas dependientes de Ca<sup>2+</sup> y/o calmodulina (superfamilia CDPK-SnRK). Sin embargo, y a diferencia de estas, la PEPCK no posee ningún dominio de unión a Ca<sup>2+</sup> o secuencia autoinhibidora, con lo cual su actividad es independiente de Ca<sup>2+</sup> y se encuentra constitutivamente activa (Echevarría y Vidal, 2003). Su regulación se produce por cambios en su velocidad de síntesis, con una tasa de aproximadamente 2 horas (Jiao *et al.*, 1991; Hartwell *et al.*, 1996, 1999).

El genoma de *Arabidopsis* posee dos genes que codifican PEPCK: *AtPPCK1* y *AtPPCK2*, siendo el primero el que se expresa de forma más abundante en hojas (Fontaine *et al.*, 2002; Nimmo, 2003). En sorgo se han descrito tres genes que codifican PEPCK: *SbPPCK1*, *SbPPCK2* y *SbPPCK3*. Únicamente se han caracterizado los dos primeros, puesto que *SbPPCK3* ha sido descrito a partir de la secuenciación del genoma del sorgo por homología con los genes *PPCK* de maíz (Paterson *et al.*, 2009). El gen *SbPPCK1* se expresa en respuesta a la luz en las células del mesófilo, mientras que *SbPPCK2* se expresa en las células de la vaina y su respuesta a los cambios luz-oscuridad es mucho menor. El gen *SbPPCK3* está filogenéticamente relacionado con el gen *ZmPPCK4*, aunque se desconoce la localización de su expresión (Shenton *et al.*, 2006; Paterson *et al.*, 2009).

La PEPCK está fundamentalmente regulada a nivel transcripcional (Hartwell *et al.*, 1999). En plantas C<sub>4</sub>, se regula por la intensidad luminosa (Echevarría *et al.*, 1990) a través de una cadena de señalización de la que se conocen numerosos componentes

(Giglioli-Guivarc'h *et al.*, 1996; Coursol *et al.*, 2000; Echevarría y Vidal, 2003; Monreal *et al.*, 2010a). Aunque la luz es el principal regulador, las respuestas a diferentes estreses como la salinidad o el estrés por amonio también pueden aumentar la expresión y la estabilidad de la PEPCK en sorgo (Monreal *et al.*, 2007a, 2007b; 2013a; Arias-Baldrich *et al.*, 2017). En plantas CAM, la síntesis de PEPCK depende de un oscilador circadiano que actúa en conjunción con el malato (Taybi *et al.*, 2004).

Nuestro grupo ha encontrado que la salinidad causaba un gran aumento de la actividad PEPCK en hojas de sorgo (Echevarría *et al.*, 2001; García-Mauriño *et al.*, 2003). Este fenómeno podría estar implicado en el reciclaje del CO<sub>2</sub> respiratorio y en la economía del carbono en unas condiciones en las que el aporte fotosintético de carbono reducido se ve drásticamente disminuido por el cierre estomático inducido por la sal. Diversas evidencias experimentales indicaban que, en parte, el aumento de la actividad PEPCK era consecuencia de una disminución de la velocidad de degradación de la proteína, y que estaba relacionado con un control negativo de la vía ubiquitina-proteasoma ejercido por el ABA (Monreal *et al.*, 2007a; Feria *et al.*, 2008). Algunos de los efectos del ABA en las células oclusivas de los estomas están mediados por NO (García-Mata y Lamattina, 2001). La salinidad aumentaba el NO en el mesófilo de las hojas de sorgo, y dicho aumento estaba, efectivamente, relacionado con la menor degradación de la PEPCK observada en dichas condiciones (Monreal *et al.*, 2013b).

En plantas C<sub>3</sub> la regulación de la PEPCK es similar a la de las plantas C<sub>4</sub>. Las PTPCs de plantas C<sub>3</sub> también son fosforiladas por la PEPCK en la serina del mismo dominio, y es la luz la que activa la síntesis de ésta (Duff y Chollet *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1996; Osuna *et al.*, 1996, 1999; Tripodi *et al.*, 2005; Murmu y Plaxton, 2007; Shane *et al.*, 2013; Feria *et al.*, 2016).

#### *Regulación por monoubiquitinación*

En 2008 fue descrita la regulación por monoubiquitinación de la PEPC en semillas de ricino en germinación, constituyendo el primer ejemplo de este tipo de regulación en una enzima metabólica de plantas (Uhrig *et al.*, 2008b). La adición de la molécula de ubiquitina a la subunidad de PEPC hace que ésta experimente un cambio de peso molecular de 107 a 110 kDa, y este cambio es detectable en una electroforesis en condiciones desnaturalizantes. De esta manera, en un inmunoblot se pueden distinguir dos bandas de PEPC a diferente altura que se corresponden con los denominados polipéptidos p107 y p110, en función de su tamaño. Según la cantidad de proteína a cada altura, se puede determinar la cantidad de proteína que se encuentra monoubiquitinada (Uhrig *et al.*, 2008b). La purificación de estas proteínas junto con estudios de espectrometría de masas permitió comprobar que se trataba de un heterotetrámero del tipo PEPC de clase 1 con dos subunidades p110 y dos p107 (Uhrig *et al.*, 2008b).



Además de en semillas de ricino, posteriormente se ha localizado PEPC monoubiquitinada en hojas y flores de ricino (O'Leary *et al.*, 2011a), raíces con proteoides de *Hakea prostrata* R. Br. (Shane *et al.*, 2013), semillas de sorgo en germinación (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014, 2016), hojas de arabisopsis (Figuroa *et al.*, 2016), raíces de sorgo (Arias-Baldrich *et al.*, 2017) y polen de *Lilium longiflorum* Thunb. (Igawa *et al.*, 2010). No se tiene constancia de monoubiquitinación en la PEPC C<sub>4</sub> ni en la BTPC.

Del mismo modo, esta doble banda de PEPC ha aparecido frecuentemente en diversos estudios antes de conocer antes de descubrirse su composición molecular y, por lo tanto, se puede considerar que existe PEPC monoubiquitinada en diferentes plantas, incluyendo hojas, células guarda, raíces y frutos de diferentes plantas C<sub>3</sub> (Denecke *et al.*, 1993; Law y Plaxton, 1997; De Nisi y Zocchi, 2000; Rao *et al.*, 2006) y raíces y semillas en germinación de arabisopsis, así como en semillas en desarrollo y germinación de cereales tales como trigo y cebada, además del ya mencionado anteriormente sorgo (Osuna *et al.*, 1996, 1999; González *et al.*, 1998; Nhiri *et al.*, 2000; Feria *et al.*, 2008).

En cuanto a su función fisiológica, aún es desconocida. Se conocen los efectos que esta PTM tiene sobre la PEPC en los diferentes tejidos estudiados, así como los cambios en el patrón de monoubiquitinación de la PEPC en distintas situaciones y estreses. La monoubiquitinación de la PEPC de semillas de ricino y de raíces con proteoides de *Hakea prostrata* tiene un efecto principalmente inhibitorio ya que aumenta su  $K_m$  (PEP) mientras que aumenta su sensibilidad a los inhibidores alostéricos, aunque también a los activadores (O'Leary *et al.*, 2011b). Se propuso que la fosforilación de la PEPC y la monoubiquitinación de la misma son PTMs mutuamente exclusivas, ya que presentan unos patrones totalmente opuestos, no coincidiendo ambas en ningún caso en la misma subunidad (O'Leary *et al.*, 2011a; Shane *et al.*, 2013), aunque posteriormente se describió que ambas modificaciones pueden coexistir *in vitro* en una misma subunidad de las isoenzimas SbPPC2, SbPPC3 y SbPPC4 de semillas de sorgo (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014; Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016).

En semillas de sorgo en germinación, se ha descrito un patrón muy definido de monoubiquitinación de la PEPC. En éste ocurre un aumento considerable de monoubiquitinación en las primeras horas de la germinación, coincidiendo con la emergencia de la radícula, y se mantiene durante el posterior periodo de división celular rápida y removilización de reservas, decayendo de nuevo cuando el coleóptilo inicia la formación de los tejidos fotosintéticos (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016). Esta monoubiquitinación tiene lugar en los residuos de lisina en posición 630, para la isoenzima SbPPC2, y 624, para SbPPC3 (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014, 2016), y no parece guardar relación con la actividad de la PEPC en las semillas de sorgo, que aumenta progresivamente durante todo el proceso de germinación (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016).

También se ha descrito un aumento en la monoubiquitinación de la PEPC de raíces de sorgo estresadas por amonio (Arias-Baldrich *et al.*, 2017). Y en estas condiciones la actividad de la PEPC aumenta. Por lo tanto, los distintos efectos que la monoubiquitinación tiene sobre la actividad de la PEPC según el tejido o la planta y la disparidad de resultados con respecto a la co-existencia junto a la fosforilación, sugiere que la monoubiquitinación de la PEPC posee una función fisiológica que aún se desconoce. La germinación de las semillas y el estrés por amonio en las raíces son dos contextos metabólicos donde la función anaplerótica de la PEPC puede ser muy relevante, lo cual indica que esta PTM podría actuar en situaciones caracterizadas por alta tasa metabólica y gran actividad proteolítica.

#### *Regulación por ácido fosfatídico*

En 2004, Testerink y colaboradores pusieron por primera vez de manifiesto, utilizando extractos proteicos procedentes de cultivos celulares de arabis y tomate (*Solanum lycopersicum* L.), la interacción entre el PA y distintas isoenzimas de PEPC. También mostraron que la afinidad de la PEPC por el PA es mayor que por otros lípidos (Testerink *et al.*, 2004; Testerink y Munnik, 2005). En concreto, en tomate son las isoenzimas S1PPC1 y S1PPC2 las que se unen al PA, mientras que en arabis son AtPPC1 y AtPPC3, sugiriendo cierta especificidad en la interacción (Testerink *et al.*, 2004). Luego también se observó que el sometimiento de estas células a estrés hipoosmótico o al elicitor fúngico xilanasas también aumentaba el grado de unión del PA a la PEPC. Por lo tanto, esta interacción podría tener un papel en la respuesta de la planta a estreses ambientales (Zhang *et al.*, 2005).

Posteriormente, se describió que el PA también se une a la PEPC de tipo C<sub>4</sub> o fotosintética de sorgo (Monreal *et al.*, 2010b). En este estudio, la PEPC C<sub>4</sub> de sorgo semipurificada se inhibió catalíticamente tras la adición de PA, tanto en su forma fisiológica como en su forma soluble. El estado de fosforilación de la enzima, el pH o la presencia de metabolitos reguladores o de PEP no influyeron en esta inhibición. Además, se observó la presencia de PEPC en la fracción de membrana, detectándose múltiples bandas de PEPC que indican que ésta se encuentra parcialmente proteolizada o modificada (Monreal *et al.*, 2010b). Más tarde se averiguó que el PA induce la exposición del C-terminal de la PEPC hacia el exterior de la misma, y en consecuencia se activa un mecanismo de degradación a través de una cisteín-proteasa que hasta el momento no ha sido identificada (Gandullo, 2010). Con todos estos resultados, se propuso que una posible función de la interacción del PA con la PEPC fuera el reclutamiento de ésta a la membrana, y que dicho proceso podría estar relacionado con su degradación proteolítica.

### Regulación dependiente de NO

En sendos estudios en los que se llevaban a cabo análisis proteómicos se ha identificado a la PEPC de *Arabidopsis* (Lindermayr *et al.*, 2005) y a la de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Abat *et al.*, 2008), una planta C<sub>3</sub> y una planta CAM, respectivamente, como diana de la S-nitrosilación. Son los dos únicos casos en los que se ha descrito la S-nitrosilación de la PEPC, y no existe información sobre la nitrosilación de la enzima de tipo C<sub>4</sub> o fotosintética.

Por otro lado, existe un estudio en el que el tratamiento con donadores de NO aumenta la actividad PEPC en plantas de arroz transgénicas que sobreexpresan la PEPC C<sub>4</sub> de maíz (Chen *et al.*, 2014), aunque la S-nitrosilación de la PEPC no se midió. En este mismo arroz transgénico, se ha descrito una implicación del NO en la regulación de la PEPC y de la PEPC en la respuesta a estrés hídrico, de manera que aumenta la expresión de ambas y, por consiguiente, la actividad PEPC (Qian *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017b). Además, la salinidad incrementa selectivamente la producción de NO en las células de mesófilo del sorgo, lo que tiene repercusión sobre la estabilidad de la PEPC, aumentando su actividad. Por el contrario, si se trata la planta con un eliminador de NO como es el 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-óxido-3-óxido (cPTIO) este efecto sobre la PEPC se revierte, confirmando la regulación por NO (Monreal *et al.*, 2013b).

### 2.5. Degradación de la PEPC

Aunque la PEPC ha sido profundamente estudiada en diversos aspectos tales como su enzimología, estructura, expresión, regulación o evolución molecular, y se han descrito funciones fisiológicas relevantes en las que participa, de momento no se conoce ninguna ruta de proteólisis controlada de la proteína. No obstante, sí se ha observado proteólisis de la PEPC en varias ocasiones y contextos. Diversos estudios han mostrado que el extremo N-terminal de la enzima es susceptible a ser proteolizado *in vitro* durante la purificación de ésta en ausencia de inhibidores de proteasas, produciendo alteraciones en sus propiedades cinéticas (Chollet *et al.*, 1996; Moraes y Plaxton, 2000; Blonde y Plaxton, 2003).

Esta proteólisis del extremo N-terminal fue estudiada más a fondo en semillas de ricino y se identificó una asparaginil endopeptidasa que cataliza *in vitro* la eliminación de aproximadamente 120 aminoácidos en este extremo N-terminal. Sin embargo, esta proteólisis se produce *in vitro* en presencia de ditioneitol (DTT) y alta concentración de sales. *In vivo*, esta proteólisis sólo se localiza al final del periodo de maduración de la semilla de ricino, cuando la concentración y la actividad PEPC se ven reducidas drásticamente (Crowley *et al.*, 2005).

También se conoce que al menos una parte del total de proteína PEPC es degradada mediante el sistema poliubiquitina-proteasoma (Schulz *et al.*, 1993). En *Vicia faba* L., la PEPC de las células guarda son proteolizadas mediante este mismo sistema durante el cierre estomático, en una vía de señalización en la que participa el inositol-1,4,5-trifosfato, que a su vez es inducido por ABA (Klockenbring *et al.*, 1998).

Aunque el efecto principal de la salinidad en hojas de sorgo es aumentar la actividad PEPC, también activa mecanismos que disminuyen la proteólisis de la PEPC (García-Mauriño *et al.*, 2003). Como ya se ha mencionado, las PTMs relacionadas con el NO regulan en muchos casos la estabilidad de las proteínas. En este sentido, la salinidad aumenta la síntesis de NO específicamente en las células del mesófilo de las hojas de sorgo (Monreal *et al.*, 2013b). Dicho fenómeno podría ser el responsable del cambio de estabilidad de la PEPC.

Por otro lado, nuestro grupo ha caracterizado la degradación de la PEPC C<sub>4</sub> por una cisteín-proteasa en un proceso que depende de la exposición del extremo C-terminal de la proteína (Gandullo, 2010). El extremo C-terminal de la PEPC tiene una secuencia altamente conservada que incluye los últimos 19 aminoácidos normalmente inmersos en un bolsillo hidrofóbico de la proteína y, por tanto, poco expuestos. Dicha secuencia regula la degradación de la PEPC por la citada proteasa. La interacción del PA con la PEPC aumenta la exposición del extremo C-terminal, por lo que representa un posible mecanismo de activación *in vivo* de la proteólisis de la PEPC. Ésta podría estar asociada con el recambio de PEPC degradada en condiciones de estrés que, en muchos casos, se ha documentado que causan la activación de la fosfolipasa D y la síntesis de PA.

### 3. AUTOFAGIA EN PLANTAS

La autofagia es un mecanismo universal que poseen las células eucariotas para reciclar nutrientes, degradar componentes dañados o tóxicos, o para reciclar materiales celulares como paso previo a la muerte celular (Bassham, 2007). En plantas, han sido descritos dos vías principales de autofagia: la microautofagia y la macroautofagia. En la microautofagia, el material es engullido directamente por la vacuola mediante una invaginación del tonoplasto, liberando su lumen una vesícula que contiene los componentes citoplasmáticos (Bassham, 2007). Este proceso puede ser selectivo o no selectivo en cuanto a los componentes transportados a la vacuola (Schreiber y Peter, 2014). Se han observado procesos microautofágicos durante la acumulación de proteínas de almacenamiento en semillas de trigo en desarrollo y también en la degradación de gránulos de almidón y proteínas de almacenamiento que ocurre en semillas en germinación de plantas del género *Vigna* (Bassham, 2007). Durante el desarrollo de la planta, en las células meristemáticas carentes de vacuola, se ha sugerido que la microautofagia podría ser responsable del transporte directo desde el

citosol a la provacuola de componentes necesarios para la maduración de ésta (Bassham *et al.*, 2006). También se ha descrito su implicación en procesos de senescencia (Bassham *et al.*, 2006; Floyd *et al.*, 2015) y en la degradación de los peroxisomas y de partes del núcleo, denominadas pexofagia y nucleofagia respectivamente (Schreiber y Peter, 2014).

La macroautofagia es el proceso autofágico más ampliamente estudiado y utilizado por las plantas, cuyo término es normalmente simplificado por la comunidad científica refiriéndose a ella simplemente como autofagia. A diferencia de la microautofagia, se inicia en el citoplasma con la formación de membranas en forma de copa, denominados fagoforos, que encierran el material que va a ser degradado (Bassham, 2007). Recientemente se ha propuesto que el origen de estas membranas en plantas proviene del retículo endoplasmático (Zhuang *et al.*, 2016, 2017). Estos fragmentos de membrana van alargándose y finalmente se fusionan entre ellos para formar un autofagosoma de doble membrana que contiene el material citoplasmático a degradar. Posteriormente, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el tonoplasto, liberando hacia el interior de la vacuola un cuerpo autofágico constituido por la membrana interna y el contenido a degradar en el interior. Las hidrolasas ácidas vacuolares se encargan de degradar el cuerpo autofágico, y los productos de la degradación son transportados de nuevo al citosol (Bassham, 2007).

La autofagia ha sido un tema de estudio al alza en el campo de la fisiología vegetal en los últimos años, y se ha descrito su implicación en prácticamente todos los aspectos del ciclo de vida de las plantas, y especialmente en respuesta a estreses. La autofagia puede ser un proceso no selectivo que se encarga de la degradación masiva de elementos citosólicos, o bien puede ocurrir la autofagia selectiva, un proceso del cual se han descrito numerosos elementos que se encargan de la señalización en esta vía para que el cargo –o elemento a degradar– sea encerrado dentro del autofagosoma. Los tipos de cargo pueden ser llamativamente diversos: proteínas específicas, complejos moleculares como los ribosomas o proteasomas, agregados proteicos, fragmentos del retículo endoplasmático o del núcleo, orgánulos enteros (mitocondria, peroxisomas y cloroplastos) e incluso patógenos invasores (Marshall y Vierstra, 2018).

### **3.1. La maquinaria autofágica**

A partir de numerosos estudios en una gran variedad de organismos durante las últimas dos décadas, se ha logrado conocer en su mayor parte el funcionamiento del mecanismo de autofagia. Entre estos estudios, los de Yoshinori Ohsumi, premiado con el Premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2016, y colaboradores fueron particularmente importantes porque identificaron el loci *ATG* (*AUTOPHAGY-RELATED*) en levaduras, que es esencial para la macro- y microautofagia, la degradación de los peroxisomas y la vía de señalización citoplasma-vacuola (Ohsumi,

2001). El análisis de más de 40 proteínas reveló una ruta canónica para la macroautofagia, con varios componentes compartidos con la microautofagia. Varios de estos componentes forman parte de complejos que se encargan de estimular la inducción de la autofagia escalonadamente en función del estado de desarrollo o nutricional de la célula. Las fases en las que se divide la autofagia son: inducción, reclutamiento de membrana, nucleación de la vesícula, expansión del fagoforo y cierre, fusión del autofagosoma con la vacuola, y por último rotura de la membrana del autofagosoma y digestión de su contenido (**Fig. 8**).

Durante la investigación de la autofagia en plantas ha sido de especial importancia el hecho de que la mayoría de proteínas ATG de levaduras tiene claros ortólogos en especies como *Arabidopsis*, arroz, maíz, tabaco, mijo [*Setaria itálica* (L.) P. Beauv.] y el alga *Chlamydomonas reinhardtii*, lo que ha facilitado un rápido entendimiento de este sistema vegetal. Además, varias de las proteínas de plantas son codificadas por pequeñas familias génicas, lo que implica que ha habido una expansión del sistema de plantas y/o una división de funciones de algunos componentes individuales (Marshall y Vierstra, 2018).

### 3.1.1. Inducción

Como se muestra en la **Fig. 8**, la autofagia comienza cuando ambas señales, nutricional y de desarrollo, convergen para provocar el ensamblaje del complejo ATG1 quinasa. En este proceso es especialmente importante el regulador negativo TOR (*target of rapamycin*), que es una quinasa serina/treonina que junto con sus efectores Raptor y Lst8 (*lethal with sec thirteen protein 8*) se encuentra activa en condiciones de nutrición suficiente (Dobrenel *et al.*, 2016). En esta situación, TOR activa el crecimiento celular y la traducción de proteínas, y reprime la autofagia; pero en condiciones de deficiencia nutricional TOR está inactivo (Dobrenel *et al.*, 2016).

La quinasa TOR es capaz de bloquear la autofagia mediante la fosforilación de ATG13, que es un activador de ATG1. Esta fosforilación hace que ATG13 no pueda asociarse con ATG1, mientras que si TOR es inactivado ocurre una rápida desfosforilación de ATG13, lo que permite la unión a ATG1 (**Fig. 8**) (Suttangkakul *et al.*, 2011). En consecuencia, la sobreexpresión de TOR en plantas suprime la autofagia, mientras que la inactivación de TOR mediante silenciamiento por ARNi, inhibidores químicos como la rapamicina y AZD8055, o la delección de los genes de Raptor o Lst8 intensifican la autofagia (Liu y Bassham, 2010; Pu *et al.*, 2017). Sin embargo, recientemente se ha puesto en evidencia que existe otra vía de activación de autofagia independiente de TOR que es inducida por estrés oxidativo o por estrés del retículo endoplasmático (Pu *et al.*, 2017).

La proteína quinasa A (PKA) y SnRK1 (*sucrose non-fermenting 1-related kinase 1*) proporcionan alternativas adicionales al regular la inducción de la autofagia en pasos

previos al de TOR. Por ejemplo, la sobreexpresión y el silenciamiento mediado por ARNi de la subunidad catalítica de SnRK1, llamada AKIN10, acelera y reprime respectivamente la inducción de la autofagia bajo condiciones de falta de nutrientes (Marshall y Vierstra, 2018). Además, existen otros dos componentes del complejo quinasa ATG1/ATG13, ATG11 y ATG101, que sirven de conexión entre este complejo y otros elementos posteriores de la vía autofágica, estimulando su función a través de eventos de fosforilación (Suttangkakul *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014).

En arabidopsis, ATG1 tiene tres isoformas: ATG1a, ATG1b y ATG1c; ATG13 posee dos: ATG13a y ATG13b. Los genes *ATG1a* y *ATG13a* son los que más se expresan entre sus parálogos. La expresión de *ATG1b* y *ATG1c* se localiza mayoritariamente en el polen (Suttangkakul *et al.*, 2011). *ATG11* y *ATG101*, junto con *ATG1a* y *ATG13a* y *ATG13b* se expresan ampliamente en numerosos tejidos de arabidopsis y en varios estadios de desarrollo (Li *et al.*, 2014).

### 3.1.2. Reclutamiento de membrana

El reclutamiento de membrana es uno de los pasos que son activados por el complejo ATG1/ATG13, siendo esencial la presencia de ATG11 en él (Kang *et al.*, 2018). En este paso, se distribuyen lípidos por el fagoforo, lo cual es dirigido por la proteína transmembrana ATG9 junto con sus factores cíclicos, ATG2 y ATG18 (Xiong *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2017), aunque la función de estos últimos aún no se conoce con precisión. Se ha descrito en arabidopsis que ATG9 regula el transporte de membrana desde el retículo endoplasmático, siendo la isoforma ATG18a la que efectúa este transporte hacia el autofagosoma, un transporte que también es dependiente de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Zhuang *et al.*, 2017). Luego de cumplir su función y una vez que el autofagosoma está completo, tanto ATG9 como ATG18a son reciclados y disociados de éste (Zhuang *et al.*, 2017). En cualquier caso, el retículo endoplasmático no es el único origen de la membrana autofágica, ya que en algunos mutantes *atg9* no se bloquea por completo el flujo autofágico, observándose señales de membrana autofagosómica no relacionadas con el retículo endoplasmático (Zhuang *et al.*, 2017).

De ATG2 se sabe que en levaduras interacciona con ATG9 en el complejo ATG9/ATG18 y que su función es llevada a cabo en un paso posterior al de éstos, durante la biogénesis de las vesículas autofágicas (Kang *et al.*, 2018). Además, en arabidopsis el fenotipo mutante *atg2* es más severo que el de *atg9* y *atg11*, y acumula numerosas vesículas autofágicas que no pueden ser transportadas a la vacuola (Kang *et al.*, 2018).

Mientras que ATG2 y ATG9 son codificados por genes únicos, ATG18 posee hasta 8 isogenes en arabidopsis (Di Berardino *et al.*, 2018) y 10 en maíz, aunque dos de ellos son transcripcionalmente inactivos (Li *et al.*, 2015). Además, se ha descrito que los

mutantes *atg18a* de *arabidopsis* son más sensibles al estrés salino e hídrico que el silvestre (Liu *et al.*, 2009).

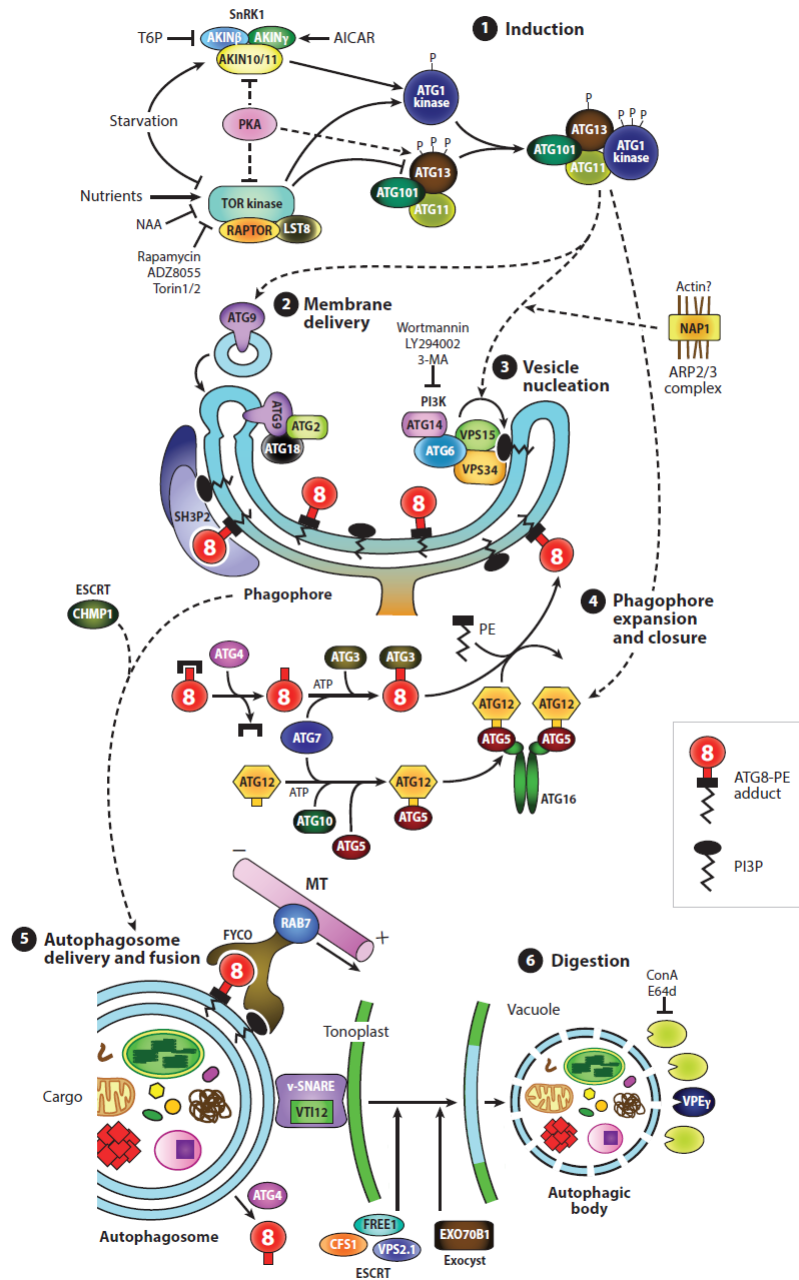
### 3.1.3. Nucleación de la vesícula

La nucleación de la vesícula o fagoforo incipiente ocurre cuando los fragmentos de membrana reclutados en los pasos anteriores por el complejo ATG9/ATG18 comienzan a ensamblarse y a tomar forma de copa en su conjunto. Este paso implica el recubrimiento del fagoforo con fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) por parte de un complejo que contiene la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de clase III, VPS34 (*vacuolar protein sorting 34*), ATG6 (también denominada VPS30 y Beclin1), ATG14 o VPS38, y VPS15 (**Fig. 8**). En concreto, este complejo es responsable de fosforilar al lípido fosfatidilinositol, formando el PI3P (Marshall y Vierstra, 2018). Los mutantes de *arabidopsis* deficientes en VPS34, ATG6 o VPS15 son letales (Marshall y Vierstra, 2018).

No obstante la regulación de este proceso de nucleación, en el que ATG6 parece tener un papel fundamental, aún no está bien definido en plantas (Qi *et al.*, 2017). En mamíferos, se conoce que el homólogo de ATG1 fosforila al homólogo de ATG6 y esto hace que se estimule la producción de PI3P por parte de la PI3K. Este PI3P actúa como sitio de reconocimiento o acoplamiento para otras proteínas reguladoras y como un complejo quinasa de lípidos que facilita la nucleación de las membranas autofágicas (Qi *et al.*, 2017). En *arabidopsis* una de las proteínas reclutadas por el PI3P es SH3P2 (*SH3 domain-containing protein 2*), que también se une a ATG8 y que participa activamente en el proceso de deformación de la membrana necesario en la nucleación (**Fig. 8**) (Zhuang *et al.*, 2013).

Es importante tener en cuenta que no todas las proteínas autofágicas tienen que ser específicas de esta vía, sino que pueden actuar simultáneamente en otro proceso. ATG6 es el ejemplo mejor conocido que presenta esta situación. En levaduras se conoce que es esencial para el transporte biosintético a la vacuola (Bassham, 2007). Y en plantas, parece que también es una proteína multi-funcional. Un mutante *knockout atg6* de *arabidopsis* es defectuoso en la germinación del tubo polínico, probablemente debido a un defecto en el tráfico vacuolar, y en tabaco se ha descrito una implicación de ATG6 en la regulación de la muerte celular programada (Bassham, 2007). En cualquier caso, la regulación de ATG6 es sometida a un control estricto por parte de varios componentes de distintas vías. Dentro de la vía de la autofagia, aparte de su interacción con el complejo de ATG1/ATG13, y con los componentes de su complejo de fosforilación de lípidos, la estabilidad de ATG6 también está regulada en *arabidopsis* por proteínas de la familia TRAF (*tumor necrosis factor receptor-associated factor*) (Qi *et al.*, 2017).





**Figura 8. Representación esquemática de los pasos conocidos o propuestos en autofagia.** 1. Inducción; 2. Reclutamiento de membrana; 3. Nucleación de la vesícula; 4. Expansión del fagoforo y cierre; 5. Fusión del autofagosoma con la vacuola; 6. Digestión. Casi todos los componentes representados (excepto ATG16 y PKA) han sido investigados formalmente en plantas. 3-MA: 3-metiladenina; AICAR: 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido monofosfato; ATG: *autophagy-related*; ConA: concanamina A; ESCRT: *endosomal sorting complexes required for transport*; MT: microtúbulo; NAA: ácido 1-naftalenoacético; PE: fosfoatidiletanolamina; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa; PI3P: fosfatidilinositol-3-fosfato; PKA: proteína quinasa A; SNARE: *soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*; SnRK1: *sucrose non-fermenting 1-related kinase*; T6P: trehalosa-6-fosfato; TOR: *target of rapamycin* (Marshall y Vierstra, 2018).

### 3.1.4. Expansión del fagoforo

Una vez que los fragmentos de membrana se han ensamblado, el siguiente paso de la vía autofágica consiste en completar la formación del autofagosoma mediante su expansión y cierre. Para ello, ocurre un proceso de conjugación análogo al del sistema de ubiquitina que termina con el fagoforo recubierto con la proteína *ubiquitin-like* ATG8, conocida en animales como MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) o GARABAP (*gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein*). Esta proteína primariamente se encuentra en forma de precursor inactivo, hasta que es procesada por la cisteín-proteasa ATG4, que la corta en su C-terminal de modo que queda expuesta una glicina muy conservada entre todos los miembros de la familia de ATG8 (Yoshimoto *et al.*, 2004). Entonces, la proteína ATG8 madura es activada en esta glicina por la proteína ATG7, siendo esta reacción dependiente de ATP; y luego es transferida a la enzima conjugadora ATG3. Por último, un complejo ligasa hexamérico formado por ATG5, ATG16 y una segunda proteína *ubiquitin-like*, ATG12, se encarga de conectar ATG8 con el lípido fosfatidiletanolamina (PE) a través de un enlace éter. Mediante el PE, ATG8 queda unido a la membrana del autofagosoma (**Fig. 8**) (Marshall y Vierstra, 2018).

Para el montaje del complejo ligasa también es requerida la proteína ATG7, que junto con la enzima conjugadora ATG10 se encargan de unir la glicina C-terminal de ATG12 a una lisina conservada de ATG5 (**Fig. 8**). Este conjugado entre ATG12 y ATG5 posteriormente se une a la proteína dimerica de andamiaje ATG16, que se encarga de mantener al conjugado cerca del fagoforo para estimular la lipidación de ATG8 (**Fig. 8**) (Doelling *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2008; Chung *et al.*, 2010).

El aducto ATG8-PE recubre todo el fagoforo en expansión y ayuda a cerrar la vesícula reclutando, junto con PI3P, a proteínas con dominio SH3 como SH3P2. Los dímeros de SH3P2 cooperan para estimular la curvatura del fagoforo usando el dominio SH3 para unirse a PI3P y el dominio curvado BAR (*bin/amphiphysin/rysin*) para deformar la membrana (Zhuang *et al.*, 2013). Finalmente, los aductos ATG8-PE que se encuentran dispuestos hacia fuera, en la membrana externa, son deslipidados por ATG4 y liberados para su reutilización (Yoshimoto *et al.*, 2004), mientras que aquellos que quedan atrapados dentro del autofagosoma al encontrarse en la membrana interna son digeridos por la vacuola.

Hay que añadir que ATG8, así como ATG5, también se han localizado en la membrana de las invaginaciones del tonoplasto durante la microautofagia (Thompson *et al.*, 2005; Floyd *et al.*, 2015).

En el caso de ATG4, en *Arabidopsis* se ha descrito que está regulado por el estado redox, ya que la actividad de ambas isoformas es reversiblemente inhibida *in vitro* por ROS (Woo *et al.*, 2014). El mismo efecto se ha demostrado en *Chlamydomonas* (Pérez-

Pérez *et al.*, 2016). En *Arabidopsis* coexisten dos isoformas de este gen, *ATG4a* y *ATG4b* (Yoshimoto *et al.*, 2004), mientras que *ATG5* y *ATG7* son genes únicos cuyos mutantes *knockout* suelen ser los más utilizados para estudiar plantas deficientes en autofagia (Zhou *et al.*, 2013) aunque el mutante *ATG2* es más severo (Kang *et al.*, 2018). *ATG12a* y *ATG12b* son las dos isoformas en *Arabidopsis* (Chung *et al.*, 2010). En cuanto a *ATG8*, en general existen diversas isoformas que incluso se separan en clados específicos a nivel de familia (Kellner *et al.*, 2016). En *Arabidopsis* existen 9 isoformas (*ATG8a-i*), y con diferente patrón de expresión y funciones entre ellas (Thompson *et al.*, 2005; Sláviková *et al.*, 2005), y el sorgo es una de las plantas vasculares con menos isoformas: solo 3 (Kellner *et al.*, 2016).

En todo el proceso de formación del autofagosoma parece ser que la actina también participa, ya que se ha descrito una implicación del complejo de nucleación de actina ARP2/3 (*actin-related protein 2/3*), junto con NAP1 (*NCK-associated protein 1*) (Marshall y Vierstra, 2018). Además, hay evidencias de una implicación de la actina en los pasos concernientes a *ATG11* y *ATG9* en levaduras, así como en gran parte de proceso de formación del autofagosoma en mamíferos (Coutts y La Thangue, 2016). Es también importante señalar que se ha demostrado que *ATG8* y *ATG1* interactúan, evidenciando así constante conexión e interacción entre todos los pasos de la formación del autofagosoma (Suttangkakul *et al.*, 2011), además de la posibilidad de que el complejo *ATG1/ATG13* también participe en los pasos finales de la autofagia (Michaeli *et al.*, 2015)

### 3.1.5. Transporte y fusión del autofagosoma a la vacuola

Una vez formados y recubiertos de *ATG8* y *PI3P*, los autofagosomas son transportados a la vacuola probablemente usando la red de microtúbulos controlada por la maquinaria ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*), y se fusionan con el tonoplasto mediante los factores v-SNARE (*vesicular soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), que están relacionados con dicha maquinaria (**Fig. 8**) (Marshall y Vierstra, 2018). Una vez producida esta fusión con la membrana externa del autofagosoma, el cuerpo autofágico es liberado dentro de la vacuola.

Otros componentes de los que se ha descrito su implicación en el transporte y fusión a la vacuola son la proteína de exocitosis EXO70B1 y los siguientes componentes de la maquinaria ESCRT: CFS1 (*cell death-related endosomal fyve/sylyf protein 1*), VPS2.1 (*vacuolar protein sorting 2.1*) y FREE1 (*fyve-domain protein required for endosomal sorting 1*) (Marshall y Vierstra, 2018). Este último, FREE1, se une a *PI3P* y se puede asociar a *ATG6* en el complejo *PI3K* (Gao *et al.*, 2015).

### 3.1.6. Degradación del autofagosoma

Una vez que los cuerpos autofágicos son depositados en el interior de la vacuola, su membrana y contenido son degradados por una multitud de hidrolasas vacuolares activas contra lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos. Una proteasa destacada es la proteasa *caspase-like* VPE- $\gamma$  (*vacuolar processing enzyme  $\gamma$* ), que es capaz de activar numerosas proenzimas y que está regulado positivamente durante la senescencia en células que están sometidas a mega-autofagia (**Fig. 8**) (Marshall y Vierstra, 2018).

### 3.2. Autofagia selectiva

Inicialmente se consideraba que la autofagia era un proceso no selectivo, es decir, un proceso de degradación masiva donde los autofagosomas formados encerraban porciones aleatorias del citoplasma para transportarlos a la vacuola para su degradación y consiguiente reutilización de nutrientes (aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos) por la misma célula o para su exportación a otras partes de la planta (Bassham, 2007, 2014). Y de hecho, está descrito que este mecanismo ocurre al menos durante la respuesta a falta de nutrientes y durante la senescencia (Bassham *et al.*, 2006; Guiboileau *et al.*, 2012), muy probablemente mediante señalización por SnRK1, TOR y ATG1 (Marshall y Vierstra, 2018). Además, la autofagia también se encuentra activa a un nivel basal en todas las células vegetales y en todos los estadios del desarrollo, presumiblemente eliminando desechos celulares (Marshall y Vierstra, 2018).

No obstante, durante la última década ha venido volviéndose cada vez más obvio el hecho de que existen varias rutas de autofagia selectiva. En general, esta selectividad o especificidad viene mediada por la forma lipidada de ATG8, que tiene la capacidad de asociarse a un gran número de receptores autofágicos con afinidad por un cargo específico (Marshall y Vierstra, 2018). Esta asociación se produce a través de un motivo de interacción que poseen numerosas proteínas denominado AIM (*ATG8-interacting motif*) (Noda *et al.*, 2010). Este motivo consiste en una secuencia consenso central, W/F/Y-X-X-V/I/L, que a menudo aparece rodeada por residuos ácidos (Noda *et al.*, 2010). Como se ha mostrado recientemente en una estructura por cristalografía de la isoforma ATG8CL de patata (*Solanum tuberosum* L.) unida a la secuencia AIM del efector PexRD54 de *Phytophthora infestans*, el motivo se une a un dominio hidrofóbico de la proteína ATG8 conocido como LDS (*LIR/AIM docking site*), que se caracteriza por dos bolsillos hidrofóbicos que acomodan a los grupos W/F/L y V/I/L (Maqbool *et al.*, 2016). A partir de la secuencia consenso, se han desarrollado herramientas *in silico* para predecir motivos AIM en las secuencias proteicas (Kalvari *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2016), pero éstas todavía tendrían que ser validadas experimentalmente debido a la naturaleza cambiante de esta secuencia corta.

En los últimos años se ha ido ampliando el catálogo de proteínas que contienen algún AIM, muchas de las cuales son receptores de cargos. Curiosamente, algunas de estas proteínas también tienen afinidad por la ubiquitina, lo cual entrelaza de manera consistente a la ubiquitinación con la autofagia. Todos estos receptores de cargos proporcionan mecanismos para eliminar proteínas específicas, complejos proteicos, agregados proteicos, orgánulos e incluso patógenos invasores (Marshall y Vierstra, 2018). Además, como algunos de los propios componentes de la formación del autofagosoma contienen AIMS (ATG1, ATG3 y ATG11), la interacción resultante con ATG8 sirve para auto-regular negativamente la autofagia a través de la auto-degradación (Marshall y Vierstra, 2018).

### 3.2.1. NBR1

Como se ha mencionado anteriormente, la autofagia selectiva se produce a través de receptores de cargos o adaptadores que median la unión indirecta del cargo a degradar con proteínas de la maquinaria autofágica como ATG8. Los primeros receptores de cargos fueron identificados en mamíferos: p62, NDP52 y Nix/Bnip3L (Svenning *et al.*, 2011), y posteriormente se caracterizó NBR1 (*neighbor of BRCA1 gene*) como un receptor de cargo que cooperaba con p62 en la degradación autofágica de sustratos ubiquitinados (Svenning *et al.*, 2011).

p62 actúa en mamíferos como un receptor para la degradación autofágica de agregados proteicos, proteínas solubles, anillos del cuerpo medio, mitocondrias dañadas, peroxisomas, bacterias intracelulares, remanentes de membranas fagocíticas, precursores bacteriocidas y proteínas de la cápsida de virus (Svenning *et al.*, 2011). A NBR1 se le suponen funciones parecidas ya que ambas proteínas comparten una organización de sus dominios similar, con el mismo dominio PB1 N-terminal seguido de un dominio dedos de zinc de tipo ZZ, un dominio LIR (equivalente al motivo AIM en mamíferos) y un dominio UBA (*ubiquitin-associated*) que puede interactuar con mono- y poliubiquitinación (Svenning *et al.*, 2011). La diferencia principal entre ambas proteínas es que el dominio N-terminal de p62 confiere capacidad de polimerización de la proteína mientras que el de NBR1 no (aunque ésta lo hace a través de otro dominio), formando un homo-oligómero determinante para la degradación por autofagia. Sin embargo, NBR1 sí puede interactuar con p62 a través de su dominio N-terminal, formando un heterodímero (Svenning *et al.*, 2011).

En ensayos de *pull-down* con GST (glutatión S-transferasa), el dominio UBA de NBR1 de mamíferos aislado interactúa fuertemente con GST monoubiquitinado y con GST poliubiquitinado (4 moléculas de ubiquitina), mientras que la proteína completa NBR1 se une débilmente a GST poliubiquitinado y no se une a la forma monoubiquitinada (Kirkin *et al.*, 2009). Por su parte, p62 se une mucho más

fuertemente a sustratos mono- o multiubiquitinados que su dominio UBA aislado (Kirkin *et al.*, 2009).

En plantas se puso de manifiesto la existencia de un homólogo de NBR1 mientras que no existe ninguno de p62. Sin embargo, el homólogo de NBR1 de plantas tiene propiedades funcionales más parecidas a p62 de mamíferos que a su homólogo NBR1 (Svenning *et al.*, 2011). Estas propiedades son la polimerización a través del dominio PB1 N-terminal, requerida para una unión eficiente a ubiquitina, y que esta unión se produce a través del dominio UBA. En concreto, NBR1 de plantas posee dos dominios UBA, UBA1 y UBA2, pero sólo el segundo tiene las mismas propiedades de unión a ubiquitina que el dominio UBA de mamíferos; el dominio UBA1, presente en todas las plantas vasculares, licófitos y musgos, tiene función desconocida ya que no puede unirse a ubiquitina (Svenning *et al.*, 2011).

La proteína NBR1 de *A. thaliana* (AtNBR1) puede unirse selectivamente a seis de las isoformas ATG8 de la planta mediante su dominio AIM. Por consiguiente, y en conjunto con su capacidad de unión a ubiquitina y el alto grado de conservación de su dominio UBA, AtNBR1 y la ubiquitina parecen tener un rol importante en la autofagia selectiva en plantas.

### 3.2.2. Tipos de autofagia selectiva

Aparte de la degradación por autofagia selectiva de proteínas concretas, recientemente ha sido objeto de estudio la degradación por autofagia selectiva de ciertos orgánulos o complejos moleculares. A continuación se presenta un resumen de las principales vías de autofagia selectiva.

#### *Agregafagia*

La agregafagia consiste en la degradación por autofagia selectiva de agregados proteicos potencialmente citotóxicos que se encuentran en el medio celular y que son demasiado grandes como para ser degradados por el proteasoma. Esta ruta se basa en la ubiquitinación como señal, y se ha descrito un papel principal de NBR1 como mediador entre la autofagia y los agregados (Marshall y Vierstra, 2018).

#### *Clorofagia*

Consiste en la degradación de los cloroplastos por autofagia. Existen distintos tipos de clorofagia, dependiendo del estado del cloroplasto o de las necesidades nutricionales. El tipo de clorofagia más llamativo es la encapsulación de cloroplastos enteros en vesículas recubiertas por ATG8, proceso que es estimulado cuando los cloroplastos acumulan un alto grado de daño foto-oxidativo y que parece que también viene señalizado por ubiquitina (Izumi *et al.*, 2017).

Otro tipo de clorofagia consiste en la rápida degradación por autofagia de RCBs (*rubisco-containing bodies*) (**Fig. 9**), constituyendo una forma rápida de degradar gran cantidad de proteína, al ser la rubisco la proteína más abundante, y removilizar mucho nitrógeno, especialmente durante la senescencia hacia tejidos en desarrollo y semillas. La formación de los RCBs depende del estado de los niveles de carbono en la hoja, y no sólo contienen rubisco sino también otras proteínas del estroma como la glutamina sintetasa, pero no proteínas del tilacoide ni la membrana del cloroplasto (Marshall y Vierstra, 2018).

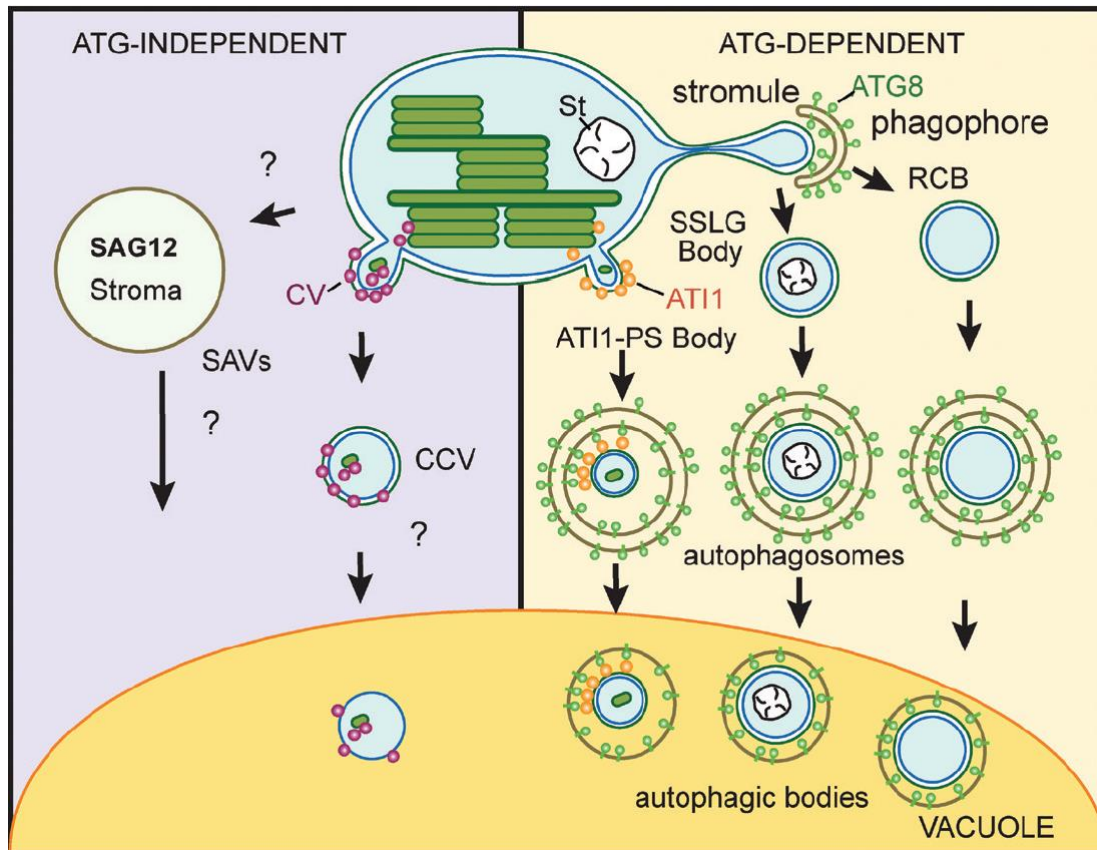
Una tercera ruta de clorofagia depende de las proteínas ATI1 (*ATG8-interacting protein 1*) y ATI2 (**Fig. 9**), que se localizan en los plastos y en el retículo endoplasmático y que se asocian a cuerpos vesiculares que aparecen en el citoplasma durante deficiencia de carbono o estrés salino. A diferencia de los RCBs, éstos transportan a la vacuola proteínas de membrana bien de la envuelta externa o bien de los tilacoides. Dado que AT1 también puede unirse a ATG8 a través de un motivo AIM, parece claro que actúa como un receptor de cargo especializado en la clorofagia (Michaeli *et al.*, 2014; Marshall y Vierstra, 2018).

Otro tipo de clorofagia es aquella que degrada los denominados SSLGs (*small starch-like granules*) (**Fig. 9**). A pesar de que la mayor parte del almidón es degradado en el cloroplasto, esta vía constituye una forma de hacerlo de manera rápida en la vacuola, a través de vesículas dependientes de autofagia. Para ello, estos SSLGs contienen proteínas que regulan esta vía, y la vacuola contiene  $\beta$ -amilasa para poder llevar a cabo este tipo de degradación (Otegui, 2018).

Alternativamente, se han descrito dos tipos de degradación de componentes del cloroplasto que son independientes de autofagia. En uno de ellos participan las SAVs (*senescence-associated vacuoles*) (**Fig. 9**) que aparecen cuando se induce la senescencia foliar. Se han denominado vacuolas porque poseen un lumen ácido y la misma pirofosfatasa, aunque es cierto que son más ácidas y carecen de la acuaporina  $\gamma$ -TIP que sí está presente en la vacuola central (Otegui, 2018). Se ha reconocido a la cisteína-proteasa SAG12 como específica de estos orgánulos, aunque no es la única proteasa que se encuentra en ellos. Entre los componentes encontrados dentro de las SAVs se encuentran proteínas del estroma (incluyendo la subunidad grande de la rubisco) y clorofila a pero no proteínas del tilacoide (Otegui, 2018). Aún no se conoce cómo son formadas las SAVs ni cómo se transfieren los componentes a ellas, aunque sí se sabe que no dependen de autofagia ya que se han hallado en el mutante *atg7* de arábidopsis (Otegui, 2018).

El otro tipo de degradación independiente de autofagia es la vía CV (*chloroplast vesiculation*) o CCV (*CV-containing vesicle*) (**Fig. 9**). CV es una proteína con un dominio transmembrana que se expresa durante la senescencia o el estrés abiótico. En

arabidopsis, CV primero viaja a los cloroplastos donde interacciona con proteínas del tilacoide, del estroma y de la envuelta, donde induce cambios estructurales del tilacoide y se forman las CCVs que encierran proteínas del tilacoide, estroma y envuelta y que son transportadas hasta la vacuola para su degradación (Otegui, 2018). Este tipo de vía tampoco tiene relación con la autofagia ni ATG8, ni con SAG12, constituyendo otra vía alternativa (Otegui, 2018).



**Figura 9. Diagrama de las principales vías que exportan material cloroplástico para su degradación en la vacuola.** En el lado derecho de la imagen se esquematizan tres rutas distintas de clorofagia. Los RCBs (*rubisco-containing bodies*), los cuerpos dependientes de ATI1 y los SSLGs (*small starch-like granules*) se forman a partir del cloroplasto en asociación con membranas recubiertas de ATG8. En el lado izquierdo de la imagen se muestran dos rutas independientes de proteínas autofágicas: las SAVs (*senescence-associated vacuoles*) y las CCVs (*chloroplast vesiculation-containing vesicle*), aunque el mecanismo de biogénesis de las SAVs y las características estructurales de las CCVs aún no se conocen (Otegui, 2018).

### Mitofagia

La mitofagia consiste en la degradación por autofagia de las mitocondrias, en concreto de proteínas de su membrana externa. Este proceso está mejor descrito en mamíferos donde entra en juego la ubiquitinación a través de la ubiquitina-ligasa PARKIN y su quinasa reguladora PINK1 (*PTEN-induced putative kinase 1*), y a partir de ahí pueden ser reclutados distintos receptores de autofagia que contienen AIMs como NDP52, OPTN, ATG32 o TAX1BP1 (Marshall y Vierstra, 2018).



En plantas no se conoce muy bien el mecanismo, aunque hay evidencias suficientes que prueban su existencia. Se ha implicado a ATG1 y ATG11 en el mecanismo, y un posible receptor podría ser la proteína FRIENDLY, que se encarga de dirigir la localización mitocondrial dentro de la célula (Marshall y Vierstra, 2018; Logan y Paszkiewicz, 2018).

#### *Pexofagia*

En la pexofagia se lleva a cabo la degradación por autofagia selectiva de peroxisomas cuya integridad se ve comprometida debido al daño oxidativo auto-infringido. Se ha puesto de manifiesto la importancia de ATG2, ATG3 y ATG7 en este proceso, el cual no se tiene lugar en condiciones estresantes, si no que en condiciones normales existe una pexofagia basal que se encarga de regular el número de peroxisomas presentes en la célula (Marshall y Vierstra, 2018).

No se conoce aún la ruta de señalización de la pexofagia en plantas. Como la chaperona LON2 puede reprimirla, se especula que la señal puede venir de proteínas mal plegadas o de agregados proteicos. Además, recientemente se ha descrito una interacción de las proteínas del peroxisoma PEX6 y PEX10 con ATG8 a través de un AIM (Xie *et al.*, 2016; Marshall y Vierstra, 2018).

#### *Reticulofagia*

El retículo endoplasmático es la estructura membranosa más abundante en las células eucariotas y dirige la biosíntesis, plegamiento y transporte de la mayoría de proteínas de membrana y de secreción. En condiciones adversas, su capacidad de plegamiento se ve comprometida, traduciéndose en estrés del retículo endoplasmático. En respuesta a este estrés las células inducen la UPR (*unfolded protein response*) para aumentar la capacidad plegadora, y la ERAD (*ER-associated protein degradation*) que devuelve a las proteínas mal plegadas al citoplasma para su degradación por el sistema ubiquitina-proteasoma (Marshall y Vierstra, 2018). Pero en situaciones más extremas, el retículo endoplasmático dañado es degradado por autofagia selectiva en un proceso denominado reticulofagia, que es inducido en *arabidopsis* por una hiperacumulación de proteínas desplegadas y la consiguiente activación del factor IRE1b (*inositol-requiring enzyme 1b*), una quinasa/ribonucleasa bifuncional (Liu *et al.*, 2012).

Aún se conoce poco acerca de la ruta de la reticulofagia en plantas, solo se sabe que algunos miembros de la familia de proteínas que contienen un RHD (*reticulon homology domain*) parecen estar implicados (Marshall y Vierstra, 2018).

#### *Ribofagia*

Al ser uno de los orgánulos cuya biosíntesis y función requieren mucha energía, las células eucariotas emplean un tipo de autofagia llamado ribofagia para amortiguar

la traducción y restaurar las reservas de aminoácidos cuando son limitantes. Durante la ribofagia, las subunidades ribosomales 40S y 60S –que en total suman cuatro ARN ribosómicos (ARNr) y más de 80 proteínas- se transportan a la vacuola separadamente por mecanismos distintos, que implican enzimas desubiquitinadoras y cofactores (Marshall y Vierstra, 2018).

En plantas, el estudio de la ribofagia se ha centrado en la degradación del ARNr por autofagia, lo que requiere la ribonucleasa RNS2 y depende de ATG5 pero no de ATG9, lo que sugiere que una vía especial dentro de la autofagia en la que no se utilizan los fagoforos, como podría ser la microautofagia, es la que lleva a cabo la ribofagia. En cualquier caso, aún faltan por descubrir los elementos de la ruta de señalización, en la que se proponen a Ubp3, Rsp5 y Ltn1 (Marshall y Vierstra, 2018).

### *Proteafagia*

La proteafagia, o degradación autofágica del proteasoma, fue demostrada por primera vez en *arabidopsis* y se identificaron dos rutas: una inducida por deficiencia de nitrógeno y regulada por la quinasa ATG1, lo que indica una ruta de degradación masiva; y otra sensible a la inactivación del proteasoma (bien por mutación bien con inhibidores del proteasoma) e independiente de ATG1 (Marshall y Vierstra, 2015). Además, la inhibición del proteasoma viene acompañada por una amplia ubiquitinación del complejo, lo que sugiere un reconocimiento por un receptor autofágico con afinidad por ubiquitina (Marshall y Vierstra, 2018). Sorprendentemente, se puso en evidencia que este receptor no era NBR1 sino RPN10, una subunidad del proteasoma de unión a ubiquitina que previamente se había descrito que podía existir como forma libre además de formando parte del proteasoma. Durante la proteafagia, RPN10 se une simultáneamente a proteasomas ubiquitinados a través de un dominio UBA y a ATG8 a través de otro dominio también relacionado con la ubiquitina y que es distinto del típico motivo AIM (Marshall *et al.*, 2015).

### *Xenofagia*

La xenofagia consiste en la implicación de la autofagia en la defensa de la planta frente a diversos patógenos que incluyen bacterias, hongos y virus. En general, la autofagia está implicada en la supervivencia de las células durante la respuesta hipersensible, aunque existen casos en los que tiene un rol negativo en la inmunidad contra bacterias y hongos (Marshall y Vierstra, 2018). En otros casos, elementos de los patógenos se han implicado directamente en la señalización de la autofagia: secretando efectores que inhiben a TOR y activan la autofagia o que se unen a los proteasomas y activan la proteafagia, o incluso que contienen un AIM y se unen a ATG8 desplazando a NBR1 y repercutiendo en la integridad celular (Dagdás *et al.*, 2016; Maqbool *et al.*, 2016; Marshall y Vierstra, 2018).

### 3.3. Métodos de monitorización de la autofagia en plantas

El desarrollo de métodos y ensayos para detectar y monitorizar los diferentes pasos y cribar los posibles sustratos ha sido crucial en el estudio de la autofagia en plantas. En este sentido, la proteína central en los procesos autofágicos, ATG8, ha tenido protagonismo en el desarrollo de distintos ensayos, si bien no es la única que ha sido utilizada. El uso de diferentes inhibidores de la autofagia también, en combinación con ensayos también ha contribuido a la obtención de un mejor entendimiento de los procesos y elementos implicados en la autofagia.

#### 3.3.1. Métodos de microscopía

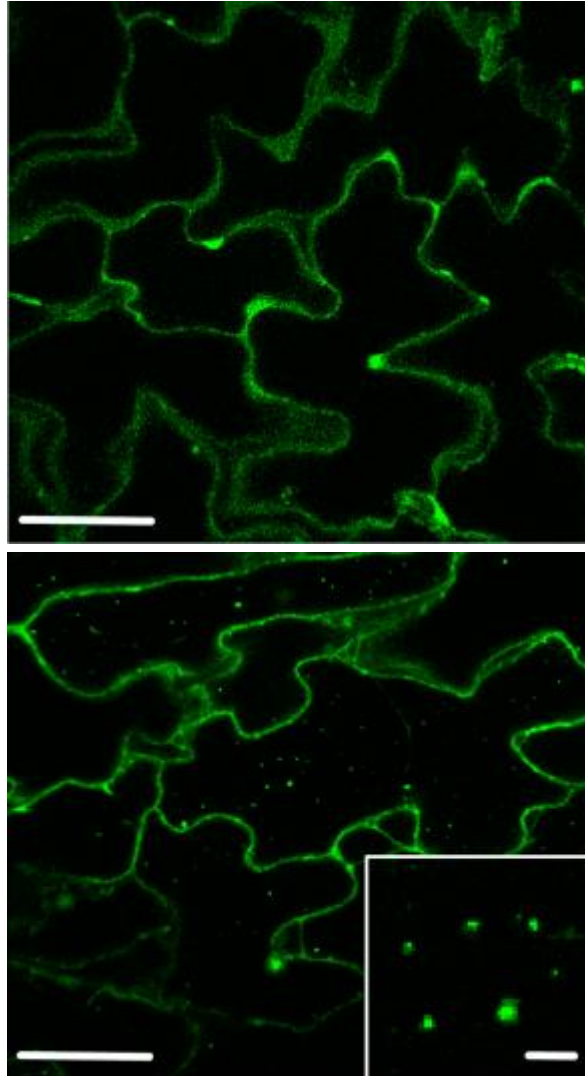
El estudio de la autofagia a nivel celular por microscopía ha sido crucial en las averiguaciones que se han realizado hasta la fecha. El microscopio electrónico y, sobre todo, el microscopio confocal han sido los principales microscopios utilizados en este campo.

##### *GFP-ATG8 como marcador de autofagosomas*

Debido a la importancia y el papel central de la proteína ATG8 en la vía de la autofagia, el objetivo inicial para visualizar los autofagosomas fue fusionar esta proteína a la proteína verde fluorescente (GFP) o similares. Como ATG8 se conjuga con PE en su extremo C-terminal, la fusión se ha de hacer en el extremo N-terminal. Arabidopsis contiene nueve genes que codifican ATG8, y aunque no está todavía clara la especificidad de sus productos, todos parecen localizarse en los autofagosomas y ser útiles como marcadores de autofagia (Bassham, 2014).

Las proteínas de fusión GFP-ATG8 pueden ser expresadas o bien transitoriamente o bien en líneas transgénicas, y monitorizadas por microscopía confocal (Bassham, 2014). En ausencia de estrés, la proteína de fusión se localiza en el citoplasma como fluorescencia difusa, a veces con algunos pequeños puntos visibles (**Fig. 10, arriba**). Estos puntos representan los autofagosomas formados por autofagia basal. Cuando GFP-ATG8 es sobreexpresado se pueden formar algunos agregados, pero con forma desigual en vez de circular. Cuando las células son expuestas a condiciones de estrés, el número de puntos marcados con GFP-ATG8 aumenta rápidamente (**Fig. 10, abajo**). Y se puede obtener una estimación cuantitativa de la actividad autofágica contando el número de puntos, bien por célula bien por área, pero siempre teniendo en cuenta que el número de estructuras viene determinado tanto por la tasa de formación como por la tasa de degradación de los autofagosomas (Bassham, 2014).

Otras proteínas como ATG1, ATG13 y ATG11 también pueden ser usadas como marcadores para localizar los autofagosomas junto a una proteína de fusión. ATG5 y SH3P2, sin embargo, se localizan en la formación de los fagoforos y una vez que el autofagosoma está completo desaparecen (Bassham, 2014).



**Figura 10. Visualización de la proteína de fusión GFP-ATG8 en el microscopio confocal.** Las imágenes se obtuvieron de células epidérmicas de hojas de plantas de arabisopsis transgénicas que expresan GFP-ATG8 recién cortadas (arriba) o cortadas y luego incubadas en 10 mM MES-NaOH (pH 5,5) añadiendo 1  $\mu$ M concanamicina A durante 20 h en oscuridad (abajo). El recuadro pequeño muestra una magnificación de los cuerpos autofágicos. Barras de escala = 50  $\mu$ m en las imágenes principales y 5  $\mu$ m en la magnificación (Ishida *et al.*, 2008).

#### *Tintes fluorescentes que se acumulan dentro de los autofagosomas*

Aunque GFP-ATG8 es considerado un marcador ideal para visualizar los autofagosomas, la gran desventaja es que la proteína de fusión debe ser expresada bien transitoriamente o bien creando plantas transgénicas, lo cual es más complicado y costoso cuando se trabaja con monocotiledóneas como el sorgo. Por ello, existen otros marcadores fluorescentes para los autofagosomas que, aunque son menos selectivos

que GFP-ATG8, pueden ser usados para teñir este tipo de plantas y visualizar los autofagosomas en el microscopio confocal (Bassham, 2014).

Estos tintes básicamente se basan en la asunción de que el lumen del autofagosoma es ácido, y por lo tanto puede acumular tintes acidotrópicos. Esta teoría se apoya por el hecho de que los autolisosomas (correspondientes a los autofagosomas en animales) poseen actividad fosfatasa ácida, una H<sup>+</sup>-ATPasa vacuolar y actividad cisteína proteasa. Aunque no se conoce cuál es el origen de estas enzimas en plantas, parece razonable que los autofagosomas vegetales se acidifiquen en algún punto de su formación o maduración (Bassham, 2014).

Algunos marcadores de autofagosomas comúnmente usados son los tintes acidotrópicos *Lysotracker*, quinacrina, *Neutral Red* y *Lucifer Yellow*, acumulándose todos y fluoresciendo en compartimentos ácidos (Bassham, 2014). Suelen teñir también la vacuola, pero mucho más débilmente que los autofagosomas/autolisosomas. El segundo tipo de tinte fluorescente para autofagosomas es la monodansilcadaverina (MDC), que se acumula y fluoresce dentro de compartimentos rodeados de membrana que tienen un lumen ácido y una membrana rica en lípidos. Ambas características son típicas de los autofagosomas, y ya se ha demostrado que tiñen los autofagosomas en células animales y vegetales (Contento *et al.*, 2005; Bassham, 2014), incluyendo monocotiledóneas (Williams *et al.*, 2015), y que se colocaliza con el marcador GFP-ATG8 en condiciones de deficiencia nutricional (Contento *et al.*, 2005).

Los tintes fluorescentes deben ser utilizados con precaución porque son capaces de teñir otros compartimentos ácidos aparte de los autofagosomas. Además, al requerir un lumen ácido, presumiblemente teñirán una etapa tardía de la maduración del autofagosoma, y no pueden ser utilizados para analizar los pasos de la formación (Le Bars *et al.*, 2014). Hace cuatro años, Merkulova y colaboradores compararon el marcaje por GFP-ATG8 con la tinción por MDC y *Lysotracker Red* en raíces de *Arabidopsis* en condiciones de falta de sacarosa y concluyeron que había colocalización (Merkulova *et al.*, 2014), lo cual contrasta con el trabajo previo donde sí se había visualizado la colocalización de ambos marcadores (Contento *et al.*, 2005). No obstante, en el trabajo reciente sólo se retiró la sacarosa durante 4 h, que es mucho menos tiempo que los tiempos que se utilizan más comúnmente (Yoshimoto *et al.*, 2004; Xiong *et al.*, 2005; Phillips *et al.*, 2008) que tienen en cuenta que muchas células vegetales tienen reservas de nutrientes que se gastan antes de que comience la respuesta a la deficiencia. Además, la iniciación de la autofagia podría ocurrir dentro de estas 4 h, pero puede que este periodo de tiempo no sea suficiente para que los autofagosomas alcancen un grado de maduración suficiente, lo que explicaría los autofagosomas en formación que son marcados por GFP-ATG8 y no por los tintes. Esto también explicaría por qué hay tan poca tinción por MDC y *Lysotracker* en el artículo reciente (Merkulova *et al.*, 2014) en comparación con otros estudios donde es evidente una amplia tinción de

estructuras (Xiong *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005; Patel y Dinesh-Kumar, 2008; Liu *et al.*, 2009).

#### *Autofagia selectiva*

Del mismo modo, usando proteínas de fusión unidas a proteínas candidatas, se puede visualizar una colocalización con GFP-ATG8 o incluso con NBR1, u otro receptor de cargo, unido a otra proteína de fusión lo que daría una idea de si la proteína candidata es degradada por autofagia o no. Esta colocalización debería producirse en las estructuras en forma de puntos, es decir, dentro de los autofagosomas que se encuentren bien en el citoplasma, bien en el interior de la vacuola (Bassham, 2014). No obstante, esta interacción debe ser confirmada mediante otros ensayos de interacción entre proteínas.

Otra posibilidad para estudiar las relaciones autofágicas de proteínas candidatas es el ensayo de complementación por fluorescencia bimolecular (BiFC), en el que se requiere que las dos proteínas interactúen para poder visualizar la fluorescencia, y en este caso una de ellas serían proteínas autofágicas como ATG8 o NBR1 (Marshall y Vierstra, 2018).

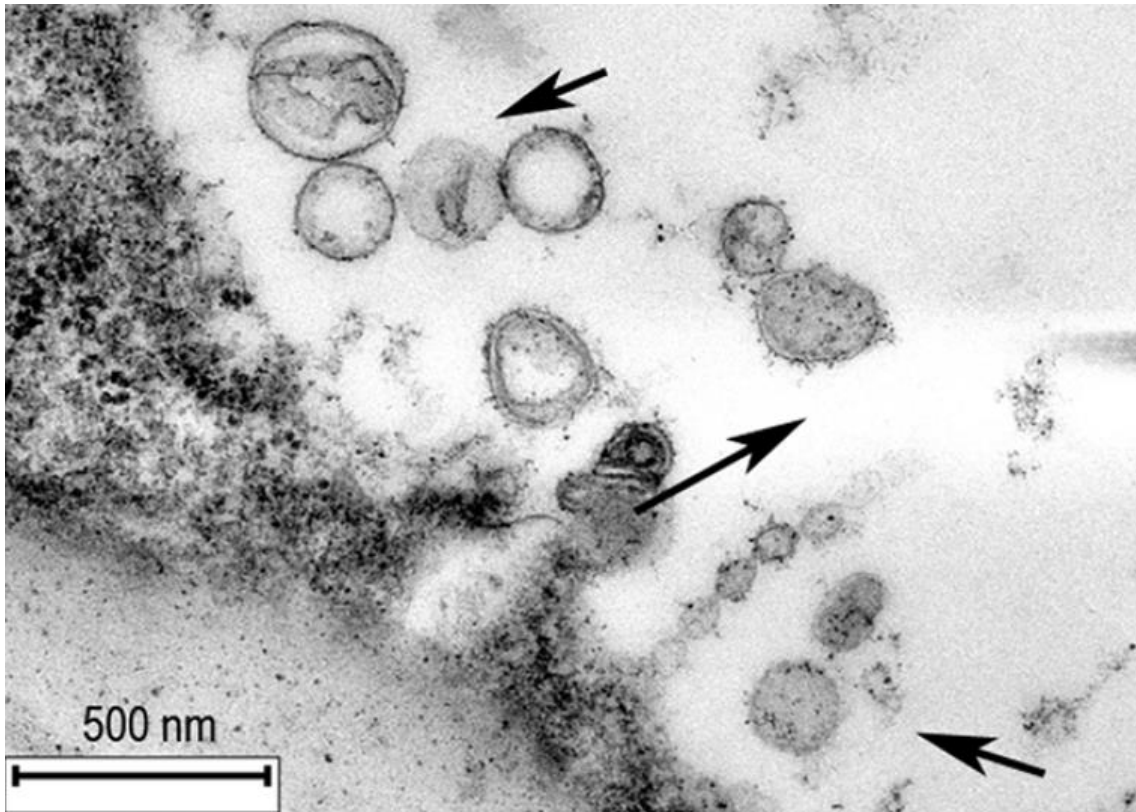
#### *Microscopía electrónica*

La morfología de doble membrana de los autofagosomas originados por deficiencia nutricional y que luego se fusionan con la vacuola fue descrita muy pronto usando microscopía electrónica (Aubert *et al.*, 1996), y posteriormente fue confirmado en *Arabidopsis* (Rose *et al.*, 2006). La microscopía electrónica aún es considerada uno de los mejores métodos para demostrar la presencia de autofagia, siendo las principales desventajas el tiempo y la dificultad técnica de preparación de las muestras, y la imposibilidad de visualizar muestras en vivo y así estudiar la dinámica celular.

Además de poder observarse la morfología de los autofagosomas (**Fig. 11**), este método puede usarse, en combinación con inhibidores que bloquean la degradación, para identificar el contenido de los autofagosomas. Y del mismo modo que con el microscopio confocal, puede realizarse una cuantificación del número de autofagosomas por célula o por área (Bassham, 2014).

### 3.3.2. Métodos bioquímicos

Existen métodos bioquímicos que constituyen una alternativa consistente a la visualización directa por microscopía, aunque algunos han presentado más dificultades y problemas a la hora de implementarlos en plantas, en comparación con animales.



**Figura 11. Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica.** Hojas de *Tripogon loliiformis* de tres meses fueron divididas en segmentos de 1 cm, infiltradas al vacío con una solución que contenía 5 mM de trehalosa y 1  $\mu$ M de concanamicina A e incubadas durante 24 h. Los autofagosomas se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión (Williams *et al.*, 2015).

#### *Inmunoblot de ATG8*

Como se ha descrito anteriormente, un paso clave en la formación del autofagosoma es la unión covalente de ATG8 a PE. Esta característica ha sido ampliamente usada para determinar la actividad de la vía autofágica comparando la cantidad de ATG8 libre con la cantidad de la forma lipídada (Bassham, 2014), y a raíz de ahí se han desarrollado diferentes anticuerpos contra la proteína ATG8a de arabisopsis, que funcionan en un amplio rango de plantas (Williams *et al.*, 2015). Un hándicap de este método es la presencia de múltiples isoformas de ATG8, aunque los anticuerpos diseñados reconocen a la mayoría de isoformas e incluso a posibles productos de su degradación. Lo que sí constituye un inconveniente es que este tipo de anticuerpos tienen un alto grado de inespecificidad por lo que reconocen gran variedad de bandas, incluyendo alguna del mismo tamaño que la forma lipídada, lo que complica el análisis (Bassham, 2014). Una solución inicial fue analizar las formas lipídada y no lipídada mediante inmunoblots de geles corridos en presencia de urea, que hace que el conjugado ATG8-PE migre más rápidamente que la forma no conjugada durante la electroforesis debido a las cargas, aunque posea mayor peso molecular (Klionsky *et al.*, 2014). Aun así, la forma lipídada no podía ser identificada correctamente debido a que se detectaban múltiples bandas, así que el método se

mejoró con el uso de fosfolipasa D, que elimina el lípido y por lo tanto revierte el tamaño a la forma no lipidada por lo que se puede identificar fácilmente cuál es la forma lipidada (Bassham, 2014; Williams *et al.*, 2015).

En *arabidopsis*, no obstante, no se recomienda determinar el grado de autofagia según la cantidad de ATG8-PE en los inmunoblots porque algunas isoformas son lipidadas incluso en condiciones control (Bassham, 2014). La situación en el maíz es mejor porque sólo existen 5 genes que codifican ATG8, y el patrón es fácilmente visualizado con geles de urea y el uso de fosfolipasa D (Bassham, 2014). En el sorgo, al haber sólo 3 genes que codifican ATG8 (Kellner *et al.*, 2016), la ejecución de este ensayo debería ser similar.

Una alternativa a este método consiste en el uso de la proteína de fusión GFP-ATG8, mediante la cual se podría detectar la forma lipidada más fácilmente con anticuerpos contra GFP después de la separación electroforética en geles de urea (Bassham, 2014). Otra opción es la inmunodetección de la forma libre de GFP, ya que la fusión GFP-ATG8 es procesada en la vacuola, de modo que la cantidad de GFP libre, fácilmente detectado al tener diferente tamaño, da una idea del flujo de autofagia que tiene lugar en la planta (Shin *et al.*, 2014).

#### *Autofagia selectiva*

Como complemento para confirmar la colocalización de fluorescencias por microscopio confocal, se pueden llevar a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación o *pull-down* para verificar la interacción entre dos proteínas (Zhou *et al.*, 2013; Marshall y Vierstra, 2018). Normalmente una de las proteínas es ATG8 o algún receptor de cargo como NBR1 unidos a una proteína de fusión que permita utilizar anticuerpos acoplados a diferentes partículas que permitan la inmunoprecipitación. Otra opción es el sistema del doble híbrido en levadura (Marshall y Vierstra, 2018).

#### **3.3.3. Inhibidores de la autofagia**

Los métodos de microscopía descritos anteriormente permiten la visualización de los autofagosomas u otros intermediarios autofágicos, así como el inmunoblot con anticuerpos ATG8 da información acerca de cantidad de aducto ATG8-PE y, por tanto, de la cantidad de autofagosomas formados. Sin embargo, todos estos ensayos proporcionan una medida estática de la autofagia, y el número de autofagosomas o la cantidad de ATG8-PE presentes sólo reflejan el balance entre la tasa de formación y la tasa de degradación de los autofagosomas (Bassham, 2014). Es decir, una acumulación de autofagosomas podría explicarse tanto por un aumento en la tasa de formación por activación de la autofagia como por un descenso de la tasa de degradación, y por lo tanto la suposición de que un aumento en el número de autofagosomas implica la activación de la autofagia podría ser erróneo. Aunque sea más complicado de medir, la



actividad autofágica se define mejor como el flujo a través de la ruta completa de la autofagia (Bassham, 2014).

Para definir este flujo autofágico entran en juego los inhibidores de la autofagia, entre los cuales la concanamicina A (concA) (**Tabla 1**) es el que tiene más relevancia. La concanamicina A inhibe la ATPasa de protones vacuolar presente en la red *trans*-Golgi, los endosomas y la vacuola, previniendo la acidificación vacuolar e interrumpiendo el tráfico de vesículas entre la red *trans*-Golgi y la vacuola (Matsuoka *et al.*, 1997). Por consiguiente, la degradación de macromoléculas dentro de la vacuola es bloqueada debido al elevado pH y posiblemente también debido a la pérdida del transporte de algunas hidrolasas a la vacuola. Bajo estas condiciones, después de que los autofagosomas se fusionen con el tonoplasto, los cuerpos autofágicos, de una sola membrana y que contienen el cargo a degradar, son estables en el lumen de la vacuola y son acumulados en proporción a la actividad autofágica (Yoshimoto *et al.*, 2004). De este modo, todos los autofagosomas que se formen y entren en la vacuola desde que la concanamicina A surta efecto podrán ser visualizados y contados mediante los métodos de microscopía descritos anteriormente, así como la cantidad de conjugado ATG8-PE formado mediante el inmunoblot.

**Tabla 1. Inhibidores y activadores comúnmente usados en el estudio de la autofagia en plantas. PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa (adaptado de Marshall y Vierstra, 2018).**

Nombre del inhibidor	Mecanismo de acción	Concentraciones efectivas	Comentarios
3-metiladenina (3-MA)	Inhibidor de la PI3K	2,5-10 mM	Puede tener efectos pleiotrópicos relacionados con roles no autofágicos del complejo PI3K
5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleósido monofosfato (AICAR)	Activador de SnRK1	10 mM	Los efectos de otras dianas de este compuesto incluyen la activación de la glutamina sintasa, la NADH-nitrato reductasa y la sacarosa-fosfato sintasa
AZD8055	Inhibidor de la quinasa TOR	1-10 $\mu$ M	Tiene 1000 veces más especificidad por TOR que por otras quinasas
Concanamicina A (concA)	Inhibidor de la H <sup>+</sup> -ATPasa vacuolar	100 nM (células); 1 $\mu$ M (plantas)	Estabiliza los cuerpos autofágicos en la vacuola, facilitando su detección; también se puede usar bafilomicina A
E64c/E64d	Inhibidores de cisteín proteasas	10 $\mu$ M (células); 100 $\mu$ M (plantas)	Estabiliza los cuerpos autofágicos en la vacuola, facilitando su detección
LY294002	Inhibidor de la PI3K	30-100 $\mu$ M	Es considerado un inhibidor muy específico (más que la wortmanina; puede tener efectos pleiotrópicos relacionados con roles no autofágicos del complejo PI3K
Ácido 1-naftalenoacético	Activador de la quinasa TOR	20 nM	Puede tener efectos pleiotrópicos relacionados con roles no autofágicos de la señalización por auxinas/TOR
Rapamicina	Inhibidor de la quinasa TOR	10 $\mu$ M	Inicialmente se pensaba que era inactivo en plantas, pero hay evidencias recientes que sugieren lo contrario
Trehalosa-6-fosfato	Inhibidor de SnRK1	100 $\mu$ M	Puede tener efectos pleiotrópicos relacionados con roles no autofágicos de SnRK1
Torina1/torina2	Inhibidores de la quinasa TOR	250 nM - 10 $\mu$ M	Considerados menos específicos que AZD8055 pero aún así tienen 300 veces más afinidad por TOR que por otras quinasas
Wortmanina	Inhibidor de la PI3K	1-10 $\mu$ M	También puede inhibir las fosfatidilinositol-4-quinasas a concentraciones más elevadas; puede tener efectos pleiotrópicos relacionados con roles no autofágicos del complejo PI3K

La adición de concA permite distinguir entre un aumento en la formación de autofagosomas, en cuyo caso se van a acumular muchos más autofagosomas en presencia de concA que en su ausencia, y un bloqueo de su degradación, en cuyo caso la concA no tiene efecto sobre el número de autofagosomas acumulados (Bassham, 2014). De hecho, cuando se realiza un ensayo de visualización de autofagosomas en condiciones de estrés, por lo general no se localizan muchos más autofagosomas que el nivel basal de las condiciones control. Y eso es debido a que aunque la tasa de formación aumente debido a la activación de la autofagia, la degradación funciona a pleno rendimiento y, tal como se van formando y madurando los autofagosomas, rápidamente son degradados en la vacuola y desaparecen. Por el contrario, tras la adición de concA típicamente se observa un aumento marcado en el número de autofagosomas detectados en condiciones de estrés (Chung *et al.*, 2010; Bassham, 2014; Marshall y Vierstra, 2018).

Otros inhibidores de uso común en el estudio de la autofagia están descritos en la **tabla 1**. Entre ellos, se puede destacar a la 3-metiladenina (3-MA) (Seglen y Gordon, 1982), que bloquea la formación de los autofagosomas mediante la inhibición de la PI3K.

### **3.4. La autofagia en el desarrollo, metabolismo y respuesta a estrés**

Hay numerosos estudios en una gran variedad de mutantes defectivos en la autofagia que han proporcionado una imagen consistente de los roles de la autofagia en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La autofagia es un proceso clave en la formación de la vacuola en las células vegetales. En las células meristemáticas que aún no tienen vacuola, se forman numerosos autofagosomas de doble membrana que envuelven grandes porciones de citoplasma (Bassham *et al.*, 2006).

Durante el desarrollo de las semillas, las vacuolas de almacenamiento de proteínas reemplazan a las vacuolas vegetativas o líticas normales. Durante este proceso de reemplazo, las rutas autofágicas se encuentran operando llevando a cabo alguna función (Bassham *et al.*, 2006). También se ha descrito la acumulación de algunos precursores de proteínas y algunas proteasas que son depositadas en la vacuola por autofagia en un paso previo necesario antes de llevar a cabo su función. En el caso de los precursores de proteasas, se acumulan en vesículas derivadas del retículo endoplasmático y se encuentran preparadas para ejecutar su función si se requieren cambios drásticos y repentinos de la actividad proteolítica, como en la removilización de proteínas de almacenamiento o en la muerte celular programada (Bassham *et al.*, 2006). En relación a la muerte celular programada vinculada con la respuesta hipersensible a patógenos, se ha demostrado que la autofagia participa en la respuesta inmune de las plantas. La autofagia puede encargarse de eliminar las señales de

muerte celular que viajan más allá del área de infección del patógeno y también de limpiar y reciclar el daño celular causado durante la respuesta (Bassham *et al.*, 2006).

En cualquier caso, ninguna de estas funciones es totalmente crucial para la planta bajo condiciones control, ya que los mutantes defectivos en proteínas autofágicas (*atg8*, *atg7*, *atg5*, etc.) son perfectamente capaces de completar su ciclo vital y producir semillas viables bajo condiciones de crecimiento óptimo. De hecho, algunos procesos de desarrollo donde se supone que la autofagia es requerida son completados de forma normal en estos mutantes, como la biogénesis del xilema o u otros eventos de muerte celular programada como la degeneración del estomio y el tapete en la antera, y sólo se observan defectos leves (Marshall y Vierstra, 2018). Sólo en arroz ocurre un fenotipo letal por falta de autofagia, pero esta letalidad es causada por un fallo en el desarrollo del polen y no por procesos metabólicos (Marshall y Vierstra, 2018).

Cuando realmente los fenotipos de autofagia defectiva aparecen es cuando las plantas crecen en condiciones de estrés. En estas condiciones, surge el fenotipo típico de los mutantes de autofagia, que se caracteriza por un crecimiento lento, senescencia temprana, baja fertilidad y supervivencia reducida (Marshall y Vierstra, 2018). En estas condiciones se pueden discernir claramente dos tipos de componentes de la maquinaria autofágica: aquellos cuyos mutantes están severamente afectados y por lo tanto son componentes centrales (p. ej. ATG3, ATG5, ATG7 y ATG10), y aquellos que tienen una función más periférica y cuyos mutantes se ven menos afectados por el estrés (p. ej. la quinasa ATG1 y NBR1) (Marshall y Vierstra, 2018).

Durante la senescencia de las hojas, la autofagia tiene roles opuestos. Uno es mantener la longevidad mediante el reciclaje de nutrientes y el otro es participar en la degradación sistemática de los tejidos mientras los nutrientes son exportados a otras zonas de crecimiento y almacenamiento (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2017). En este sentido, se ha descrito un rol esencial de la autofagia en la translocación del nitrógeno y el hierro a las semillas en desarrollo de *arabidopsis* (Guiboileau *et al.*, 2012; Pottier *et al.*, 2018).

La fertilidad reducida en plantas deficientes en autofagia puede tener dos explicaciones posibles. Una es que se deba a una translocación de nutrientes hacia la semilla muy reducida, y la otra es que la ausencia de autofagia haga que no se ejecuten los procesos necesarios para la formación de las vacuolas de almacenamiento de proteínas y/o la deposición de las proteínas de reserva en ellas (Marshall y Vierstra, 2018).

Por otro lado, la sobreexpresión de *ATG5* y *ATG7* en *arabidopsis*, o de diferentes isógenos *ATG8* en *arabidopsis* y maíz aumentó la producción de semillas; mejoró la tolerancia a sequía, déficit de nitrógeno y estrés oxidativo; y estimuló la resistencia a patógenos necrotrofos. Todo esto sugiere que estimular la movilización de nutrientes

a través de la autofagia puede tener beneficios agronómicos (Xia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2016; Minina *et al.*, 2018).

Aunque las diferencias fenotípicas de los mutantes de autofagia parecen limitadas, existen algunos estudios metabólicos que revelan un impacto mucho mayor en el metabolismo vegetal, incluso en condiciones control. El primero de estos estudios comparó hojas de la roseta de *Arabidopsis* del silvestre con las de mutantes de autofagia en condiciones déficit de nitrógeno (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014). Los mutantes acumulaban menos hexosas (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) pero más de sus alcoholes (manitol y sorbitol) y ácidos (gluconato, galacturonato, ribonato y treonato), lo que sugiere un defecto en la gestión redox de los azúcares. También se hiperacumulaban numerosos aminoácidos: glutamato, aspartato, metionina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina; y también siquimato, que es el precursor de los aminoácidos aromáticos y un punto de partida para la biosíntesis del ácido salicílico. Este tipo de acumulación implica que el catabolismo de los aminoácidos está modificado en los mutantes de autofagia, lo que explicaría por qué hiperacumulan compuestos ricos en nitrógeno como amonio y aminoácidos en las rosetas (Guiboileau *et al.*, 2013; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014). De hecho, la acumulación de siquimato fue el indicador más consistente de la deficiencia de autofagia, y esto se observó independientemente del fondo genético y de la disponibilidad de nitrógeno. Además, los datos transcriptómicos mostraron que las vías de producción de glutatión, metionina, rafinosa y galacturonato también estaban perturbadas en los mutantes de autofagia (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2014), así como la acumulación de antocianinas (Marshall y Vierstra, 2018).

Los datos de otro estudio metabólico, en este caso en plántulas etioladas de *Arabidopsis* germinadas sin sacarosa como déficit de carbono, mostraron niveles reducidos de aminoácidos libres y ácidos orgánicos como el malato, fumarato y deshidroascorbato (Avin-Wittenberg *et al.*, 2015). El análisis del flujo metabólico sugirió un aumento en la respiración y un descenso en la biosíntesis neta de proteínas en los mutantes de autofagia en comparación con el silvestre. La composición de lípidos de los mutantes también cambió, con aumentos en los triacilglicerolos y los ácidos grasos libres. También se registraron altos niveles de fosfatidilinositol, posiblemente indicando un intento de los mutantes de compensar la falta de autofagia aumentando el sustrato para el complejo PI3K (Avin-Wittenberg *et al.*, 2012).

Un estudio metabólico más reciente comparó un mutante *atg12* de maíz con el silvestre en condiciones de déficit de nitrógeno y se encontraron aumentos drásticos de ácidos grasos libres y oxilipinas, lo que implica fuertes perturbaciones en el metabolismo de lípidos en los mutantes de autofagia (Marshall y Vierstra, 2018). Este estudio también examinó el perfil proteómico, encontrando un incremento en los

niveles de proteínas ribosómicas, mitocondriales, y del proteasoma y peroxisoma (Marshall y Vierstra, 2018).

### **3.5. Interés del estudio de la implicación de la autofagia y las PTMs en la degradación de la PEPC**

La PEPC es una enzima clave en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, y es por ello por lo que está sometida a un estricto control postraduccional, sobre todo en condiciones adversas para las plantas. Es lógico pensar que su degradación también pueda estar estrictamente regulada en estas condiciones, y la autofagia selectiva es un proceso mediante el cual la degradación de muchos elementos celulares se lleva a cabo de forma precisa y controlada. En este sentido, existen dos motivos principales que conducen a formular la hipótesis de que determinadas isoenzimas PEPC sean degradadas a través de alguna vía autofágica, en condiciones concretas.

En primer lugar, la monoubiquitinación de la PEPC no tiene ninguna función fisiológica conocida hasta la fecha, aparte de la función inhibidora de la actividad de la enzima descrita por O'Leary y colaboradores (O'Leary *et al.*, 2011b), habiéndose presentado en multitud de plantas y tejidos y en varias isoenzimas de tipo C<sub>3</sub>. Además, se ha descrito que esta PTM aumenta en condiciones de estrés, como en el estrés por amonio (Arias-Baldrich *et al.*, 2017), y en tejidos en desarrollo donde la actividad catabólica es alta, como en las semillas de sorgo en germinación (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016). Son contextos en los que la inducción de la autofagia sería normal. Y precisamente algunos receptores de cargo de vías autofágicas, como NBR1, tienen dominios de reconocimiento de sustratos ubiquitinados en general, y monoubiquitinados en particular (Kirkin *et al.*, 2009; Svenning *et al.*, 2011), lo que abre la posibilidad de que una posible función de la monoubiquitinación de la PEPC sea su reconocimiento por parte de este tipo de receptores autofágicos.

En segundo lugar, dentro de la clorofagia ha sido descrita una vía de degradación autofágica de la rubisco por parte de los RCBs, además de dos otras vías de degradación vacuolar independientes de autofagia como son las SAVs y las CCVs (Otegui, 2018). Este tipo de mecanismos están encaminados a controlar la degradación de la proteína más abundante en plantas, y por lo tanto a reciclar gran cantidad de nitrógeno. Sin embargo, estas vías han sido descritas en plantas C<sub>3</sub>, y no se han estudiado en plantas C<sub>4</sub>. En el caso del sorgo, al ser una planta C<sub>4</sub>, la cantidad de proteína PEPC es muy alta y similar a la cantidad de rubisco, con lo que se podría pensar que un mecanismo parecido a los RCBs, las SAVs o las CCVs pudieran llevar a cabo la degradación de la PEPC. Aunque la PEPC es una enzima citosólica, mientras que la rubisco se encuentra en el estroma de los cloroplastos, existen evidencias experimentales de su asociación a membranas de orgánulos o al plasmalema. En maíz, la unión de la PEPC a la membrana del cloroplasto ocurre en paralelo a una

inactivación de la enzima (Wu y Wedding, 1992). La PEPC también puede asociarse a la membrana mitocondrial, aumentando la eficiencia de su función anaplerótica en la respiración (Park *et al.*, 2012). En el mismo sentido, la interacción con el PA, que tiene una mayor afinidad en el caso de la PEPC C<sub>4</sub> fotosintética y que inactiva a la enzima, puede estar asociada a un reclutamiento a membrana y posterior proteólisis de la PEPC (Monreal *et al.*, 2010b).

El estudio de las funciones de las isoenzimas PEPC en distintas situaciones de estrés refleja que se activan distintos mecanismos en las hojas y en las raíces. En las hojas de sorgo (donde la isoenzima predominante es la PEPC de tipo C<sub>4</sub>, que además existe en cantidad mucho mayor que el resto de las isoenzimas) la respuesta principal en estrés salino o causado por amonio es que aumenta la cantidad de PEPCK y la fosforilación de la PEPC (Monreal *et al.*, 2013a; Arias-Baldrich *et al.*, 2017). Por el contrario, en raíces, donde las isoenzimas presentes son de tipo C<sub>3</sub>, la respuesta a estos estreses se focaliza en aumentar la actividad PEPC (Arias-Baldrich *et al.*, 2017; Pérez-López *et al.*, 2018). Aunque los mecanismos que regulan los niveles de actividad PEPC y PEPCK son complejos, en ambos casos hay evidencia de que se modifica la degradación de las proteínas correspondientes. Los resultados que se presentan en este trabajo contribuyen a aumentar el conocimiento sobre la regulación de la estabilidad de elementos claves del metabolismo como la PEPC, la repercusión de las PTMs sobre la misma y las diferencias entre los mecanismos que afectan a la isoenzima fotosintética y a las no fotosintéticas.

# OBJETIVOS

---

El objetivo central de este trabajo es profundizar en los mecanismos que regulan la estabilidad de la proteína PEPC de sorgo, tanto en lo relativo a la isoforma fotosintética como a las no fotosintéticas, analizando la repercusión de las modificaciones postraduccionales (PTMs) sobre la misma, e investigando el papel de la autofagia, selectiva o masiva, en la degradación de la PEPC. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Detectar y evaluar la repercusión sobre la actividad y la estabilidad de la PEPC de hojas de sorgo de dos PTMs: carbonilación y S-nitrosilación. Analizar la interacción entre ambas PTMs, tanto *in vitro* como *in vivo*, y buscar contextos fisiológicos en los que dicha interacción sea relevante.
2. Buscar marcadores de autofagia en sorgo y desarrollar métodos para su detección, y emplearlos para monitorizarla en plantas sometidas estrés salino, nutricional y oxidativo.
3. Analizar la idoneidad del péptido vírico  $\beta$ C1 como herramienta para estudios de autofagia.
4. Obtener indicios de la degradación vía autofagia de la PEPC, detectando interacciones de componentes de dicha vía con la PEPC, o la acumulación de la proteína tras la inhibición química o genética de la autofagia.
5. Investigar la implicación de la monoubiquitinación de la PEPC en su reclutamiento a la vía autofágica selectiva, detectando cambios en el patrón de esta PTM tras la inhibición de la autofagia.



# OBJECTIVES

---

The main objective of this work is to strengthen the understanding of the mechanisms that regulate the stability of sorghum PEPC, both for the photosynthetic and the non-photosynthetic isoforms. This will be realized by analyzing the repercussions of post-translational modifications (PTMs) on the protein, and investigating the role of bulk or selective autophagy on PEPC degradation. To achieve this, the following objectives were proposed:

1. To detect and evaluate the effect of two PTMs on the stability of sorghum leaf PEPC: carbonylation and S-nitrosylation. To analyze the interplay between these PTMs, both *in vitro* and *in vivo*, and to determine the physiological importance of the interaction.
2. To find autophagic markers in sorghum and to develop methods for its detection in order to monitor autophagy in plants subjected to salt, nutritional and oxidative stresses.
3. To analyze the suitability of the viral peptide  $\beta$ C1 as tool for autophagy studies.
4. To provide clues on the degradation of PEPC via autophagy, by detecting interactions between intermediaries of this pathway and the protein, or accumulation of PEPC after the chemical or genetic inhibition of autophagy.
5. To investigate the role of monoubiquitination of PEPC in relation to its recruitment to the pathway of selective autophagy, and to detect changes in this PTM after autophagic inhibition.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

### 1.1. *Sorghum bicolor*

Las plantas de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench, cultivar PR87G57, Pioneer Hi-Bred España] fueron cultivadas hidropónicamente bajo un ciclo día/noche de 12 h de luz (25 °C, 60% de humedad relativa) y 12 h de oscuridad (20 °C, 70% de humedad relativa). La intensidad de luz fue de 350  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Para tratamientos a corto plazo, las semillas de sorgo se esterilizaron con lejía al 2% (v/v) durante 30 min. Luego, éstas se lavaron dos veces con agua destilada, seguido de un lavado con 10 mM HCl y otros cinco lavados con agua destilada (Abdul-Baki, 1974). La imbibición se llevó a cabo colocando las semillas en placas de Petri con papeles de filtro empapados en agua destilada, manteniéndolas durante 2-3 días a 25 °C en oscuridad. Una vez germinadas, se transfirieron las semillas a sistemas Araponic® (Tocquin *et al.*, 2003), usando agarosa al 0,65% (p/v) como sustrato en los soportes para semillas y solución nutritiva que contenía nitrato como fuente de nitrógeno (medio control; Hewitt, 1966) como medio líquido durante una semana. Para tratamientos a largo plazo, las semillas de sorgo fueron germinadas en vermiculita durante 10 días, y posteriormente se transfirieron las plantas a cultivos hidropónicos con medio control durante 2-3 semanas. Cuando se indica, el medio control se sustituyó por medio con deficiencia en algún nutriente. La **tabla 2** muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas para el sorgo.

**Tabla 2. Composición del medio de cultivo de sorgo.** Composición del medio de cultivo de sorgo (Hewitt, 1966) para condiciones control y de deficiencia de nitrógeno (-N), fósforo (-P) y hierro (-Fe).

		Macronutrientes						
		KNO <sub>3</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	SO <sub>4</sub> Mg·7H <sub>2</sub> O	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na·2H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	
Concentración (mM)	Control	5	5		1,34	-	-	
	-N	-	-	2		5	5	
	-P	5	5		-	-	-	
		Micronutrientes						
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	ClNa	FeNa-EDTA
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	2·10 <sup>-4</sup>	1	0,1 (-Fe: 0)

Los tratamientos descritos como “deficiencia de nitrógeno” se llevaron a cabo utilizando el medio correspondiente durante 2 días en plántulas de 10 días de edad.

Además del sorgo silvestre, se utilizó un sorgo ARN<sub>i</sub>-SbPPC3 (Sbppc3) que fue generado por la técnica del ARN de interferencia (ARN<sub>i</sub>), llevada a cabo por el Servicio de Transformación de Plantas de la Universidad de Missouri (EE.UU.). El vector pFCG161, diseñado para el silenciamiento génico en cereales, fue usado para construir el casete hpARN<sub>i</sub> que contenía un fragmento de 300 pb proveniente del gen PPC3 de sorgo (Sb04g008720) en la orientación sentido y anti-sentido. El vector obtenido se usó para transformar embriones de sorgo y generar plantas con este gen silenciado. Se

obtuvieron 14 líneas T1 independientes distintas de las cuales se seleccionaron las 2 que poseían el nivel de transcrito de *SbPPC3* afectado más severamente. A continuación, se autopolinizaron y se recolectaron todas las líneas T2 homocigotas para los análisis. El cultivar silvestre que se utilizó para generar estas líneas fue *P898012*.

## 1.2. *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* [*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia (Col-0), *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC)] se cultivaron hidropónicamente con un ciclo día/noche de 8 h de luz (22 °C, 60% de humedad relativa) y 16 h de oscuridad (18 °C, 70% de humedad relativa) en un fitotrón FitoClima S600 (Aralab). La intensidad de luz fue de 100  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Las semillas se esterilizaron con lejía al 2% (v/v) durante 20 min y se lavaron varias veces con agua destilada (McCourt y Keith, 1998). Luego, las semillas se mantuvieron en oscuridad a 4 °C durante al menos 3 días para sincronizar la germinación antes de transferirlas a sistemas Araponic® (Tocquin *et al.*, 2003) con un sustrato en los soportes de semillas que contenía un 50% (v/v) de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) y un 0,65% (p/v) de agar, y medio MS completo como medio líquido durante 6-8 semanas. Cuando se indica, el medio MS control se sustituyó por medio con deficiencia en algún nutriente. La **tabla 3** muestra la composición de las distintas soluciones nutritivas para *Arabidopsis*.

**Tabla 3. Composición del medio de cultivo de *Arabidopsis*.** Composición del medio de cultivo de *Arabidopsis* (Murashige y Skoog, 1962) para condiciones control y de deficiencia de nitrógeno (-N).

		Macronutrientes							
		KNO <sub>3</sub>	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	SO <sub>4</sub> Mg·7H <sub>2</sub> O	PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> Na·2H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		
Concentración (mM)	Control	6	4	1	2	-	-		
	-N	-	-	-	-	5	5		
		Micronutrientes							
		MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	CoSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	ClNa	FeNa-EDTA
		10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-3</sup>	5·10 <sup>-2</sup>	2·10 <sup>-4</sup>	1	0.1

Además de Col-0, se utilizaron cuatro líneas SALK (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*, NASC). Dos de ellas, *atg2* y *atg5*, deficientes en las correspondientes proteínas, fueron cedidas por el Dr. Yasin Dagdas del *Gregor Mendel Institute* (Viena, Austria). Las otras dos, *atg18a* (SALK\_N684432) y *nbr1* (SALK\_N635513), se adquirieron directamente del NASC, y la presencia de la mutación insercional en el *locus* correspondiente y la homocigosidad de ésta fueron confirmadas por PCR (Alonso *et al.*, 2003).

## 1.3. *Nicotiana benthamiana*

### 1.3.1. Plantas

Las plantas de *Nicotiana benthamiana* Domin fueron cultivadas en sustrato sólido con un ciclo día/noche de 12 h de luz (25 °C, 60% de humedad relativa) y 12 h de

oscuridad (20 °C, 70% de humedad relativa). La intensidad de luz fue de 350  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Durante la primera semana después de la siembra, las semillas se mantuvieron tapadas con film transparente para favorecer la germinación de éstas. Las plantas de *N. benthamiana* se mantuvieron creciendo durante 4-5 semanas antes de ser utilizadas para la infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*.

### 1.3.2. Cultivos de células

Se esterilizaron semillas de *N. benthamiana* con lejía al 2% (v/v) durante 20 min y se lavaron varias veces con agua destilada (McCourt y Keith, 1998). Estas semillas fueron germinadas en placas con medio sólido que contenía un 50% (v/v) de medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa al 2% (p/v) y agar al 1% (p/v). Transcurridas 3 semanas desde la germinación, los tejidos de las raíces se seccionaron en segmentos y se transfirieron a nuevas placas con medio de inducción de callos que contenía MES 0,5  $\text{g l}^{-1}$  pH 5,7, glucosa al 2% (p/v), agar al 0,8% (p/v), MS Basal Medium (Sigma) 4,4  $\text{g l}^{-1}$ , ácido 2,4-diclorofenoxiacético 0,5  $\text{mg l}^{-1}$  y kinetina 0,05  $\text{mg l}^{-1}$  durante 2-3 semanas hasta la obtención de callos vegetales.

Posteriormente, se transfirieron fragmentos de callos de 0,3 g a un matraz con 20 ml de medio de cultivo celular, que contenía medio MS que incluye vitaminas Gamborg B5 (Duchefa) 4,4  $\text{g l}^{-1}$  pH 5,8, ácido  $\alpha$ -naftalenacético 0,5  $\text{mg l}^{-1}$ , kinetina 0,05  $\text{mg l}^{-1}$  y sacarosa al 3% (p/v), y se cultivaron bajo un ciclo de día/noche de 12 h de luz (22 °C, 60% de humedad relativa) y 12 h de oscuridad (18 °C, 70% de humedad relativa) en agitación orbital continua a 150 rpm. La intensidad de luz fue de 100  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR. Después de 10 días, las células generadas se transfirieron a un matraz con 80 ml de medio de cultivo celular nuevo. El mantenimiento del cultivo celular se realizó transfiriendo el 25% del cultivo anterior a un matraz con medio de cultivo celular nuevo una vez a la semana. Todo el proceso tuvo lugar en condiciones de esterilidad.

La composición del medio MS que incluye vitaminas Gamborg B5 (Duchefa), utilizado para preparar el medio de cultivo celular es la siguiente:  $\text{CaCl}_2$  2,99 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,25 mM,  $\text{KNO}_3$  18,79 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,5 mM y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  20,61 mM como macronutrientes; glicina 26,64  $\mu\text{M}$ , mio-inositol 554,94  $\mu\text{M}$ , ácido nicotínico 4,06  $\mu\text{M}$ , piridoxina-HCl 2,43 mM y tiamina-HCl 0,3 mM como vitaminas; y los micronutrientes de la **tabla 3**. Para preparar el medio sin fósforo, se eliminó el  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  del medio; para preparar el medio sin nitrógeno, se eliminaron el  $\text{KNO}_3$  y el  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ .

## 2. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS

En general, y si no se indica lo contrario, los extractos proteicos de hojas de sorgo se obtuvieron homogeneizando 0,2 g de peso fresco en un mortero a 4 °C con 1 ml de tampón de extracción que contenía Tris-HCl 0,1 M pH 7,5, glicerol al 5% (v/v), ácido

etilendiaminotetraacético (EDTA) 1 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM, y que fue suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 mM, quimostatina 16,5 μM y leupeptina 2,2 μM como inhibidores de proteasas, y β-mercaptoetanol 14 mM o ditioneitol (DTT) 10 mM. El homogenado se centrifugó a 17 000 g durante 5 min a 4 °C.

En el caso de extractos de raíces de sorgo y de hojas y raíces de *arabidopsis*, se homogeneizaron 0,5 g de peso fresco en 1 ml de tampón de extracción. Para los extractos proteicos de células de *N. benthamiana* se trituraron 0,5 g de células, filtradas previamente con membrana de filtro de 0,45 μm (Sigma), en un 1ml de tampón de extracción.

### 3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

#### 3.1. Purificación de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo

La purificación de la PEPC C<sub>4</sub> desfosforilada de hojas de sorgo se llevó a cabo a partir de plantas adaptadas a oscuridad. Se homogeneizaron 20 g de hojas en 100 ml de tampón A, que contenía Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) 1 mM, glicerol al 10% (v/v), Triton X-100 al 0,1% (v/v), PMSF 1 mM, leupeptina 2,2 μM y quimostatina 16,5 μM, a 4 °C. El homogenado se centrifugó a 48 000 g durante 15 minutos a 4 °C. Luego se añadió al sobrenadante polietilenglicol 8000 al 8,5% (p/v), se dejó en agitación durante 30 min a 4 °C y se volvió a centrifugar a 48 000 g durante 30 minutos a 4 °C. Un segundo paso de polietilenglicol 8000 se llevó a cabo, pero en este caso al 20% (p/v), y se centrifugó como en el paso anterior. Las columnas descritas a continuación fueron utilizadas usando un *FPLC NGC™ Chromatography System* (Bio-Rad).

El pellet obtenido se resuspendió en tampón B que contenía Hepes-KOH 50 mM pH 8,0 y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, y la solución resultante fue cargada a 2 ml min<sup>-1</sup> en una columna de hidroxapatita cerámica de tipo II (Bio-Rad) de 10 ml de volumen, pre-equilibrada en tampón B. La columna fue lavada con tampón B al que se añadió NaCl 150 mM hasta que el valor de absorbancia A<sub>280</sub> descendió hasta estabilizarse en un valor basal. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas mediante un gradiente de tampón C que contenía Hepes-KOH 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 M. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se agruparon y se concentraron usando un *Amicon Ultra-15* con filtro de 100 kDa (Millipore).

A continuación, la muestra fue cargada a 1 ml min<sup>-1</sup> en una columna *Fractogel EMD DEAE (S)* de 10 ml (Merck) pre-equilibrada en tampón D que contenía Tris-HCl 100 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM, glicerol al 10% (v/v), PMSF 1 mM, leupeptina 2 μM y quimostatina 16 μM. Las proteínas fueron eluidas con un gradiente lineal (50 ml) de tampón E que contenía tampón D con KCl 1M. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se

agruparon y se concentraron de nuevo con un *Amicon Ultra-15* con filtro de 100 kDa. El sobrenadante se llevó hasta un volumen de 5 ml con tampón D y se cargó a 1 ml min<sup>-1</sup> en una columna *Macro-Prep High Q Support* (Bio-Rad). Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas con un gradiente lineal (25 ml) de tampón E. Las fracciones correspondientes al pico de actividad PEPC se agruparon y se concentraron de nuevo con un *Amicon Ultra-15* con filtro de 100 kDa, y el sobrenadante obtenido se llevó hasta un volumen de 1 ml con Tris-HCl 100 mM pH 8,0. La solución final de PEPC se mantuvo en 50% de glicerol a -20 °C.

### 3.2. Producción y purificación de ATG8a recombinante a partir de *E. coli*

La proteína ATG8a fue producida y purificada a partir de una línea de *E. coli* BL21 transformada con el plásmido pETG30A que contenía la proteína ATG8a de *Arabidopsis* unida a la proteína glutatión S-transferasa (GST), cedida por el Dr. Yasin Dagdas del *Gregor Mendel Institute* (Viena, Austria). Las bacterias de esta línea fueron cultivadas a 37 °C en 1 L de medio líquido hasta que alcanzó una densidad óptica a 600 nm de entre 0,6 y 0,8. La inducción de la expresión de la proteína recombinante GST-ATG8a se inició añadiendo IPTG 0,2 mM y se mantuvo toda la noche a 37 °C en agitación.

El cultivo se centrifugó a 1500 g durante 20 min y el pellet se resuspendió en 10 ml de tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicina 50 mM, glicerol al 5% (v/v), benzonasa 2 µl/ml e inhibidores de proteasas en tableta (una tableta por cada 50 ml) y se sonicó (amplitud 60%) durante 4 minutos realizando pausas de 1 segundo por cada segundo transcurrido de sonicado. Se volvió a centrifugar durante 30 min a 10 000 g y 4 °C y se tomó la fase soluble que se transfirió a una columna *GST-trap* (GE Healthcare) previamente equilibrada con tampón A que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicina 50 mM y glicerol al 5% (v/v). La columna fue lavada con tampón A hasta que el valor de absorbancia A<sub>280</sub> descendió hasta estabilizarse en un valor basal. Las proteínas retenidas en la columna fueron eluidas mediante un gradiente de glutatión con tampón de elución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 500 mM, glicina 50 mM, glicerol al 5% (v/v) y glutatión 10 mM. La solución obtenida se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación con 1 mg/ml proteasa 3C (ThermoFisher).

A continuación, se transfirió la solución a una columna de exclusión molecular (*Gel Filtration Column*, Bio-Rad) previamente equilibrada con tampón C que contenía HEPES 20 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM. Las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia A<sub>280</sub> se recolectaron y se analizaron por inmunoblot. Se obtuvieron dos picos, uno correspondiente a GST y el otro a ATG8a, cuyas soluciones finales se mantuvieron en 50% glicerol a -80 °C. Las columnas descritas en este apartado fueron utilizadas usando un *FPLC NGC™ Chromatography System* (Bio-Rad).



### 3.3. Producción y purificación de GST-NBR1 recombinante a partir de *E. coli*

A partir de la clonación de GST-NBR1 descrita en el apartado 6.5.1, el plásmido se purificó mediante miniprep y se utilizó para transformar *E. coli* BL21. Las colonias positivas se cultivaron a 37 °C en 100 ml de medio líquido hasta que las células alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de entre 0,6 y 0,8. La inducción de la expresión de la proteína recombinante GST-NBR1 se inició añadiendo isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM y se mantuvo durante 6 h más a 37 °C en agitación.

El cultivo de *E. coli* se centrifugó a 1500 g durante 20 min y el pellet se resuspendió en 3 ml de un tampón de extracción que contenía Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, Triton X-100 al 0,02% (v/v), Tween-20 al 0,05% (v/v), EDTA 5 mM, ácido trietilenglicoldiaminotetraacético (EGTA) 1 mM y DTT 5 mM suplementado con PMSF 1 mM, quimostatina 16,5  $\mu$ M y leupeptina 2,2  $\mu$ M. Posteriormente se sonicó (amplitud 60%) durante 6 minutos con pausas de 10 segundos cada 20 segundos de sonicado. Se volvió a centrifugar a 10 000 g durante 15 min a 4 °C y se tomó la fase soluble, que se transfirió a 200  $\mu$ l de la resina Glutathión Sefarosa 4B (GE Healthcare), previamente equilibrada con el tampón de extracción, y se dejó toda la noche incubando en agitación a 4 °C.

A continuación, se centrifugó a 500 g durante 5 min a 4 °C y se realizaron 4 lavados con tampón de lavado que contenía Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM y DTT 5 mM. Por último, se añadieron 100  $\mu$ l de tampón de lavado y se comprobó mediante inmunoblot que la proteína GST-NBR1 se encontraba unida a la resina. Esta resina se utilizó en los experimentos de coimmunoprecipitación con GST-NBR1.

## 4. ENSAYOS ENZIMÁTICOS

### 4.1 Determinación de la actividad PEPC

La actividad fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) se realizó utilizando un ensayo acoplado a la enzima malato deshidrogenasa (MDH). La MDH reduce el oxalacetato producido por la PEPC a L-malato con oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), teniendo esta reacción una estequiometría equimolar. Se registró la oxidación del NADH en un lector de placas (Molecular Devices) a 340 nm en 0,2 ml de un medio de reacción que contenía HEPES-KOH 0,1 M pH 8, PEP 2,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, NADH 0,2 mM y 5 U ml<sup>-1</sup> de MDH (Echevarría *et al.*, 1994), siendo el coeficiente de extinción del NADH a 340 nm de 6,23  $\mu$ mol<sup>-1</sup> ml cm<sup>-1</sup>. El ensayo se inició con la adición del extracto crudo o solución que contiene PEPC, y se registró la desaparición del NADH durante 5 minutos a 30 °C. Una unidad de enzima

(U) se define como la cantidad de PEPC que cataliza la carboxilación de 1  $\mu\text{mol}$  de PEP por minuto a pH 8 y 30 °C.

## 5. TÉCNICAS ANALÍTICAS

### 5.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida o SDS-PAGE se realizaron en condiciones desnaturalizantes según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970), usando geles discontinuos formados por un gel de compactación al 4% de acrilamida/bisacrilamida (p/v) y un gel de separación con una concentración entre el 8 y el 15% (p/v), dependiendo del peso molecular de la proteína a estudiar. Las muestras fueron suplementadas con tampón de disociación compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 6,8, glicerol al 10% (v/v), dodecilsulfato sódico (SDS) al 2% (p/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y azul de bromofenol al 0,1% (p/v); y se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C. El gel de separación se preparó con un tampón Tris-HCl 375 mM pH 8,8, persulfato amónico al 0,5% (p/v) y TEMED 6 mM. El gel de compactación contenía los mismos componentes excepto que el tampón utilizado fue un Tris-HCl 125 mM pH 6,8. En el caso de los geles para la detección de ATG8-PE, se añadió urea 6 M tanto al gel de separación como al de compactación.

Los geles se desarrollaron en una cubeta *Mini-Protean® III-2D Cell* (Bio-Rad) con tampón de electroforesis que contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS al 0,1% (p/v), a voltaje constante de 200 V durante 50 min. El peso molecular de la PEPC se determinó utilizando como marcadores proteínas pre-teñidas de pesos moleculares conocidos (*gTP-bio RGB Prestained Protein Ladder*, Bio-Rad).

### 5.2. Tinción con azul de Coomassie

Después del desarrollo de la electroforesis, los geles se sumergieron durante 1 h en solución de tinción que contenía etanol al 45% (v/v), ácido acético al 10% (v/v) y *Coomassie Blue G-250* al 0,27% (p/v). Posteriormente se destiñeron con solución de destinción que contenía etanol al 45% (v/v) y ácido acético al 10% (v/v).

### 5.3. Preparación y detección de proteínas carboniladas

La carbonilación de la PEPC *in vitro* se llevó a cabo incubando PEPC C<sub>4</sub>, purificada de hojas de sorgo, durante 1-20 min a 25 °C con ascorbato de sodio 25 mM y CuSO<sub>4</sub> 1 mM (Marx y Chevion 1986). La carbonilación de proteínas *in planta* se realizó suministrando a hojas cortadas metil viológeno (MV) 0,1-5 mM durante 1-12 horas por corriente transpiratoria en la luz (350  $\mu\text{mol}$  de fotones  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR).

La presencia de grupos carbonilos en las proteínas se detectó mediante la derivatización de extractos proteicos con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) y la

posterior detección inmunológica de los grupos DNP con anticuerpos comerciales anti-DNP (Sigma) (Nakamura y Goto, 1996; Levine *et al.*, 2000; Pyngrope *et al.*, 2013). Alícuotas de 100-300 µg de proteínas se mezclaron con un volumen de DNPH 10 mM en HCl 2 M, y se incubaron durante 1 h a 25 °C. Se añadieron diez volúmenes ácido tricloroacético (TCA) al 10% (p/v) en acetona a cada muestra, y se mantuvieron a -20 °C durante 1 h. Las muestras se centrifugaron entonces a 5000 g durante 5 min, y los precipitados formados se lavaron tres veces con una mezcla 1:1 (v/v) de etanol:acetato de etilo. Finalmente, estas proteínas precipitadas se resuspendieron en PBS 10 mM, que contenía fosfato sódico 10 mM pH 7,4 y NaCl 137 mM, y se usaron para la posterior electroforesis y inmunoblot.

#### 5.4. Detección de proteínas S-nitrosiladas

##### 5.4.1. El método de *biotin switch*

La detección de proteínas S-nitrosiladas se llevó a cabo mediante el método de *biotin switch* (Begara-Morales *et al.*, 2013). Los extractos proteicos se obtuvieron triturando 0,2 g de tejido de hojas de sorgo en 1 ml de tampón HEN, que contenía HEPES-KOH 25 mM pH 7,7, EDTA 1 mM y neocuproína 0,1 mM. El control positivo se preparó incubando la muestra con 1 mM del agente nitrosilante S-nitrosocisteína (CSNO) durante 1 h a 4 °C en oscuridad. A continuación, se añadieron tres volúmenes de tampón de bloqueo, que contenía HEPES-KOH 25 mM pH 7,7, EDTA 1 mM, SDS al 3% (p/v) y S-metilmetanotiosulfonato (MMTS) 28 mM pre-disuelto en dimetilformamida (DMF) seca, para desnaturalizar las proteínas y bloquear los grupos tiol libres. Las muestras se incubaron entonces durante 20 min a 50 °C, dando un vórtex cada 10 min. El exceso de MMTS se retiró precipitando las muestras con acetona, y las proteínas se resuspendieron en 0,1 ml de tampón HENS, que contenía HEPES-KOH 250 mM pH 7,7, EDTA 1 mM, neocuproína 0,1 mM y SDS al 1% (p/v), por cada mg de proteína. La biotinilación se consiguió añadiendo N-[6-(biotinamido)-hexil]-3-(2-piridiltio)-propionamida (biotina-HPDP) y ascorbato 0,1 mM, e incubando a temperatura ambiente durante 1,5 h en oscuridad. Luego, las proteínas se volvieron a precipitar con acetona para eliminar el exceso de biotina, se resuspendieron en HENS y, en el caso de experimentos *in vitro* o *in planta*, se separaron por SDS-PAGE (excluyendo al β-mercaptoetanol del tampón de disociación) y se analizaron por inmunoblot detectando las proteínas biotiniladas con anticuerpos comerciales anti-biotina (Sigma).

##### 5.4.2. Purificación de proteínas nitrosiladas

En el caso de experimentos *in vivo*, al haber menor cantidad de proteína nitrosilada, los anticuerpos anti-biotina no son lo suficientemente sensibles y se precisa una concentración de dichas proteínas para poder detectarlas. La concentración y purificación de proteínas nitrosiladas se llevó a cabo con resina agarosa Neutravidina®

(Thermo Scientific), según lo descrito por Correa-Aragunde y colaboradores (2013). Para ello, previamente se sometieron al método de *biotin switch* 100 µg de proteínas y, una vez marcadas con biotina, se precipitaron con acetona para eliminar el exceso de biotina y, a continuación, se resuspendieron en 100 µl de HEN10 (HEPES-KOH 10 mM pH 7,7, EDTA 1 mM y neocuproína 0,1 mM). Una alícuota de 20 µl de la muestra obtenida se reservó para usarla como control de carga (CC) en el SDS-PAGE. A los 80 µl restantes se les añadieron tres volúmenes de tampón de neutralización, que contenía tampón HEN, NaCl 100 mM y Triton X-100 al 0,5% (v/v), y la mezcla se transfirió a tubos nuevos, que contenían 15 µl de Neutravidina® previamente lavada tres veces con tampón de neutralización, y se mantuvo en agitación durante toda la noche a 4 °C.

Los sobrenadantes (SN) obtenidos tras la centrifugación de las muestras durante 1 min a 200 g se precipitaron con acetona, se resuspendieron en HENS y se utilizaron para monitorizar las proteínas no unidas a la Neutravidina®. La resina se lavó 4 veces con tampón de neutralización 600, que contenía HEN, NaCl 600 mM y Triton X-100 al 0,5% (v/v); y las proteínas unidas (EL) se eluyeron con β-mercaptoetanol al 1% (v/v) en tampón HEN10. Para cada muestra, CC, EL y SN se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC.

## 6. MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

### 6.1. Tipos de anticuerpos utilizados en este trabajo

1. Anticuerpos **anti-PEPC**: anticuerpos policlonales dirigidos contra la totalidad de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo. Producidos en conejo en los Servicios Generales de Investigación de la Universidad de Sevilla. La dilución utilizada fue de 1:3000.
2. Anticuerpos **anti-DNP**: anticuerpos policlonales dirigidos contra grupos dinitrofenol (DNP). Anticuerpos comerciales producidos en conejo (Sigma). La dilución utilizada fue de 1:500.
3. Anticuerpos **anti-biotina**: anticuerpos monoclonales dirigidos contra biotina. Anticuerpos comerciales producidos en ratón (Sigma). La dilución utilizada fue de 1:1000.
4. Anticuerpos **anti-ATG8**: anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína ATG8a de *Arabidopsis*. Anticuerpos comerciales producidos en ratón (Abcam). La dilución utilizada fue de 1:750.
5. Anticuerpos **anti-RFP**: anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína roja fluorescente (RFP) recombinante. Reconocen todas las variantes de la proteína RFP, incluyendo mCherry. Anticuerpos comerciales producidos en rata (Chromotek). La dilución utilizada fue de 1:1000.
6. Anticuerpos **anti-GFP**: anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína verde fluorescente (GFP) recombinante. Anticuerpos comerciales producidos en rata (Chromotek). La dilución utilizada fue de 1:1000.

7. Anticuerpos **anti-tubulina**: anticuerpos cedidos por el Dr. Yasin Dagdas del *Gregor Mendel Institute* (Viena, Austria). La dilución utilizada fue de 1:1000.
8. Anticuerpos **anti-GST**: anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína GST recombinante. Anticuerpos comerciales producidos en ratón (Santa Cruz Biotechnology). La dilución utilizada fue de 1:1000.
9. Anticuerpos **anti-ubiquitina**: anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína ubiquitina recombinante, clon P4D1-A11. Anticuerpos comerciales producidos en ratón (Merck). La dilución utilizada fue de 1:500.

## 6.2. Inmunoblot

Una vez finalizada la electroforesis, el gel de poliacrilamida se sumergió durante 20 min en tampón TGM, que contenía Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS al 0,037% (p/v) y metanol al 5% (v/v) (en el caso de inmunoblot para detectar la proteína ATG8 el porcentaje de metanol fue del 20%), en agitación. Los polipéptidos se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (GE Healthcare) o bien a una membrana de PVDF de 0,2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (GE Healthcare) mediante uno de los siguientes aparatos de transferencia: *Semidry Transfer Blot* (Bio-Rad) o *Trans Blot® Turbo™ Transfer System* (Bio-Rad). En el caso del primer aparato, las transferencias se realizaron durante 45 min a un voltaje constante de 10 V y una corriente límite de 5,5 mA  $\text{cm}^{-2}$  de membrana. En el caso del segundo aparato, las transferencias se realizaron durante 20 min a un voltaje constante de 25 V y una intensidad límite de 1,0 A, excepto en el caso de inmunoblot para detectar la proteína ATG8, en cuyo caso las transferencias se realizaron durante 5 min a un voltaje constante de 25 V y una intensidad límite de 1,3 A.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se incubó durante 1 h en agitación continua con tampón TBS que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,5 y NaCl 150 mM suplementado con leche desnatada en polvo al 5% (p/v) para saturar los sitios inespecíficos de ésta. Posteriormente se realizaron varios lavados con TBS y se procedió a la incubación con anticuerpos primarios (apartado 6.1) durante 3 h a temperatura ambiente o bien durante toda la noche a 4 °C, siempre en agitación continua.

Después de la incubación con anticuerpos primarios se lavó la membrana 3 veces con tampón TBS Tween, que contenía tampón TBS y Tween-20 al 0,1% (v/v), y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa, que pudieron ser anti-conejo (Invitrogen), anti-ratón (Novus) o anti-rata (CST) dependiendo de los anticuerpos primarios; también con agitación constante. Luego, se volvió a lavar la membrana 3 veces con tampón TBS Tween y por último se reveló mediante quimioluminiscencia con uno de los siguientes kits de revelado: *SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminiscent Substrate* (Thermo Scientific) o

*WesternBright™ Quantum* (Advansta); en uno de los dos sistemas de imagen siguientes: *LAS-3000 Imager* (Fujifilm) o *Amersham Imager 600* (GE Healthcare).

En las ocasiones en las que se reveló una misma membrana con dos anticuerpos primarios diferentes, después del primer revelado la membrana fue deshibridada con tampón de deshibridación que contenía glicina 25 mM pH 2 y SDS al 1% (p/v) durante 30 min en agitación continua, seguido de 3 lavados con TBS Tween. A partir de ahí, se volvió a empezar el protocolo para el segundo revelado desde la saturación con leche.

### 6.3. Purificación de anticuerpos

En el caso de los anticuerpos anti-PEPC, que no eran comerciales, hubo que realizar una purificación a partir del suero sanguíneo del conejo. Se hizo mediante una cromatografía basada en la capacidad de la *Protein A-Sepharose® CL-4B* (GE Healthcare) de retener específicamente a las inmunoglobulinas G. La capacidad de retención de la resina oscila entre 2 y 15 mg de inmunoglobulinas por cada ml de resina.

Para la preparación de la columna se resuspendió 1 g de resina en 4 ml de tampón A, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 8, y se empaquetó en una columna de 20 ml (Bio-Rad) equilibrada previamente con tampón PBS, que contenía fosfato sódico 25 mM pH 7,5 y NaCl 0,9% (p/v). A continuación, se hicieron pasar por la columna 2 ml del suero sanguíneo, y se lavó con 25 ml de tampón PBS hasta que la absorbancia a 280 nm se estabilizó a cero. Las inmunoglobulinas retenidas en la columna fueron eluidas con tampón citrato 200 mM pH 2,8. Se recogieron 6 fracciones de 4 ml a las que se les añadió rápidamente 1,5 ml de tampón Tris-HCl 1 M pH 8,8 para neutralizar la acidez. Las fracciones que contenían las inmunoglobulinas se agruparon, se concentraron con sulfato de amonio al 50% de saturación y se centrifugaron a 20 000 g durante 15 min a 4 °C; y el precipitado se resuspendió en tampón B que contenía Tris-HCl 100 mM pH 7,5 y glicerol al 20% (v/v). Los anticuerpos recogidos se dializaron durante toda la noche a 4 °C utilizando membranas de celulosa (Sigma). Los anticuerpos se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

### 6.4. Inmunoprecipitación de la PEPC

Para inmunoprecipitar la PEPC se utilizaron los anticuerpos obtenidos en el apartado anterior. Para ello, 60 µg de proteína proveniente de extractos proteicos que contenían la PEPC se incubaron con 10 µg de anticuerpos durante toda la noche a 4 °C en agitación. Tras ello, se añadió la resina *Protein A-Sepharose CL-4B* (GE Healthcare) al 4% (p/v) y se dejó actuar en agitación durante 15 min a 4 °C. Luego, el inmunoprecipitado se recuperó por centrifugación a 13 000 g durante 5 min a 4 °C y se sometió a dos lavados sucesivos con tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 1,5 M y Triton X-100 al 1% (v/v). También se realizó un lavado con tampón que contenía Tris-HCl 100 mM pH 8 para eliminar los restos de detergente y sal, y

finalmente el precipitado se resuspendió en tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS al 2% (p/v), glicerol al 10% (v/v) y  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM, y se calentó a 95 °C durante 10 min para eluir las proteínas de la resina. Se centrifugó a 13 000 g durante 5 min y el sobrenadante se sometió al protocolo de detección de proteínas carboniladas (apartado 5.3).

## 6.5. Coinmunoprecipitaciones

### 6.5.1. Coinmunoprecipitación con GST-NBR1

En las coinmunoprecipitaciones con GST-NBR1 se usó la proteína recombinante GST-NBR1 pre-unida a la resina glutatión sefarosa 4B, producida tal y como se indica en el apartado 3.3. Los extractos proteicos usados provenían de hojas, raíces y semillas de sorgo; de hojas de *arabidopsis*, y de células de *N. benthamiana*, y se realizaron con tampón GTEN que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10% (v/v) y EDTA 1 mM suplementado con PMSF 1 mM, quimostatina 16,5  $\mu$ M y leupeptina 2,2  $\mu$ M como inhibidores de proteasas, IGEPAL® CA-630 (Sigma) al 0,1% (v/v) y DTT 10 mM. Para disminuir la degradación de GST-NBR1 durante la incubación con los extractos de sorgo, éstos se congelaron y descongelaron previamente a su utilización.

Para la coinmunoprecipitación, alícuotas de 100-200  $\mu$ g de proteína provenientes de los extractos proteicos se incubaron con 25  $\mu$ l de resina durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, se centrifugaron a 1000 g durante 2 min a 4 °C y se tomó el sobrenadante (SN) para monitorizar las proteínas no unidas a GST-NBR1. Se realizaron cinco lavados con tampón de lavado que contenía tampón GTEN e IGEPAL® CA-630 al 0,1% (v/v), tomando una alícuota de último lavado como referencia. Por último, el precipitado se resuspendió en tampón de disociación y se calentó durante 5 min a 95 °C; se centrifugó a 1000 g durante 2 min y el sobrenadante (IP) se analizó por SDS-PAGE y inmunoblot.

### 6.5.2. Coinmunoprecipitación con GFP-ATG8

En las coinmunoprecipitaciones con GFP-ATG8 se usaron extractos proteicos de hojas de *N. benthamiana* infiltradas con construcciones de GFP-ATGa-i. Estos extractos se realizaron en tampón GTEN que contenía Tris-HCl 25 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol al 10% (v/v) y EDTA 1 mM, suplementado con inhibidores de proteasas en tableta (1 tableta por cada 50 ml), IGEPAL® CA-630 (Sigma) al 0,1% (v/v), polivinilpolipirrolidona al 2% (p/v) y DTT 10 mM.

Para la coinmunoprecipitación, alícuotas de 1 ml de extracto proteico se incubaron con 10  $\mu$ l de *GFP\_Trap®\_A* (Chromotek) durante 1-2 h a 4 °C, y se centrifugaron a 1000 g durante 2 min a 4 °C seguido de 5 lavados con tampón de lavado que contenía tampón GTEN e IGEPAL® CA-630 al 0,1% (v/v). Por último, la

resina se resuspendió en tampón de disociación y se calentó durante 5 min a 95 °C; se centrifugó a 1000 g durante 2 min y el sobrenadante se analizó por SDS-PAGE y inmunoblot.

## 7. TÉCNICAS MOLECULARES

### 7.1. Extracción de ADN

A partir de 50-100 mg de tejido congelado, se extrajo el ADN total mezclándolo con tampón Edwards, que contenía Tris-HCl 200 mM pH 7,5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS al 0,5% (p/v). Se centrifugó a 1500 g durante 15 min a temperatura ambiente y se añadió al sobrenadante un volumen de isopropanol para precipitar el ADN. Se volvió a centrifugar a 1500 g durante 30 min y por último se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante toda la noche. Por último, se resuspendió el precipitado en 20 µl de tampón TE, que contenía Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM, y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

### 7.2. Extracción de ARN

A partir de 50-100 mg de tejido congelado pulverizado se extrajo el ARN total utilizando el kit *Plant RNA Isolation Mini Kit* (Agilent Technologies). Los ácidos nucleicos extraídos se trataron con ADNasa I (Sigma) para eliminar la contaminación de ADN genómico en las muestras. Las concentraciones de ARN se determinaron usando un Nanodrop 2000, y se determinó la calidad de la extracción mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$ . El ARN obtenido se conservó a -80 °C hasta su utilización.

### 7.3. Retrotranscripción de ARN a ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó 1 µg del ARN extraído, empleando el kit *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo durante 10 min a 25 °C seguidos de 30 min a 55 °C. Por último, se inactivó la transcriptasa reversa calentando a 85 °C durante 5 min. El ADNc sintetizado se diluyó cinco veces y se conservó a -20 °C hasta su uso.

### 7.4. Experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

#### 7.4.1. PCR a tiempo final

Las reacciones de PCR a tiempo final se realizaron con el kit comercial *i-Taq™ DNA Polymerase* (iNtRON Biotechnology), o bien con el kit *Q5® High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs), en un termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad). Los productos de las PCRs se visualizaron en geles de agarosa fabricados con tampón TAE que contenía Tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM y agarosa al 1% (p/v), utilizando *RedSafe™* (iNtRON Biotechnology) para teñir los ácidos nucleicos. Estos geles se desarrollaron a un voltaje constante de 100 V durante 30 min en una



cubeta Gel XL Ultra V-2 (Labnet), y se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (MaestroGen).

#### 7.4.2. PCR a tiempo real (qPCR)

Las reacciones de PCR a tiempo real (qPCR) se realizaron en un volumen final de 20 µl consistente en 5 µl del ADNc obtenido en el apartado 7.3, 15 µM de cebadores específicos (**Tabla 4**) y 10 µl de 2X *SensiFAST SYBR No-ROX kit* (Roche). La qPCR se llevó a cabo en un *MiniOpticon™ Real-Time PCR System* (Bio-Rad), y los ciclos umbral ( $C_t$ ) se determinaron usando el software de análisis CFX Manager V1.6 (Bio-Rad). Como control interno para normalizar los valores obtenidos se midió la cantidad de transcrito del gen de actina del sorgo y se utilizó el método Livak (Livak y Schmittgen, 2001) para el tratamiento de los datos y el cálculo de la expresión relativa. Para validar los cebadores y el programa de amplificación utilizado se usaron diluciones seriadas de ADNc para la construcción de una recta de eficiencia:  $R^2 > 0,98$  y eficiencia 90-105%.

**Tabla 4.** Cebadores utilizados en este trabajo.

Gen		Secuencia	Descripción
SbATG18a	F	5'-GGATGGAAGCTTCTACAGATGCCA-3'	Marcador de expresión autofágico
	R	5'-GGTCACCGAGGGCCACAAA-3'	
SbATG6a	F	5'-ATTGGAAGAGCGGTACTGGC-3'	Marcador de expresión autofágico
	R	5'-GCCATGGTATGCAACAGCAG-3'	
SbATG6b	F	5'-GTCGGAGCTGACTCCGGTAT-3'	Marcador de expresión autofágico
	R	5'-TGGCCTTGGTGGTTGGTTAG-3'	
Sbactina	F	5'-TCACCATCGGGGCAGAG-3'	Control interno de expresión
	R	5'-GGGAGGCAAGGATGGAC-3'	
AtATG18a	LP	5'-TCAAGTGACAAAGGAACGGTC-3'	Genotipado de línea SALK deficiente en ATG18a
	RP	5'-ATGTGGTCCTGTTTCTTGGAC-3'	
AtNBR1	LP	5'-GGAGGCATTAAGGTTTCAGTCC-3'	Genotipado de línea SALK deficiente en NBR1
	RP	5'-TCGCTTGTGAATATTGTGCAG-3'	
LBb1.3		5'-ATTTTGGCGATTCGGAA-3'	Genotipado de líneas SALK
SbPPC3	1	5'-GGCTCTATGCCGGAGCGGCACCAGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGCTGCTGGCCCCCGG-3'	Clonación del gen <i>PPC3</i> de sorgo con el sistema <i>GreenGate</i> – incluye 3 domesticaciones de sitios de restricción
	2	5'-CCTTCCCGGGGGCCAGCAGCCGCAGCTGCGCTCGATCGACTGGTGCCGCTCCGGCATAG-3'	
	3	5'-AACAGGTCTCAAAGGTTCCGAGGACGACAA-3'	
	4	5'-AACAGGTCTCAAGAGATCTCCTGACGGACTG-3'	
	5	5'-AACAGGTCTCACTCTTCTCCAGAAGCACGGCAG-3'	
	6	5'-AACAGGTCTCAGGTCACCCTTGGCGAAAACC-3'	
	7	5'-AACAGGTCTCAGACCCGGGAATTGCAGCTGTATATGA-3'	

	8	5'-AACAGGTCTCACTGACTAGCCGGTATTC TGCAT-3'	
SbNBR1	1	5'-AACAGGTCTCAGGCTCTGAGGAGAAGTT GCTGAGGGA-3'	Clonación del fragmento C-terminal del gen <i>NBR1</i> de sorgo con el sistema <i>GreenGate</i>
	2	5'-AACAGGTCTCACTGATCACTTGTCCTTTT TCTCCCTGG-3'	
$\beta$ C1	F	5'-GGCTCTAGGAGCAGAACAAACACGCAG GGAGTCAGGTTACAGTCGACGTTTCGCATC ATGACGAACATGAAGATATTCATTCACATG AAGCTAGTATCCACCAAGTCACCATCGCTC ATC-3'	Alineamiento de la secuencia del péptido $\beta$ C1 para su clonación con el sistema <i>GreenGate</i>
	R	5'-CTGAGATGAGCGATGGTGACTTGGTGGA TACTAGCTTCATGTGAATGAATATCTTCAT GTTTCGTCATGATGCGAACGTCGACTGTGAA CCTGACTCCCTGCGTGTGTTGTTCTGCTCCTA G-3'	
$\beta$ C1 <sup>V32A</sup>	F	5'- GGCTCTAGGAGCAGAACAAACACGCAG GGAGTCAGGTTACAGTCGACGTTTCGCATC ATGACGAACATGAAGATATTCATTCACATG AAGCTAGCATCCACCAAGTCACCATCGCTC ATC-3'	Alineamiento de la secuencia del péptido $\beta$ C1 <sup>V32A</sup> para su clonación con el sistema <i>GreenGate</i>
	R	5'- CTGAGATGAGCGATGGTGACTTGGTGGA TGCTAGCTTCATGTGAATGAATATCTTCAT GTTTCGTCATGATGCGAACGTCGACTGTGAA CCTGACTCCCTGCGTGTGTTGTTCTGCTCCTA G-3'	
$\beta$ C1 <sup>30-40</sup>	F	5'- GGCTCTATGAAGCTAGTATCCACCAAGT CACCATCGCTCATC-3'	Alineamiento de la secuencia del péptido $\beta$ C1 <sup>30-40</sup> para su clonación con el sistema <i>GreenGate</i>
	R	5'- CTGAGATGAGCGATGGTGACTTGGTGGA TACTAGCTTCATAG 3'	
$\beta$ C1 <sup>30-40V32A</sup>	F	5'- GGCTCTATGAAGCTAGCATCCACCAAGT CACCATCGCTCATC-3'	Alineamiento de la secuencia del péptido $\beta$ C1 <sup>30-40V32A</sup> para su clonación con el sistema <i>GreenGate</i>
	R	5'- CTGAGATGAGCGATGGTGACTTGGTGGA TGCTAGCTTCATAG -3'	

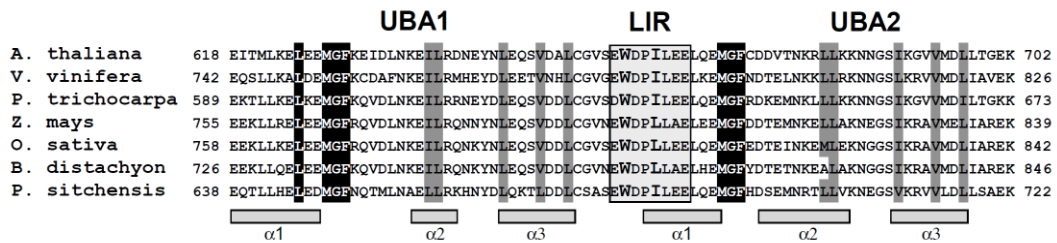
## 7.5. Clonaciones y construcciones

### 7.5.1. GST-NBR1

El extremo C-terminal de la proteína NBR1 de sorgo (número de acceso GenBank XM\_002454062), correspondiente a la secuencia de nucleótidos entre los residuos en posición 2293 y 2556 junto con los sitios de recombinación attB, fue sintetizada experimentalmente mediante gBlocks® (IDT). Esta secuencia contenía los dos dominios UBA y el motivo AIM de la proteína, siendo la secuencia homóloga a la ya descrita para otras especies vegetales (**Fig. 12**).

La secuencia, que fue clonada en un vector de expresión a través del sistema de clonación Gateway®, se introdujo en el vector de clonación pDNOR221 (Invitrogen) utilizando el sistema BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen). La construcción se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$ , y a partir de ella los plásmidos confirmados se

purificaron mediante miniprep (Promega) y se utilizaron en una reacción LR con el vector de destino pGEX-KG (donado por el Dr. Galván-Ampudia, Universidad de Ámsterdam) para obtener el vector de expresión con la proteína recombinante unida a GST (**Fig. 13A**). Este vector se transformó de nuevo en *E. coli* DH5 $\alpha$  y los clones positivos fueron confirmados mediante ensayos de restricción.



**Figura 12.** Alineamiento de secuencia del extremo C-terminal de homólogos de NBR1 de plantas superiores. La secuencia contiene los dos dominios UBA (UBA1 y UBA2) de unión a ubiquitina y el motivo AIM (LIR) de unión a ATG8. Los residuos hidrofóbicos conservados están señalados en gris en el caso de residuos similares y en negro en el caso de residuos idénticos. Las cajas grises indican la localización aproximada de  $\alpha$ -hélices (Svenning *et al.*, 2011).

### 7.5.2. mCherry-PPC3

La proteína recombinante mCherry-PPC3 se clonó en un vector de expresión en plantas a través del sistema de clonación *GreenGate* (Lampropoulos *et al.*, 2013). Con el ADNc sintetizado de sorgo se amplificó la secuencia de *SbPPC3* (N° de acceso en GenBank: XM\_002451810) por PCR usando una ADN polimerasa de alta fidelidad y los cebadores específicos que contenían los sitios de recombinación con el plásmido, además de otros cebadores diseñados para domesticar la secuencia eliminando tres sitios de restricción de la enzima *BsaI*, con la cual trabaja el sistema *GreenGate* (**Tabla 4**). La primera pareja de cebadores para la clonación del gen *SbPPC3* se utilizó directamente realizando un alineamiento entre los cebadores a 95 °C durante 3 min y posteriormente reduciendo la temperatura hasta 22 °C a 0,1 °C s<sup>-1</sup>. El producto de PCR fue confirmado por tamaño y fue introducido en el vector de clonación pGGC basado en el plásmido pUC19. Esta construcción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR y secuenciación, se purificó el plásmido mediante miniprep. Este plásmido se usó en una reacción *GreenGate* para introducir la secuencia de *PPC3* en un vector de destino pGGZ basado en el plásmido pGreen-IIS unida a mCherry bajo el control del promotor y el terminador del gen *UBQ10* (**Fig. 13B**).

La construcción en el vector de destino se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR, se purificó el plásmido mediante miniprep. El plásmido purificado se usó, junto con el plásmido auxiliar pSOUP, para cotransformar *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 competente por

choque térmico, y las colonias positivas se usaron para transformar hojas de tabaco mediante infiltración.

### 7.5.3. BFP-NBR1

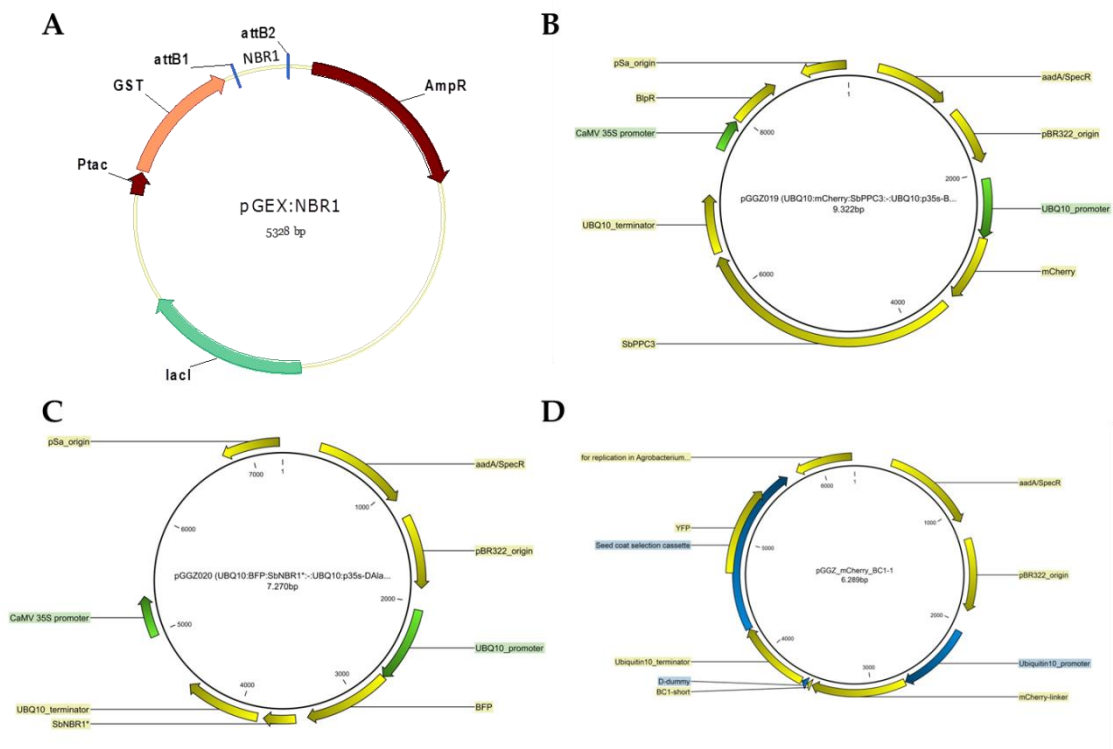
La proteína recombinante BFP-NBR1 se clonó en un vector de expresión en plantas a través del sistema de clonación *GreenGate* (Lampropoulos *et al.*, 2013). La secuencia del extremo C-terminal de NBR1 se amplificó a partir del vector ya clonado en el sistema Gateway® usando cebadores específicos que contenían los sitios de recombinación con el plásmido de entrada (**Tabla 4**). El producto de fue confirmado por tamaño y fue introducido en el vector de clonación pGGC basado en el plásmido pUC19. Esta construcción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR y secuenciación, se purificó el plásmido mediante miniprep. Este plásmido se usó en una reacción *GreenGate* para introducir la secuencia de *PPC3* en un vector de destino pGGZ basado en el plásmido pGreen-IIS unida a BFP bajo el control del promotor y el terminador del gen *UBQ10* (**Fig. 13C**).

La construcción en el vector de destino se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR, se purificó el plásmido mediante miniprep. El plásmido purificado se usó, junto con el plásmido auxiliar pSOUP, para cotransformar *A. tumefaciens* GV3101 competente por choque térmico, y las colonias positivas se usaron para transformar hojas de tabaco mediante infiltración.

### 7.5.4. mCherry- $\beta$ C1

La proteína recombinante mCherry- $\beta$ C1, en su versión corta y larga así como las correspondientes versiones mutadas, se clonaron en un vector de expresión en plantas a través del sistema de clonación *GreenGate* (Lampropoulos *et al.*, 2013). Las secuencias fueron sintetizadas experimentalmente a partir del alineamiento de parejas de cebadores específicos (**Tabla 4**). Las parejas de cebadores para la clonación de las versiones de  $\beta$ C1 se utilizaron directamente realizando un alineamiento entre los cebadores a 95 °C durante 3 min y posteriormente reduciendo la temperatura hasta 22 °C a 0,1 °C s<sup>-1</sup>. El producto del alineamiento fue confirmado por tamaño y fue introducido en el vector de clonación pGGC basado en el plásmido pUC19. Esta construcción se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR y secuenciación, se purificó el plásmido mediante miniprep. Este plásmido se usó en una reacción *GreenGate* para introducir las distintas secuencias de  $\beta$ C1 en vectores de destino pGGZ basados en el plásmido pGreen-IIS unidas a mCherry bajo el control del promotor y el terminador del gen *UBQ10* (**Fig. 13D**).

La construcción en el vector de destino se usó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competente y a partir de las colonias positivas, confirmadas por PCR, se purificó el plásmido mediante miniprep. El plásmido purificado se usó, junto con el plásmido auxiliar pSOUP, para cotransformar *A. tumefaciens* GV3101 competente por electroporación, y las colonias positivas se usaron para transformar hojas de tabaco mediante infiltración.



**Figura 13. Vectores de expresión utilizados en este trabajo.** A. Vector de expresión en *E. coli* pGEX que contiene la proteína recombinante NBR1 unida GST. B. Vector de expresión en plantas pGreen-IIS que contiene la proteína recombinante SbPPC3 unido a mCherry bajo el control del promotor y terminador de la ubiquitina 10. C. Vector de expresión en plantas pGreen-IIS que contiene el extremo C-terminal de la proteína SbNBR1 unido a BFP bajo el control del promotor y terminador de la ubiquitina 10. D. Vector de expresión en plantas pGreen-IIS que contienen  $\beta$ C1 unido a mCherry bajo el control del promotor y terminador de la ubiquitina 10. Para el resto de versiones de  $\beta$ C1 la construcción es la misma.

### 7.5.5. GFP-ATG8

Las líneas de *A. tumefaciens* GV3101 que contenían los plásmidos de expresión en plantas pGGZ (basado en el plásmido pGreen-IIS) del sistema *GreenGate*, con las construcciones GFP-ATG8a, GFP-ATG8b, GFP-ATG8c, GFP-ATG8d, GFP-ATG8e, GFP-ATG8f, GFP-ATG8g, GFP-ATG8h y GFP-ATG8i, bajo el promotor y terminador del gen *UBQ10*, fueron donadas por el Dr. Yasin Dagdas del *Gregor Mendel Institute* (Viena, Austria). Las secuencias procedían de los distintos isógenos *ATG8* de *Arabidopsis*.

### 7.5.6. EV-mCherry y EV-GFP

Las líneas de *A. tumefaciens* GV3101, que contenían los plásmidos de expresión en plantas pGGZ (basado en el plásmido pGreen-IIS) del sistema *GreenGate*, con las construcciones EV-mCherry y EV-GFP, bajo el promotor y terminador del gen *UBQ10*, fueron donadas por el Dr. Yasin Dagdas del *Gregor Mendel Institute* (Viena, Austria). Estas construcciones se diseñaron para la expresión de las proteínas fluorescentes mCherry y GFP solas, sin ninguna secuencia codificante unida a ellas, y se utilizaron como control negativo.

### 7.6. Termoforesis a microescala (MST)

La termoforesis a microescala es una técnica novedosa que se usa para determinar la afinidad entre moléculas. Se basa en la detección de cambios termoforéticos debidos a interacción entre las moléculas testadas. Se utilizó la proteína ATG8a de arabisopsis purificada en el apartado 3.2, a la que se le aplicó la tinción fluorescente *Monolith™ NT Protein Labeling kit BLUE-MALEIMIDE* (NanoTemper Technologies). Los péptidos  $\beta C1^{30-40}$ ,  $\beta C1^{30-40V32A}$ , PexRD54 y PexRD54<sup>AIM2</sup>, sintetizados experimentalmente, fueron cedidos por el Dr. Yasin Dagdas del Gregor Mendel Institute (Viena, Austria). Las medidas de afinidad se realizaron con 28 nM de la proteína recombinante ATG8a disuelta en agua con un 0,05% de Tween-20 (v/v), que fueron incubadas con los péptidos  $\beta C1^{30-40}$ ,  $\beta C1^{30-40V32A}$ , PexRD54 y PexRD54<sup>AIM2</sup> en diluciones seriadas. En los casos de  $\beta C1^{30-40}$  y  $\beta C1^{30-40V32A}$ , se utilizó una concentración inicial de 10 mM y 16 diluciones seriadas hasta 305 nM. Para PexRD54 y PexRD54<sup>AIM2</sup> se usó una concentración inicial de 2 mM y 16 diluciones seriadas hasta 61 nM. Todas las mezclas experimentales se incubaron durante 30 min antes de transferir las muestras a capilares *NT.115 Hydrophobic Treated Capillaries* (NanoTemper Technologies). Las medidas se realizaron en un instrumento *Monolith™ NT.115 BLUE/RED* (NanoTemper Technologies) a 25 °C, con unos tiempos de láser apagado/encendido/apagado de 5 s/ 30 s/ 5 s, una potencia de excitación LED de 70% y una potencia MST del láser infrarrojo del 20%. Los datos de tres experimentos independientes fueron ajustados al modelo de unión simple mediante el software *NT.Analysis* versión 1.5.41 (NanoTemper Technologies) usando la señal de la termoforesis + T-Jump.

## 8. MICROSCOPIA

### 8.1. Microscopía confocal

Para la detección de autofagosomas en plantas de sorgo, las hojas se cortaron en secciones de 1 cm y se sumergieron en monodansilcadaverina (MDC, Sigma) 100  $\mu$ M en PBS, incubándolas durante 30 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Las raíces se sumergieron directamente en la MDC y se incubó en las mismas condiciones.

Luego, las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 15 min y las hojas se volvieron a seccionar a mano usando una cuchilla, de manera que se obtuviera un corte transversal de éstas. Las muestras se observaron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710 usando un filtro DAPI con excitación a 405 nm y emisión a 452 nm.

Para la detección de autofagosomas mediante GFP-ATG8, y de mCherry- $\beta$ C1, mCherry-PPC3 y BFP-NBR1 en hojas de *N. benthamiana* infiltradas con *A. tumefaciens*, éstas se cortaron en secciones cuadradas de 0,5 cm de lado. Las muestras se observaron usando un microscopio confocal Zeiss LSM 710, usando para GFP un láser a 488 nm y un filtro de emisión de 504-533 nm, para mCherry un láser a 561 nm y un filtro de emisión de 610-630 nm, y para BFP un láser a 405 nm y un filtro de emisión de 441-470 nm. La clorofila A se detectó usando el láser a 488 nm y un filtro de emisión de 658-690 nm.

## 8.2. Detección de autofagosomas por microscopía electrónica

En la preparación de las muestras para la microscopía electrónica, secciones de hoja y de raíz de sorgo fueron fijadas con glutaraldehído al 3% (p/v) en cacodilato de sodio 0,1 M, seguido de una post-fijación con tetróxido de osmio al 1% (p/v) en cacodilato de sodio 0,1 M. A continuación, las muestras se lavaron con agua ultrapura y fueron deshidratadas mediante la incubación en una serie de soluciones de etanol con un gradiente positivo de concentración. Por último, se embebieron en resina EMBED-812. Se produjeron secciones ultrafinas en un ultramicrotomo Leica UC7 y las muestras fueron visualizadas en uno de los dos siguientes microscopios electrónicos de transmisión: JEOL JEM-1400 o Zeiss Libra 120, a un voltaje de aceleración de 80 kV.

## 9. OTROS MÉTODOS

### 9.1. Infiltración de hojas de *N. benthamiana* con *A. tumefaciens*

Las líneas de *A. tumefaciens* fueron cultivadas en 15 ml de medio líquido durante 48 h a 28 °C con agitación constante. Posteriormente, los cultivos se centrifugaron a 1000 g durante 5 min y se resuspendieron en 1 ml de *AgroBuffer*, que contenía MES 5 mM pH 5,6 y MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Este proceso se repitió una vez más, y luego se midió la densidad óptica de la muestra a 600 nm. Para la infiltración en hojas de *N. benthamiana*, se utilizaron las siguientes densidades ópticas en el caso de experimentos para microscopía confocal: isoformas de GFP-ATG8: 0,1-0,2; mCherry- $\beta$ C1 y versiones: 0,05; mCherry-PPC3: 0,5; BFP-NBR1: 0,5; EV-mCherry: 0,05; EV-GFP: 0,05. En el caso de experimentos para coimmunoprecipitaciones, se usaron las siguientes densidades ópticas: isoformas de GFP-ATG8: 1; mCherry- $\beta$ C1 y versiones: 0,5; EV-mCherry: 0,1; EV-GFP: 0,1. En el caso de que se coinfiltrara dos o más construcciones, se mezclaron en la misma solución las dos líneas de *A. tumefaciens* que contenían las construcciones indicadas, manteniendo para cada una la densidad óptica correspondiente.

Por último, se realizó la infiltración en hojas de *N. benthamiana* de 5-6 semanas de edad realizando un pequeño corte con una aguja estéril en el envés de la hoja, e introduciendo la solución preparada con *A. tumefaciens* mediante una jeringuilla estéril de 1 ml a través de la incisión, aplicando al mismo tiempo presión manualmente por la parte correspondiente del haz. Las plantas infiltradas se mantuvieron en las condiciones de cultivo indicadas en el apartado 1.3.1 durante 72 horas.

## 9.2. Cuantificación de proteínas y medidas de pH

Cuando se menciona, la determinación de proteínas en los extractos proteicos se realizó según el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976).

Las medidas de pH se realizaron en un medidor de pH GLP21 provisto de un electrodo (Crison).

## 10. SOFTWARE INFORMÁTICO

Los árboles filogenéticos fueron construidos usando secuencias obtenidas del *National Center of Biotechnology Information* (NCBI), encontradas usando BLAST, y utilizando el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016) con el método *neighbor-joining*. Los árboles fueron inferidos usando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de Kimura de 2 parámetros (Kimura, 1980). En los alineamientos múltiples se usó ClustalW. Para el análisis estadístico se utilizó el SigmaPlot 12.0 (Systat Software), siendo los datos analizados mediante el *t*-test.

En los análisis de imagen provenientes de inmunoblots se utilizaron dos programas: MultiGauge V3.0 (Fujifilm) e ImageStudio Lite V5.2 (LI-COR), y para el análisis y edición de imágenes provenientes de microscopía se usó el software ZEN (Zeiss). Para el análisis de datos provenientes de qPCR se utilizó el software CFX Manager V1.6 (Bio-Rad).

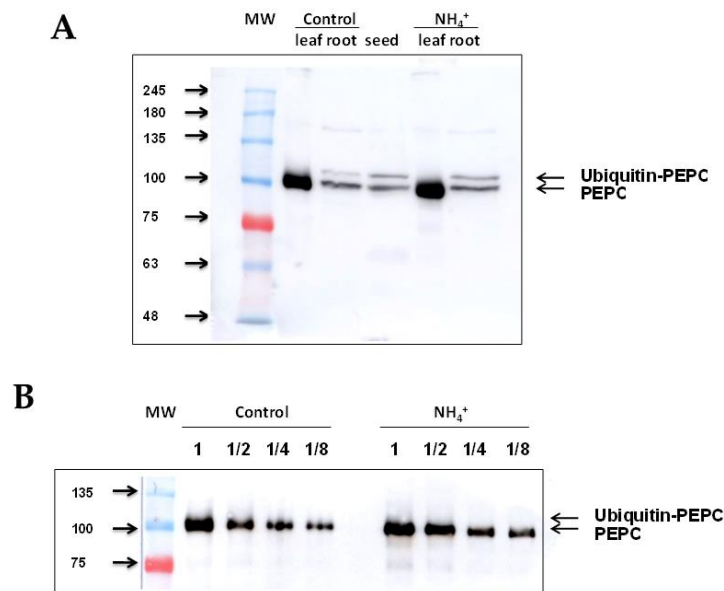


# RESULTADOS

---

## 1. SALINITY PROMOTES OPPOSITE PATTERNS OF CARBOXYLATION AND NITROSYLATION OF C<sub>4</sub> PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE IN SORGHUM LEAVES

Non-photosynthetic PEPC isoforms can be modulated both by phosphorylation and/or monoubiquitination (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014, 2016; Arias-Baldrich *et al.*, 2017). The latter post-translational modification (PTM) has not been reported for the photosynthetic C<sub>4</sub> isoform so far. **Fig. 14** shows the characteristic double band that is immunodetected by anti-PEPC antibodies in sorghum seeds and roots. The upper band is recognized by anti-ubiquitin antibodies (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014, 2016; Arias-Baldrich *et al.*, 2017) and it is absent in sorghum leaves (**Fig. 14**). In the present chapter, two new post-translational modifications of the C<sub>4</sub> PEPC of sorghum leaves are characterized: carbonylation and S-nitrosylation, as well as interactions between them.

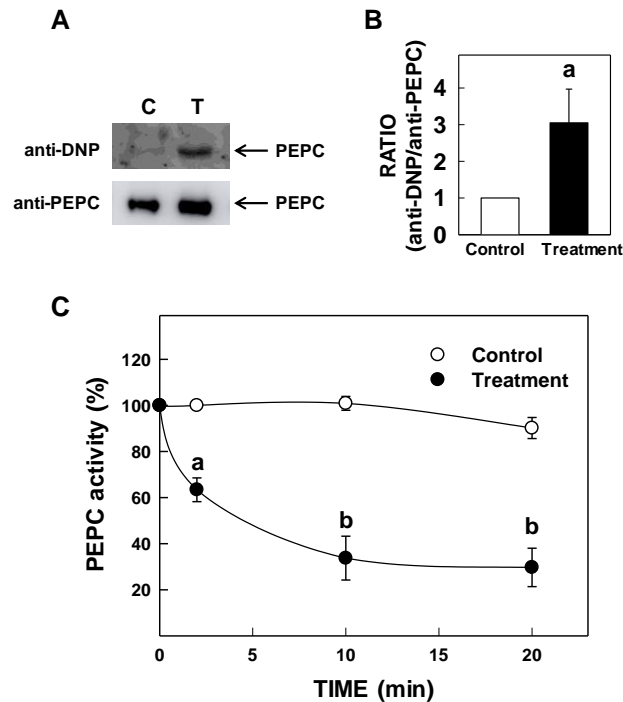


**Figure 14. Monoubiquitination of root and seed sorghum PEPC (C<sub>3</sub> isoforms) that is absent in leaf PEPC (C<sub>4</sub> isoform).** Extracts were prepared with leaves and roots of control and ammonium-treated plants (supplied with 5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> instead of nitrate, for 21 days), and with sorghum seeds that had been kept in distilled water for 20 h. **A.** 10 mU of PEPC were used for SDS-PAGE and immunoblot with anti-PEPC antibodies. **B.** Leaf extracts from control and ammonium-treated plants were diluted as indicated.

### 1.1. PEPC is carbonylated *in vitro* and *in vivo*

Measuring protein carbonylation level is usually used to evaluate oxidative modification of proteins. Detection and quantification of carbonylated proteins is accomplished after derivatization of the carbonyl groups. The most commonly employed derivatizing reagent is 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Dixon, 1964). The DNPH-derivatized proteins can be detected by immuno-blotting of SDS-PAGE separated proteins using commercial antibodies raised against DNP groups (Levine, 2002). Carbonylated proteins can be prepared with copper and ascorbate (Marx and

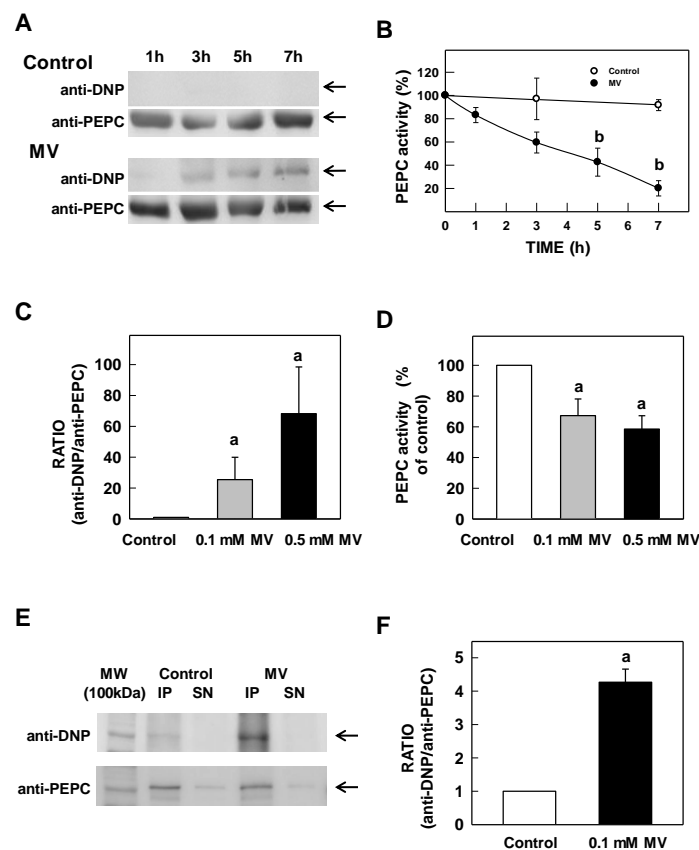
Chevion, 1986). Indeed, the incubation of purified C<sub>4</sub>-type PEPC from sorghum leaves with 25 mM sodium ascorbate and 0.1 mM CuSO<sub>4</sub> increased the amount of immunoreactive DNP-PEPC (**Fig. 15A**) by 3.6-fold (**Fig. 15B**). The treatment caused a time-dependent inactivation of the enzyme (**Fig. 15C**).



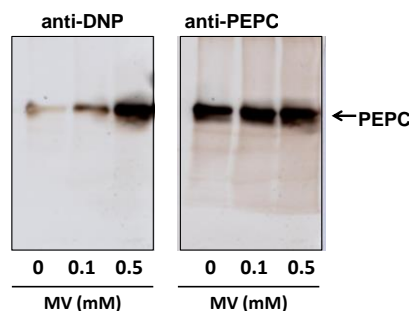
**Figure 15.** *In vitro* carbonylation of PEPC causes activity loss. Purified sorghum leaf PEPC (300 mU, 200 U mg<sup>-1</sup> protein) was incubated in 100  $\mu$ l of 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5, 0.15 NaCl, in the presence (T, treatment) or absence (C, control) of 25 mM sodium ascorbate and 0.1 mM CuSO<sub>4</sub>. **A.** Detection of carbonylated PEPC. After 20 min of incubation at 25 °C, proteins were processed as described in “Materiales y métodos”, analyzed by SDS-PAGE and immuno-blotted with anti-DNP (aliquots corresponding to 100 mU PEPC) and anti-PEPC antibodies (aliquots corresponding to 2 mU PEPC). **B.** Quantitative data (mean  $\pm$  SE,  $n = 4$ ) of the carbonylation. The ratio of the signal obtained with anti-DNP and anti-PEPC antibodies was calculated, and an arbitrary value of 1 was ascribed to the ratio of the control. **C.** Time-course of PEPC inactivation. 100% activity corresponded to  $7.29 \pm 1.05$  U mg<sup>-1</sup>. Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). Bars at **a**  $P < 0.05$  versus control ( $t$  test); at **b**  $P < 0.01$  versus control ( $t$  test).

To promote the oxidative modification of PEPC *in planta*, excised leaves were supplied with methyl viologen (MV) by transpiratory steam in the light (**Fig. 16**). MV causes an overproduction of ROS within chloroplasts, subjecting the plant to a severe oxidative stress. The supply of 5 mM MV caused a progressive increase of protein carbonylation level (**Fig. 16A**) accompanied by a parallel decrease of PEPC activity (**Fig. 16B**). At lower concentrations (0.1 and 0.5 mM), MV supplied for 12 h likewise increased the relative amount of carbonylated PEPC (**Fig. 16C**) and decreased enzyme activity (**Fig. 16D**). The loss of activity was not a result of protein cleavage (**Fig. 17**). The identity of the 105 kDa protein recognized by anti-DNP antibodies was confirmed by immunoprecipitation with anti-C<sub>4</sub> PEPC antibodies (**Fig. 16E, F**). **Fig. 16E** shows that

the amount of immunoprecipitated protein that was recognized by anti-PEPC antibodies was alike in control and MV-treated plants (IP bands, anti-PEPC). On the contrary, the signal corresponding to carbonylated proteins increased in MV-treated plants with respect to control plants (IP bands, anti-DNP). The quantification of IP bands showed that the ratio of carbonylated to total PEPC (anti-DNP/anti-PEPC) was significantly increased by the treatment with MV (**Fig. 16F**).

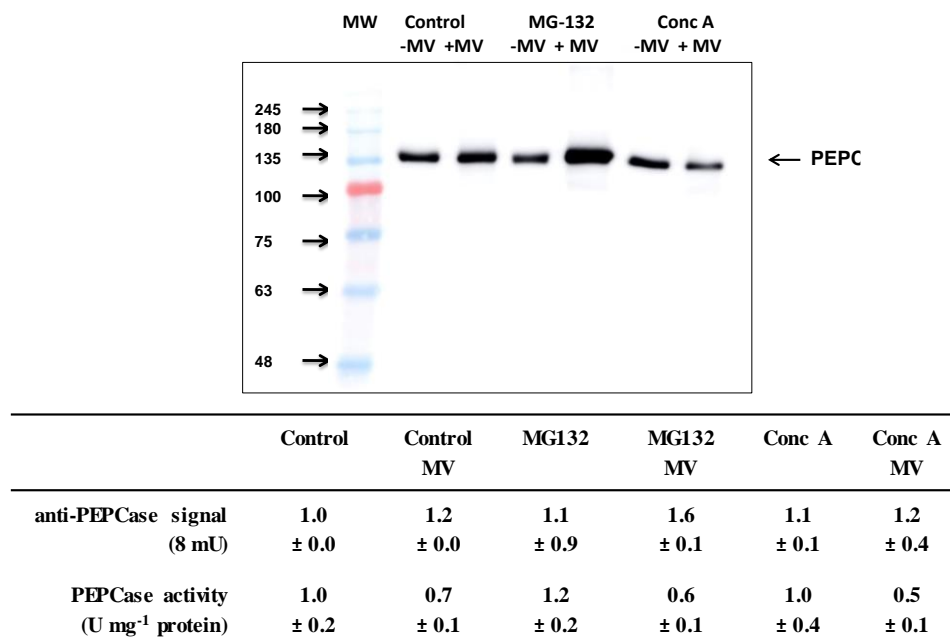


**Figure 16. The supply of MV to sorghum excised leaves promotes PEPC carbonylation and loss of activity.** **A, B.** Fully expanded leaves were excised and supplied with distilled water (control) or 5 mM MV (treatment) by transpiratory steam in the light ( $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR). **A.** Immunodetection of carbonylated PEPC. Leaf extracts (0.2 g) were prepared at different times, as described in “Materiales y métodos”. Immunoblots ( $75 \mu\text{g}$  protein per lane) were probed with anti-DNP and anti-PEPC antibodies. **B.** Time-course of PEPC inactivation. 100% of activity corresponded to  $1.7 \pm 0.3 \text{ U mg}^{-1}$  protein. Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). **C, D.** Excised leaves were supplied with 0, 0.1 or 0.5 mM MV for 12h in the light. **C.** Proteins (aliquots corresponding to 100 mU PEPC) were processed as described in “Materiales y métodos”, analyzed by SDS-PAGE and immuno-blotted with anti-DNP and anti-PEPC antibodies. Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). **D.** PEPC activity. Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 4$ ). 100% of activity corresponded to  $0.75 \pm 0.26 \text{ U mg}^{-1}$ . **E, F.** Extracts (0.2 g) from control and 0.1 mM MV-supplied leaves (24 h) were immunoprecipitated as described in “Materiales y métodos”, and then treated with DNPH. **E.** Immunoprecipitates (IP) and supernatants (SN) were immuno-blotted with anti-DNP (aliquots corresponding to  $60 \mu\text{g}$ ) and anti-PEPC (aliquots corresponding to  $15 \mu\text{g}$ ) antibodies. **F.** Quantitative data (mean  $\pm$  SE) from independent experiments ( $n = 4$ ). Bars at **a**  $P < 0.05$  versus control ( $t$  test); at **b**  $P < 0.01$  versus control ( $t$  test). Arrows show PEPC.



**Figure 17. MV promotes the carbonylation of PEPC without causing the cleavage of the enzyme.** Excised leaves were supplied with 0, 0.1 or 0.5 mM MV for 12 h in the light ( $350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR). Leaf extracts (0.2 g) were prepared as described in “Materiales y métodos”. Immunoblots (75  $\mu\text{g}$  protein per lane) were probed with anti-DNP and anti-PEPC antibodies.

The effect of MV was measured in the presence of the ubiquitin-proteasome pathway inhibitor MG132 (Lee and Goldberg, 1998) and the autophagy inhibitor concanamycin A (conca) (Matsuoka *et al.*, 1997). Both inhibitors decreased specific PEPC activity, presumably due to accumulation of altered proteins that were cleared by these two pathways (Fig. 18). The observation that MG132, but not conca, increased the amount of PEPC protein necessary to obtain a fixed PEPC activity, suggested that inactive, carbonylated PEPC was cleared by the ubiquitin-proteasome pathway. These results show that PEPC is carbonylated both *in vitro* and *in planta*, and this oxidative modification of the protein causes its inactivation.



**Figure 18. Effect of MG132 and conca on the accumulation of inactive PEPC in MV-treated leaves.** Excised leaves were supplied overnight with distilled water (control) or 0.2 mM MG132 or 1  $\mu\text{M}$  conca (conca). Then were supplied, when indicated, with 5 mM MV and illuminated for 3 h. PEPC activity was measured in crude extracts, and aliquots containing 8 mU were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted with anti-PEPC antibodies. Numbers in the table are means  $\pm$  SE of two independent experiments.

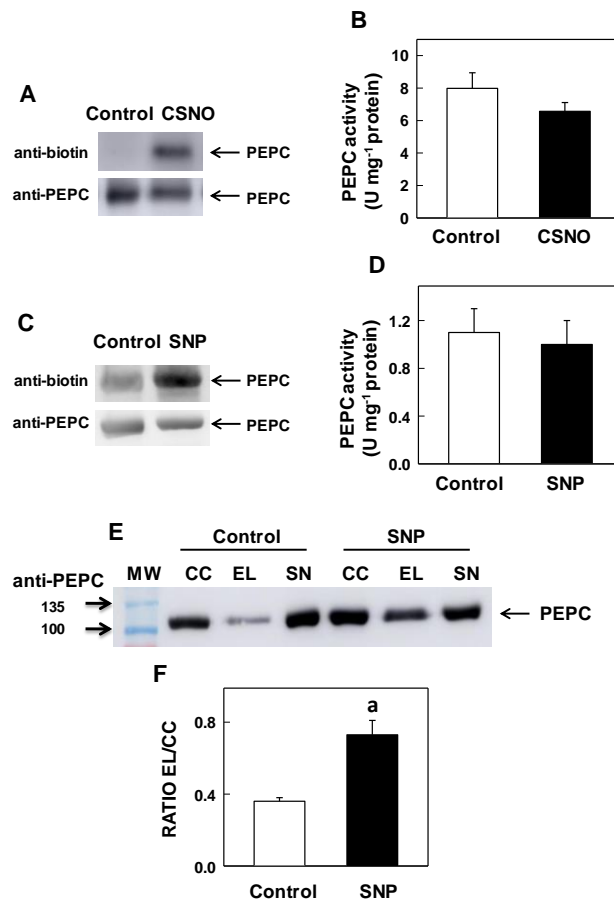
## 1.2. PEPC is nitrosylated *in vitro* and *in vivo*

Proteomic analyses have identified PEPC as a target of S-nitrosylation in arabidopsis (Lindermayr *et al.*, 2005) and in the CAM plant *Kalanchoe pinnata* (Abat *et al.*, 2008). *In silico* analysis of C<sub>4</sub> sorghum PEPC with the GPS-SNO v1.0 software (Xue *et al.*, 2010) predicted S-nitrosylation sites at C186, C417, C528 and C678 (**Table 5**). For *in vitro* protein S-nitrosylation, purified PEPC was incubated with 1 mM of the S-nitrosylating agent S-nitrosocysteine (CSNO). This treatment increased the amount of immunoreactive biotin-PEPC after the biotin switch (**Fig. 19A**). Similar results were obtained when excised sorghum leaves were supplied with the NO donor SNP (sodium nitroprusside) (**Fig. 19C**). This modification of the protein did not increase PEPC activity (**Fig. 19B, D**), but moderately decreased it in some of the experiments. These results show that PEPC is nitrosylated both *in vitro* and *in planta*, and that this modification of the protein has little effect on the activity of the enzyme.

**Table 5. Predicted S-nitrosylation sites on sorghum C<sub>4</sub> PEPC.** Cys nitrosylated residues were predicted using GPS-SNO 1.0 software with a high threshold (Xue *et al.*, 2010).

Position	Peptide	Score	Cutoff	Cluster
186	KNARIRN <b>CL</b> TQLSAK	3.641	2.443	Cluster B
417	CYKSLCE <b>CG</b> DKAIAD	2.554	2.443	Cluster B
528	GPYIISM <b>CT</b> APSDVL	1.563	1.484	Cluster A
678	MFGEEN <b>LC</b> FQSLQRF	2.473	2.443	Cluster B

As a previous step to optimize the detection of physiologically S-nitrosylated PEPC, neutravidin agarose was used to purify and concentrate S-nitrosylated proteins (**Fig. 19E, F**). After the biotin switch, proteins were incubated with neutravidin agarose and partitioned by centrifugation in “not bound” fraction (SN) and “bound fraction”, being this last eluted from neutravidin agarose with  $\beta$ -mercaptoethanol (EL). The amount of immunoreactive PEPC retained by neutravidin agarose (corresponding to S-nitrosylated PEPC) was higher in SNP-treated plants (**Fig. 19E**, EL bands). To correct differences in protein precipitation and recovery, the quantification of EL was referred to its corresponding control (CC; see “Materiales y métodos”). The EL/CC ratio was significantly increased in SNP-treated plants (**Fig. 19F**).

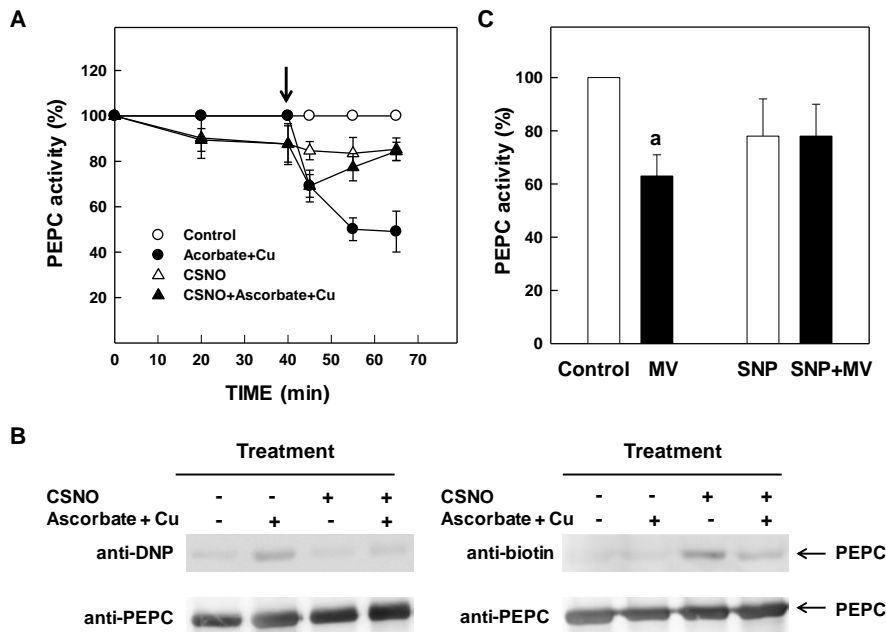


**Figure 19. Nitrosylation of PEPC.** A. Purified sorghum leaf PEPC (0.125 U, 0.6  $\mu$ g) was incubated in 100  $\mu$ l of 0.01 M PBS, pH 7.4, in the presence (CSNO) or absence (control) of 1 mM CSNO. After 60 min of incubation at 25  $^{\circ}$ C, proteins were subjected to biotin switch, SDS-PAGE and immuno-blotting with anti-biotin and anti-PEPC antibodies. B. Purified sorghum leaf PEPC (0.4 U, 50  $\mu$ g) was incubated in 50  $\mu$ l of 0.01 M PBS, pH 7.4, in the presence (CSNO) or absence (control) of 1 mM CSNO. After 60 min of incubation at 25  $^{\circ}$ C, PEPC activity was measured. Data are mean  $\pm$  SE from independent experiments ( $n = 3$ ). C. Excised leaves were supplied with distilled water (control) or 0.2 mM SNP (SNP). After 3 h in the light (750  $\mu$ mol photons  $m^{-2} s^{-1}$  PAR), aliquots containing 50  $\mu$ g of protein were used for the detection of nitrosylated PEPC. D. PEPC activity was measured in extracts from leaves treated as in Fig. 16C ( $n = 5$ ). E. Excised leaves were supplied with distilled water (control) or 1 mM SNP (SNP), and kept overnight inside a vacuum chamber. Extracts containing 100  $\mu$ g of protein were subjected to biotin switch and nitrosylated proteins were detected by binding to neutravidin as explained in “Materiales y métodos”. CC charge control, EL eluted proteins from neutravidin, SN supernatant with proteins not bound to neutravidin. F. Quantitative data (mean  $\pm$  SE) from independent experiments ( $n = 3$ ). Bars at a  $P < 0.05$  versus control ( $t$  test).

### 1.3. Interplay between nitrosylation and carbonylation of PEPC

There are experimental evidences that point to an interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants (Lounifi *et al.*, 2013). This subject was first investigated *in vitro* using purified PEPC (Fig. 20). The preincubation of purified PEPC with the nitrosylating agent CSNO protected the enzyme from the subsequent inactivation caused by copper and ascorbate (Fig. 20A). This effect on enzyme activity was accompanied of decreased carbonylation (Fig 20B, left) and increased S-nitrosylation (Fig. 20B, right) of PEPC. The protective effect of CSNO was not due to

direct interaction between CSNO and ascorbate + Cu (Fig. 21). After 5 min of incubation with ascorbate + Cu, PEPC preincubated (45 min) with CSNO kept 100% of its activity. When preincubation was omitted, PEPC activity decreased to 34%, both in the absence or the presence of CSNO. Similarly, overnight supply with the NO donor SNP protected the PEPC of excised sorghum leaves from MV-mediated inactivation (Fig. 20C). Taken together, the results suggest that S-nitrosylation protects the activity of C<sub>4</sub> PEPC from inactivation by protein carbonylation in sorghum leaves.

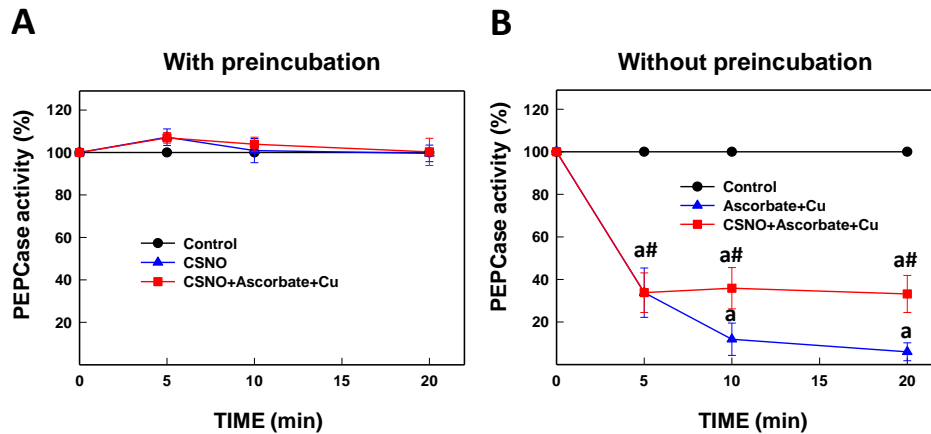


**Figure 20. Interplay between S-nitrosylation and carbonylation of PEPC.** **A.** Purified sorghum leaf PEPC (90 mU, 10  $\mu$ g) was incubated in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5, 0.15 M NaCl, in the presence (*triangles*) or absence (*circles*) of 1 mM CSNO for 45 min. Then (*arrow*), 25 mM sodium ascorbate and 0.1 mM CuSO<sub>4</sub> was added (*black symbols*) and PEPC activity was measured in aliquots of the incubation mixture at different times. 100% of activity corresponded to  $8.97 \pm 1.06$  U mg<sup>-1</sup>. Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). **B.** Immunoblots from a representative experiment at the last point of incubation. Aliquots corresponding to 10  $\mu$ g of proteins were probed with anti-DNP and anti-PEPC antibodies (*left*) or with anti-biotin and anti-PEPC antibodies (*right*). *Arrows* show PEPC. **C.** Excised leaves were supplied with distilled water (control) or 1 mM SNP (SNP) and kept overnight inside a vacuum chamber. Then, the leaves were transferred to solutions containing distilled water (control) or 5 mM MV (MV) and illuminated (350  $\mu$ mol photons m<sup>-1</sup> s<sup>-1</sup> PAR) for 3 h. PEPC activity was measured in crude extracts. 100% of activity corresponded to  $1.59 \pm 0.22$  U mg<sup>-1</sup>. Values are mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). *Bars at a*  $P < 0.05$  versus control (*t* test).

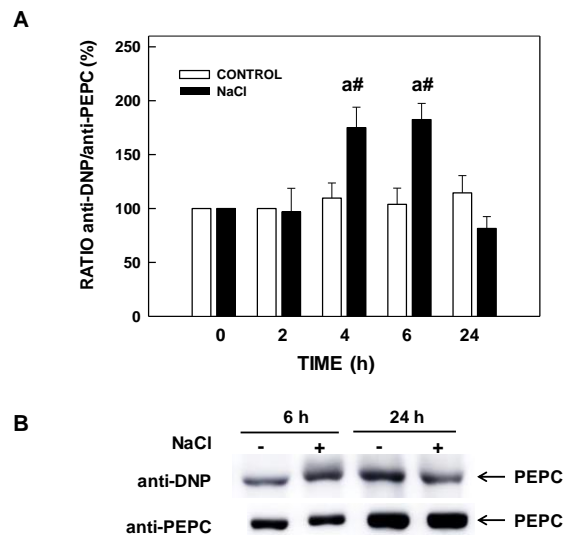
Next step was to explore the occurrence of these post-translational modifications in a physiological context, with physiological levels of ROS and NO. Sorghum seedlings were subjected to salt-shock (172 mM NaCl) and the level of carbonylation (Fig. 22) and nitrosylation (Fig. 23) of leaf PEPC was determined at different times. Maximum carbonylation levels were observed at 4-6 h after the onset of the treatment (Fig. 22), decreasing to control level at 24 h. On the contrary, minimum and maximum levels of PEPC S-nitrosylation were measured at 6 and 24 h, respectively, being the level at 24 h even higher than the corresponding to the control without treatment (Fig.



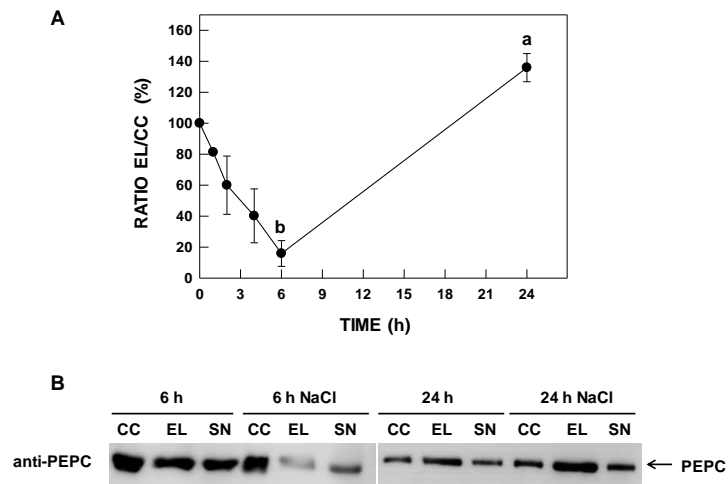
23). At 48 h after the onset of the treatment, PEPC S-nitrosylation kept higher in salinity than in control (not shown). The results illustrated the opposite patterns of these two post-translational modifications of sorghum leaf PEPC in plants under salt stress, and support the hypothesis that nitrosylation was protecting PEPC from oxidative inactivation.



**Figure 21. The protective effect of CSNO against the inactivation of PEPC caused by ascorbate and Cu requires preincubation.** Purified sorghum leaf PEPC (280 mU, 1.5  $\mu\text{g}$ ) was incubated in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5, 0.15 NaCl, in the presence or absence of 1 mM CSNO and/or 5 mM sodium ascorbate and 0.1 mM  $\text{CuSO}_4$ . **A.** PEPC was preincubated for 45 min with or without CSNO before the addition of ascorbate + Cu. **B.** CSNO and/or ascorbate + Cu were added at time 0. PEPC activity was measured in aliquots of the incubation mixture at different times. 100% of activity corresponded to  $187.32 \pm 13.79 \text{ U mg}^{-1}$ . Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Bars **a**  $P < 0.05$  versus time 0 ( $t$  test); at #  $P < 0.05$  versus the same treatment without preincubation ( $t$  test).



**Figure 22. Salt shock promotes the carbonylation of PEPC.** **A.** Time-course of PEPC carbonylation promoted by short-term salinity. A subset of 6-day old plants was supplied with 172 mM NaCl at time 0. Extracts were prepared as described in "Materiales y métodos", and aliquots of 100  $\mu\text{g}$  of protein were analyzed by SDS-PAGE and immuno-blotting with anti-DNP and anti-PEPC antibodies. The ratio of the signal obtained with anti-DNP antibodies with respect to the signal corresponding to anti-PEPC antibodies is shown. An arbitrary value of 100 was ascribed to the ratio of the control (time 0). Values are expressed as mean  $\pm$  SE ( $n = 5$ ). Bars at **a**  $P < 0.05$  versus time 0 ( $t$  test); at #  $P < 0.05$  versus control ( $t$  test). **B.** Immunoblots showing differences between 6 and 24 h.



**Figure 23. S-nitrosylation of PEPC in sorghum plants under salt shock.** A subset of 6-day-old plants was supplied with 172 mM NaCl at time 0. **A.** Extracts containing 100  $\mu$ g of protein were subjected to biotin switch and S-nitrosylated proteins were detected by binding to neutravidin. CC charge control, EL eluted proteins from neutravidin, SN supernatant with proteins not bound to neutravidin. The ratio EL/CC at each time is represented as % with respect its control without NaCl. Bars at **a**  $P < 0.05$  versus time 0 ( $t$  test); at **b**  $P < 0.01$  versus 24 h ( $t$  test). **B.** Immunoblots from a representative experiment.

## 2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE AUTOFAGIA EN SORGO

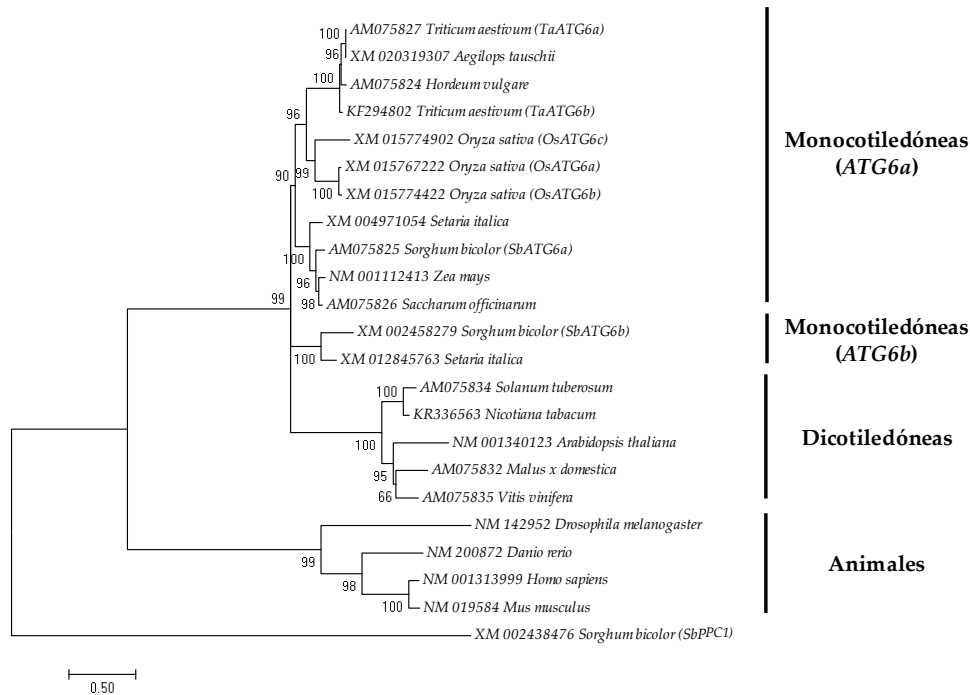
La autofagia es un proceso altamente conservado que se usa para la degradación, masiva o selectiva, de componentes celulares mediante la encapsulación en vesículas de doble membrana, denominadas autofagosomas, que posteriormente son transportadas al lisosoma (animales) o a la vacuola (plantas) para su degradación. Existen evidencias experimentales recientes que muestran que la regulación al alza de genes relacionados con la autofagia (*ATG*) tienen un impacto positivo en la producción de los cultivos (Marshall y Vierstra, 2018). El funcionamiento de la autofagia ha sido ampliamente estudiado en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* y en varias plantas de cultivo como el tomate, el maíz o el arroz. Sin embargo, no hay información respecto a los mecanismos de la autofagia en sorgo. El sorgo, una planta  $C_4$ , es el quinto cereal más cultivado del mundo y tiene usos como alimento para humanos y animales y como biomasa para la producción de biofuel. El genoma del sorgo ha sido secuenciado por completo (Paterson *et al.*, 2009) y se encuentra disponible en las bases de datos públicas. El propósito de este bloque de resultados es detectar la activación de la autofagia en sorgo mediante distintos métodos, para así desarrollar un conjunto de herramientas que permitan investigar adecuadamente las funciones de la autofagia en el desarrollo de la planta de sorgo y en su productividad.

### 2.1. Marcadores de expresión de la autofagia en sorgo

La síntesis de las proteínas *ATG* y su actividad son reguladas a nivel postraduccional pero también transcripcional. Por ejemplo, se han descrito cambios de expresión de genes *ATG* tras la activación de la autofagia en *Arabidopsis* (Rose *et al.*, 2006), tabaco (Wang *et al.*, 2013) y arroz (Xia *et al.*, 2011). Entre estos genes *ATG*, este trabajo de tesis se centra en *ATG18a* y *ATG6*. En el caso del primero, se ha observado que aumenta su expresión en condiciones de estrés por calor (Zhou *et al.*, 2013), deficiencia de nitrógeno y sacarosa y también durante la senescencia (Xiong *et al.*, 2005) en *Arabidopsis*. El nivel de expresión de *ATG6* aumenta en respuesta a estrés por calor en *Arabidopsis* (Zhou *et al.*, 2013), a la sequía en arroz (Rana *et al.*, 2012) y a la salinidad y a la deficiencia de nitrógeno en trigo (Yue *et al.*, 2015), entre otros.

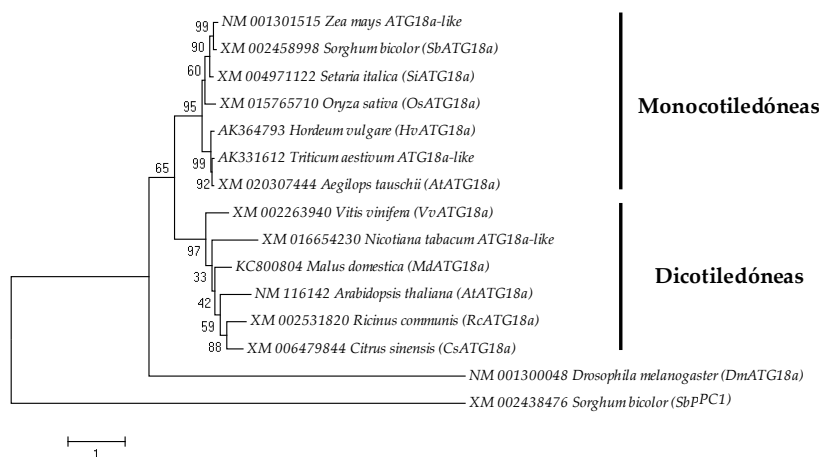
Usando BLAST (*basic local alignment search tool*), se encontraron dos homólogos de *AtATG6/beclin-1* (At3g61710) en sorgo: *SbATG6a* (Sb03g044340) y *SbATG6b* (Sb03g031280). Para entender el origen evolutivo de esta divergencia en el gen *ATG6* de sorgo, se identificaron secuencias relacionadas con los genes *ATG6* de sorgo en los genomas de varias plantas y animales. El análisis filogenético basado en las secuencias nucleotídicas mostró que *SbATG6a* es un homólogo del gen *ATG6* de la mayoría de monocotiledóneas (Fig. 24). Como se muestra en el árbol evolutivo, *SbATG6b* parece ser parte de un clado independiente que divergió dentro de un grupo de monocotiledóneas (Fig. 24). Sin embargo, en la base de datos sólo *Setaria italica*, otra

monocotiledónea con metabolismo  $C_4$ , presentó este segundo gen *ATG6* (XM\_012845763) que puede ser incluido en el mismo clado que *SbATG6b* (Fig. 24).



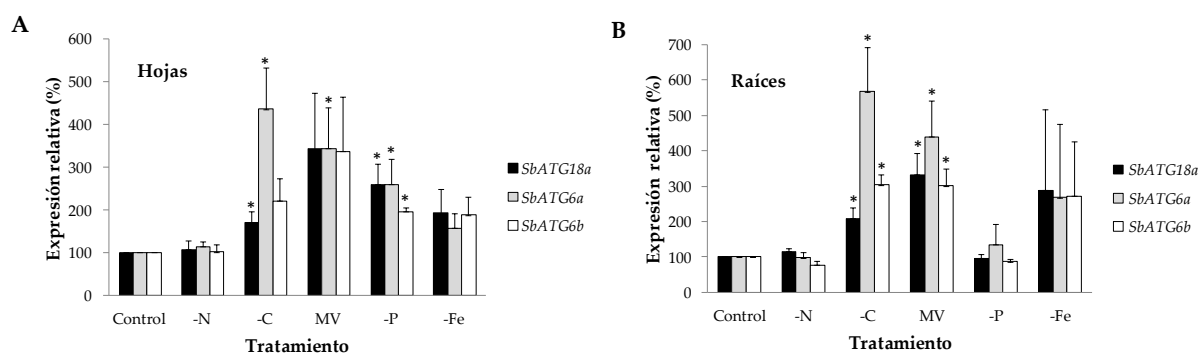
**Figura 24. Relaciones filogenéticas entre genes *ATG6* eucarióticos.** El árbol filogenético fue generado con el programa MEGA7 usando el método *neighbor-joining*. El análisis de *bootstrap* se realizó a partir de 1000 réplicas. Los números en las ramas indican los valores de *bootstrap* (porcentaje). Las secuencias fueron obtenidas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). El gen *PPC1* de *Sorghum bicolor* se utilizó como grupo externo.

*SbATG18a* (Sb03g044990), que es homólogo a *AtATG18a* (At3g62770) de acuerdo a BLAST, también fue analizado filogenéticamente junto a secuencias de nucleótidos de genes *ATG18a* y *ATG18a-like* de varias plantas y animales. El análisis filogenético determinó que el gen *SbATG18a* es un homólogo del gen *ATG18a* de plantas (Fig. 25).



**Figura 25. Relaciones filogenéticas entre genes *ATG18a* eucarióticos.** El árbol filogenético fue generado con el programa MEGA7 usando el método *neighbor-joining*. El análisis de *bootstrap* se realizó a partir de 500 réplicas. Los números en las ramas indican los valores de *bootstrap* (porcentaje). Las secuencias fueron obtenidas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). El gen *PPC1* de *Sorghum bicolor* se utilizó como grupo externo.

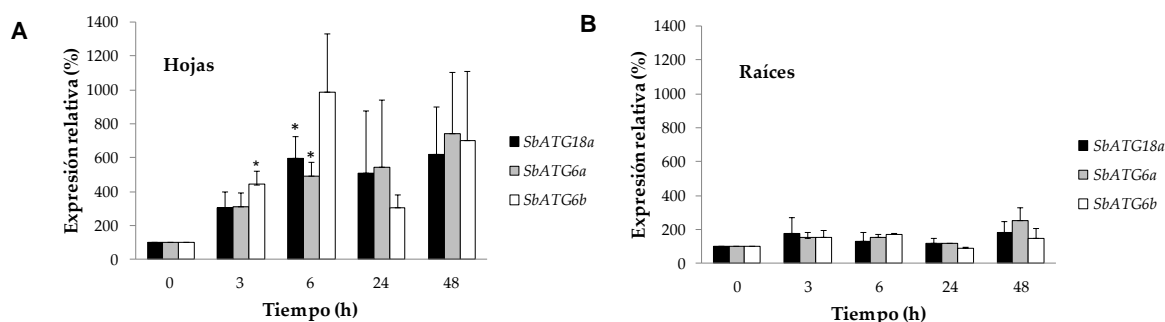
Se realizaron análisis de expresión por PCR cuantitativa a tiempo real de *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* en hojas y raíces de plántulas de sorgo bajo deficiencia de nitrógeno, carbono, fósforo y hierro, así como bajo estrés oxidativo inducido por el suministro de 10  $\mu$ M de metil viológeno (MV). No se encontraron cambios de expresión bajo deficiencia de nitrógeno para ninguno de los tres genes. Por el contrario, la deficiencia de carbono aumentó sustancialmente los niveles de expresión de los tres genes tanto en hoja como en raíces, siendo significativa esta diferencia para *SbATG18a* y *SbATG6a* en hojas y para los tres genes en raíces (Fig. 26). La deficiencia de fósforo incrementó significativamente la expresión de los tres genes en hojas (Fig. 26A), mientras que en raíces no hubo diferencias significativas (Fig. 26B). Aunque la deficiencia de hierro elevó la expresión de los tres genes tanto en hojas como en raíces, estas diferencias no fueron significativas (Fig. 26). El estrés oxidativo mediado por MV aumentó la expresión de los tres genes en hojas y en raíces, siendo este aumento significativo para *SbATG6a* en hojas y para los tres genes en raíces (Fig. 26).



**Figura 26. Análisis de qPCR de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* bajo estrés abiótico.** El ARN total se extrajo de hojas (A) y raíces (B) de plantas de sorgo de 10 días de edad. El nivel relativo de ARNm de cada gen individual se normalizó con respecto al gen *SbACTINA*. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa (control) y en solución nutritiva sin nitrógeno (-N), sin fósforo (-P) y sin hierro (-Fe) durante 2 días. La deficiencia de carbono se indujo manteniendo a las plantas en oscuridad durante 2 días (-C). El estrés oxidativo se indujo suplementando la solución nutritiva completa con MV 10  $\mu$ M durante 2 días (MV). Los datos se representan con respecto al control (porcentaje). Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (*t* test,  $P < 0,05$ ).

Por último, se midieron los niveles de expresión de *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* en plantas sometidas a choque salino. Las plántulas de sorgo fueron tratadas con 172 mM NaCl (10 g/l NaCl), lo que provocó un aumento progresivo de los niveles de ARNm en hojas de los tres genes testados durante las primeras 48 h (Fig. 27A). En raíces, por el contrario, el tratamiento de choque salino no cambió la expresión de los tres genes (Fig. 27B).

En conjunto, los resultados de las medidas de expresión de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* muestran un aumento de estas expresiones sólo en algunas de las condiciones en las que se activa la autofagia. Además, los cambios de expresión de estos tres genes pueden ser distintos en las hojas y en las raíces de sorgo.

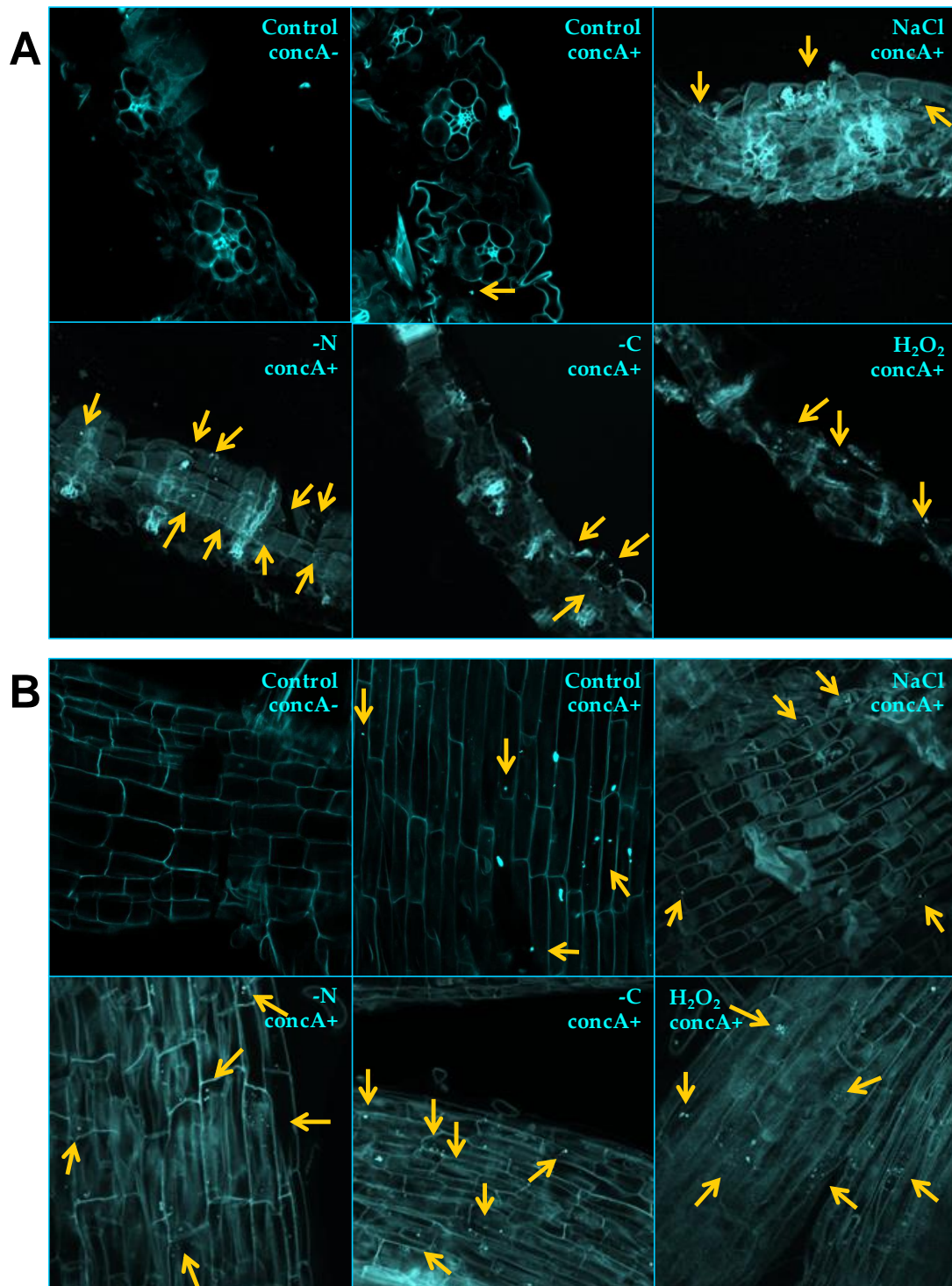


**Figura 27. Análisis de qPCR de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* bajo choque salino.** El ARN total se extrajo de hojas (A) y raíces (B) de plantas de sorgo de 10 días de edad. El nivel relativo de ARNm de cada gen individual se normalizó con respecto al gen *SbACTINA*. A tiempo 0, a las plantas se les suministró solución nutritiva completa suplementada con NaCl 172 mM durante 3, 6, 24 y 48 h. Los datos se representan con respecto al control (porcentaje). Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control a 0 h (*t* test,  $P < 0,05$ ).

## 2.2. Visualización de autofagosomas de sorgo por microscopía confocal

Uno de los métodos más utilizados para el estudio de la autofagia en plantas es la visualización directa de los autofagosomas mediante microscopía confocal, y en especial la utilización de la proteína de fusión de la proteína verde fluorescente (GFP) y ATG8 (GFP-ATG8) como marcador fluorescente en los autofagosomas (Bassham, 2014). En el caso del sorgo, al ser más compleja y costosa su transformación para conseguir expresar esta proteína de fusión, se ha utilizado como alternativa un tinte fluorescente: la monodansilcadaverina (MDC) (Contento *et al.*, 2005). Este tinte se acumula y emite fluorescencia dentro de compartimentos rodeados de membrana que poseen un lumen ácido y una membrana rica en lípidos, características típicas de los autofagosomas, visualizándose al microscopio confocal como estructuras punteadas fluorescentes dentro de las células. Conjuntamente se usó el inhibidor de la degradación vacuolar de autofagosomas concanamina A (concA), con el objetivo de que los autofagosomas formados se acumularan en la vacuola (Yoshimoto *et al.*, 2004).

Se visualizaron hojas y raíces de sorgo en diferentes condiciones de estrés que inducen la autofagia: deficiencia de nitrógeno, deficiencia de carbono, choque salino y estrés oxidativo inducido por  $H_2O_2$ . El número de estructuras punteadas aparecieron en número reducido en hojas (Fig. 28A) y raíces (Fig. 28B) del control, tanto en presencia como en ausencia de concA. El número de puntos fluorescentes de MDC (indicados por flechas amarillas) aumentó en hojas y raíces con deficiencia de nitrógeno y carbono y tratadas con  $H_2O_2$ , mientras que el choque salino elevó este número en hojas, pero no en raíces (Fig. 28). Estos resultados indican que la tinción con MDC es válida para la detección de la autofagia en hojas y raíces de sorgo ya que muestra un incremento de puntos fluorescentes, correspondientes a los autofagosomas, en condiciones en las que la autofagia es inducida.



**Figura 28. Visualización de autofagosomas por microscopía confocal mediante tinción con MDC en sorgo.** Muestras de hojas (A) y raíces (B) de sorgo de 10 días de edad en condiciones control y de deficiencia de nitrógeno (-N), carbono (-C), estrés oxidativo inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{M}$  ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y choque salino (NaCl) durante 2 días fueron teñidas con MDC 100  $\mu\text{M}$  tal y como se describe en Materiales y métodos. Las plantas fueron tratadas con 1  $\mu\text{M}$  concA (concA+), o no (concA-), durante 2 días antes de su visualización para inhibir la degradación de los autofagosomas. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio confocal Zeiss LSM 7 Duo usando un filtro DAPI con excitación y emisión a 405 y 452 nm, respectivamente. Se muestra una imagen representativa para cada tratamiento. Las flechas amarillas indican autofagosomas.

### 2.3. Visualización de autofagosomas de sorgo por microscopía electrónica

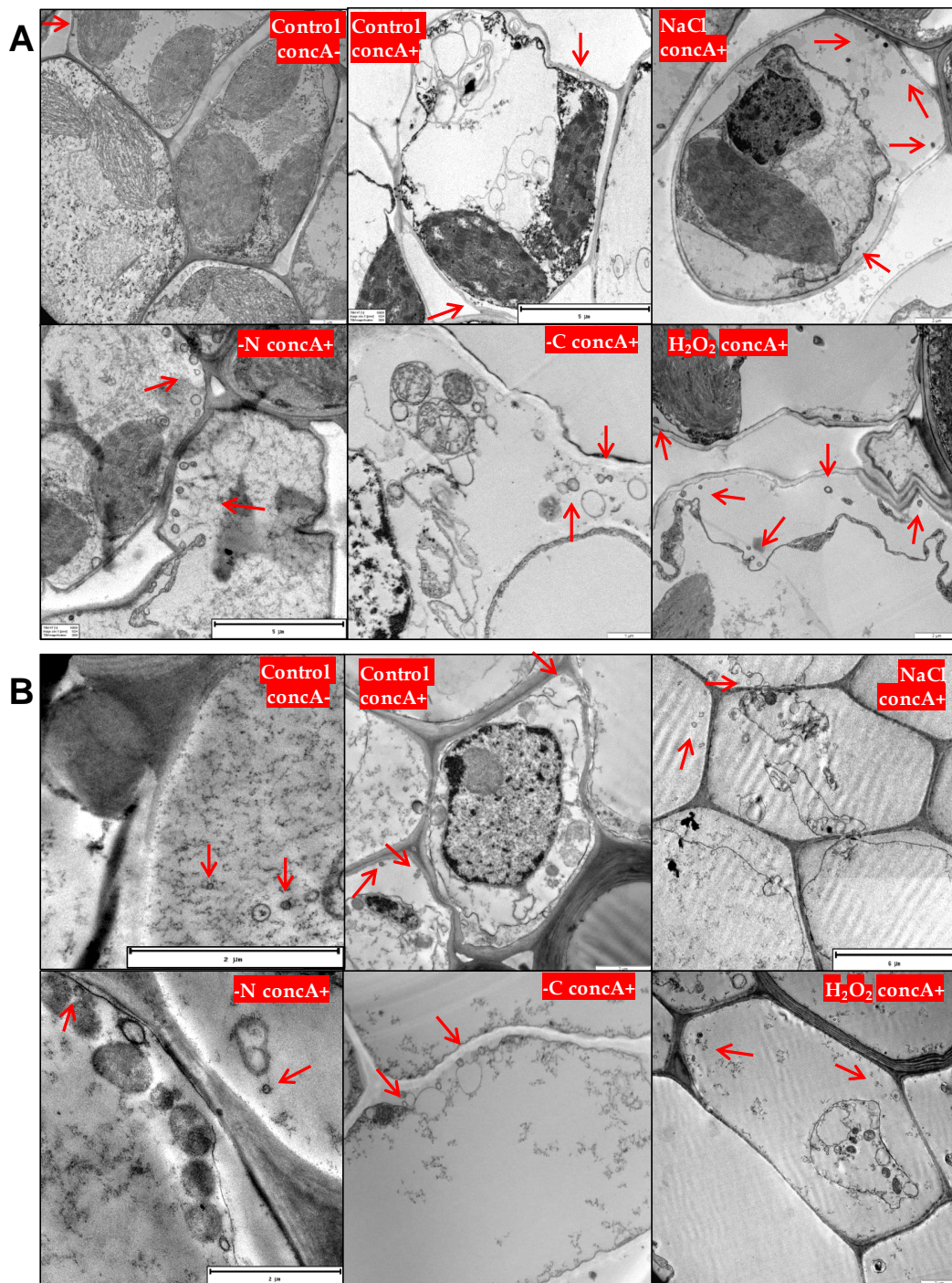
Otro método comúnmente utilizado para la visualización directa de autofagosomas en plantas es la microscopía electrónica (Rose *et al.*, 2006). Normalmente se usa como un modo de confirmación de que las estructuras punteadas teñidas por MDC son realmente autofagosomas, visualizándose como estructuras de doble membrana en el caso de que se encuentren en el citoplasma. Por ello, se utilizó el microscopio electrónico de transmisión para visualizar autofagosomas en muestras de plántulas de sorgo. Además, se realizó un recuento de autofagosomas por célula en cada muestra para poder compararlas.

Se visualizaron hojas (**Fig. 29A**) y raíces (**Fig. 29B**) de sorgo en diferentes condiciones de estrés que inducen la autofagia: deficiencia de nitrógeno, deficiencia de carbono, choque salino y estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Los autofagosomas (indicados por flechas rojas) se visualizaron como vesículas de doble membrana fuera de la vacuola, y la mayoría de ellos con contenido dentro (**Fig. 30**). El número medio de autofagosomas por célula en las muestras control sin concA fue de  $3,58 \pm 0,88$  y  $1,48 \pm 0,48$  en hojas y raíces de sorgo, respectivamente (**Fig. 31A, B, Control concA-**). El tratamiento con concA aumentó levemente la cantidad media de autofagosomas en raíces (**Fig. 31B, Control concA+**), y la mantuvo en hojas (**Fig. 31A, Control concA+**). Todos los tratamientos aumentaron la densidad media de autofagosomas tanto en hojas como en raíces, siendo el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> el que mostró una mayor densidad de autofagosomas, llegando hasta  $12,80 \pm 2,00$  autofagosomas por célula en hojas y a  $15,15 \pm 2,30$  en raíces (**Fig. 31A, B**). Se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control con concA en hojas con deficiencia de nitrógeno y tratadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados indican que la visualización de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión constituye un método adecuado para la detección de un aumento en la densidad de autofagosomas en plantas de sorgo en condiciones que activan la autofagia.

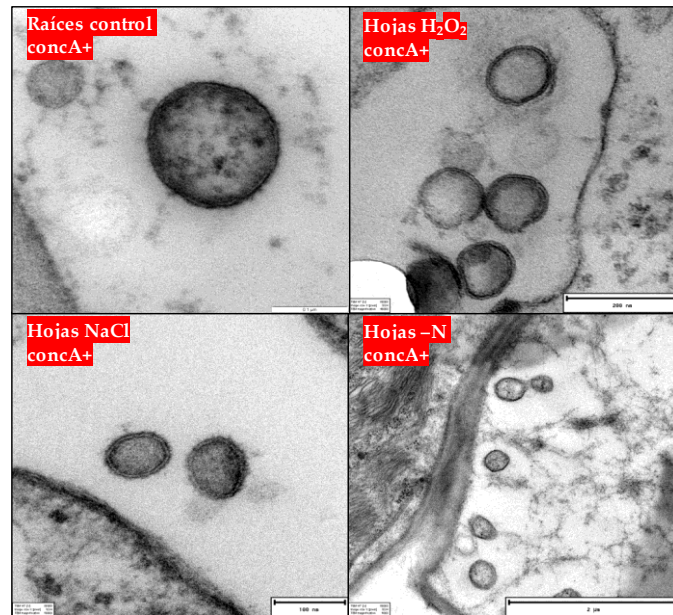
### 2.4. Inmunodetección del aducto ATG8-PE en plantas de sorgo

Uno de los pasos clave en la formación de los autofagosomas es la unión covalente de la proteína ATG8 a fosfatidiletanolamina (PE). Esta unión ATG8-PE migra más rápido en electroforesis en geles de acrilamida en presencia de urea, diferenciándose así de la forma libre de ATG8 (Bassham, 2014). Partiendo de esta base, se han utilizado anticuerpos contra la proteína ATG8a de *arabidopsis* para detectar en inmunoblots diferencias en la cantidad de conjugado ATG8-PE en extractos crudos de hojas de plantas de sorgo sometidas a estrés nutricional por falta de nitrógeno y carbono, y a estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Además, una réplica de cada muestra fue incubada a 37 °C durante 1 h con fosfolipasa D para eliminar el lípido unido a ATG8, como control de que la banda corresponde realmente a ATG8-PE.

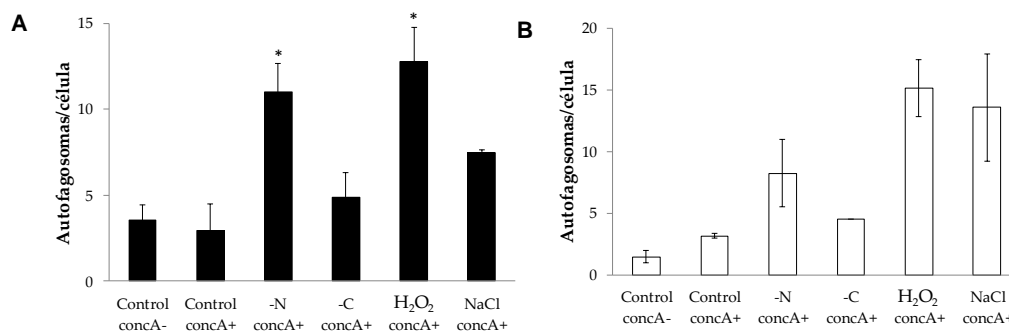




**Figura 29. Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión en sorgo.** Muestras de hojas (A) y raíces (B) de plantas de sorgo de 10 días de edad en condiciones control y de deficiencia de nitrógeno (-N), carbono (-C), estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y choque salino (NaCl) durante 2 días fueron fijadas tal y como se describe en Materiales y métodos. Las plantas fueron tratadas con concA 1 μM (concA+), o no (concA-), durante 2 días antes de su fijación para inhibir la degradación de los autofagosomas. La visualización de las muestras se realizó en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1400 a un voltaje de aceleración de 80 kV. Se muestra una imagen representativa para cada tratamiento. Las flechas rojas indican autofagosomas.



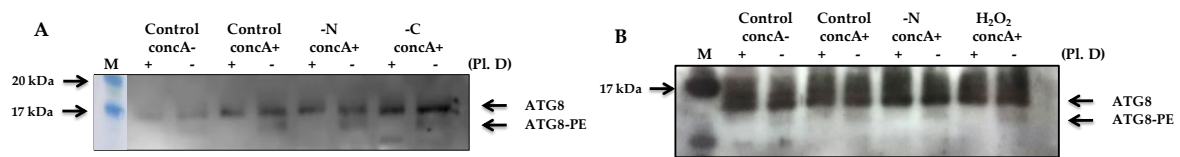
**Figura 30.** Visualización de autofagosomas por microscopía electrónica de transmisión en sorgo. Imágenes ampliadas de autofagosomas en distintas muestras. Los tratamientos son los que aparecen en la Fig. 29.



**Figura 31.** Densidad de autofagosomas visualizados por microscopía electrónica de transmisión en sorgo. Se realizó un recuento de autofagosomas en el microscopio electrónico de transmisión, en hojas (A) y raíces (B) de las muestras descritas en la Fig. 29. Se muestra la media  $\pm$  EE de 2-4 experimentos independientes, y para cada experimento se contaron los autofagosomas en 20 células. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control concA+ (*t* test,  $P < 0,05$ ).

En la Fig. 32 se observan dos bandas de ATG8, una correspondiente a la forma libre de ATG8, la superior, mientras que la inferior corresponde a la forma lipídica ATG8-PE, ya que desaparece cuando el extracto ha sido incubado con fosfolipasa D. En cuanto a los tratamientos, se observa un aumento en la cantidad de conjugado ATG8-PE cuando se utiliza concA para inhibir la degradación de los autofagosomas (Fig. 32). No obstante, las diferencias son leves si se comparan las condiciones control (Fig. 32, Control concA+) con las condiciones de estrés (Fig. 32A, -N concA+, -C concA+; Fig. 32B, -N concA+, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concA+), en las que sólo se aprecia un leve aumento del conjugado en deficiencia de nitrógeno y estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos resultados indican que la inmunodetección del aducto ATG8-PE en sorgo con

anticuerpos anti-ATG8a de arabisopsis no es lo suficientemente sensible para detectar diferencias en condiciones que activan la autofagia.



**Figura 32. Análisis por inmunoblot del aducto ATG8-PE en hojas de sorgo.** Extractos crudos de muestras de hojas de sorgo en condiciones control y de deficiencia de nitrógeno (-N), carbono (-C) (**A**) y estrés oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 2 días (**B**) fueron obtenidos tal y como se describe en Materiales y métodos. Las plantas fueron tratadas con concA1 μM (concA+), o no (concA-), durante 2 días antes de su recogida para inhibir la degradación de los autofagosomas. La concentración de proteínas se midió en los extractos crudos, y alícuotas de 60 μg fueron incubadas con fosfolipasa D 1000 U/ml (Pl. D) a 37 °C durante 1 h previamente a someterlas a electroforesis *SDS-PAGE* y a inmunoblot con anticuerpos anti-ATG8. M: marcador molecular.

### 3. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LA PROTEÍNA VÍRICA $\beta$ C1 CON LAS PROTEÍNAS ATG8 DE ARABIDOPSIS

Recientemente se ha descrito la interacción entre el factor de virulencia  $\beta$ C1 del virus de Multán del enrollamiento de la hoja de algodón (CLCuMuV) y las proteínas ATG8 de *Nicotiana benthamiana* Domin (Haxim *et al.*, 2017). A través de esta interacción, la planta es capaz de degradar este factor de virulencia vía autofagia, lo que proporciona resistencia de la planta al virus. En concreto, el dominio esencial para que se produzca esta interacción reside entre los residuos en posición 30 y 40 de  $\beta$ C1, y en este caso no se trata de un motivo AIM (*ATG8-interacting motif*). Esto abriría la puerta a un posible uso como herramienta de detección de autofagosomas, ya que no interfiere con otros posibles cargos de ATG8. Una mutación puntual en el residuo de valina en posición 32 elimina la interacción, lo que incrementa los síntomas de la planta frente al virus (Haxim *et al.*, 2017). En este apartado se realiza un análisis de la interacción de  $\beta$ C1 con las isoformas de la proteína ATG8 de arabidopsis.

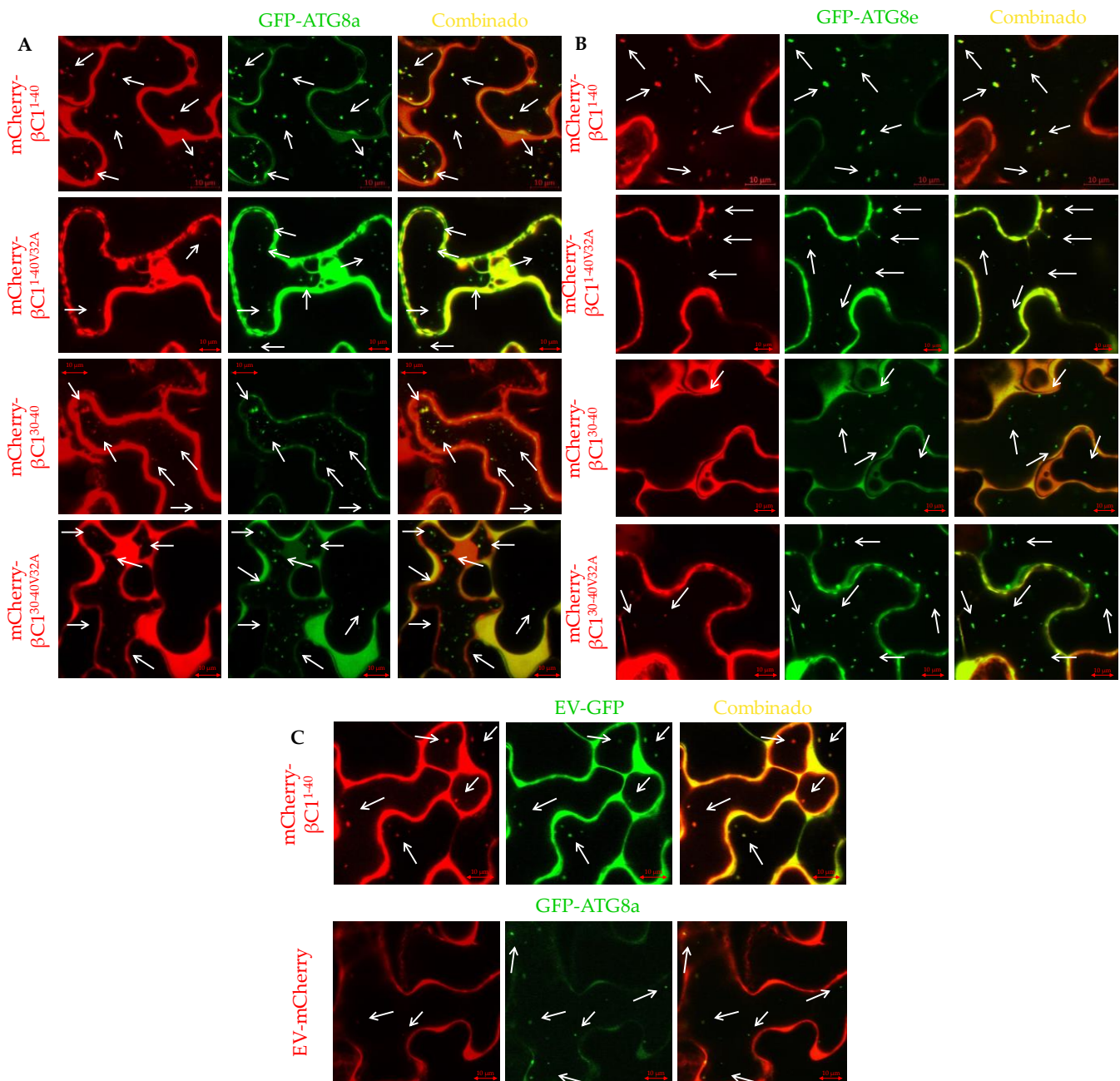
En primer lugar, se clonó la proteína de fusión mCherry junto con el motivo de unión a ATG8 de la proteína  $\beta$ C1 ( $\beta$ C1<sup>30-40</sup>), o bien su versión mutada ( $\beta$ C1<sup>30-40V32A</sup>), en la que está cambiado el residuo de valina por alanina en posición 32. Del mismo modo, se clonó una versión más larga de la proteína, con los primeros 40 residuos ( $\beta$ C1<sup>1-40</sup>), y su versión mutada ( $\beta$ C1<sup>1-40V32A</sup>), con la proteína fluorescente roja mCherry. Estas proteínas de fusión se utilizaron junto a las proteínas de fusión GFP-ATG8 de las 9 isoformas ATG8a-i de arabidopsis en experimentos de expresión transitoria en *N. benthamiana* y posterior colocalización por microscopía confocal y coimmunoprecipitación de proteínas.

#### 3.1. Colocalización por microscopía confocal

En la colocalización por microscopía confocal se utilizaron las isoformas ATG8a y ATG8e de arabidopsis en combinación con las diferentes versiones de  $\beta$ C1. La versión larga de la proteína de fusión mCherry- $\beta$ C1, mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40</sup>, colocalizó fielmente con los autofagosomas marcados con GFP-ATG8a y con GFP-ATG8e, estando presente en prácticamente la totalidad de estructuras punteadas que se localizaron en las células de las hojas de tabaco (**Fig. 33A, B, mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40</sup>**). La versión corta de  $\beta$ C1,  $\beta$ C1<sup>30-40</sup>, colocalizó algo peor que la versión larga con los autofagosomas marcados por GFP-ATG8a y mucho peor con GFP-ATG8e (**Fig. 33A, B, mCherry- $\beta$ C1<sup>30-40</sup>**). Las versiones que poseían una mutación puntual, mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40V32A</sup> y mCherry- $\beta$ C1<sup>30-40V32A</sup>, se localizaron débilmente en las estructuras punteadas marcadas con GFP-ATG8a y GFP-ATG8e (**Fig. 33A, B, mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40V32A</sup> y mCherry- $\beta$ C1<sup>30-40V32A</sup>**). Por último, se utilizaron las proteínas de fusión GFP y mCherry solas como controles. Mientras que EV-mCherry no se localizó prácticamente en ninguno de los autofagosomas marcados por GFP-ATG8a (**Fig. 33C, EV-mCherry**), EV-GFP se localizó en estructuras punteadas



a pesar de no poseer la proteína ATG8, y además mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40</sup> colocalizó débilmente con estas estructuras.



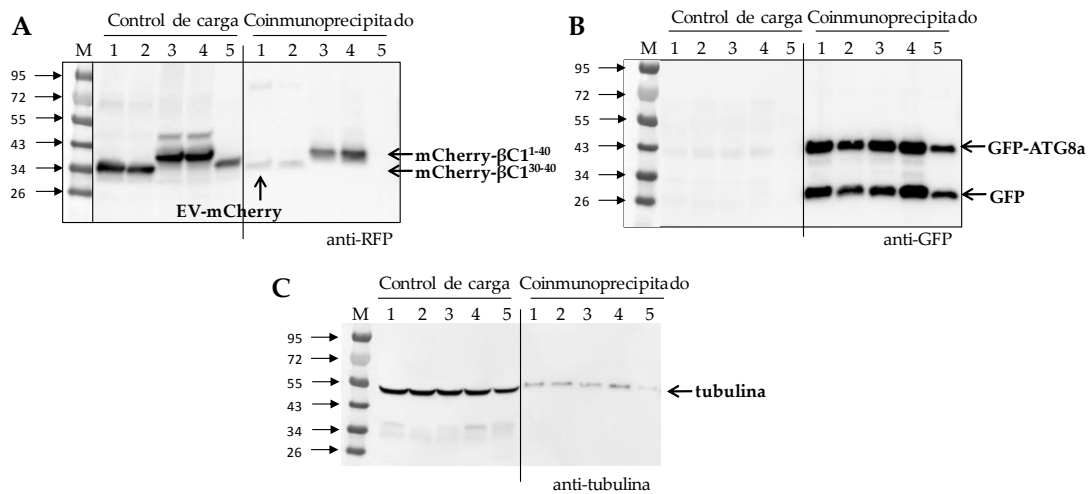
**Figura 33. Colocalización de GFP-ATG8a de arabidopsis y mCherry- $\beta$ C1 por microscopía confocal.** Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS con las construcciones: GFP-ATG8a (A) y GFP-ATG8e (B) en combinación con mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40</sup>, mCherry- $\beta$ C11-40V32A, mCherry- $\beta$ C1<sup>30-40</sup> y mCherry- $\beta$ C1<sup>1-40V32A</sup>, cuya composición se detalla en Materiales y métodos. C. Controles con las proteínas fluorescentes solas: GFP (EV-GFP) y mCherry (EV-mCherry). Las plantas se mantuvieron en oscuridad durante 48 h previas a su visualización para inducir la autofagia, y sus hojas se infiltraron con concA 1  $\mu$ M 16 h antes de su visualización para bloquear la degradación de los autofagosomas. 72 h después de la infiltración, secciones de hoja de *N. benthamiana* se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 7 Duo usando para GFP un láser a 488 nm y un filtro de emisión a 504-533 nm y para mCherry un láser a 561 nm y un filtro de emisión a 610-630 nm. Se muestra una imagen representativa de cada combinación. Las flechas blancas indican autofagosomas.

El conjunto de estos resultados indica que la versión larga del factor de virulencia  $\beta C1$ ,  $\beta C1^{1-40}$ , colocaliza con los autofagosomas marcados con GFP-ATG8a y GFP-ATG8e, y que la versión corta  $\beta C1^{30-40}$  lo hace débilmente. Cuando se sustituye el residuo de valina en posición 32 de  $\beta C1$  por alanina, esta colocalización se hace más débil. Además, la proteína de fusión GFP podría mostrar algún tipo de interacción, específica o no, con algún elemento de los autofagosomas o bien con  $\beta C1$ .

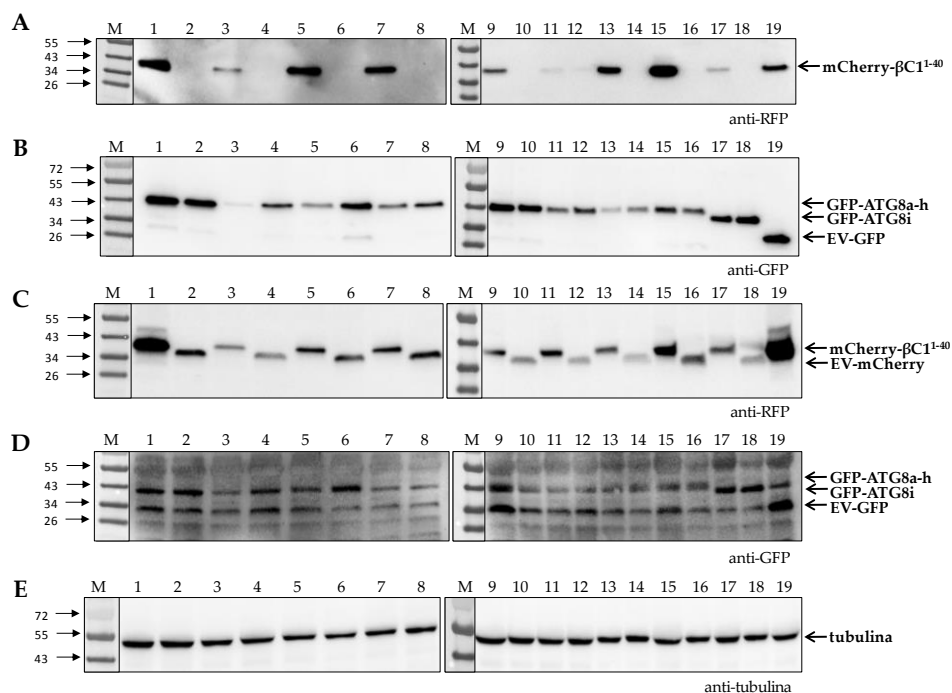
### 3.2. Coimmunoprecipitación de proteínas

En primer lugar, se realizó un experimento de coimmunoprecipitación de GFP-ATG8a de *Arabidopsis* con las distintas versiones de  $\beta C1$  clonadas a partir de infiltraciones en hojas de *N. benthamiana* en las que se coexpresaron las distintas versiones de mCherry- $\beta C1$  con GFP-ATG8a. Se utilizó un anticuerpo anti-GFP en agarosa para realizar la coimmunoprecipitación, y después las proteínas de los coimmunoprecipitados se revelaron con los anticuerpos anti-RFP (proteína roja fluorescente), anti-GFP y anti-tubulina. Los inmunoblots revelados con anticuerpos anti-RFP detectaron mCherry en los coimmunoprecipitados de las cuatro construcciones:  $\beta C1^{30-40}$ ,  $\beta C1^{30-40V32A}$ ,  $\beta C1^{1-40}$ ,  $\beta C1^{1-40V32A}$  (**Fig. 34A**). Se detectó una mayor cantidad de proteína en los coimmunoprecipitados de las versiones largas de  $\beta C1$  que en las cortas (**Fig. 34A**). Además, las versiones con la mutación puntual en el residuo de valina en posición 32 no mostraron diferencias con respecto a la versión silvestre (**Fig. 34A**). En la **Fig. 34B** se muestra el control de GFP que se retuvo en la coimmunoprecipitación con la resina y en la **Fig. 34C** se muestra el control de carga en cada carril. A partir de estos resultados, se decidió seguir el estudio sólo con la versión larga silvestre de la proteína  $\beta C1$  ( $\beta C1^{1-40}$ ).

A continuación, se realizaron coexpresiones en hojas de *N. benthamiana* de mCherry- $\beta C1^{1-40}$  con todas las isoformas de ATG8 de *Arabidopsis* unidas a GFP (**Fig. 35**). Se usaron vectores vacíos sólo con GFP o mCherry como controles. A partir de los extractos de hojas de cada coinfiltración se realizaron coimmunoprecipitaciones con agarosa anti-GFP, detectándose mCherry, en mayor o menor medida, en todas los coimmunoprecipitados de las isoformas de ATG8 (desde GFP-ATG8a a GFP-ATG8i) en las que se había coinfiltrado con mCherry- $\beta C1^{1-40}$ , mientras que no se detectó mCherry en los respectivos controles con EV-mCherry (**Fig. 35**). Sin embargo, en la coimmunoprecipitación de EV-GFP y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  también se detectó mCherry (**Fig. 35**). Aunque en principio, estos resultados parecen indicar que  $\beta C1^{1-40}$  se une a todas las isoformas de ATG8 de *Arabidopsis* con mayor o menor intensidad, al haber salido positivo el control negativo de GFP cabe la posibilidad de que sea la unión de  $\beta C1^{1-40}$  y GFP la que se estuviera produciendo.

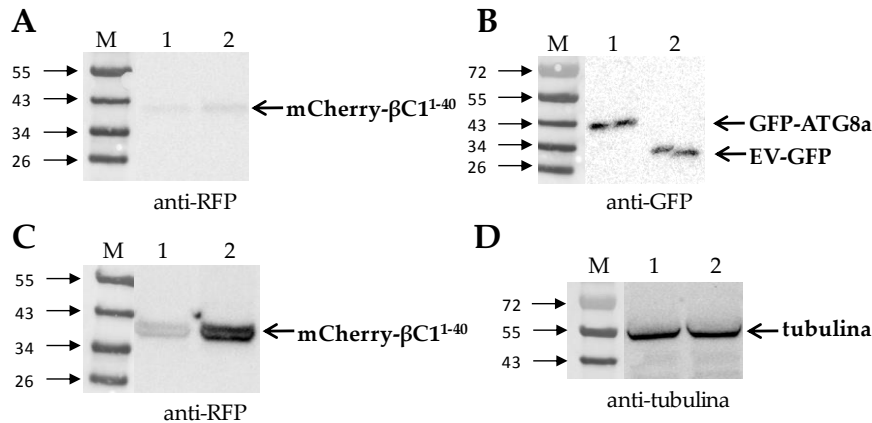


**Figura 34. Coimmunoprecipitación de  $\beta C1$  con ATG8a de *Arabidopsis*.** Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS coexpresando las construcciones: GFP-ATG8a y mCherry- $\beta C1^{30-40}$  (1), GFP-ATG8a y mCherry- $\beta C1^{30-40V32A}$  (2), GFP-ATG8a y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (3), GFP-ATG8a y mCherry- $\beta C1^{1-40V32A}$  (4) y GFP-ATG8a y EV-mCherry (5). 72 h después de la infiltración, se prepararon extractos crudos de hoja (de donde se obtuvieron 15  $\mu$ l para los controles de carga de los coimmunoprecipitados) y se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación con agarosa anti-GFP tal y como se describe en Materiales y métodos. Los inmunoblots fueron incubados con anticuerpos anti-RFP (A), anti-GFP (B) y anti-tubulina (C) como control de carga entre las diferentes muestras. M: marcador molecular.



**Figura 35. Coimmunoprecipitación de  $\beta C1^{1-40}$  con las isoformas ATG8 de *Arabidopsis*.** Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS coexpresando las construcciones: GFP-ATG8a y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (1), GFP-ATG8a y EV-mCherry (2), GFP-ATG8b y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (3), GFP-ATG8b y EV-mCherry (4), GFP-ATG8c y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (5), GFP-ATG8c y EV-mCherry (6), GFP-ATG8d y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (7), GFP-ATG8d y EV-mCherry (8), GFP-ATG8e y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (9), GFP-ATG8e y EV-mCherry (10), GFP-ATG8f y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (11), GFP-ATG8f y EV-mCherry (12), GFP-ATG8g y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (13), GFP-ATG8g y EV-mCherry (14), GFP-ATG8h y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (15), GFP-ATG8h y EV-mCherry (16), GFP-ATG8i y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (17), GFP-ATG8i y EV-mCherry (18) y EV-GFP y mCherry- $\beta C1^{1-40}$  (19). 72 h después de la infiltración, se prepararon extractos crudos de hoja (de donde se obtuvieron 15  $\mu$ l para los controles de carga de los coimmunoprecipitados) y se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación con agarosa anti-GFP tal y como se describe en Materiales y métodos. Los inmunoblots fueron incubados con anticuerpos anti-RFP (A, C), anti-GFP (B, D) y anti-tubulina (E) como control de carga entre las diferentes muestras. A, B: coimmunoprecipitados; C, D, E: controles de carga; M: marcador molecular.

Con el fin de descartar que la unión de GFP a  $\beta\text{C1}^{1-40}$  fuera inespecífica, se aumentó la concentración de sal y detergente en la preparación de los extractos y en la coimmunoprecipitación. Sin embargo, se detectó igualmente la presencia de mCherry, tanto en el coimmunoprecipitado de GFP-ATG8a como en el de EV-GFP (Fig. 36), lo que indica que la presencia de GFP podría estar interfiriendo en las interacciones durante la coimmunoprecipitación.



**Figura 36. Coimmunoprecipitación de GFP-ATG8a y mCherry- $\beta\text{C1}^{1-40}$  con un aumento en la concentración de sales y detergente.** Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS coexpresando las construcciones: GFP-ATG8a y mCherry- $\beta\text{C1}^{1-40}$  (1) y EV-GFP y mCherry- $\beta\text{C1}^{1-40}$  (2). 72 h después de la infiltración, se prepararon extractos crudos de hoja (de donde se obtuvieron 15  $\mu\text{l}$  para los controles de carga de los coimmunoprecipitados) y se realizaron experimentos de coimmunoprecipitación con agarosa anti-GFP tal y como se describe en Materiales y métodos, con la excepción de que, tanto en la preparación de extractos crudos como en la coimmunoprecipitación se aumentó la concentración de NaCl y el detergente Tween-20 hasta los 500 mM y 0,5% (v/v), respectivamente. Los inmunoblots fueron incubados con anticuerpos anti-RFP (A, C), anti-GFP (B) y anti-tubulina (D) como control de carga entre las diferentes muestras. A, B: coimmunoprecipitados; C, D: controles de carga; M: marcador molecular.

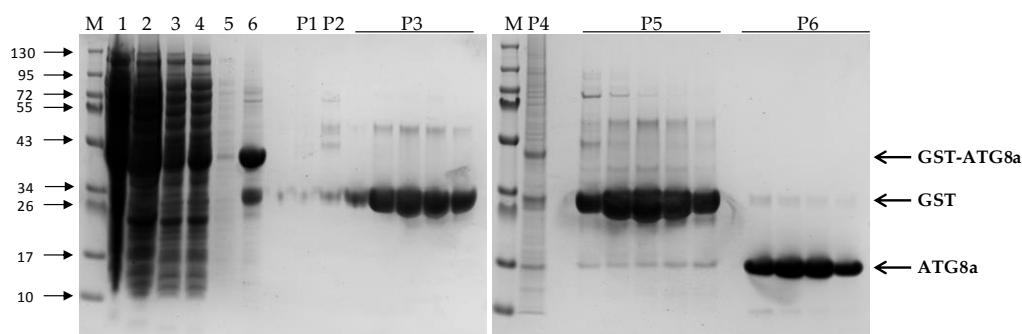
### 3.3. Termoforesis a microescala (MST)

A raíz de los problemas con el control de GFP en los experimentos de coimmunoprecipitación, se decidió utilizar otro tipo de técnica para evaluar la interacción entre  $\beta\text{C1}$  y ATG8: la termoforesis a microescala (MST). La MST se basa en los cambios en la fluorescencia de una muestra cuando se aplica un cambio de temperatura, siendo este cambio detectable y cuantificable. El patrón de cambio de fluorescencia de una molécula puede alterarse bien por cambios conformacionales de la molécula o bien por la proximidad de un ligando. Y al ser cuantificable, se pueden medir estas alteraciones en el patrón para un ligando específico. Además, realizando diluciones seriadas de este ligando se puede cuantificar la afinidad de la interacción o  $K_d$  (constante de disociación), pudiendo comparar entre distintos ligandos.

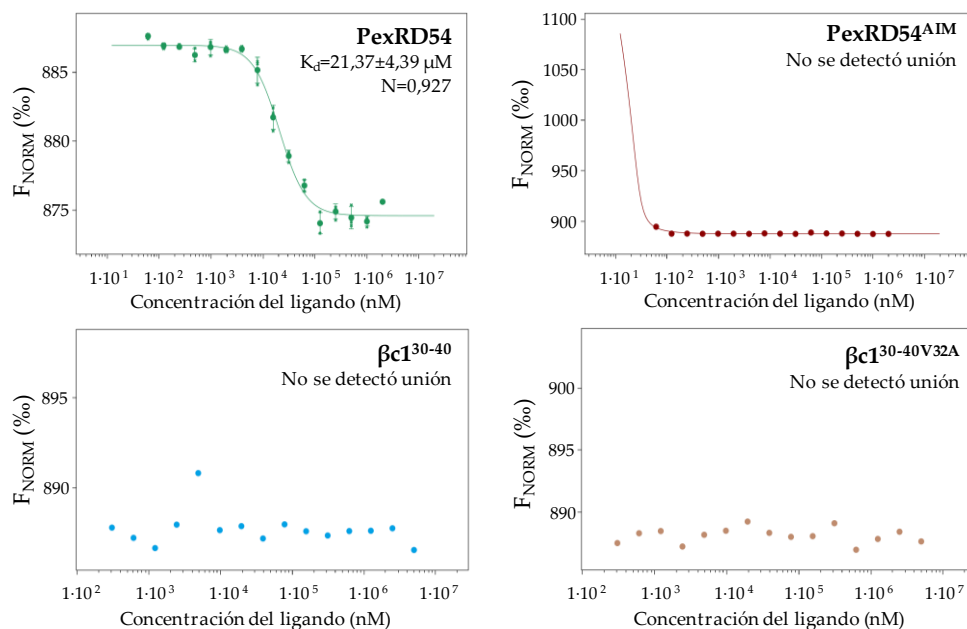
Para llevar a cabo esta técnica, previamente se purificó la proteína recombinante AtATG8a inducida en *E. coli* (Fig. 37), y ésta fue marcada con un tinte fluorescente. Además, se utilizaron los péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias aminoacídicas de  $\beta\text{C1}^{30-40}$ ,  $\beta\text{C1}^{30-40V32A}$ , PexRD54 y PexRD54<sup>AIM2</sup>. En este caso, se utilizó



PexRD54 como control positivo por ser un efector del patógeno *Phytophthora infestans* para el cual está descrita su unión a ATG8 a través de un motivo AIM (Dagdás *et al.*, 2016). PexRD54<sup>AIM2</sup> es una versión de éste que carece del motivo AIM responsable de la interacción con ATG8 (Dagdás *et al.*, 2016). No se detectó unión del péptido  $\beta$ C1<sup>30-40</sup> a la proteína ATG8a de arábidoopsis, mientras que para PexRD54 sí interaccionó con ATG8a (Fig. 38). Este resultado indica que  $\beta$ C1, al menos en la región comprendida entre sus residuos en posición 30 y 40, no se une a ATG8a de arábidoopsis.



**Figura 37. Purificación de la proteína ATG8a de arábidoopsis.** La purificación de la proteína recombinante ATG8a de arábidoopsis se llevó a partir de *E. coli* tal y como se explica en Materiales y métodos, incluyendo la utilización de una columna de unión a GST en FPLC, seguido de una incubación con proteasa 3C para separar ATG8a de GST y por último una cromatografía por exclusión molecular (filtración por gel) en FPLC. Alicuotas de los distintos pasos de proceso de purificación fueron sometidas a electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE y posterior tinción con azul de Coomassie. M: marcador molecular; 1: fracción insoluble del sonicado; 2: fracción soluble del sonicado; 3-4: fracciones cargadas en columna de unión a GST; 5: lavado de la columna de unión a GST; 6: eluido obtenido de la columna de unión a GST; P1-P6: fracciones correspondientes a los 6 picos obtenidos de la cromatografía por exclusión molecular.



**Figura 38. Termoforesis a microescala de la unión de  $\beta$ C1<sup>30-40</sup> y PexRD54 a ATG8a.** Las proteína AtATG8a purificada fue marcada con fluorescencia tal y como se describe en Materiales y métodos. Se utilizó una concentración de 28 nM de la proteína ATG8a para realizar los ensayos. Se utilizó una concentración inicial de 2 mM y 16 diluciones seriadas hasta 61 nM para PexRD54 y PexRD54<sup>AIM2</sup>. Se utilizó una concentración inicial de 10 mM y 16 diluciones seriadas hasta 305 nM para  $\beta$ C1<sup>30-40</sup> y  $\beta$ C1<sup>30-40V32A</sup>. Las medidas y el ajuste utilizado se describen en Materiales y métodos. Se representa la diferencia de fluorescencia normalizada (%) para el análisis de termoforesis frente a la concentración del ligando testado. Los datos para PexRD54 representan la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes.

#### 4. ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE LA PEPC MEDIANTE AUTOFAGIA

En este apartado se investiga si la PEPC, o específicamente algunas de sus isoenzimas, es degradada por la vía autofágica. Como material de experimentación se han empleado plantas (sorgo, tabaco y arabidopsis) y cultivos celulares (tabaco). Se han usado tanto líneas de plantas con defectos en la autofagia como inhibidores químicos de proceso, y se han estudiado las isoformas C<sub>4</sub> y C<sub>3</sub> de la PEPC. En el caso de las primeras, su interacción con el PA (Monreal *et al.*, 2010b), y posterior asociación con membranas, podría estar relacionada con su inclusión en vesículas, autofágicas o no. Las isoformas C<sub>3</sub> sí pueden encontrarse monoubiquitinadas (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014), al contrario que las C<sub>4</sub>. Dicha PTM podría marcar su reclutamiento al autofagosoma mediante autofagia selectiva, a través de la interacción con NBR1, ATG8 u otras proteínas de esta vía.

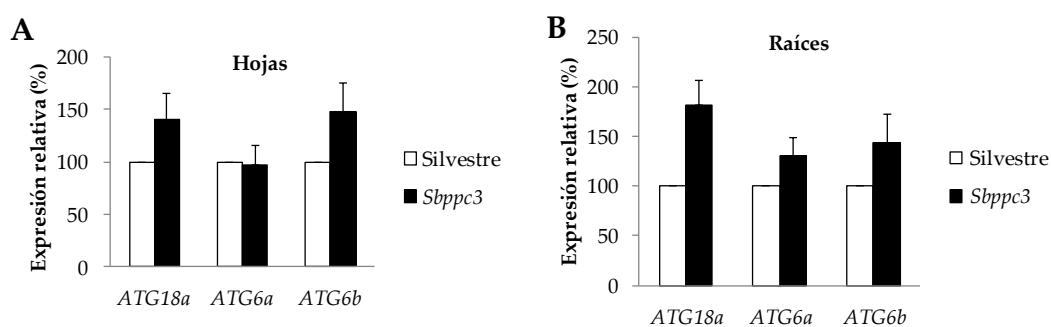
Por otro lado, dada la importancia de la PEPC en el metabolismo del carbono y del nitrógeno, en el apartado 4.1 se estudia si la carencia de la principal isoenzima PEPC de raíces (PPC3) causa una activación de la autofagia.

En conjunto, en este bloque se estudian las modificaciones en la actividad PEPC y en las PTMs de esta proteína, en condiciones control o bajo señales que activan la autofagia, así como las interacciones entre la PEPC y proteínas autofágicas; todo ello en líneas de arabidopsis con alteraciones en genes de la ruta autofágica y en una línea de sorgo silenciada en el gen *ppc3*.

##### 4.1. Expresión de marcadores de autofagia en sorgo ARNi-SbPPC3

Se utilizó una línea de sorgo silenciada en la proteína PPC3 mediante ARN de interferencia (*ppc3*) para evaluar la activación de la autofagia a partir del aumento del nivel de transcritos de los marcadores de autofagia en sorgo descritos en el apartado 2.1. El análisis se realizó en hojas y raíces de tres semanas de edad en condiciones control. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, se observó un modesto aumento de expresión de los genes *ATG18a* y *ATG6b* en el sorgo *ppc3* en hojas (**Fig. 39A**), mientras que *ATG6a* permaneció inalterado. En raíces, los tres genes aumentaron levemente su expresión (**Fig. 39B**).

Estos resultados muestran que la ausencia de PPC3 puede incrementar levemente la expresión de los genes *ATG18a*, *ATG6a* y *ATG6b*, lo que podría corresponder a una activación de la autofagia en las plantas de sorgo *ppc3*.

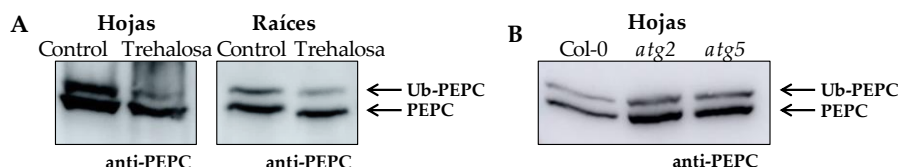


**Figura 39. Análisis de qPCR de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* en el mutante *Sbppc3*.** El ARN total se extrajo de hojas (A) y raíces (B) de plantas de sorgo silvestre y sorgo ARNi-*SbPPC3* (*Sbppc3*) de tres semanas de edad. El nivel relativo de ARNm de cada gen individual se normalizó con respecto al gen *SbACTINA*. Los datos se representan con respecto al control (porcentaje). Los resultados son la media  $\pm$  EE de tres experimentos independientes.

#### 4.2. Estudio de la PEPC de líneas SALK de arabis de proteínas autofágicas

De ser la autofagia una vía relevante en la degradación de la PEPC, una pérdida de función de las proteínas de dicha vía produciría un aumento en la cantidad de proteína PEPC. En base a los estudios previos que muestran que la monoubiquitinación está implicada en el reconocimiento de éstas para su degradación por autofagia selectiva (Svenning *et al.*, 2011), se esperaría un incremento de la cantidad de PEPC monoubiquitinada. Por todo ello, en este apartado se analiza la cantidad de PEPC y su monoubiquitinación en líneas SALK de arabis deficientes en proteínas autofágicas (ATG2, ATG5, ATG18a y NBR1), así como en plantas tratadas con trehalosa, que activa la autofagia (Williams *et al.*, 2015).

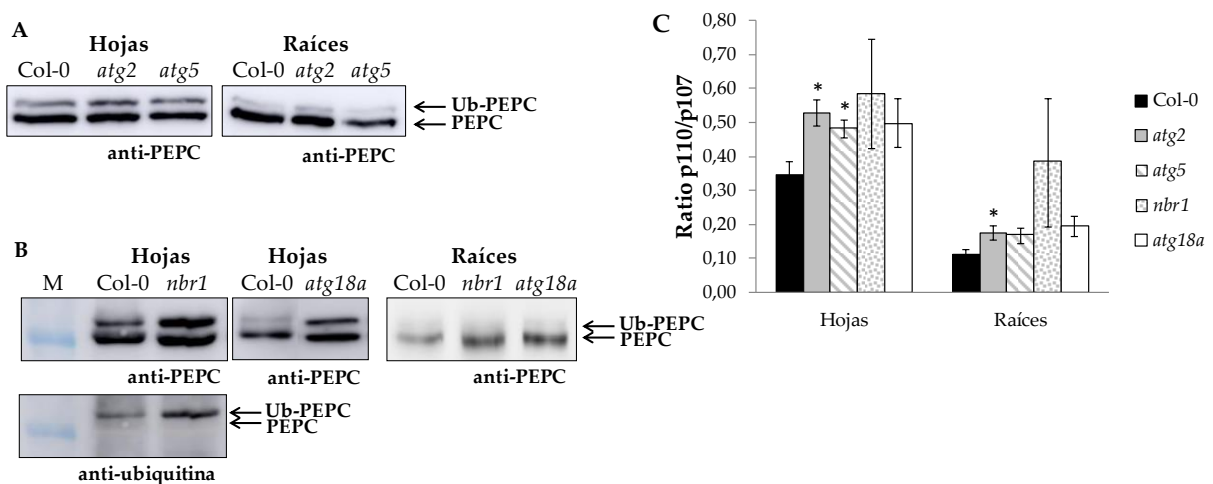
En experimentos de inmunoblot con plantas de arabis tratadas con trehalosa se observó una disminución de la cantidad de PEPC monoubiquitinada (Fig. 40A) con respecto al control tanto en hojas como en raíces. En las líneas *atg2* y *atg5* de arabis se detectó un aumento en la cantidad de PEPC, tanto de la forma monoubiquitinada como de la desubiquitinada (Fig. 40B). Los geles correspondientes a estos dos inmunoblots se cargaron por unidades de PEPC, por lo que una mayor cantidad de PEPC observada corresponde a PEPC inactiva.



**Figura 40. Análisis de la cantidad de PEPC en líneas SALK de arabis deficientes en proteínas autofágicas y bajo tratamiento con trehalosa.** A. Plantas de arabis silvestre (Col-0) de 6 semanas de edad fueron cultivadas en presencia de trehalosa al 1% (p/v) durante 48 h. Se realizaron extractos de proteínas de hojas y raíces y se analizaron (alícuotas correspondientes a 10 mU de actividad PEPC) por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC. B. Plantas de arabis silvestre (Col-0) y de las líneas SALK *atg2* y *atg5* fueron cultivadas tal y como se describe en Materiales y métodos durante 6 semanas aproximadamente. Se realizaron extractos de proteínas de hojas y se analizaron (alícuotas correspondientes a 1 mU de actividad PEPC) por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC. Ub-PEPC: PEPC monoubiquitinada.

Los resultados del análisis del patrón de monoubiquitinación de la PEPC mostraron un aumento de ésta, en forma de ratio p110/p107, en hojas y raíces de todas las líneas de arabidopsis respecto a Col-0 (**Fig. 41A, B**), y este aumento fue significativo en hojas de las líneas *atg2* y *atg5* y en raíces de *atg2* (**Fig. 41C**). La banda p110 corresponde a la PEPC monoubiquitinada, y p107 a la que no lo está.

Estos resultados indican que, en plantas de arabidopsis en condiciones que activan la autofagia, la cantidad de PEPC monoubiquitinada desciende. Y que en plantas de arabidopsis con alguna deficiencia en la vía autofágica se acumula más PEPC que en el silvestre, resultando en un aumento de PEPC monoubiquitinada con respecto a la no monoubiquitinada. Por lo tanto, al menos una fracción de la PEPC de tipo C<sub>3</sub> es degradada por autofagia selectiva, siendo la monoubiquitinación un marcaje para su reclutamiento al autofagosoma.



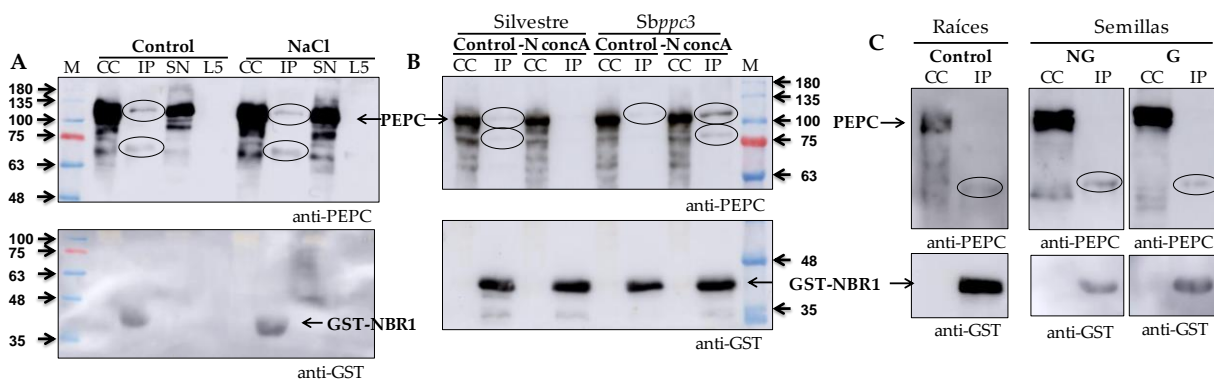
**Figura 41. Análisis de la ubiquitinación de la PEPC en líneas SALK de arabidopsis deficientes en proteínas autofágicas.** Plantas de arabidopsis silvestre (Col-0) y de las líneas SALK *atg2*, *atg5* (A), *nbr1* y *atg18a* (B) fueron cultivadas tal y como se describe en Materiales y métodos durante 6 semanas. A, B. Se realizaron extractos de proteínas de hojas y raíces y se analizaron (alícuotas correspondientes a 50 µg de proteína total) por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC o anticuerpos anti-ubiquitina. C, D. Se cuantificaron las dos bandas correspondientes a la PEPC y se calculó la ratio entre la PEPC monoubiquitinada (Ub-PEPC; p110) y la PEPC desubiquitinada (PEPC; p107). Los valores representan la media ± EE de 2 o más experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto a Col-0 (*t* test,  $P < 0,05$ ).

### 4.3. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1

Svenning *et al.* (2011) mostraron que la proteína NBR1 de plantas se une a proteínas mono- y poliubiquitinadas a través de su dominio de unión a ubiquitina UBA2. Por ello, se clonó mediante el sistema Gateway® el gen *SbNBR1* truncado conteniendo los dos dominios a ubiquitina (UBA1 y UBA2), y el motivo AIM o de unión a ATG8. Se indujo la producción de la proteína recombinante GST-NBR1 en *E. coli*, y posteriormente se purificó y se utilizó unida a una resina de glutatión-agarosa. Esta resina, con la proteína recombinante unida, se utilizó para la realización de

experimentos de coimmunoprecipitación con NBR1 en extractos proteicos de diferentes tejidos de sorgo, arábidopsis y *N. benthamiana*.

En hojas de sorgo, dos fragmentos de PEPC fueron coimmunoprecipitados junto a NBR1: uno de ellos del tamaño normal de la subunidad de la proteína, alrededor de 110 kDa, y otro fragmento más pequeño de en torno a 65-70 kDa (**Fig. 42A**). Esto ocurrió en extractos de hojas de sorgo de 3 semanas de edad en condiciones control y en salinidad, y no se observaron diferencias aparentes entre ambos tratamientos. Por otro lado, también se utilizaron extractos provenientes de hojas de plántulas de sorgo *ppc3* y de su control silvestre (*P898012*), de un cultivar diferente al sorgo utilizado en el resto de experimentos, de 10 días de edad en condiciones control y déficit de nitrógeno. En este caso también se observaron ambas bandas en el coimmunoprecipitado, aunque la banda inferior se localizó un poco más alta, en torno a 80 kDa (**Fig. 42B**). No hubo diferencias entre la cantidad de PEPC coimmunoprecipitada en el sorgo silvestre y el sorgo *ppc3* en condiciones control; no obstante, el déficit de nitrógeno disminuyó la cantidad de PEPC coimmunoprecipitada en el silvestre y la aumentó en *ppc3* (**Fig. 42B**).

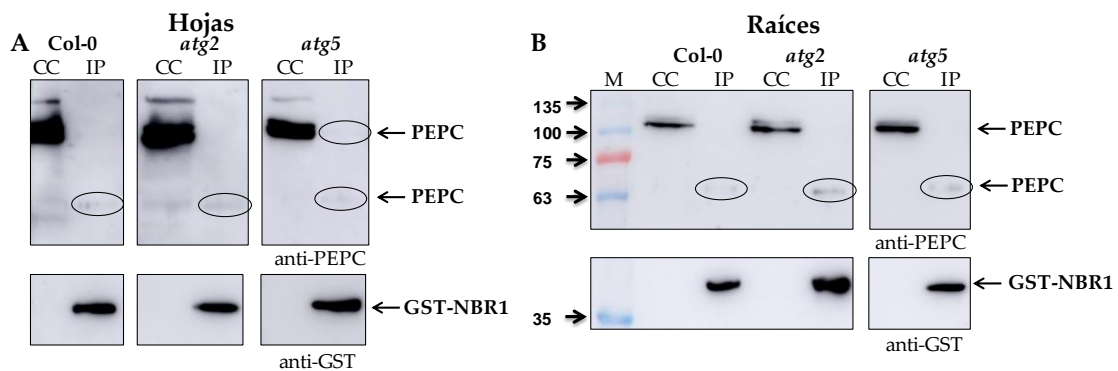


**Figura 42. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en sorgo.** Se realizaron extractos de hojas de 3 semanas de edad (A), hojas de 10 días de edad (B), raíces de 10 días de edad y semillas de sorgo (C) y se realizaron coimmunoprecipitaciones con la proteína recombinante de sorgo GST-NBR1, purificada a partir de *E. coli* y pre-unida a glutatión sefarosa, tal y como se describe en Materiales y métodos. El tratamiento con NaCl (NaCl) se llevó a cabo durante dos semanas, a 86 mM durante la primera semana y a 172 mM durante la segunda y última. El tratamiento sin nitrógeno y concA 1  $\mu$ M (-N concA) se llevó a cabo durante dos días. Las semillas de sorgo utilizadas para los extractos se mantuvieron en agua destilada a 25 °C durante 2 días, dividiéndose en no germinadas (NG) y germinadas (G). Las coimmunoprecipitaciones se realizaron durante toda la noche a 4 °C, tomándose 20  $\mu$ g como control de carga en el caso de las hojas y 50  $\mu$ g en el caso de raíces y semillas. Después de la incubación, se tomaron alícuotas de sobrenadante y último lavado correspondientes a 20  $\mu$ g del extracto crudo original en el caso de las hojas y de 50  $\mu$ g en el caso de raíces y semillas. El coimmunoprecipitado a partir de la resina se utilizó completamente. Se analizaron por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC y anti-GST. M: marcador molecular; CC: control de carga; IP: coimmunoprecipitado; SN: sobrenadante; L5: último lavado de la coimmunoprecipitación.

En raíces y semillas de sorgo sólo se obtuvo de la coimmunoprecipitación el fragmento de PEPC de menor peso molecular, que en este caso volvía a ser de en torno a 65-70 kDa (**Fig. 42C**). Además, en semillas se realizó la coimmunoprecipitación en semillas mantenidas en agua destilada durante 2 días a 25 °C, diferenciando entre no germinadas y germinadas ya que la monoubiquitinación de la PEPC varía entre ambas.

Sin embargo, no hubo diferencias entre ambas semillas en la cantidad de PEPC coimmunoprecipitada con NBR1 (Fig. 42C).

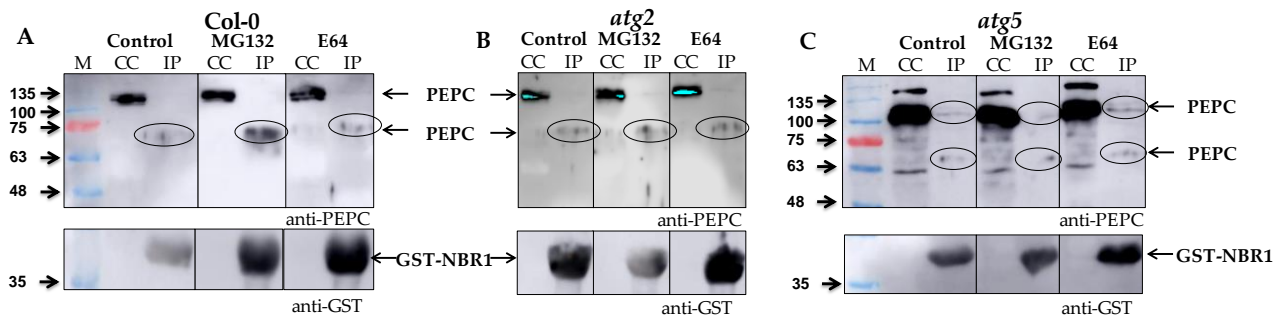
En arábidopsis, se utilizaron extractos de hojas y raíces de las líneas *atg2* y *atg5*, además del silvestre (Col-0). En todos los casos se visualizó la banda inferior de PEPC en el coimmunoprecipitado (Fig. 43A, B), situándose en torno a 65-70 kDa. Además, del extracto de hojas de *atg5* se obtuvo una pequeña cantidad de PEPC a la altura de 110 kDa en el coimmunoprecipitado (Fig. 43A, *atg5*). Hubo diferencias en la cantidad de PEPC de 65-70 kDa coimmunoprecipitada entre las diferentes líneas de arábidopsis de manera que las líneas deficientes en proteínas autofágicas mostraron mayor cantidad de PEPC en el coimmunoprecipitado con respecto a Col-0, siendo *atg2* donde se observa el mayor aumento. Esto ocurre tanto en hojas como en raíces (Fig. 43A, B).



**Figura 43. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en líneas SALK de arábidopsis.** Se realizaron extractos de hojas (A) y raíces (B) de arábidopsis de 5-6 semanas de edad y se realizaron coimmunoprecipitaciones con la proteína recombinante de sorgo GST-NBR1, purificada a partir de *E. coli* y pre-unida a glutatión sefarosa, tal y como se describe en Materiales y métodos. Las líneas SALK utilizadas fueron las deficientes en las proteínas ATG2 y ATG5, utilizándose la línea Col-0 como control. Las coimmunoprecipitaciones se realizaron durante toda la noche a 4 °C, tomándose 50 µg como control de carga. El coimmunoprecipitado a partir de la agarosa se utilizó completamente. Se analizaron por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC y anti-GST. M: marcador molecular; CC: control de carga; IP: coimmunoprecipitado.

Por último, se volvieron a realizar los experimentos de coimmunoprecipitación en extractos de arábidopsis, pero en este caso las plantas fueron tratadas con dos inhibidores de la degradación de proteínas: MG132 y E64. El primero es un inhibidor del proteasoma y el segundo inhibe un amplio rango de cisteín-proteasas (Matsumoto *et al.*, 1999). Estos inhibidores se utilizaron para bloquear la degradación por otras vías que no fueran la autofágica, y de este modo poder observar la acumulación de PEPC inactiva. Las coimmunoprecipitaciones se realizaron en extractos de hojas Col-0, *atg2* y *atg5*, y en el caso de Col-0 tratada con MG132 se obtuvo una mayor cantidad de PEPC de 65-70 kDa en el coimmunoprecipitado (Fig. 44A). Esta diferencia no se observó para *atg2* ni *atg5* (Fig. 44B, C). En el caso del E64, no se observaron diferencias en la cantidad de PEPC coimmunoprecipitada en ninguna de las líneas (Fig. 44).





**Figura 44. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en líneas SALK arábidoopsis tratadas con inhibidores.** Se realizaron extractos de hojas de arábidoopsis de 5-6 semanas de edad y tratadas con MG132 100 mM como inhibidor del proteasoma (MG132), E64 100 mM como inhibidor de cisteín proteasas (E64) y un volumen equivalente de DMSO como control (Control) y se realizaron coimmunoprecipitaciones con la proteína recombinante de sorgo GST-NBR1, purificada a partir de *E. coli* y pre-unida a glutatión sefarosa, tal y como se describe en Materiales y métodos. Las líneas SALK utilizadas fueron las deficientes en las proteínas ATG2 (B) y ATG5 (C), utilizándose la línea Col-0 como control (A). Las coimmunoprecipitaciones se realizaron durante toda la noche a 4 °C, tomándose 50 µg como control de carga (CC). El coimmunoprecipitado a partir de la agarosa se utilizó completamente. Se analizaron por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC y anti-GST (glutatión S-transferasa). M: marcador molecular; CC: control de carga; IP: coimmunoprecipitado.

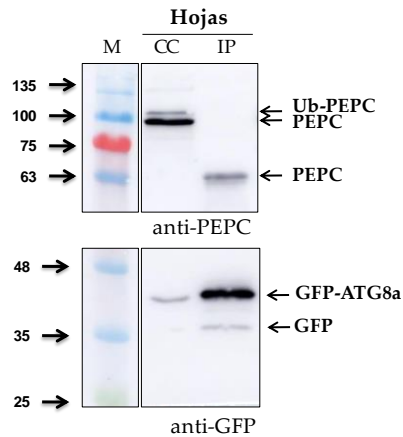
En conjunto, estos resultados muestran que GST-NBR1 interacciona con la PEPC de sorgo y de arábidoopsis *in vitro*, resultando un fragmento de PEPC de unos 65-70 kDa de la coimmunoprecipitación con GST-NBR1 en extractos de hojas, raíces y semillas de sorgo y hojas y raíces de arábidoopsis. Además, en hojas de sorgo y en la línea *atg5* de arábidoopsis también se obtiene PEPC sin proteolizar (110 kDa) en este coimmunoprecipitado. La utilización del inhibidor del proteasoma MG132 en hojas de arábidoopsis hace que la cantidad de PEPC de 65-70 kDa aumente en el coimmunoprecipitado.

#### 4.4. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GFP-ATG8a

Del mismo modo que en el apartado anterior, se realizó un experimento de coimmunoprecipitación en extractos de hoja de *N. benthamiana* expresando la construcción GFP-ATG8a de arábidoopsis utilizada previamente en el apartado 3.2. La Fig. 45 muestra cómo junto a ATG8a se coimmunoprecipita un fragmento de PEPC similar al detectado en sorgo y arábidoopsis, en este caso de un peso molecular algo menor (en torno a 63 kDa). Esto indica que este fragmento de PEPC también se une, directa o indirectamente, a ATG8a.

#### 4.5. Colocalización por microscopía confocal

Los resultados obtenidos indicaban que podía estar teniendo lugar una interacción entre la PEPC y algunos componentes de la autofagia como NBR1 y/o ATG8. Por ello, en experimentos de expresión transitoria en hojas de *N. benthamiana*, se coexpresaron las proteínas recombinantes mCherry-PPC3 y GFP-ATG8a. Se utilizó el



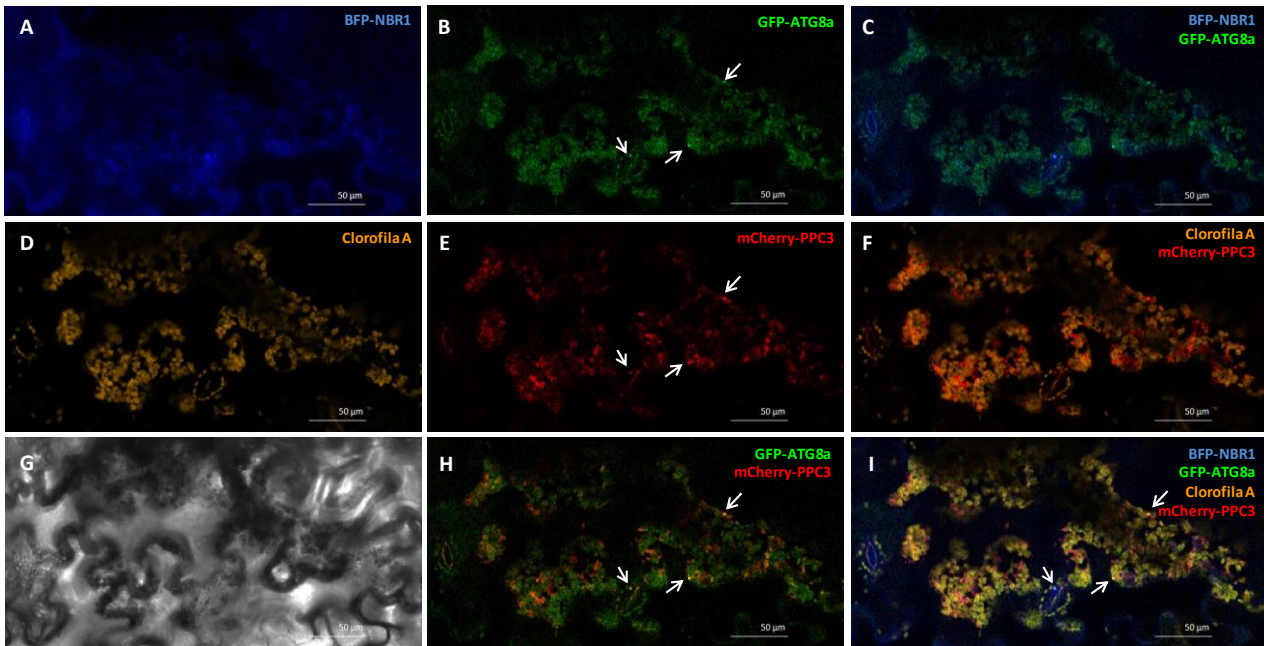
**Figura 45. Coinmunoprecipitación de la PEPC con GFP-ATG8a de *Arabidopsis* en *N. benthamiana*.** Hojas de *N. benthamiana* fueron infiltradas con *A. tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS expresando la construcción GFP-ATG8a. 72 h después de la infiltración, se preparó un extracto crudo de hoja, de donde se obtuvieron 15  $\mu$ l para el control de carga, y se realizó una coinmunoprecipitación con agarosa anti-GFP tal y como se describe en Materiales y métodos. Los inmunoblots fueron incubados con anticuerpos anti-PEPC y anti-GFP. **M:** marcador de peso molecular; **CC:** control de carga; **IP:** coinmunoprecipitado.

microscopio confocal para intentar visualizar la proteína PPC3 mediante su marcaje fluorescente (mCherry) en colocalización con autofagosomas marcados con GFP-ATG8a en las hojas de *N. benthamiana* infiltradas. También se añadió la construcción BFP(proteína fluorescente azul)-NBR1 al experimento, y se utilizó para su construcción el mismo fragmento de NBR1 clonado para los experimentos con GST-NBR1 del apartado 4.2, con los dos dominios UBA y el motivo AIM.

En las hojas de *N. benthamiana* infiltradas, los autofagosomas, marcados por GFP-ATG8a como estructuras punteadas brillantes, colocalizaron con estructuras similares marcadas por mCherry-PPC3 (**Fig. 46B, E, H; flechas blancas**). BFP-NBR1 colocalizó en menor medida con estas estructuras punteadas, siendo su localización más dispersa (**Fig. 46**). Además, mCherry-PPC3 se localizó en el citoplasma y en general tendió a posicionarse cerca de la envuelta externa de los cloroplastos, localizados mediante la autofluorescencia de la clorofila A (**Fig. 46D, E, F**).

Estos resultados muestran que la PPC3 de sorgo recombinante se localiza en autofagosomas marcados con GFP-ATG8a en hojas de *N. benthamiana*, lo cual supone un indicio de su degradación vía autofagia.





**Figura 46. Colocalización de GFP-ATG8a de arabis y BFP-NBR1 y mCherry-PPC3 de sorgo por microscopía confocal.** Hojas de *Nicotiana benthamiana* fueron infiltradas con *Agrobacterium tumefaciens* estirpe GV3101 transformada con el plásmido pGreen-IIS con las construcciones: GFP-ATG8a, BFP-NBR1 y mCherry-PPC3, cuya composición se detalla en Materiales y métodos. Las plantas se mantuvieron en oscuridad durante 48 h previas a su visualización para inducir la autofagia, y sus hojas se infiltraron con concA 1  $\mu$ M 16 h antes de su visualización para bloquear la degradación de los autofagosomas. 72 h después de la infiltración, secciones de hoja de *N. benthamiana* se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM 7 Duo usando para GFP un láser a 488 nm y un filtro de emisión de 504-533 nm, para BFP un láser a 405 nm y un filtro de emisión de 441-470 nm y para mCherry un láser a 561 nm y un filtro de emisión de 610-630 nm. La clorofila A se detectó usando el láser a 488 nm y un filtro de emisión de 658-690 nm. Las flechas indican estructuras punteadas. **A.** BFP; **B.** GFP; **C.** BFP y GFP; **D.** Clorofila A; **E.** mCherry; **F.** Clorofila A y mCherry; **G.** Campo claro; **H.** GFP y mCherry; **I.** BFP, GFP, clorofila A y mCherry.

#### 4.6. Degradación de la PEPC en células de *N. benthamiana* y raíces de sorgo

Los cultivos de células constituyen un escenario distinto y simplificado para estudiar procesos celulares complejos. A partir de tejido de raíces de *N. benthamiana*, se establecieron cultivos celulares en donde se analizó el patrón de proteína PEPC y su actividad, así como sus variaciones en respuesta a distintos estreses e inhibidores de la degradación. A estos cultivos, que se mantienen en oscuridad, se les suministra una fuente de carbono orgánico en forma de sacarosa ya que son heterótrofos.

En primer lugar, se realizó un estudio del patrón de proteína PEPC en electroforesis e inmunoblot bajo distintos estreses. El déficit de carbono, un activador de la autofagia, inducido por la retirada de sacarosa en el medio durante 5 días provocó un decremento de la cantidad de PEPC en las células, y cuando este déficit se prolongó hasta 10 días, la PEPC desapareció por completo (**Fig. 47A**). El decremento de PEPC, causado por 5 días de ausencia de sacarosa, vino acompañado de un descenso en la actividad específica de la enzima (**Fig. 47B, -sac**). Al volver a aportar sacarosa al medio durante 2 días, tanto la cantidad de PEPC como su actividad aumentaron de

nuevo (**Fig. 47B, +sac**). El déficit de fósforo en el medio provocó un descenso de la cantidad de PEPC. En estas condiciones, sin embargo, la actividad PEPC aumentó considerablemente (**Fig. 47B, -P**). Por último, el déficit de nitrógeno también disminuyó la cantidad de PEPC, mientras que su actividad no sufrió importantes cambios (**Fig. 47B, -N**).

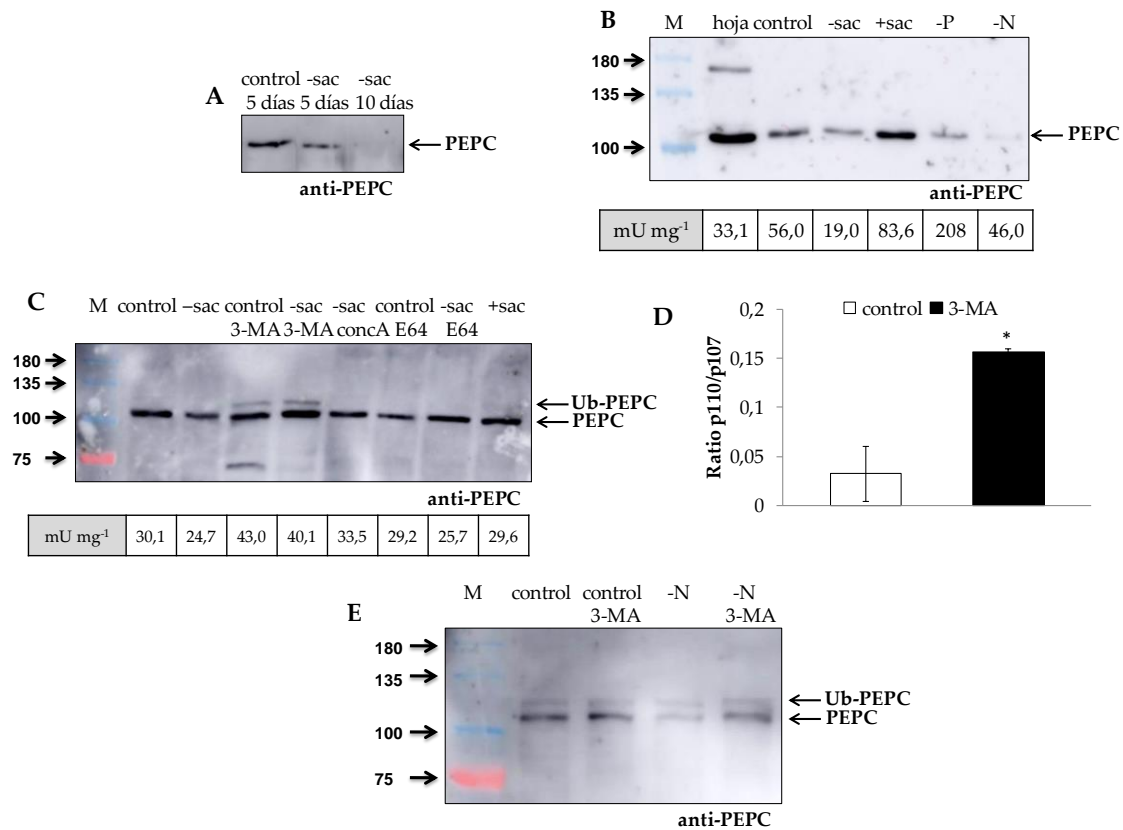
Posteriormente, se utilizaron en estas células una serie de inhibidores de la degradación de proteínas entre los que se encuentran el 3-MA (Seglen y Gordon, 1982), que inhibe la vía tradicional de la autofagia mediante la inhibición de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K); la concA, y el E64. Los tres inhibidores previnieron la degradación de la proteína al retirar la sacarosa, y en especial el 3-MA, que hizo que la cantidad de proteína incluso incrementara (**Fig. 47C**). El inhibidor 3-MA produjo la aparición de una banda superior, similar a la banda de PEPC monoubiquitinada, que en condiciones control en el cultivo de células de *N. benthamiana* es prácticamente inexistente (**Fig. 47C, D**). Además, este inhibidor de la formación de autofagosomas también provocó un aumento de la actividad PEPC con respecto al control (**Fig. 47C**).

Estos resultados indican que: i) bajo condiciones de déficit de carbono la PEPC de células de *N. benthamiana* es degradada; ii) utilizando inhibidores de la autofagia esta degradación se bloquea; iii) el uso de un inhibidor de la formación de autofagosomas como el 3-MA hace que aumente notablemente la cantidad de PEPC monoubiquitinada.

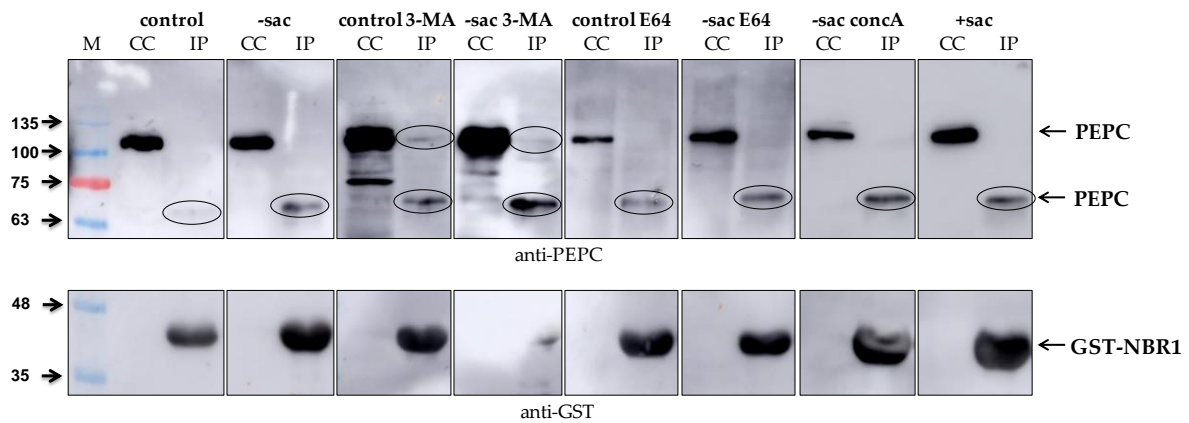
Una situación parecida ocurre en raíces de sorgo en condiciones de deficiencia de nitrógeno. La cantidad de PEPC detectada disminuye en falta de nitrógeno (**Fig. 47E, -N**), y tras el tratamiento con 3-MA se recupera parte de esta PEPC (**Fig. 47E, -N 3-MA**).

Del mismo modo que se realizó en el apartado 4.3, los extractos de células de *N. benthamiana* se sometieron a coimmunoprecipitación con la proteína recombinante GST-NBR1 de sorgo. En todos los casos volvió a aparecer una banda de PEPC de 65-70 kDa en el coimmunoprecipitado, y esta banda fue más intensa en déficit de carbono inducido por falta de sacarosa y tras la utilización de los inhibidores 3-MA, E64 y concA (**Fig. 48**). Además, en los extractos proteicos de las células tratadas con 3-MA apareció una banda a una altura de unos 110 kDa en el coimmunoprecipitado con GST-NBR1 (**Fig. 48**).

En resumen, los resultados de este apartado evidencian que una parte de la cantidad total de PEPC C<sub>3</sub> de *N. benthamiana* es degradada vía autofagia en condiciones de déficit nutricional, y que el marcaje con monoubiquitinación está implicado en este proceso.



**Figura 47. Efecto de inhibidores de autofagia sobre la PEPC de cultivos de células de *N. benthamiana* y raíces de sorgo.** Las células de *N. benthamiana* se generaron y se cultivaron tal y como se describe en Materiales y métodos. Los extractos proteicos, provenientes de triturar 0,2 g de hojas o células filtradas provenientes del cultivo en 1 ml de tampón de extracción, se utilizaron para medir la actividad PEPC (expresada en mU de PEPC por mg de proteína total) y se analizaron (alícuotas correspondientes a 30 µg de proteína total) por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC. **A.** Extractos de células control, sin sacarosa (-sac) durante 5 días y durante 10 días. **B.** Los extractos se hicieron a partir de hojas de una planta de 6 semanas de edad (hoja) o bien de un cultivo de células de 5 días con medio control (control), medio sin sacarosa (-sac), medio sin fósforo (-P), medio sin nitrógeno (-N) o de medio sin sacarosa seguido de 2 días más con medio control (+sac). La actividad PEPC se muestra en mU mg<sup>-1</sup> bajo la imagen del inmunoblot. **C.** Los extractos se hicieron a partir de un cultivo de células de 5 días con medio control (control), sin sacarosa (-sac) o sin sacarosa seguido de 2 días más con medio control (+sac). El inhibidor 3-MA (3-MA) se usó durante los 5 días de cultivo a 2,5 mM. Los inhibidores concA (concA) y E64 (E64) se usaron durante las 16 horas previas a recoger el cultivo y a unas concentraciones de concA 1 µM y E64 10 µM. Las muestras que no fueron tratadas con inhibidores contenían un volumen equivalente de DMSO como control. La actividad PEPC se muestra en mU mg<sup>-1</sup> bajo la imagen del inmunoblot. **D.** Se cuantificaron las dos bandas correspondientes a la PEPC de las muestras control y tratadas con 3-MA y se calculó la ratio entre la PEPC ubiquitinada (Ub-PEPC; p110) y la PEPC desubiquitinada (PEPC p107). Los valores representan la media ± EE de al menos 3 réplicas. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (*t* test, *P*<0,05). **E.** Se realizaron extractos de proteínas de raíces de plantas de sorgo de 10 días de edad cultivadas hidropónicamente con medio completo (control) o sin nitrógeno durante 2 días (-N) y se utilizaron para medir actividad PEPC y se analizaron (alícuotas correspondientes a 0,6 mU de actividad PEPC) por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC. El inhibidor 3-MA (3-MA) se usó durante los 2 días previos a la recogida a una concentración de 5 mM. **M:** marcador de peso molecular.



**Figura 48. Coimmunoprecipitación de la PEPC con GST-NBR1 en células de *N. benthamiana* tratadas con inhibidores.** A partir de extracciones proteicas de cultivos de células de *N. benthamiana* se realizaron coimmunoprecipitaciones con la proteína recombinante de sorgo GST-NBR1, purificada a partir de *E. coli* y pre-unida a glutatión sefarosa, tal y como se describe en Materiales y métodos. Las células de *N. benthamiana* se generaron y se cultivaron tal y como se describe en Materiales y métodos. Los extractos se hicieron a partir de células provenientes de un cultivo de 5 días con medio control (control), medio sin sacarosa (-sac), o medio sin sacarosa seguido de 2 días más con medio control (+sac). El inhibidor 3-MA (3-MA) se usó durante los 5 días de cultivo a 2,5 mM. Los inhibidores concA (concA) y E64 (E64) se usaron durante las 16 horas previas a recoger el cultivo y a unas concentraciones de concA 1  $\mu$ M y E64 10  $\mu$ M. Las muestras que no fueron tratadas con inhibidores contenían un volumen equivalente de DMSO como control. Las coimmunoprecipitaciones se realizaron durante toda la noche a 4 °C, tomándose 50  $\mu$ g como control de carga. El coimmunoprecipitado a partir de la agarosa se utilizó completamente. Se analizaron por SDS-PAGE y posteriormente mediante inmunoblot con anticuerpos anti-PEPC y anti-GST. **M:** marcador molecular; **CC:** control de carga; **IP:** coimmunoprecipitado.

# DISCUSIÓN

---

La PEPC es una enzima multifuncional implicada en procesos clave del metabolismo del carbono y del nitrógeno y, por lo tanto, ha sido ampliamente estudiada en distintos aspectos tales como su enzimología, estructura, expresión génica, regulación o evolución molecular. Como resultado, se han descrito numerosas características de esta proteína, destacando la diversa regulación postraduccional que posee la enzima. Entre los mecanismos de regulación se incluyen regulación alostérica y distintas modificaciones postraduccionales (PTMs), como la fosforilación, la monoubiquitinación y la regulación por ácido fosfatídico (PA) y óxido nítrico (NO) (Echevarría y Vidal, 2003; Monreal *et al.*, 2010b; O'Leary *et al.*, 2011b; Monreal *et al.*, 2013b; Ruiz-Ballesta *et al.*, 2014).

Sin embargo, pese a que la degradación de la proteína es un proceso que se ha descrito en diferentes contextos (Chollet *et al.*, 1996; Moraes y Plaxton, 2000; Blonde y Plaxton, 2003), se sabe poco o nada sobre los posibles mecanismos de regulación *in vivo*, que sí se han descrito para otras proteínas (Sun *et al.*, 2017). En este sentido, mientras que algunas de las PTMs de la PEPC, como la fosforilación y algunos reguladores alostéricos (Echevarría y Vidal, 2003; O'Leary *et al.*, 2011b), modifican las propiedades cinéticas de la enzima y tienen una importante repercusión fisiológica, hay otras cuya función no está clara. Este es el caso de la ubiquitina, el NO y el PA, tres reguladores postraduccionales que están relacionados con la degradación o estabilidad de las proteínas (Testerink y Munnik, 2005; Svenning *et al.*, 2011; Albertos *et al.*, 2015; Zhan *et al.*, 2018).

Se ha descrito que la monoubiquitinación es una señal para la degradación de proteínas por autofagia selectiva (Svenning *et al.*, 2011), una vía de degradación alternativa a la vía ubiquitina-proteasoma que ha sido ampliamente estudiada durante los últimos años. Por otro lado, el PA se ha relacionado con el reclutamiento a membrana y posterior proteólisis de la PEPC de tipo C<sub>4</sub> de sorgo (Monreal *et al.*, 2010b), habiéndose descrito este reclutamiento a membrana en otras plantas (Wu y Wedding, 1992; Park *et al.*, 2012). Precisamente en plantas C<sub>3</sub> se conoce que existen diversos mecanismos de degradación vacuolar a partir de vesículas formadas en torno a la membrana del cloroplasto capaces de degradar a la rubisco (Otegui, 2018), y varios de estos mecanismos son dependientes de autofagia. Pero estas vías han sido descritas en plantas C<sub>3</sub> y no en plantas C<sub>4</sub>, donde la rubisco comparte con la PEPC su papel protagonista en la fotosíntesis, y es una fuente de nitrógeno tan importante como la primera para el reciclaje de este elemento. Por eso, un posible mecanismo por el que la PEPC se degrada tras su reclutamiento a membrana por parte del PA es la inclusión en vesículas, dependientes de autofagia o no, para su transporte a la vacuola.

Por todo ello, el objetivo del trabajo presentado es, en primer lugar, estudiar el efecto de la S-nitrosilación sobre la PEPC y también de otra PTM relacionada con la degradación, la carbonilación, así como las interacciones entre ambas PTMs. En

segundo lugar, posibilitar el estudio de la autofagia en la planta de sorgo mediante el desarrollo de métodos para su detección y monitorización. Y por último, obtener indicios de la degradación de la PEPC por la vía autofágica.

### **1. La salinidad induce patrones opuestos de carbonilación y nitrosilación de la PEPC en hojas de sorgo**

En trabajos anteriores se había puesto de manifiesto que la salinidad aumentaba el estado de fosforilación de la PEPC en hojas de sorgo (Echevarría *et al.*, 2001), y que la PEPC de plantas con estrés salino era más estable que la de plantas control (García-Mauriño *et al.*, 2003). El primer fenómeno repercutía favorablemente sobre el balance de carbono de la planta, y era consecuencia de una compleja serie de acontecimientos entre los que estaba la acumulación de NO en las células de mesófilo de la hoja de sorgo como consecuencia de la salinidad (Monreal *et al.*, 2013a, b). Por otro lado, la salinidad hace que la producción de ROS aumente, y, como consecuencia, la carbonilación de proteínas. Este trabajo muestra que la PEPC de hojas de sorgo está sometida a PTMs derivadas de las ROS y el NO, como son la carbonilación y la S-nitrosilación respectivamente, y que la interacción entre ambas, regulando la estabilidad de la proteína PEPC, podría tener relevancia fisiológica para la planta.

El daño oxidativo puede ser monitorizado en plantas a través de la carbonilación de proteínas, una PTM que normalmente provoca la inactivación enzimática e incrementa la vulnerabilidad al ataque proteolítico (Nyström, 2005). Inicialmente, se consideraba a la carbonilación de proteínas como un proceso aleatorio, irreversible y con efecto inactivante. Pero actualmente se conoce que esta modificación participa en la regulación de distintas funciones biológicas (Lounifi *et al.*, 2013). Entre ellas, la carbonilación ha sido relacionada con la germinación de las semillas (Arc *et al.*, 2011) y el envejecimiento (Kalemba y Pukacka, 2014). En general, la carbonilación es un proceso irreversible; sin embargo, se ha sugerido la existencia de un mecanismo de descarbonilación en animales (Wong *et al.*, 2010), pero que aún está por describir en plantas.

La cantidad de proteínas carboniladas aumenta en muchos estreses abióticos. Los resultados de este trabajo muestran que la carbonilación de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo se produce paralelamente a la inactivación de la enzima (**Figs. 15, 16**), y los resultados preliminares sugieren que esta PEPC inactiva es degradada por la vía ubiquitina-proteasoma (**Fig. 18**). Por lo tanto, es más probable que los cambios en la cantidad de PEPC carbonilada se deban al reemplazo de la PEPC carbonilada por nuevas moléculas que a la descarbonilación de la propia proteína. La nitrosilación evitaría que la cantidad de PEPC carbonilada siguiera aumentando.

La S-nitrosilación puede modular la actividad, la estabilidad y el tráfico de las proteínas (Astier *et al.*, 2011). La S-nitrosilación de la rubisco ocasionó la pérdida de su

actividad carboxilasa (Abat *et al.*, 2008), mientras que la misma PTM reguló positivamente la actividad de la ascorbato peroxidasa (Begara-Morales *et al.*, 2014). En semillas de *Arabidopsis* la S-nitrosilación del factor transcripcional ABI5 facilitó su degradación mediante el sistema ubiquitina proteasoma, promoviendo así la germinación (Albertos *et al.*, 2015). Este trabajo pone de manifiesto que la PEPC de hojas de sorgo pudo ser S-nitrosilada *in vitro* e *in vivo*, pero que esta PTM no cambió significativamente su actividad (**Fig. 19**). No obstante, la PEPC S-nitrosilada fue menos vulnerable a la posterior inactivación por carbonilación, tanto *in vitro* como *in vivo* (**Fig. 20**).

Existe evidencia de una interacción entre la oxidación proteica derivada de las ROS y la S-nitrosilación de proteínas derivada del NO (Lounifi *et al.*, 2013). Un análisis proteómico de plantas de cítricos expuestas a estrés salino identificó varias proteínas cuya carbonilación o S-nitrosilación fue modificada por salinidad (Tanou *et al.*, 2009). Un pretratamiento con SNP disminuyó la carbonilación de proteínas inducida por salinidad en estos cítricos. Entre las proteínas cuya carbonilación fue inducida por salinidad y disminuida por el tratamiento con SNP, había varias proteínas relacionadas con la fotosíntesis. En esta línea, la incubación de cloroplastos de soja con el donador de NO S-nitrosoglutatión (GSNO) redujo el nivel de carbonilación (Jasid *et al.*, 2006). Además, el NO disminuyó la carbonilación inducida por desecación e intensificó el estado de S-nitrosilación de las enzimas antioxidantes en las semillas recalcitrantes de *Antiaris toxicaria* (Bai *et al.*, 2011). Se propuso que el NO actuaba doblemente: primero, incrementando la actividad de las enzimas antioxidantes mediante S-nitrosilación; y segundo, previniendo la pérdida de actividad antioxidante causada por la carbonilación de proteínas. Además, la S-nitrosilación podría causar un cambio conformacional de la proteína que la hiciera más resistente a la carbonilación. Esta última posibilidad es apoyada por el efecto protector que la S-nitrosilación *in vitro* tiene sobre la posterior carbonilación (**Fig. 20**), y por los patrones opuestos de estas dos PTMs que se observan en la PEPC de hojas de sorgo en condiciones de estrés salino (**Figs. 22, 23**). Los resultados presentados en este trabajo no permiten afirmar que la S-nitrosilación de la PEPC es responsable, directa y exclusivamente, de una disminución en su carbonilación. Es posible, además, que el efecto del NO fuese indirecto, mediante un incremento del nivel antioxidante y consecuente disminución de ROS. No obstante, ambos efectos, directo e indirecto, podría coexistir y contribuirían a mantener la actividad PEPC en salinidad.

En resumen, previamente se había encontrado un aumento de la estabilidad de la PEPC quinasa (PEPCK) en salinidad, siendo el ácido abscísico (ABA) y el NO mediadores importantes en este efecto (Echevarría *et al.*, 2001; García-Mauriño *et al.*, 2003; Monreal *et al.*, 2007a; 2013a, b). Este trabajo apoya que también la estabilidad de la PEPC puede ser modulada por PTMs en hojas de sorgo, y que la S-nitrosilación



disminuye la carbonilación. Mediante estos mecanismos, la salinidad y el NO protegen a la PEPC de su inactivación mientras que promueven su fosforilación, conduciendo de este modo a un funcionamiento óptimo de esta enzima en condiciones subóptimas, tales como el estrés salino.

## 2. Detección y monitorización de la autofagia en sorgo

El estudio de la autofagia en plantas se encuentra muy desarrollado en *arabidopsis* y menos en otras especies de interés agronómico como el tomate, arroz, maíz, soja o trigo, entre otras. Ningún estudio de autofagia en sorgo ha sido realizado hasta la fecha. En cualquier caso, es recomendable confirmar la validez de un método de detección de autofagia a través de la detección paralela mediante otro método distinto (Bassham, 2014; Marshall y Vierstra, 2018). La autofagia posee una función principal en el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Ren *et al.*, 2014), por eso las condiciones de deficiencia en estos dos nutrientes son los más usados para activar la autofagia. Además, se ha descrito también una implicación de la autofagia en el metabolismo de otros nutrientes como el fosfato (Tasaki *et al.*, 2014; Naumann *et al.*, 2018), el hierro (Pottier *et al.*, 2018) o el azufre (Dong *et al.*, 2017); así como en estreses como el oxidativo (Xiong *et al.*, 2007; Bassham, 2007), salino (Luo *et al.*, 2017), hídrico (Liu *et al.*, 2009), térmico (Rana *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2014) y biótico (Batoko *et al.*, 2017). En este trabajo se describe la detección de la activación de la autofagia en sorgo en diferentes condiciones de estrés abiótico y mediante distintos métodos.

Evaluar el nivel de expresión de los genes *ATG* implicados en la vía autofágica es un recurso que, aunque no es el más común en los estudios de autofagia, ha sido utilizado en numerosas ocasiones y en diferentes plantas. No todos los genes *ATG* aumentan su expresión en condiciones en las que se activa la autofagia, y entre los que sí lo hacen no tienen por qué aumentar su expresión siempre que la autofagia se active. Esto depende de la ruta de activación de la autofagia que se produzca, que puede presentar diferencias según cuál sea el desencadenante. No obstante, algunos genes autofágicos se han descrito como marcadores de activación de la autofagia en varias plantas (Rose *et al.*, 2006).

*ATG18a* aumenta su expresión en respuesta a déficit nutricional, estrés oxidativo, senescencia y estrés osmótico y salino en *arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009). La expresión del gen *ATG6* también aumenta en condiciones de déficit nutricional, estrés térmico, estrés hídrico y salinidad en diferentes plantas (Rana *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2015). Los resultados de este trabajo ponen de manifiesto que los genes *SbATG18a*, homólogo al gen *AtATG18a*, y *SbATG6a* y *SbATG6b*, homólogos al gen *AtATG6*, aumentan su expresión en condiciones de déficits nutricionales y estrés oxidativo, excepto la deficiencia de nitrógeno y hierro, en hojas y raíces (**Fig. 26**); así como en estrés salino en hojas de sorgo (**Fig. 27**). Por lo tanto, la medida de la

expresión de dichos genes puede emplearse para detectar la activación de la autofagia en sorgo en salinidad, déficit de carbono y fósforo, y estrés oxidativo; pero no es útil en deficiencia de nitrógeno y hierro.

La forma más directa de monitorizar la activación de la autofagia es visualizar los propios autofagosomas dentro de las células por microscopía. La tinción con monodansilcadaverina (MDC) es un método ya utilizado en varias plantas para visualizar los autofagosomas por fluorescencia en el microscopio confocal, incluso en otra monocotiledónea con metabolismo  $C_4$  como *Tripogon loliiformis* (Williams *et al.*, 2015). En este caso se usa en combinación con concA, que inactiva la  $H^+$ ATPasa del tonoplasto e inhibe la degradación de los autofagosomas en su interior. En hojas y raíces de sorgo el número de autofagosomas detectados por este método aumentó en condiciones de deficiencia nutricional y estrés oxidativo, así como estrés salino en hojas (**Fig. 28**).

Otro modo de visualizar los autofagosomas es mediante microscopía electrónica, también en combinación con el uso del inhibidor concA. En este caso, los autofagosomas pueden ser visualizados como vesículas de doble membrana, en el caso de que se encuentren en el citoplasma, o de membrana simple, si se encuentran en el lumen vacuolar. La media de autofagosomas por célula aumentó en condiciones de deficiencia nutricional, estrés oxidativo y estrés salino en hojas y raíces (**Fig. 31**).

La unión de la proteína ATG8 a fosfatidiletanolamina (PE), que ocurre durante la formación de los autofagosomas, puede ser usada para monitorizar la activación de la autofagia. Este conjugado ATG8-PE migra de forma diferente a la proteína soluble en geles de poliacrilamida con urea, y también es un índice cuantitativo del grado de activación de la autofagia. Normalmente se usan anticuerpos anti-ATG8a de arabisidopsis, que han demostrado ser útiles en diferentes plantas (Li *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2015). En sorgo, estos anticuerpos detectan ATG8 con menor sensibilidad. La cantidad de conjugado ATG8-PE aumenta levemente en plantas con déficit nutricional y estrés oxidativo (**Fig. 32**), pero no constituye un método eficiente para detectar la activación de la autofagia en sorgo.

La combinación de distintos métodos para detectar la activación de la autofagia es una estrategia común en el estudio de los mecanismos relacionados con este proceso de degradación. En arabisidopsis, utilizando la detección de autofagosomas en el microscopio confocal mediante tinción con MDC en combinación con la visualización de cuerpos autofágicos en el microscopio electrónico, se describió la degradación del retículo endoplasmático por autofagia (Liu *et al.*, 2012). Para determinar que la autofagia estaba implicada en la tolerancia a salinidad y estrés hídrico en arabisidopsis se combinaron análisis de expresión de genes autofágicos y la detección de autofagosomas con MDC (Liu *et al.*, 2009); y los mismos métodos se utilizaron para

determinar la implicación de ATG18a en la vía autofágica en condiciones de deficiencia de nutrientes y senescencia (Xiong *et al.*, 2005). También se utilizó en *Arabidopsis* la técnica de la inmunodetección de ATG8-PE junto con la visualización de autofagosomas por microscopía confocal, en este caso con GFP-ATG8, para determinar la implicación de ATG10 en la vía autofágica (Phillips *et al.*, 2008). Aparte de *Arabidopsis*, en otras plantas también se han usado estos métodos en el estudio de la autofagia. En maíz, se estudió el papel de la autofagia en la removilización del nitrógeno usando la inmunodetección de ATG8-PE y la visualización de autofagosomas en el microscopio confocal, con YFP-ATG8, y en el microscopio electrónico (Li *et al.*, 2015). En arroz, se hizo uso de análisis de expresión de genes autofágicos y de detección de autofagosomas por microscopía confocal con MDC para estudiar la implicación del gen *OsATG10b* en la autofagia activada en condiciones de estrés oxidativo (Shin *et al.*, 2009). En la planta de la resurrección *Tripogon loliiformis*, se combinaron las técnicas de la inmunodetección de ATG8-PE y la visualización de autofagosomas por microscopía confocal con MDC y por microscopía electrónica para estudiar el papel de la autofagia en el proceso de desecación de esta planta en condiciones de estrés hídrico (Williams *et al.*, 2015). En este trabajo se combinan las técnicas de análisis de expresión de genes autofágicos, visualización de autofagosomas por microscopía confocal con MDC y por microscopía electrónica, e inmunodetección de ATG8-PE para monitorizar la activación de la autofagia en hojas y raíces de sorgo en condiciones de déficit nutricional, estrés oxidativo y estrés salino. Los resultados muestran que la autofagia es activada en hojas y raíces de sorgo con déficit de nitrógeno, y también con déficit de carbono; aunque sí es cierto que los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* no aumentan su expresión en sorgo en condiciones de deficiencia de nitrógeno (**Fig. 26**), a diferencia de *ATG18a* de *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2005) y de los genes *ATG6b* y *ATG6c* de trigo (Yue *et al.*, 2015). No obstante, el gen *ATG6a* de trigo tampoco aumentó su expresión en deficiencia de nitrógeno (Yue *et al.*, 2015). En el sorgo en condiciones de estrés oxidativo, los resultados obtenidos por las 4 diferentes técnicas evidenciaron una clara activación de la autofagia tanto en hojas como en raíces de sorgo. Por último, en condiciones de estrés salino, los resultados de los análisis de expresión de los genes *ATG* y la visualización de autofagosomas por microscopía confocal y electrónica pusieron de manifiesto una activación de la autofagia en hojas. Sin embargo, en raíces sólo se observó un aumento en el número de autofagosomas en el microscopio electrónico, presentando este resultado una alta variabilidad (**Fig. 31**). Esto sugiere que la respuesta autofágica al estrés salino se produce principalmente en hojas de sorgo, y no en raíces, en los tiempos y en las condiciones en las que se ha realizado el estudio descrito en este trabajo.

En conclusión, la activación de la autofagia ya había sido descrita para otras plantas en condiciones de déficit nutricional, estrés oxidativo y estrés salino, siendo común en estos estudios la combinación de dos o más técnicas de monitorización de la

autofagia. Este trabajo establece que la autofagia es activada en sorgo en las condiciones nombradas anteriormente, y que las técnicas de visualización de autofagosomas por microscopía confocal con MDC y microscopía electrónica, así como el análisis de expresión de los genes *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b* son efectivas para detectar esta activación.

### 3. Estudio de la utilidad de la proteína vírica $\beta$ C1 como herramienta para estudios de autofagia

Las células vegetales son capaces de emplear la autofagia para defenderse frente a diversos patógenos (Han *et al.*, 2011). La autofagia regula positivamente la resistencia de las plantas frente a patógenos necrotróficos (Lenz *et al.*, 2011; Kabbage *et al.*, 2013), mientras que en el caso de la resistencia a patógenos biotróficos la autofagia puede repercutir tanto negativamente (Wang *et al.*, 2011) como positivamente (Dagdas *et al.*, 2016; Haxim *et al.*, 2017). Sin embargo, el mecanismo responsable del vínculo entre la autofagia y la resistencia a estos patógenos sólo está descrito en el caso de la infección del virus de Multán del enrollamiento de la hoja de algodón (CLCuMuV) en hojas de *N. benthamiana* (Haxim *et al.*, 2017). El factor de virulencia  $\beta$ C1 de este virus, encargado de bloquear el silenciamiento de ARN vírico, interacciona con ATG8 para su degradación por autofagia, siendo este el mecanismo que establece el vínculo entre la autofagia y la resistencia al virus. Esta interacción con diferentes isoformas de la proteína ATG8 de *N. benthamiana* se produce en un dominio de  $\beta$ C1, localizado entre los residuos en posición 30 y 40, que es diferente a un motivo AIM (Haxim *et al.*, 2017).

La capacidad potencial  $\beta$ C1 de unirse a todas las diferentes isoformas de ATG8 de distintas especies sin interactuar con el dominio de unión a AIMS podría ser útil para desarrollar una herramienta molecular que pudiera utilizarse como marcador de la autofagia en plantas. Por ello, en este trabajo se estudió la interacción del dominio de unión a ATG8 de  $\beta$ C1 con las diferentes isoformas ATG8 de arabidopsis. Los resultados ponen de manifiesto una unión de mCherry- $\beta$ C1 a las isoformas ATG8a-i de arabidopsis fusionadas con GFP (**Fig. 35**), y también muestran su inclusión dentro de los autofagosomas (**Fig. 33**). Sin embargo, la construcción mCherry- $\beta$ C1 también interaccionó con la proteína GFP (**Fig. 36**). Esta interacción inespecífica de  $\beta$ C1 con GFP disminuye su utilidad como herramienta, ya que el marcaje con GFP es uno de los más frecuentemente utilizados. Además, también se detectó una interacción inespecífica con GST, otro de los marcadores comúnmente usados.

Para analizar la posible interacción de  $\beta$ C1, eliminando las interferencias de uniones inespecíficas, se recurrió a la termoforesis a microescala. Con dicha técnica se comprobó que no había interacción entre la región comprendida entre los residuos 30 y 40 de  $\beta$ C1 y ATG8 de arabidopsis (**Fig. 38**).

La proteína  $\beta$ C1 del virus de la hoja de tomate amarilla y enrollada de China (TYLCCNB) es fosforilada por la quinasa SnRK1 (Shen *et al.*, 2011), que participa en la inducción de la autofagia. Además, recientemente se ha descrito que esta fosforilación provoca la pérdida de función del factor de virulencia, suprimiendo su capacidad de bloquear el silenciamiento de ARN (Zhong *et al.*, 2017). La proteína  $\beta$ C1 del TYLCCNB es similar a la del CLCuMuV, ya que ambas contienen el motivo de unión a ATG8 (Haxim *et al.*, 2017). Es posible que la interacción de  $\beta$ C1 con ATG8 dependa de la fosforilación previa del factor de virulencia por parte de SnRK1. En concordancia con lo anterior, el péptido sintético que contiene los 11 aminoácidos en posición 30-40 de  $\beta$ C1 no interactuó *in vitro* con la proteína ATG8a de *Arabidopsis* (Fig. 38). Por lo tanto, este péptido, por sí solo, no sería útil como herramienta de detección de autofagosomas *in vivo* en *Arabidopsis*. Futuros ensayos de fosforilación ayudarán a determinar si la fosforilación de  $\beta$ C1 es un requisito indispensable para su unión a ATG8 y consiguiente degradación vía autofagia.

#### 4. La PEPC se degrada parcialmente por autofagia

La degradación de una parte del total de proteína PEPC a través del sistema ubiquitina-proteasoma fue descrita hace tiempo (Schulz *et al.*, 1993). Por ejemplo, la PEPC de células guarda es proteolizada mediante dicho proceso durante el cierre estomático (Klockenbring *et al.*, 1998). Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento otra vía alternativa de degradación de la enzima.

Se ha demostrado en varias ocasiones que la PEPC es susceptible de proteólisis en su extremo N-terminal (Chollet *et al.*, 1996; Moraes y Plaxton, 2000; Blonde y Plaxton, 2003), y además se ha caracterizado una cisteín-proteasa que reconoce a la proteína cuando su extremo C-terminal es expuesto (Gandullo, 2010). El PA es una PTM capaz de provocar la exposición de dicho extremo de la PEPC (Gandullo, 2010), y se ha observado una unión de este modificador a la proteína que provoca el reclutamiento de ésta a la membrana plasmática y su posterior proteólisis (Monreal *et al.*, 2010b). En plantas  $C_3$ , se han descrito varias rutas de degradación vacuolar de componentes cloroplásticos, en las que ciertas proteínas que se unen a la membrana del cloroplasto, así como la rubisco y otras proteínas cloroplásticas, son incluidas en vesículas para ser degradadas vía autofagia u otra ruta alternativa de degradación en la vacuola (Marshall y Vierstra, 2018; Otegui, 2018). En maíz, una planta  $C_4$ , se describió una inactivación de la PEPC paralela a la unión de ésta a la membrana del cloroplasto (Wu y Wedding, 1992). Por lo tanto, cabe la posibilidad de que en plantas  $C_4$  ocurra algo similar con la PEPC, dado que posee un papel relevante en la fotosíntesis  $C_4$  y también contiene una cantidad importante de nitrógeno para su reciclaje. En este trabajo se muestra una tendencia de la PPC3 recombinante a localizarse cerca de la envuelta externa de los cloroplastos en hojas de tabaco (Fig. 46). Este resultado es preliminar y harán falta futuros experimentos de localización de la

PEPC de tipo C<sub>4</sub>, así como la implicación del PA y la unión a membrana de cloroplastos secescentes en la degradación por autofagia.

La autofagia es, por lo tanto, un mecanismo de degradación a tener en cuenta en la degradación de la PEPC. Este mecanismo se encuentra ampliamente extendido en las células eucariotas y tiene una función principal en el metabolismo del carbono y del nitrógeno (Ren *et al.*, 2014), al igual que la PEPC (O'Leary *et al.*, 2011b). Además, al encontrarse regulada postraduccionalmente de manera estricta, cabe pensar que la degradación de la PEPC también pueda estar sometida a un control preciso. Justamente la autofagia selectiva constituye una vía de degradación precisa y controlada. Los resultados ponen de manifiesto un descenso en la cantidad de PEPC en condiciones en deficiencia de nitrógeno en raíces de sorgo (**Fig. 47E**) y en deficiencia de carbono, fósforo y nitrógeno en células de *N. benthamiana* (**Fig. 47A, B**). Éstas son condiciones en las que se activa la autofagia. Además, si existe una parte de la cantidad total de PEPC que se degrada vía autofagia, el bloqueo de esta vía, mediante el uso de líneas de plantas deficientes en la vía autofágica, impediría esta degradación. Y dicho bloqueo de la degradación de la proteína por autofagia provocaría un aumento en la cantidad de PEPC. Esto ocurre en hojas de plantas de *Arabidopsis* deficientes en las proteínas ATG2 y ATG5, donde se observa una acumulación de PEPC inactiva (**Fig. 40B**). Del mismo modo, el uso de inhibidores de la autofagia en las condiciones en las que disminuye la cantidad de PEPC, mencionadas anteriormente, revertiría esta situación al impedir la degradación de la PEPC. Eso es lo que se observa tras el uso del inhibidor de la autofagia 3-MA en hojas de sorgo en condiciones de deficiencia de nitrógeno (**Fig. 47E**), y en células de *N. benthamiana* con deficiencia de carbono al ser tratadas con los inhibidores de la autofagia 3-MA, concA y E64 (**Fig. 47C**). Precisamente se había descrito una inhibición de la autofagia en células de tabaco bajo deficiencia de carbono por parte del 3-MA (Takatsuka *et al.*, 2004). Por otro lado, la PPC3 recombinante colocaliza en hojas de *N. benthamiana* con autofagosomas marcados con GFP-ATG8a (**Fig. 46**). Estos resultados apoyan la teoría de que al menos una parte de la PEPC es degradada vía autofagia.

En la autofagia selectiva es común la implicación de receptores de carga, que son capaces de reconocer a las proteínas a degradar y llevarlas al interior de los autofagosomas. El receptor de carga más común en plantas es NBR1, que reconoce sustratos monoubiquitinados (Kirkin *et al.*, 2009; Svenning *et al.*, 2011). La PEPC de tipo C<sub>3</sub> se monoubiquitina (Uhrig *et al.*, 2008), y esta monoubiquitinación aumenta en procesos en los que participa la autofagia (Bassham *et al.*, 2006; Honig *et al.*, 2012), como en el estrés por amonio (Arias-Baldrich *et al.*, 2017) y en semillas de sorgo en germinación (Ruiz-Ballesta *et al.*, 2016). En primer lugar, los resultados muestran una disminución de la cantidad de PEPC monoubiquitinada tras el tratamiento con trehalosa (**Fig. 40A**), un activador de la autofagia (Williams *et al.*, 2015).

En segundo lugar, si esta monoubiquitinación puede actuar como un marcaje para la degradación de la PEPC por autofagia, en condiciones en las que la autofagia se encuentre bloqueada o inhibida debería observarse más cantidad de PEPC monoubiquitinada. En las líneas de arabis de arabis deficientes en proteínas autofágicas aumenta la cantidad de PEPC monoubiquitinada (**Fig. 41**). Y en células de *N. benthamiana*, donde no se observa apenas monoubiquitinación de la PEPC en condiciones control, el uso del inhibidor de la autofagia 3-MA provoca la aparición de una banda consistente de PEPC monoubiquitinada (**Fig. 47C, D**). Sin embargo, el uso de otros inhibidores de la degradación autofágica como la concA o el E64 no provocan la aparición de la banda. Esto podría deberse a que el 3-MA es un inhibidor que bloquea la autofagia en un paso previo a la formación de los autofagosomas, mientras que la concA y el E64 bloquean la degradación de los autofagosomas una vez que se encuentran dentro de la vacuola. La ubiquitina, así como otros modificadores *ubiquitin-like*, es una molécula que, al ser ampliamente utilizada, tiende a ser reciclada en los procesos de degradación (Finley, 2009). Y se ha descrito que la proteína ATG8, un modificador *ubiquitin-like*, una vez que se ha formado el autofagosoma es deslipidada por ATG4 y liberados para su reutilización (Yoshimoto *et al.*, 2004). Por lo tanto, cabría esperar que la molécula de ubiquitina de la PEPC fuera reutilizada en un paso previo a la degradación de los autofagosomas en la vacuola y debido a eso sólo se observa la acumulación de PEPC monoubiquitinada cuando se bloquea la autofagia antes de la formación de los autofagosomas, en este caso con el 3-MA. Estos resultados indican que la monoubiquitinación de la PEPC está implicada en su degradación por autofagia. No obstante, los resultados no permiten afirmar que en todos los contextos fisiológicos en los que se observa la monoubiquitinación de la PEPC, dicha PTM esté encaminada a degradar a la proteína vía autofagia. Por lo tanto, será necesario estudiar la degradación de la PEPC por la ruta autofágica en cada caso particular.

Por último, si efectivamente la monoubiquitinación de la PEPC es el marcaje que conduce hacia su degradación por autofagia, es probable que el receptor de cargo NBR1 sea capaz de interactuar con la PEPC. Los resultados muestran una interacción *in vitro* de la región de la proteína NBR1 de sorgo que contiene el dominio de unión a ubiquitina, así como su motivo AIM, con una fracción de PEPC parcialmente proteolizada. Y esto ocurre en hojas, raíces y semillas de sorgo (**Fig. 42**), en hojas y raíces de arabis (**Fig. 43**), y en células de *N. benthamiana* (**Fig. 48**). Además, al inhibir la autofagia con 3-MA, la cantidad de esta PEPC degradada aumenta (**Fig. 48**). En cuanto a las líneas de arabis deficientes en proteínas autofágicas, en *atg2* se detecta mayor cantidad de PEPC degradada unida a NBR1 que en *atg5*. Precisamente *atg2* se describió como uno de los fenotipos más severamente afectados de entre las líneas de arabis deficientes en proteínas autofágicas (Kang *et al.*, 2018). Esta PEPC parcialmente degradada también interacciona con ATG8 (**Fig. 45**). El conjunto de estos resultados sugieren que se trata de PEPC que se degrada vía autofagia.

Además de la PEPC parcialmente proteolizada, también se observa la unión a NBR1 de una PEPC de 110 kDa de tamaño en hojas de sorgo (**Fig. 42**). Y cuando se inhibe la autofagia o se utilizan plantas deficientes en la vía autofágica también aparece una PEPC completa unida a NBR1 (**Figs. 44C, 48**). El conjunto de estos resultados indican que NBR1 es el receptor encargado de conducir a la PEPC al interior de los autofagosomas. Se requerirán futuros experimentos para conocer la naturaleza tanto del fragmento de PEPC como de la PEPC completa que se encuentran unidas a NBR1, así como las PTMs que pudieran contener.

En resumen, la PEPC, al igual que la autofagia, se encuentra involucrada en el metabolismo del carbono y del nitrógeno. La autofagia selectiva es un mecanismo de degradación preciso y controlado, y previamente se habían descrito procesos que tenían lugar en diferentes isoformas de PEPC, tales como la monoubiquitinación y el reclutamiento a membrana, que guardan relación con mecanismos implicados en la autofagia selectiva. Los resultados presentados en este trabajo apoyan la teoría de que parte de la PEPC de tipo C<sub>3</sub> se degrada por autofagia, y que la monoubiquitinación de la proteína está implicada en el mecanismo de autofagia selectiva para transportarla a la vacuola. Estos resultados conciernen a la PEPC de tipo C<sub>3</sub>, que es la que se monoubiquitina. En el futuro, deberá investigarse con más detalle la degradación de la PEPC de tipo C<sub>4</sub> y su posible asociación a membranas de cloroplastos senescentes, lo que podría causar su inclusión en vesículas, autofágicas o no, relacionadas con la degradación de la rubisco para reciclar el nitrógeno.



# CONCLUSIONES

---

1. La PEPC de hojas de sorgo puede ser carbonilada, tanto *in vitro* como *in vivo*, empleando agentes oxidantes o potenciadores de la formación de especies reactivas de oxígeno. La carbonilación es una modificación asociada a estrés oxidativo y ocasiona la pérdida de la actividad PEPC.
2. La PEPC de hojas de sorgo puede ser *S*-nitrosilada, tanto *in vitro* como *in vivo*, con agentes donadores de NO. La *S*-nitrosilación de la PEPC C<sub>4</sub> de hojas de sorgo no cambia su actividad, pero la hace menos vulnerable a la inactivación por carbonilación tanto *in vitro* como *in vivo*.
3. En hojas de sorgo en condiciones de estrés salino, se observa un patrón opuesto de *S*-nitrosilación y carbonilación de la PEPC. La salinidad promueve la acumulación de NO en el mesófilo fotosintético, donde se localiza la PEPC de tipo C<sub>4</sub>. Por tanto, al favorecer la *S*-nitrosilación de la PEPC protege a la enzima de la carbonilación inactivante asociada a la salinidad. Este mecanismo podría ser relevante para preservar la PEPC fotosintética en estrés salino.
4. El estrés salino, el déficit de carbono y de fósforo, y el estrés oxidativo causan un aumento de expresión de los genes autofágicos *SbATG18a*, *SbATG6a* y *SbATG6b*, pero ésta no cambia significativamente en déficit de nitrógeno y hierro. En todas las circunstancias descritas, se produce una activación de la autofagia. Por tanto, los cambios de expresión de los citados genes sirven como marcadores de la activación de la autofagia en estrés salino, déficit de carbono y fósforo, y estrés oxidativo; pero no en déficit de nitrógeno o hierro.
5. En sorgo, la autofagia es activada en condiciones de déficit de carbono y nitrógeno, estrés oxidativo y estrés salino, y la visualización de autofagosomas por microscopía confocal y electrónica constituyen métodos efectivos para monitorizar la autofagia en las condiciones citadas.
6. La proteína vírica  $\beta$ C1 tiene interacciones inespecíficas que hacen que no sea una herramienta idónea para estudios de autofagia. Más aún, el péptido que contiene el dominio de unión a ATG8 no se une a ATG8a de *Arabidopsis*, y por lo tanto tampoco es una herramienta útil para detectar autofagosomas *in vivo*.
7. Se detecta un descenso en la cantidad total de PEPC en raíces de sorgo con déficit de nitrógeno y en células de *Nicotiana benthamiana* con déficit de carbono, condiciones en las que se activa la autofagia. El uso de inhibidores de la autofagia en estas condiciones bloquea esta degradación y la cantidad de PEPC no disminuye. En hojas de *Arabidopsis* deficientes en las proteínas autofágicas ATG2 y ATG5 se observa un aumento de la cantidad total de PEPC. Por lo tanto, una parte del total de proteína PEPC es degradada por autofagia.
8. La trehalosa, un activador de la autofagia, disminuye la cantidad de PEPC monoubiquitinada en plantas de *Arabidopsis*. Las plantas de *Arabidopsis* deficientes en las proteínas autofágicas ATG2 y ATG5 muestran un aumento de PEPC con esta PTM. En células de *N. benthamiana*, la PEPC se encuentra principalmente desubiquitinada, y el uso de 3-MA provoca un aumento

significativo de la monoubiquitinación de la PEPC. Esto indica que la PEPC monoubiquitinada es degradada por autofagia, y que la ubiquitina es un marcaje para la degradación por esta vía, que sería reutilizada antes de la degradación de la proteína en la vacuola.

9. El receptor de cargos autofágicos NBR1 se une a la PEPC en hojas de sorgo, en plantas de arabidopsis deficientes en la proteína ATG5, y en células de *N. benthamiana* tratadas con 3-MA. Además, NBR1 también se une a una PEPC parcialmente degradada en hojas, raíces y semillas de sorgo, hojas y raíces de arabidopsis y células de *N. benthamiana*. Por lo tanto, la PEPC que se degrada por autofagia es reconocida por NBR1 para su inclusión en autofagosomas.
10. En conjunto, los resultados indican que una parte de la PEPC de tipo C<sub>3</sub> es degradada por autofagia, y que la monoubiquitinación es un marcaje para su reclutamiento a la vía autofágica selectiva.

# CONCLUSIONS

---

1. Sorghum leaf C<sub>4</sub> PEPC can be carbonylated both *in vitro* and *in vivo*, by using oxidizing agents or ROS-formation enhancers. Carbonylation is a modification related to oxidative stress and results in the loss of PEPC activity.
2. Sorghum leaf C<sub>4</sub> PEPC can be S-nitrosylated both *in vitro* and *in vivo* by NO donors. S-nitrosylation of sorghum leaf C<sub>4</sub> PEPC does not change its activity, but makes it less vulnerable to subsequent inactivating by carbonylation, both *in vitro* and *in vivo*.
3. Opposite patterns of carbonylation and S-nitrosylation of C<sub>4</sub> PEPC are observed in sorghum leaves under salt stress. Salinity promotes the accumulation of NO in photosynthetic mesophyll, where C<sub>4</sub> PEPC is located. Thus, by promoting S-nitrosylation of PEPC, NO can prevent the enzyme from inactivating carbonylation associated with salinity. This mechanism could be relevant in preserving photosynthetic PEPC during salt stress.
4. Salt stress, carbon and phosphorus starvation, and oxidative stress cause an increase in the expression of autophagic genes *SbATG18a*, *SbATG6a* and *SbATG6b*. However, these levels do not change significantly under nitrogen and iron starvation. All of the conditions above activate autophagy. Therefore, the aforementioned expression changes can be used as autophagy activation markers under salt stress, carbon and phosphorus starvation, and oxidative stress; but not during nitrogen or iron starvation.
5. Autophagy is activated in sorghum under conditions of nutritional deficiency, oxidative stress and salt stress, and the visualization of autophagosomes by confocal microscopy and electron microscopy are effective methods to monitor this activation.
6. The viral protein  $\beta$ C1 presents unspecific interactions that make it unsuitable for autophagy studies. Moreover, the peptide containing the ATG8-binding domain of  $\beta$ C1 does not bind arabidopsis ATG8a. Thus, this peptide is not a useful tool for detecting autophagosomes *in vivo*.
7. A decrease in the total amount of PEPC is detected in nitrogen-starved sorghum roots and in sucrose-starved *Nicotiana benthamiana* cells. Both are conditions in which autophagy is activated. The use of autophagy inhibitors under the conditions described above blocks the degradation of PEPC, maintaining the concentration of the enzyme. In shoots of arabidopsis plants deficient in autophagic proteins ATG2 and ATG5, an increase in the amount of PEPC is observed. Therefore, a portion of total PEPC is degraded by autophagy.
8. An activator of autophagy, trehalose, diminishes the amount of monoubiquitinated PEPC in arabidopsis plants. Arabidopsis *atg2* and *atg5* plants display increased monoubiquitination levels. Furthermore, in *N. benthamiana* cells, where PEPC is mostly found deubiquitinated, treatment with 3-MA causes an increase in the amount of monoubiquitinated PEPC. This indicates that monoubiquitinated PEPC is degraded by autophagy, and that ubiquitin acts as a

signal for this pathway. However, prior to the proteolysis of the protein, the ubiquitin tag would be recycled.

9. The autophagic cargo receptor NBR1 binds to PEPC in sorghum leaves, arabidopsis *atg5* plants and 3-MA-treated *N. benthamiana* cells. Additionally, NBR1 also interacts with a partially degraded PEPC in sorghum leaves, roots and seeds, arabidopsis shoots, and roots, and *N. benthamiana* cells. Therefore, PEPC destined to be degraded by autophagy is recognized by NBR1 for its inclusion in autophagosomes.
10. Taken together, these results show that a fraction of C<sub>3</sub>-type PEPC is processed by autophagy, and that monoubiquitination of this protein is related to its recruitment for selective autophagy.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Abat JK, Mattoo AK, Deswal R** (2008). S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata*—ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. **FEBS J** **275**, 2862-2872.
- Abdul-Baki AA** (1974). Pitfalls in using sodium hypochloride as seed disinfectant in <sup>14</sup>C incorporation studies. **Plant Physiol** **53**, 768-771.
- Akaike T, Fujii S, Sawa T, Ihara H** (2010). Cell signaling mediated by nitrated cyclic guanine nucleotide. **Nitric Oxide** **23**, 166-174.
- Albertos P, Romero-Puertas MC, Tatematsu K, Mateos I, Sánchez-Vicente I, Nambara E, Lorenzo O** (2014). S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth. **Nat Commun** **6**, 8669.
- Alonso JM et al.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. **Science** **301**, 653-657.
- Álvarez R, García-Mauriño S, Feria AB, Vidal J, Echevarría C** (2003). A conserved 19-amino acid synthetic peptide from the carboxy terminus of phosphoenolpyruvate carboxylase inhibits the *in vitro* phosphorylation of the enzyme by the calcium-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. **Plant Physiol** **132**, 1097-1106.
- Andreo CS, González DH, Iglesias AA** (1987). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase: structure and regulation. **FEBS Lett** **213**, 1-8.
- Apel K, Hirt H** (2013). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu Rev Plant Biol** **55**, 373-399.
- Arc E, Galland M, Cueff G, Godin B, Lounifi I, Job D, Rajjou L** (2011). Reboot the system thanks to protein post-translational modifications and proteome diversity: how quiescent seeds restart their metabolism to prepare seedling establishment. **Proteomics** **11**, 1606-1618.
- Arias-Baldrich C, Bosch N, Begines D, Feria AB, Monreal JA, García-Mauriño S** (2015). Proline synthesis in barley under iron deficiency and salinity. **J Plant Physiol** **183**, 121-129.
- Arias-Baldrich C, de la Osa C, Bosch N, Ruiz-Ballesta I, Monreal JA, García-Mauriño S** (2017). Enzymatic activity, gene expression and posttranslational modifications of photosynthetic and non-photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase in ammonium-stressed sorghum plants. **J Plant Physiol** **214**, 39-47.
- Aroca A, Serna A, Gotor C, Romero LC** (2015). S-sulfhydration: a cysteine posttranslational modification in plant systems. **Plant Physiol** **168**, 334-342.



- Arsova B, Watt M, Usadel B** (2018). Monitoring of plant protein post-translational modifications using targeted proteomics. **Front Plant Sci** 9, 1168.
- Astier J, Kulik A, Koen E, Besson-Bard A, Bourque S, Jeandroz S, Lamotte O, Wendehenne D** (2012). Protein S-nitrosylation: what's going on in plants? **Free Radic Biol Med** 53, 1101-1110.
- Astier J, Rasul S, Koen E, Manzoor H, Besson-Bard A, Lamotte O, Jeandroz S, Durner J, Lindermayr C, Wendehenne D** (2011). S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. **Plant Sci** 181, 527-533.
- Athenstaedt K, Daum G** (1999). Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism. **Eur J Biochem** 266, 1-16.
- Aubert S, Gout E, Bligny R, Marty-Mazars D, Barrieu F, Alabouvette J, Marty F, Douce R** (1996). Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. **J Cell Biol** 133, 1251-1263.
- Avin-Wittenberg T, Bajdzienko K, Wittenberg G, Alseekh S, Tohge T, Bock R, Giavalisco P, Fernie AR** (2015). Global analysis of the role of autophagy in cellular metabolism and energy homeostasis in *Arabidopsis* seedlings under carbon starvation. **Plant Cell** 27, 306-322.
- Azcón-Bieto J, Talón M** (eds.) (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Ed. **Mc Graw Hill**. Madrid, España.
- Bai X, Yang L, Tian M, Chen J, Shi J, Yang Y, Hu X** (2011). Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. **PLoS One** 6, e20714.
- Bandarian V, Poehner WJ, Grover SD** (1992). Metabolite activation of crassulacean acid metabolism and C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol** 100, 1411-1416.
- Bandurski RS, Greiner CM** (1953). The enzymatic synthesis of oxaloacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. **J Biol Chem** 204, 781-786.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupiáñez JA, del Río LA** (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. **J Biol Chem** 274, 36729-36733.
- Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, Radi R** (2007). Protein tyrosine nitration in hydrophilic and hydrophobic environments. **Amino Acids** 32, 501-515.

- Bassham DC** (2007). Plant autophagy—more than a starvation response. **Curr Opin Plant Biol** **10**, 587-593.
- Bassham DC** (2014). Methods for analysis of autophagy in plants. **Methods** **75**, 181-188.
- Bassham DC, Laporte M, Marty F, Moriyasu Y, Ohsumi Y, Olsen LJ, Yoshimoto K** (2006). Autophagy in development and stress responses of plants. **Autophagy** **2**, 2-11.
- Batistic O, Sorek N, Schültke S, Yalovsky S, Kudla J** (2008). Dual fatty acyl modification determines the localization and plasma membrane targeting of CBL/CIPK Ca<sup>2+</sup> signaling complexes in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **20**, 1346-1362.
- Batoko H, Dagdas Y, Baluska F, Sirko A** (2017). Understanding and exploiting autophagy signaling in plants. **Essays Biochem** **61**, 675-685.
- Begara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, López-Jaramillo J, Padilla MN, Carreras A, Corpas FJ, Barroso JB** (2014). Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. **J Exp Bot** **65**, 527-538.
- Beligni MV, Lamattina L** (2002). Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant Cell Environ** **25**, 737-748.
- Ben-Zioni A, Vaadia Y, Lips SH** (1970). Correlations between nitrate reduction, protein synthesis and malate accumulation. **Physiol Plant** **23**, 1039-1047.
- Benhar M, Forrester MT, Stamler JS** (2009). Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nat Rev Mol Cell Biol** **10**, 721-732.
- Bläsing OE, Westhoff P, Svensson P** (2000). Evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in *Flaveria*- a conserved serine residue in the carboxyterminal part of the enzyme is a major determinant for C<sub>4</sub>-specific characteristics. **J Biol Chem** **275**, 27917-27923.
- Blonde JD, Plaxton WC** (2003). Structural and kinetic properties of high and low molecular mass phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the endosperm of developing castor oilseeds. **J Biol Chem** **278**, 11867-11873.
- Bond AE, Row PE, Dudley E** (2011). Post-translation modification of proteins: methodologies and applications in plant sciences. **Phytochemistry** **72**, 975-996.
- Borland AM, Taybi T** (2004). Synchronization of metabolic processes in plants with crassulacean acid metabolism. **J Exp Bot** **55**, 1255-1265.

- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem** **72**, 248-254.
- Buchanan CD et al.** (2005). *Sorghum bicolor*'s transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. **Plant Mol Biol** **58**, 699-720.
- Budde RJA, Chollet R** (1986). *In vitro* phosphorylation of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol** **82**, 1107-1114.
- Caron JM, Vega LR, Fleming J, Bishop R, Solomon F** (2001). Single site alpha-tubulin mutation affects astral microtubules and nuclear positioning during anaphase in *Saccharomyces cerevisiae*: possible role for palmitoylation of alpha-tubulin. **Mol Bio Cell** **12**, 2672-2687.
- Carter PJ, Nimmo HG, Fewson CA, Wilkins MB** (1990). *Bryophyllum fedtschenkoi* protein phosphatase type 2A can dephosphorylate phosphoenolpyruvate carboxylase. **FEBS Lett** **263**, 233-236.
- Casati P, Lara MV, Andreo CS** (2000). Induction of a C<sub>4</sub>-like mechanism of CO<sub>2</sub> fixation in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. **Plant Physiol** **123**, 1611-1622.
- Chardot TP, Wedding RT** (1992). Role of cysteine in activation and allosteric regulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol** **98**, 780-783.
- Chen P, Li X, Huo K, Wei X, Dai C, Lv C** (2014). Promotion of photosynthesis in transgenic rice over-expressing of maize C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase gene by nitric oxide donors. **J Plant Physiol** **171**, 458-466.
- Chen ZH, Jenkins GI, Nimmo HG** (2008). pH and carbon supply control the expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Environ** **31**, 1844-1850.
- Chollet R, Vidal J, O'Leary MH** (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** **47**, 273-298.
- Christin PA et al.** (2014). Shared origins of a key enzyme during the evolution of C<sub>4</sub> and CAM metabolism. **J Exp Bot** **65**, 3609-3621.
- Christin PA, Salamin N, Savolainen V, Duvall MR, Besnard G** (2007). C<sub>4</sub> photosynthesis evolved in grasses via parallel adaptive genetic changes. **Curr Biol** **17**, 1241-1247.

- Chung T, Phillips AR, Vierstra RD** (2010). ATG8 lipidation and ATG8-mediated autophagy in *Arabidopsis* require ATG12 expressed from the differentially controlled *ATG12A* and *ATG12B* loci. **Plant J** **62**, 483-493.
- Ciechanover A** (2005). Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nat Rev Mol Cell Biol** **6**, 79-87.
- Contento AL, Xiong Y, Bassham DC** (2005). Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. **Plant J** **42**, 598-608.
- Corpas FJ et al.** (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. **Plant Physiol** **136**, 2722-2733.
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA** (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. **Planta** **224**, 246-254.
- Corpas FJ, Chaki M, Leterrier M, Barroso JB** (2009a). Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. **Plant Signal Behav** **4**, 920-923.
- Corpas FJ, Leterrier M, Valderrama R, Airaki M, Chaki M, Palma JM, Barroso JB** (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. **Plant Sci** **181**, 604-611.
- Corpas FJ, Palma JM, del Río LA, Barroso JB** (2009b). Evidence supporting the existence of L-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. **New Phytol** **184**, 9-14.
- Correa-Aragunde N, Foresi N, Delledonne M, Lamattina L** (2013). Auxin induces redox regulation of ascorbate peroxidase 1 activity by S-nitrosylation/denitrosylation balance resulting in changes of root growth pattern in *Arabidopsis*. **J Exp Bot** **64**, 3339-3349.
- Coursol S, Giglioli-Guivarc'h N, Vidal J, Pierre JN** (2000). An increase in phosphoinositide-specific phospholipase C activity precedes induction of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation in illuminated and NH<sub>4</sub>Cl-treated protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. **Plant J** **23**, 497-506.
- Coutts AS, La Thangue NB** (2016). Regulation of actin nucleation and autophagosome formation. **Cell Mol Life Sci** **73**, 3249-3263.
- Crawford NM** (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **Plant Cell** **7**, 859-868.

- Crétin C, Keryer E, Tagu D, Lepiniec L, Vidal J, Gadal P** (1990). Complete cDNA sequence of sorghum phosphoenolpyruvate carboxylase involved in C<sub>4</sub> photosynthesis. **Nucleic Acids Res** **18**, 658.
- Crétin C, Santi S, Keryer E, Lepiniec L, Tagu D, Vidal J, Gadal P** (1991). The phosphoenolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. **Gene** **99**, 87-94.
- Crowley V, Gennidakis S, Plaxton WC** (2005). *In vitro* proteolysis of phosphoenolpyruvate carboxylase from developing castor oil seeds by an endogenous thiol endopeptidase. **Plant Cell Physiol** **46**, 1855-1862.
- Curtis JM, Hahn WS, Long EK, Burril JS, Arriaga EA, Bernlohr DA** (2013). Protein carbonylation and metabolic control systems. **Trends Endocrinol Metab** **23**, 399-406.
- Cushman JC, Bohnert HJ** (1999). Crassulacean acid metabolism: molecular genetics. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** **50**, 305-332.
- Dagdas YF et al.** (2016). An effector of the Irish potato famine pathogen antagonizes a host autophagy cargo receptor. **eLife** **5**, e10856.
- Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A** (2003). Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med** **9**, 169-176.
- Dalziel KJ, O'Leary B, Brikis C, Rao SK, She YM, Cyr T, Plaxton WC** (2012). The bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzyme from developing castor oil seeds is subject to *in vivo* regulatory phosphorylation at serine-451. **FEBS Lett** **586**, 1049-1054.
- Davies MJ** (2005). The oxidative environment and protein damage. **Biochim Biophys Acta** **1703**, 93-109.
- De Neri P, Zocchi G** (2000). Phosphoenolpyruvate carboxylase in cucumber *Cucumis sativus* L. roots under iron deficiency, activity and kinetic characterization. **J Exp Bot** **51**, 1903-1909.
- Dean JV, Harper JE** (1988). The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiol** **88**, 389-395.
- Deeb RS, Nuriel T, Cheung C, Summers B, Lamont BD, Gross SS, Hajjar DP** (2013). Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** **305**, H687-H698.

- Den Hartog M, Musgrave A, Munnik T** (2001). Nod factor-induced phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate formation: a role for phospholipase C and D in root hair formation. **Plant J** **25**, 55-65.
- Denecke M, Schulz M, Fisher C, Schnabl H** (1993). Partial purification and characterization of stomatal phosphoenolpyruvate carboxylase from *Vicia faba*. **Physiol Plant** **87**, 1996-2012.
- Deribe YL, Pawson T, Dikic I** (2010). Post-translational modifications in signal integration. **Nat Struct Mol Biol** **17**, 666-672.
- Despres C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert PR** (2003). The arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. **Plant Cell** **15**, 2181-2191.
- Dever LV, Blackwell RD, Fullwood NJ, Lacuesta M, Leegood RC, Onek LA, Pearson M, Lea PJ** (1995). The isolation and characterization of mutants of the C<sub>4</sub> photosynthetic pathway. **J Exp Bot** **46**, 1363-1376.
- Di Berardino J, Marmagne A, Berger A, Yoshimoto K, Cueff G, Chardon F, Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M** (2018). Autophagy controls resource allocation and protein storage accumulation in *Arabidopsis* seeds. **J Exp Bot** **69**, 1403-1414.
- Dixon HB** (1964). Transamination of peptides. **Biochem J** **92**, 661-666.
- Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C** (2016). TOR signaling and nutrient sensing. **Annu Rev Plant Biol** **67**, 261-285.
- Doelling JH, Walker JM, Friedman EM, Thompson AR, Vierstra RD** (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem** **277**, 33105-33114.
- Dong L, Masuda T, Kawamura T, Hata S, Izui K** (1998). Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: comparison with the C<sub>4</sub>-form enzyme. **Plant Cell Physiol** **39**, 865-873.
- Dong L, Patil S, Condon SA, Haas EJ, Chollet R** (1999). The conserved C-terminal tetrapeptide of sorghum C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase is indispensable for maximal catalytic activity, but not for homotetramer formation. **Arch Biochem Biophys** **371**, 124-128.
- Dong Y et al.** (2017). Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. **Nat Commun** **8**, 1174.

- Doshi R, McGrath AP, Piñeros M, Szewczyk P, Garza DM, Kochian LV, Chang G (2017). Functional characterization and discovery of modulators of SbMATE, the agronomically important aluminium tolerance transporter from *Sorghum bicolor*. **Sci Rep** 7, 17996.
- Du S, Zhang R, Zhang P, Liu H, Yan M, Chen N, Xie H, Ke S (2016). Elevated CO<sub>2</sub>-induced production of nitric oxide (NO) by NO synthase differentially affects nitrate reductase activity in *Arabidopsis* plants under different nitrate supplies. **J Exp Bot** 67, 893-904.
- Du Z, Aghoram K, Outlaw WH (1997). *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in guard cells of *Vicia faba* L. is enhanced by fusicoccin and suppressed by abscisic acid. **Arch Biochem Biophys** 337, 345-350.
- Duan G, Walther D (2015). The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. **PLoS Comput Biol** 11, 1-23.
- Duff SMG, Chollet R (1995). *In vivo* regulation of wheat-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. **Plant Physiol** 107, 775-782.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc Natl Acad Sci USA** 95, 10328-10333.
- Echevarría C, García-Mauriño S, Álvarez R, Soler A, Vidal J (2001). Salt stress increases the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in *Sorghum* leaves. **Planta** 214, 283-287.
- Echevarría C, Pacquit V, Bakrim N, Osuna L, Delgado B, Arrio-Dupont M, Vidal J (1994). The effect of pH on the covalent and metabolic control of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum* leaf. **Arch Biochem Biophys** 315, 425-430.
- Echevarría C, Vidal J (2003). The unique phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. **Plant Physiol Biochem** 41, 541-547.
- Echevarría C, Vidal J, Jiao JA, Chollet R (1990). Reversible light activation of the phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase in maize leaves. **FEBS Lett** 275, 25-28.
- Edwards GE, Furbank RT, Hatch MD, Osmond CB (2001). What does it take to be C<sub>4</sub>? Lessons from the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. **Plant Physiol** 125, 46-49.
- El-Maarouf Bouteau H, Bailly C (2008). Oxidative signaling in seed germination and dormancy. **Plant Signal Behav** 3, 175-182.

- Ettema TJG, Makarova KS, Jellema GL, Gierman HJ, Koonin EV, Huynen MA, de Vos WM, van der Oost J** (2004). Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism. **J Bacteriol** **186**, 7754-7762.
- Fancy NN, Bahlmann AK, Loake GJ** (2017). Nitric oxide function in plant abiotic stress. **Plant Cell Environ** **40**, 462-472.
- Feng J, Shen WH** (2014). Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. **Front Plant Sci** **5**, 83.
- Feria AB, Álvarez R, Cochereau L, Vidal J, García-Mauriño S, Echevarría C** (2008). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation by metabolites and abscisic acid during the development and germination of barley seeds. **Plant Physiol** **148**, 761-774.
- Feria AB, Bosch N, Sánchez A, Nieto-Ingelmo AI, de la Osa C, Echevarría C, García-Mauriño S, Monreal JA** (2016). Phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and PEPC-kinase (PEPC-k) isoenzymes in *Arabidopsis thaliana*: role in control and abiotic stress conditions. **Planta** **244**, 901-913.
- Figuroa CM et al.** (2016). Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. **Plant J** **85**, 410-423.
- Finley D** (2009). Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. **Annu Rev Biochem** **78**, 477-513.
- Floyd BE, Morriss SC, MacIntosh GC, Bassham DC** (2015). Evidence for autophagy-dependent pathways of rRNA turnover in *Arabidopsis*. **Autophagy** **12**, 2199-2212.
- Fontaine V, Hartwell J, Jenkins GI, Nimmo HG** (2002). *Arabidopsis thaliana* contains two phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes with different expression patterns. **Plant Cell Environ** **25**, 115-122.
- Foyer CH, Noctor G** (2003). Redox and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiol Plant** **119**, 355-364.
- Foyer CH, Noctor G** (2005). Oxidant and antioxidant signalling in plants: re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant Cell Environ** **28**, 1056-1071.
- Friso G, van Wijk KJ** (2015). Posttranslational protein modifications in plant metabolism. **Plant Physiol** **169**, 1469-1487.



- Fu YF, Zhang ZW, Yuan S** (2018). Putative connections between nitrate reductase S-nitrosylation and NO synthesis under pathogen attacks and abiotic stresses. **Front Plant Sci** 9, 474.
- Fujita N, Miwa T, Ishijima S, Izui K, Katsuki H** (1984). The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the *ppc* gene and deduced amino acid sequence. **J Biochem** 95, 909-916.
- Furchgott RF** (1989). Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. **En: Vanhoutte PM** (ed.). Vasodilatation: vascular smooth muscle, peptides, autonomic nerves and endothelium, 401-414. **Ed. Raven Press**. Nueva York, Estados Unidos.
- Gadal P, Pacquit V, Giglioni N, Bui VL, Pierre JN, Echevarría C, Vidal J** (1996). The role of PEPC phosphorylation in the regulation of C<sub>4</sub> photosynthesis. **En: Shewry PR, Halford NG, Hooley R** (eds.). Protein phosphorylation in plants, 53-64. **Ed. Clarendon Press**. Oxford, Inglaterra.
- Gandullo J** (2010). Implicación del extremo C-terminal de la fosfoenolpiruvato carboxilasa en la degradación y fosforilación de la proteína. **Tesis Doctoral**, Universidad de Sevilla.
- Gao C, Zhuang X, Cui Y, Fu X, He Y, Zhao Q, Zeng Y, Shen J, Luo M, Jiang L** (2015). Dual roles of an *Arabidopsis* ESCRT component FREE1 in regulating vacuolar protein transport and autophagic degradation. **Proc Natl Acad Sci USA** 112, 1886-1891.
- García-Mata C, Lamattina L** (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol** 126, 1196-1204.
- García-Mauriño S, Monreal JA, Álvarez R, Vidal J, Echevarría C** (2003). Characterization of salt stress-enhanced phosphoenolpyruvate carboxylase kinase activity in leaves of *Sorghum vulgare*: independence from osmotic stress, involvement of ion toxicity and significance of dark phosphorylation. **Planta** 216, 648-655.
- Garson L, Gray V** (1991). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves by nitrate and alanine. **Biochem Int** 23, 299-305.
- Gennidakis S, Rao SK, Greenham K, Uhrig RG, O'Leary B, Snedden WA, Lu C, Plaxton WC** (2007). Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase

polypeptides interact in the hetero-oligomeric Class-2 PEPC complex of developing castor oil seeds. **Plant J** **52**, 839-849.

**Giglioli-Guivarc'h N, Pierre JN, Brown S, Chollet R, Vidal J, Gadal P** (1996). The light-dependent transduction pathway controlling the regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase in protoplasts from *Digitaria sanguinalis*. **Plant Cell** **8**, 573-586.

**Gil F** (ed.) (1995). Fotosíntesis C<sub>4</sub>. En: Elementos de Fisiología Vegetal, 627-666. Ed. **Mundi-Prensa**. Madrid, España.

**Giordano M** (2001). Interactions between C and N metabolism in *Dunaliella salina* cells cultured at elevated CO<sub>2</sub> and high N concentrations. **J Plant Physiol** **158**, 577-581.

**González MC, Osuna L, Echevarría C, Vidal J, Cejudo FJ** (1998). Expression and localization of phosphoenolpyruvate carboxylase in developing and germinating wheat grains. **Plant Physiol** **116**, 1249-1258.

**González MC, Sánchez R, Cejudo FJ** (2003). Abiotic stresses affecting water balance induce phosphoenolpyruvate carboxylase expression in roots of wheat seedlings. **Planta** **216**, 985-992.

**González-Segura L, Mújica-Jiménez C, Juárez-Díaz JA, Güémez-Toro R, Martínez-Castilla LP, Muñoz-Clares RA** (2018). Identification of the allosteric site for neutral amino acids in the maize C<sub>4</sub>-isozyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: the critical role of Ser100. **J Biol Chem** **293**, 9945-9957.

**Gousset-Dupont A, Lebouteiller B, Monreal JA, Echevarría C, Pierre JN, Hodges M, Vidal J** (2005). Metabolite and post-translational control of phosphoenolpyruvate carboxylase from leaves and mesophyll cell protoplasts of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Sci** **169**, 1096-1101.

**Gregory AL, Hurley BA, Tran HT, Valentine AJ, She YM, Knowles VL, Plaxton WC** (2009). *In vivo* regulatory phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase AtPPC1 in phosphate-starved *Arabidopsis thaliana*. **Biochem J** **420**, 57-65.

**Güémez-Toro R, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA** (2012). Allosteric regulation of the photosynthetic C<sub>4</sub> isoenzyme of phosphoenolpyruvate carboxylase: a comparative study between enzymes from monocot and eudicots. **J Mex Chem Soc** **56**, 58-66.

**Guerra D, Ballard K, Truebridge I, Vierling E** (2016). S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR). **Biochemistry** **55**, 2452-2464.

- Guiboileau A, Ávila-Ospina L, Yoshimoto K, Soulay F, Azzopardi M, Marmagne A, Lothier J, Masclaux-Daubresse C** (2013). Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in *Arabidopsis* leaves depending on nitrate availability. **New Phytol** **199**, 683-694.
- Guiboileau A, Yoshimoto K, Soulay F, Bataillé MP, Avice JC, Masclaux-Daubresse C** (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in *Arabidopsis*. **New Phytol** **194**, 732-740.
- Guidici-Orticoni MT, Vidal J, Le Maréchal P, Thomas M, Gadal P, Rémy R** (1988). *In vivo* phosphorylation of *Sorghum* leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochimie** **70**, 769-772.
- Guttmann RP, Powell TJ** (2012). Redox regulation of cysteine-dependent enzymes in neurodegeneration. **Int J Cell Biol** **2012**, 703164.
- Haberlandt G** (ed.) (1914). Physiological plant anatomy. Ed. **MacMillan**. Londres, Reino Unido.
- Han S, Yu B, Wang Y, Liu Y** (2011). Role of plant autophagy in stress response. **Protein Cell** **2**, 784-791.
- Hartwell J, Gill A, Nimmo GA, Wilkins MB, Jenkins GI, Nimmo HG** (1999). Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. **Plant J** **20**, 333-342.
- Hartwell J, Smith LH, Wilkins MB, Jenkins GI, Nimmo HG** (1996). Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is regulated at the level of translatable mRNA in response to light or a circadian rhythm. **Plant J** **10**, 1071-1078.
- Hashiguchi A, Komatsu S** (2016). Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress. **Proteomes** **4**, 42.
- Hatch MD** (1987). C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. **Biochim Biophys Acta** **895**, 81-106.
- Hatch MD, Slack CR** (1966). Photosynthesis by sugar-cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. **Biochem J** **101**, 103-111.
- Hatch MD, Slack CR** (1970). Photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation pathways. **Ann Rev Plant Physiol** **21**, 141-162.

- Haxim Y et al.** (2017). Autophagy functions as an antiviral mechanism against geminiviruses in plants. **eLife** **6**, e23897.
- Herppich W, Herppich M, Von Willert DJ** (1992). The irreversible C<sub>3</sub> to CAM shift in well-watered and salt-stressed plants of *Mesembryanthemum crystallinum* is under strict ontogenetic control. **Bot Acta** **105**, 34-40.
- Hewitt EJ** (1966). Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Bureau of Horticultural and Plantation Crops, **East Malling Tech Commun** No. 22.
- Holtgrefe S, Gohlke J, Starmann J, Druce S, Klocke S, Altmann B, Wojtera J, Lindermayr C, Scheibe R** (2008). Regulation of plant cytosolic glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoforms by thiol modifications. **Physiol Plant** **133**, 211-228.
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K Chu C, Wang Y, Loake GJ** (2008). Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. **J Exp Bot** **59**, 147-154.
- Honig A, Avin-Wittenberg T, Ufaz S, Galili G** (2012). A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of *Arabidopsis* plants to carbon starvation. **Plant Cell** **24**, 288-303.
- Huppe HC, Turpin DH** (1994). Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** **45**, 577-607.
- Hurley JH, Lee S, Prag G** (2006). Ubiquitin binding domains. **Biochem J** **399**, 361-372.
- Igawa T, Fujiwara M, Tanaka I, Fukao Y, Yanagawa Y** (2010). Characterization of bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase expressed in male gametophyte of higher plants. **BMC Plant Biol** **10**, 200.
- Iglesias AA, Andreo CS** (1984). On the molecular mechanism of maize phosphoenolpyruvate carboxylase activation by thiol compounds. **Plant Physiol** **75**, 983-987.
- Ishida H, Yoshimoto K, Izumi M, Reisen D, Yano Y, Makino A, Ohsumi Y, Hanson MR, Mae T** (2008). Mobilization of rubisco and stroma-localized fluorescent proteins of chloroplasts to the vacuole by an *ATG* gene-dependent autophagic process. **Plant Physiol** **148**, 142-155.
- Izui K, Matsumura H, Furumoto T, Kai Y** (2004). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a new era of structural biology. **Annu Rev Plant Biol** **55**, 69-84.

- Izui K, Sabe H, Katsuki H (1981). Increased synthesis of phosphoenolpyruvate carboxylase in a strain of *Escherichia coli* bearing a ColE1-*ppc* hybrid plasmid. **FEBS Lett** **133**, 311-315.
- Izumi M, Ishida H, Nakamura S, Hidema J (2017). Entire photodamaged chloroplasts are transported to the central vacuole by autophagy. **Plant Cell** **29**, 377-394.
- Jaffrey SR, Snyder SH (2001). The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Sci STKE** **2001**, pl1.
- Janc JW, O'Leary MH, Cleland WW (1992). A kinetic investigation of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*. **Biochemistry** **31**, 6421-6426.
- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli GG, Puntarulo S (2006). Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. **Plant Physiol** **142**, 1246-1255.
- Jawali N (1990). The dimeric form of phosphoenolpyruvate carboxylase isolated from maize: physical and kinetic properties. **Arch Biochem Biophys** **277**, 61-68.
- Jeandroz S, Wipf D, Stuehr DJ, Lamattina L, Melkonian M, Tian Z, Zhu Y, Carpenter EJ, Wong GK, Wendehenne D (2016). Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom. **Sci Signal** **9**, re2.
- Jeanneau M, Vidal J, Gousset-Dupont A, Lebouteiller B, Hodges M, Gerentes D, Perez P (2002). Manipulating PEPC levels in plants. **J Exp Bot** **53**, 1837-1845.
- Jiao JA, Echevarría C, Vidal J, Chollet R (1991). Protein turnover as a component in the light/dark regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase activity in C<sub>4</sub> plants. **Proc Natl Acad Sci USA** **88**, 2712-2715.
- Jin CW, Du ST, Shamsi IH, Luo BF, Lin XY (2011). NO synthase-generated NO acts downstream of auxin in regulating Fe-deficiency-induced root branching that enhances Fe-deficiency tolerance in tomato plants. **J Exp Bot** **62**, 3875-3884.
- Job C, Rajjou L, Lovigny Y, Belghazi M, Job D (2005). Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. **Plant Physiol** **138**, 790-802.
- Johansson E, Olsson O, Nyström T (2004). Progression and specificity of protein oxidation in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. **J Biol Chem** **279**, 22204-22208.
- Kabbage M, Williams B, Dickman MB (2013). Cell death control: the interplay of apoptosis and autophagy in the pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. **PLoS Pathog** **9**, e1003287.

- Kai Y, Matsumura H, Inoue T, Terada K, Nagara Y, Yoshinaga T, Kihara A, Tsumura K, Izui K** (1999). Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. **Proc Natl Acad Sci USA** **96**, 823-828.
- Kakizawa S, Shibasaki M, Mori N** (2012). Protein oxidation inhibits NO-mediated signaling pathway for synaptic plasticity. **Neurobiol Aging** **33**, 535-545.
- Kalemba EM, Pukacka S** (2014). Carbonylated proteins accumulated as vitality decreases during long-term storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Trees** **28**, 503-515.
- Kalvari I, Tsompanis S, Mulakkal NC, Osgood R, Johansen T, Nezis IP, Promponas VJ** (2014). iLIR: a web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. **Autophagy** **10**, 913-925.
- Kang S, Shin KD, Kim JH, Chung T** (2018). Autophagy-related (ATG) 11, ATG9 and the phosphatidylinositol 3-kinase control ATG2-mediated formation of autophagosomes in *Arabidopsis*. **Plant Cell Rep** **37**, 653-664.
- Kastle M, Grune T** (2011). Proteins bearing oxidation-induced carbonyl groups are not preferentially ubiquitinated. **Biochimie** **93**, 1076-1079.
- Kawabe H, Ohtani M, Kurata T, Sakamoto T, Demura T** (2018). Protein S-nitrosylation regulates xylem vessel cell differentiation in *Arabidopsis*. **Plant Cell Physiol** **59**, 17-29.
- Kellner R, de la Concepción JC, Maqbool A, Kamoun S, Dagdas YF** (2016). ATG8 expansion: a driver of selective autophagy diversification? **Trends Plant Sci** **22**, 204-214.
- Kim HS, Desveaux D, Singer AU, Patel P, Sondek J, Dangl JL** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. **Proc Natl Acad Sci USA** **102**, 6496-6501.
- Kim HT, Kim KP, Lledias F, Kisselev AF, Scaglione KM, Skowyra D, Gygi SP, Goldberg AL** (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s) and ubiquitin protein ligases (E3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. **J Biol Chem** **282**, 17375-17386.
- Kimura M** (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **J Mol Evol** **16**, 111-120.

- Kirkin V et al.** (2009). A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. **Mol Cell** **33**, 505-516.
- Klepper L** (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. **Atmos Environ** **13**, 537-542.
- Klionsky DJ et al.** (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy** **8**, 445-544.
- Klockenbring T, Meinhard M, Schnabl H** (1998). The stomatal phosphoenolpyruvate carboxylase—a potential target for selective proteolysis during stomatal closure? **J Plant Physiol** **152**, 222-229.
- Kluge M** (1983). The role of PEPC in C<sub>4</sub> photosynthesis and crassulacean acid metabolism. **Physiol Veg** **21**, 817-852.
- Kneeshaw S, Gelineau S, Tada Y, Loake GJ, Spoel SH** (2014). Selective protein denitrosylation activity of thioredoxin-h5 modulates plant immunity. **Mol Cell** **56**, 153-162.
- Kolbert Z, Feigl G, Bordé Á, Molnar, Á, Erdei L** (2017). Protein tyrosine nitration in plants: present knowledge, computational prediction and future perspectives. **Plant Physiol Biochem** **113**, 56-63.
- Komander D, Clague MJ, Urbé S** (2009). Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. **Nat Rev Mol Cell Biol** **10**, 550-563.
- Kovacs I et al.** (2016). ROS-mediated inhibition of S-nitrosoglutathione reductase contributes to the activation of anti-oxidative mechanisms. **Front Plant Sci** **7**, 1669.
- Kraft E, Stone SL, Ma L, Ning SU, Gau Y, Lau OS, Deng XW, Callis J** (2005). Genome analysis and functional characterization of the E2 and ring-type E3 ligase ubiquitination enzymes of *Arabidopsis*. **Plant Physiol** **139**, 1597-1611.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K** (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Mol Biol Evo** **33**, 1870-1874.
- Kuo WN, Kanadia RN, Shanbhag VP, Toro R** (1999). Denitration of peroxynitrite-treated proteins by “protein nitrases” from rat brain and heart. **Mol Cell Biochem** **201**, 11-16.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** **227**, 680-685.

- Lamotte O, Bertoldo JB, Besson-Bard A, Rosnoblet C, Aimé S, Hichami S, Terenzi H, Wendehenne D (2015). Protein S-nitrosylation: specificity and identification strategies in plants. **Front Chem** 2, 114.
- Lamotte O, Gould K, Lecourieux D, Sequeira-Legrand A, Lebrun-García A, Durner J, Pugin A, Wendehenne D (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. **Plant Physiol** 135, 516-529.
- Lampropoulos A, Sutikovic Z, Wenzl C, Maegele I, Lohmann JU, Forner J (2013). GreenGate – A novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PLoS One* 8, e83043.
- Lara MV, Casati P, Andreo CS (2001). *In vivo* phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Egeria densa*, a submersed aquatic species. **Plant Cell Physiol** 42, 441-445.
- Latzko E, Kelly GJ (1983). The many-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. **Physiol Veg** 21, 805-815.
- Law RD, Plaxton WC (1997). Regulatory phosphorylation of banana fruit phosphoenolpyruvate carboxylase by a copurifying phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase. **Eur J Biochem** 247, 642-651.
- Le Bars R, Marion J, Le Borgne R, Satiat-Jeunemaitre B, Bianchi MW (2014). ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants. **Nat Commun** 5, 4121.
- Lee DH, Goldberg AL (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. **Trends Cell Biol** 8, 397-403.
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M (2009). NO signals in the haze. Nitric oxide signalling in plant defence. **Curr Opin Plant Biol** 12, 451-458.
- Lenz HD *et al.* (2011). Autophagy differentially controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. **Plant J** 66, 818-830.
- Leymarie J, Vitkauskaitė G, Hoang HH, Gendreau E, Chazoule V, Meimoun P, Corbineau F, El-Maarouf Bouteau H, Bailly C (2012). Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. **Plant Cell Physiol** 53, 96-106.
- Lepiniec L, Keryer E, Philippe H, Gada P, Crépin C (1993). *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution. **Plant Mol Biol** 21, 487-502.



- Lepiniec L, Thomas M, Vidal J** (2003). From enzyme activity to plant biotechnology: 30 years of research on phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol Biochem** **41**, 533-539.
- Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P, Crépin C** (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. **Plant Sci** **99**, 111-124.
- Levine RL** (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. **Free Radic Biol Med** **32**, 790-796.
- Levine RL, Wehr N, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E** (2000). Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. **Methods Mol Biol** **99**, 15-24.
- Li B, Zhang XQ, Chollet R** (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in tobacco leaves is activated by light in a similar but not identical way as in maize. **Plant Physiol** **111**, 497-505.
- Li F, Chung T, Pennington JG, Federico ML, Kaeppler HF, Kaeppler SM, Otegui MS, Vierstra RD** (2015). Autophagic recycling plays a central role in maize nitrogen remobilization. **Plant Cell** **27**, 1389-1408.
- Li F, Chung T, Vierstra RD** (2014). AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy- and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **26**, 788-807.
- Li W, Chen M, Wang E, Hu L, Hawkesford MJ, Zhong L, Chen Z, Xu Z, Li L, Zhou Y, Guo C, Ma Y** (2016). Genome-wide analysis of autophagy-associated genes in foxtail millet (*Setaria italica* L.) and characterization of the function of SiATG8a in conferring tolerance to nitrogen starvation in rice. **BMC Genomics** **17**, 797.
- Lindermayr C** (2018). Crosstalk between reactive oxygen species and nitric oxide in plants: key role of S-nitrosoglutathione reductase. **Free Radic Biol Med** **122**, 110-115.
- Lindermayr C, Durner J** (2009). S-nitrosylation in plants: pattern and function. **J Proteomics** **73**, 1-9.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005). Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in arabidopsis. **Plant Physiol** **137**, 921-930.
- Lindermayr C, Sell S, Muller B, Leister D, Durner J** (2010). Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. **Plant Cell** **22**, 2894-2907.

- Liu JZ, Duan J, Ni M, Liu Z, Qiu WL, Whitham SA, Qian WJ (2017a). S-nitrosylation inhibits the kinase activity of tomato phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1). *J Biol Chem* **292**, 19743-19751.
- Liu M *et al.* (2010). Site-specific proteomics approach for study protein S-nitrosylation. *Anal Chem* **82**, 7160-7168.
- Liu X, Li X, Zhang C, Dai C, Zhou J, Ren C, Zhang J (2017b). Phosphoenolpyruvate carboxylase regulation in *C<sub>4</sub>-PEPC*-expressing transgenic rice during early responses to drought stress. *Physiol Plant* **159**, 178-200.
- Liu X, Wang Y, Jian W, Lou C, Zhang S (2007). Localization of NOS-like protein in guard cells of *Vicia faba* L. and its possible function. *Chin Sci Bull* **52**, 84-90.
- Liu Y, Bassham DC (2010). TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **5**, e11883.
- Liu Y, Soto-Burgos J, Deng Y, Srivastava R, Howell SH, Bassham DC (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**, 4635-4651.
- Liu Y, Xiong Y, Bassham DC (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**, 954-963.
- Liu Y, Schiff M, Czymmek, Tallóczy Z, Levine B, Dinesh-Kumar SP (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**, 567-577.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods* **25**, 402-408.
- Logan DC (ed.), Paszkiewicz G (2018). The dynamic chondriome: control of number, shape, size and motility of mitochondria. **En: Annual Plant Reviews 50: Plant Mitochondria**. Second Edition, 67-110. Ed. Wiley Blackwell. Chichester, Reino Unido.
- López-Millán AF, Morales F, Andaluz S, Gogorcena Y, Abadía A, de las Rivas J, Abadía J (2000). Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol* **124**, 885-897.
- Lounifi I, Arc E, Molassiotis A, Job D, Rajjou L, Tanou G (2013). Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics* **13**, 568-578.
- Luo L, Zhang P, Zhu R, Fu J, Su J, Zheng J, Wang Z, Wang D, Gong Q (2017). Autophagy is rapidly induced by salt stress and is required for salt tolerance in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **8**, 1459.

- Maisonneuve E, Ducret A, Khoueiry P, Lignon S, Longhi S, Talla E, Dukan S** (2009). Rules governing selective protein carbonylation. **PLoS One** **4**, e7269.
- Malik SI, Hussain A, Yun BW, Spoel SH, Loake GJ** (2011). GSNOR-mediated denitrosylation in the plant defence response. **Plant Sci** **181**, 540-544.
- Mannick JB, Schonhoff CM** (2008). Measurement of protein S-nitrosylation during cell signaling. **Methods Enzymol** **440**, 231-242.
- Manning G, Whyte DB, Martínez R, Hunter R, Hunter T, Sudarsanam S** (2002). The protein kinase complement of the human genome. **Science** **298**, 1912-1914.
- Mano J, Nagata M, Okamura S, Shiraya T, Mitsui T** (2014). Identification of oxidatively modified proteins in salt-stressed arabidopsis: a carbonyl-targeted proteomics approach. **Plant Cell Physiol** **55**, 1233-1244.
- Maqbool A, Hughes RK, Dagdas YF, Tregidgo N, Zess E, Belhaj K, Round A, Bozkurt TO, Kamoun S, Banfield MJ** (2016). Structural basis of host autophagy-related protein 8 (ATG8) binding by the Irish potato famine pathogen effector protein PexRD54. **J Biol Chem** **291**, 20270-20282.
- Marshall RS, Li F, Gemperline DC, Book AJ, Vierstra RD** (2015). Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in *Arabidopsis*. **Mol Cell** **58**, 1053-1066.
- Marshall RS, Vierstra RD** (2015). Eat or to be eaten: the autophagic plight of inactive 26S proteasomes. **Autophagy** **11**, 1927-1928.
- Marshall RS, Vierstra RD** (2018). Autophagy: the master of bulk and selective recycling. **Annu Rev Plant Biol** **69**, 173-208.
- Marx G, Chevion M** (1986). Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper(II) and ascorbate. **Biochem J** **236**, 397-400.
- Masclaux-Daubresse C, Chen Q, Havé M** (2017). Regulation of nutrient recycling via autophagy. **Curr Opin Plant Biol** **39**, 8-17.
- Masclaux-Daubresse C, Clément G, Anne P, Routaboul JM, Guiboileau A, Soulay F, Shirasu K, Yoshimoto K** (2014). Stitching together the multiple dimensions of autophagy using metabolomics and transcriptomics reveals impacts on metabolism, development, and plant responses to the environment in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **26**, 1857-1877.
- Masumoto C, Miyazawa S, Ohkawa H, Fukuda T, Taniguchi Y, Murayama S, Kusano M, Saito K, Fukayama H, Miyao M** (2010). Phosphoenolpyruvate

carboxylase intrinsically located in the chloroplast of rice plays a crucial role in ammonium assimilation. **Proc Natl Acad Sci USA** **107**, 5226-5231.

- Matsumoto K, Mizoue K, Kitamura K, Tse WC, Huber CP, Ishida T** (1999). Structural basis of inhibition of cysteine proteases by E-64 and its derivatives. **Biopolymers** **51**, 99-107.
- Matsumura H, Xie Y, Shirakata S, Inoue T, Yoshinaga T, Ueno Y, Izui K, Kai Y** (2002). Crystal structures of C<sub>4</sub> form maize and quaternary complex of *E. coli* phosphoenolpyruvate carboxylase. **Structure** **10**, 1721-1730.
- Matsuoka K, Higuchi T, Maeshima M, Nakamura K** (1997). A vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase in a nonvacuolar organelle is required for the sorting of soluble vacuolar protein precursors in tobacco cells. **Plant Cell** **9**, 533-546.
- Matsuoka M, Minami EI** (1989). Complete structure of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from maize. **Eur J Biochem** **181**, 593-598.
- Maurer-Stroh S, Koranda M, Benetka W, Schneider G, Sirota FL, Eisenhaber F** (2007). Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. **PLoS Comput Biol** **3**, e66.
- McCourt P, Keith K** (1998). Sterile techniques in *Arabidopsis*. **Methods Mol Biol** **82**, 13-17.
- McNaughton GAL, Fewson CA, Wilkins MB, Nimmo HG** (1989). Purification, oligomerization state and malate sensitivity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochem J** **261**, 349-355.
- Merkulova EA, Guiboileau A, Naya L, Masclaux-Daubresse C, Yoshimoto K** (2014). Assessment and optimization of autophagy monitoring methods in arabidopsis roots indicate direct fusion of autophagosomes with vacuoles. **Plant Cell Physiol** **55**, 715-726.
- Michaeli S, Galili G, Genschik P, Fernie AR, Avin-Wittenberg T** (2015). Autophagy in plants—What's new on the menu? **Trends Plant Sci** **21**, 134-144.
- Michaeli S, Honig A, Levanony H, Peled-Zehavi, Galili G** (2014). *Arabidopsis* ATG8-INTERACTING PROTEIN1 is involved in autophagy-dependent vesicular trafficking of plastid proteins to the vacuole. **Plant Cell** **26**, 4084-4101.
- Minas IS, Tanou G, Belghazi M, Job D, Manganaris GA, Molassiotis A, Vasilakaki M** (2012). Physiological and proteomic approaches to address the active role of ozone in kiwifruit post-harvest ripening. **J Exp Bot** **63**, 2449-2464.

- Minina EA et al.** (2018). Transcriptional stimulation of rate-limiting components of the autophagic pathway improves plant fitness. **J Exp Bot** **69**, 1415-1432.
- 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 Plant Sci** **16**, 300-309.
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I** (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. **Plant Physiol** **130**, 1288-1297.
- Møller IM, Sweetlove LJ** (2010). ROS signalling—specificity is required. **Trends Plant Sci** **15**, 370-374.
- Monreal JA, Arias-Baldrich C, Pérez-Montaño F, Gandullo J, Echevarría C, García-Mauriño S** (2013a). Factors involved in the rise of phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase activity caused by salinity in sorghum leaves. **Planta** **237**, 1401-1413.
- Monreal JA, Arias-Baldrich C, Tossi V, Feria AB, Rubio-Casal A, García-Mata C, Lamattina L, García-Mauriño S** (2013b). Nitric oxide regulation of leaf phosphoenolpyruvate carboxylase-kinase activity: implication in sorghum responses to salinity. **Planta** **238**, 859-869.
- Monreal JA, Feria AB, Vinardell JM, Vidal J, Echevarría C, García-Mauriño S** (2007a). ABA modulates the degradation of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in sorghum leaves. **FEBS Lett** **581**, 3468-3472.
- Monreal JA, López-Baena FJ, Vidal J, Echevarría C, García-Mauriño S** (2007b). Effect of LiCl on phosphoenolpyruvate carboxylase kinase and the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaf disks and leaves of *Sorghum vulgare*. **Planta** **225**, 801-812.
- Monreal JA, López-Baena FJ, Vidal J, Echevarría C, García-Mauriño S** (2010a). Involvement of phospholipase D and phosphatidic acid in the light-dependent up-regulation of sorghum leaf phosphoenolpyruvate carboxylase kinase. **J Exp Bot** **61**, 2819-2827.
- Monreal JA, McLoughlin F, Echevarría C, García-Mauriño S, Testerink C** (2010b). Phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>4</sub> leaves is selectively targeted for inhibition by anionic phospholipids. **Plant Physiol** **152**, 634-638.
- Moraes TF, Plaxton WC** (2000). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cell cultures. **Eur J Biochem** **267**, 4465-4476.

- Mukhopadhyay D, Riezman H** (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. **Science** **315**, 201-205.
- Müller C, Scheible WR, Stitt M, Krapp A** (2001). Influence of malate and 2-oxoglutarate on the *NIA* transcript level and nitrate reductase activity in tobacco leaves. **Plant Cell Environ** **24**, 191-203.
- Murashige T, Skoog F** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** **15**, 473-497.
- Murmu J, Plaxton WC** (2007). Phosphoenolpyruvate carboxylase protein kinase from developing castor oil seeds: partial purification, characterization, and reversible control by photosynthate supply. **Planta** **226**, 1299-1310.
- Nakagawa T, Izumi T, Banba M, Umehara Y, Kouchi H, Izui K, Hata S** (2003). Characterization and expression analysis of genes encoding phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase of *Lotus japonicus*, a model legume. **Mol Plant Microbe Interact** **16**, 281-288.
- Nakamura A, Goto S** (1996). Analysis of protein carbonyls with 2,4-dinitrophenyl hydrazine and its antibodies by immunoblot in two-dimensional gel electrophoresis. **J Biochem-Tokyo** **119**, 768-774.
- Naumann C, Müller J, Sakhonwasee S, Wiegand A, Hause G, Heisters M, Bürstenbinder K, Abel S** (2018). The local phosphate deficiency response activates ER stress-dependent autophagy. **Plant Physiol** doi: [10.1104/pp.18.01379](https://doi.org/10.1104/pp.18.01379)
- Nelson CJ, Millar AH** (2015). Protein turnover in plant biology. **Nat Plants** **1**, 1-7.
- Netto LES, Chae HZ, Kang SW, Rhee SG, Stadtman ER** (1996). Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (TSA) is involved with its antioxidant properties. TSA possesses thiol peroxidase activity. **J Biol Chem** **28**, 15315-15321.
- Nhiri M, Bakrim N, Bakrim N, El Hachimi-Messouak Z, Echevarría C, Vidal J** (2000). Posttranslational regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase during germination of *Sorghum* seeds: influence of NaCl and L-malate. **Plant Sci** **151**, 29-37.
- Nimmo HG** (2000). The regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in CAM plants. **Trends Plant Sci** **5**, 75-80.
- Nimmo HG** (2003). Control of the phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxylase in higher plants. **Arch Biochem Biophys** **414**, 189-196.

- Nimmo GA, McNaughton GAL, Fewson CA, Wilkins MB, Nimmo HG** (1987). Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* leaves in response to light and dark. **FEBS Lett** **213**, 18-22.
- Nimmo GA, Nimmo HG, Fewson CA, Wilkins MB** (1984). Diurnal changes in properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Bryophyllum* leaves: a possible covalent modification. **FEBS Lett** **178**, 199-203.
- Nishikido T, Takanashi H** (1973). Glycine activation of PEP carboxylase from monocotyledonous C<sub>4</sub> plants. **Biochem Biophys Res Commun** **53**, 126-133.
- Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F** (2010). Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. **FEBS Lett** **584**, 1379-1385.
- Nyström T** (2005). Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO J** **24**, 1311-1317.
- Oaks A** (1994). Efficiency of nitrogen utilization in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> cereals. **Plant Physiol** **106**, 407-414.
- Ohsumi Y** (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. **Nat Rev Mol Cell Biol** **2**, 211-216.
- O'Leary MH** (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. **Ann Rev Plant Physiol** **33**, 297-315.
- O'Leary B, Fedosejevs ET, Hill AT, Bettridge J, Park J, Rao SK, Leach CA, Plaxton WC** (2011a). Tissue-specific expression and post-translational modifications of plant- and bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes of the castor oil plant, *Ricinus communis* L. **J Exp Bot** **62**, 5485-5495.
- O'Leary B, Park J, Plaxton WC** (2011b). The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. **Biochem J** **436**, 15-34.
- O'Leary B, Rao SK, Kim J, Plaxton WC** (2009). Bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) functions as a catalytic and regulatory subunit of the novel class-2 PEPC complex of vascular plants. **J Biol Chem** **284**, 24797-24805.
- O'Leary B, Rao SK, Plaxton WC** (2011c). Phosphorylation of a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase at Ser<sup>425</sup> provides a further tier of enzyme control in developing castor oil seeds. **Biochem J** **433**, 65-74.

- Oracz K, El-Maarouf Bouteau H, 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. **Plant J** **50**, 452-465.
- Ortega-Galisteo AP, Rodríguez-Serrano M, Pazmino DM, Gupta DK, Sandalio LM, Romero-Puertas MC** (2012). S-nitrosylated proteins in pea (*Pisum sativum* L.) leaf peroxisomes: changes under abiotic stress. **J Exp Bot** **63**, 2089-2103.
- Osmond CB** (1978). Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context. **Ann Rev Plant Physiol** **29**, 379-414.
- Osuna L, González MC, Cejudo FJ, Vidal J, Echevarría C** (1996). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of the phosphoenolpyruvate carboxylase from wheat seeds during germination. **Plant Physiol** **111**, 551-558.
- Osuna L, Pierre JN, González MC, Álvarez R, Cejudo FJ, Echevarría C, Vidal J** (1999). Evidence for a slow-turnover form of the Ca<sup>2+</sup>-independent phosphoenolpyruvate carboxylase kinase in the aleurone-endosperm tissue of germinating barley seeds. **Plant Physiol** **119**, 511-520.
- Otegui MS** (2018). Vacuolar degradation of chloroplast components: autophagy and beyond. **J Exp Bot** **69**, 741-750.
- Outlaw WH** (1990). Kinetic properties of guard-cell phosphoenolpyruvate carboxylase. **Biochem Physiol Pflanzen** **186**, 317-325.
- Pacquit V, Giglioli N, Créatin C, Pierre JN, Vidal J, Echevarría C** (1995). Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum*: an immunological study using specific anti-phosphorylation site-antibodies. **Photosynth Res** **43**, 283-288.
- Pacquit V, Santi S, Créatin C, Le Bui V, Vidal J, Gadal P** (1993). Production and properties of recombinant C<sub>3</sub>-type phosphoenolpyruvate carboxylase from *Sorghum vulgare*: *in vitro* phosphorylation by leaf and root PyrPC protein serine kinases. **Biochem Biophys Res Commun** **197**, 1415-1423.
- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S** (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature** **327**, 524-526.
- Paradela A, Albar JP** (2008). Advances in the analysis of protein phosphorylation. **J Proteome Res** **7**, 1809-1818.
- Park HJ, Yun DJ** (2013). New insights into the role of the small ubiquitin-like modifier (SUMO) in plants. **Int Rev Cell Mol Biol** **300**, 161-209.



- Park J, Khuu N, Howard ASM, Mullen RT, Plaxton WC (2012). Bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase isozymes from developing castor oil seeds interact *in vivo* and associate with the surface of mitochondria. **Plant J** **71**, 251-262.
- Patel S, Dinesh-Kumar SP (2008). Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. **Autophagy** **4**, 20-27.
- Paterson AH *et al.* (2009). The sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. **Nature** **457**, 551-556.
- Paulus JK, Schlieper D, Groth G (2013). Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution. **Nat Commun** **4**, 1518.
- Peng Y, Cai J, Wang W, Su B (2012). Multiple inter-kingdom horizontal gene transfer in the evolution of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family. **PLoS One** **7**, e51159.
- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M (2004). Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. **Plant Cell** **16**, 2785-2794.
- Pérez-López J, de la Osa C, Feria AB, Pérez-Montaña F, Gandullo J, Baena G, Echevarría C, García-Mauriño S, Monreal JA (2018). Efectos del silenciamiento de SbPPC3 y de la exposición a aluminio en plantas de *Sorghum bicolor*. Póster presentado a las **V Jornadas Doctorales Internacionales de la UNIA** (Sede Antonio Machado); 10-11 de octubre de 2018; Baeza, Jaén.
- Pérez-Pérez ME, Lemaire SD, Crespo JL (2016). Control of autophagy in *Chlamydomonas* is mediated through redox dependent inactivation of the ATG4 protease. **Plant Physiol** **172**, 2219-2234.
- Pfeiffer S, Janistyn B, Soja G, Koesling D, Mayer B, Ebermann R (1995). Detection of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in higher plants. **J Endothel Cell Res** **3**, S17, A66.
- Phillips AR, Suttangkakul A, Vierstra RD (2008). The ATG12-conjugating enzyme ATG10 is essential for autophagic vesicle formation in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics** **178**, 1339-1353.
- Pickart CM, Eddins M (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochim Biophys Acta** **1695**, 55-72.

- Pierre JN, Prieto JL, Gadal P, Vidal J** (2004). *In situ* C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase activity and kinetic properties in isolated *Digitaria sanguinalis* mesophyll cells. **Photosynth Res** **79**, 349-355.
- Polge C, Jaquinod M, Holzer F, Bourguignon J, Walling L, Brouquisse R** (2009). Evidence for the existence in *Arabidopsis thaliana* of the proteasome proteolytic pathway: activation in response to cadmium. **J Biol Chem** **284**, 35412-35424.
- Popova LP, Stoinova ZG, Maslenkova LT** (1995). Involvement of abscisic acid in photosynthetic process in *Hordeum vulgare* L. during salinity stress. **J Plant Growth Regul** **14**, 211-218.
- Pottier M, Dumont J, Masclaux-Daubresse C, Thomine S** (2018). Autophagy is essential for optimal Fe translocation to seeds in *Arabidopsis*. **J Exp Bot** doi: [10.1093/jxb/ery388](https://doi.org/10.1093/jxb/ery388).
- Pyngrope S, Bhoomika K, Dubey RS** (2013). Oxidative stress, protein carbonylation, proteolysis and antioxidative defense system as a model for depicting water deficit tolerance in Indica rice seedlings. **Plant Growth Regul** **69**, 149-165.
- Pu Y, Luo X, Bassham DC** (2017). TOR-dependent and –independent pathways regulate autophagy in *Arabidopsis thaliana*. **Front Plant Sci** **8**, 1204.
- Qi H et al.** (2017). TRAF family proteins regulate autophagy dynamics by modulating AUTOPHAGY PROTEIN6 stability in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **29**, 890-911.
- Qian B, Li X, Liu X, Chen P, Ren C, Dai C** (2015). Enhanced drought tolerance in transgenic rice over-expressing of maize C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase gene via NO and Ca<sup>2+</sup>. **J Plant Physiol** **175**, 9-20.
- Radi R** (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **Proc Natl Acad Sci USA** **101**, 4003-4008.
- Rajagopalan AV, Agarwal RM, Raghavendra AS** (2004). Modulation *in vivo* by nitrate salts of the activity and properties of phosphoenolpyruvate carboxylase in leaves of *Alternanthera pungens* (C<sub>4</sub> plant) and *A. sessilis* (C<sub>3</sub> species). **Photosynthetica** **42**, 345-349.
- Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghazi M, Job C, Job D** (2008). Proteome-wide characterization of seeds aging in *Arabidopsis*: a comparison between artificial and natural aging protocols. **Plant Physiol** **148**, 620-641.
- Rana RM, Dong S, Ali Z, Huang J, Zhang HS** (2012). Regulation of ATG6/Beclin-1 homologs by abiotic stress and hormones in rice (*Oryza sativa* L.). **Genet Mol Res** **11**, 3676-3687.

- Rao RSP, Møller IM** (2011). Pattern of occurrence and occupancy of carbonylation sites in proteins. **Proteomics** **11**, 4166-4173.
- Rao SK, Reiskind J, Bowes G** (2006). Light regulation of the photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase PEPC in *Hydrilla verticillata*. **Plant Cell Physiol** **9**, 1206-1216.
- Raven JA, Cockell CS, de la Rocha CL** (2008). The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis. **Phil Trans R Soc B** **363**, 2641-2650.
- Reinders J, Sickmann A** (2005). State-of-the-art in phosphoproteomics. **Proteomics** **5**, 4052-4061.
- Ren C, Liu J, Gong Q** (2014). Functions of autophagy in plant carbon and nitrogen metabolism. **Front Plant Sci** **5**, 301.
- Requena JR, Levine RL, Stadtman ER** (2003). Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids** **25**, 221-226.
- Ribeiro Jr EA, Cunha FQ, Tamashiro WM, Martins IS** (1999). Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. **FEBS Lett** **445**, 283-286.
- Rivoal J, Dunford R, Plaxton WC, Turpin DH** (1996). Purification and properties of four phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms from the green alga *Selenastrum minutum*: evidence that association of the 102-kDa catalytic subunit with unrelated polypeptides may modify the physical and kinetic properties of the enzyme. **Arch Biochem Biophys** **332**, 47-57.
- Rivoal J, Trzos S, Gage DA, Plaxton WC, Turpin DH** (2001). Two unrelated phosphoenolpyruvate carboxylase polypeptides physically interact in the high molecular mass isoforms of this enzyme in the unicellular green alga *Selenastrum minutum*. **J Biol Chem** **276**, 12588-12597.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. **J Exp Bot** **53**, 103-110.
- 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**, 4120-4130.
- Rose TL, Bonneau L, Der C, Marty-Mazars D, Marty F** (2006). Starvation-induced expression of autophagy-related genes in *Arabidopsis*. **Biol Cell** **98**, 53-67.

- Rubbo H, Radi R** (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. **Biochim Biophys Acta** **1780**, 1318-1324.
- Ruiz-Ballesta I, Baena G, Gandullo J, Wang L, She YM, Plaxton WC, Echevarría C** (2016). New insights into the post-translational modification of multiple phosphoenolpyruvate carboxylase isoenzymes by phosphorylation and monoubiquitination during sorghum seed development and germination. **J Exp Bot** **67**, 3523-3536.
- Ruiz-Ballesta I, Feria AB, Ni H, She YM, Plaxton WC, Echevarría C** (2014). *In vivo* monoubiquitination of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase occurs at Lys624 in germinating sorghum seeds. **J Exp Bot** **65**, 443-451.
- Sage RF, Sage TL, Kocacinar F** (2012). Photorespiration and the evolution of C<sub>4</sub> photosynthesis. **Annu Rev Plant Biol** **63**, 19-47.
- Sako Y, Takai K, Nishizaka T, Ishida Y** (1996). Biochemical relationship of phosphoenolpyruvate carboxylases (PEPCs) from thermophilic archaea. **FEMS Microbiol Lett** **153**, 159-165.
- Sako Y, Takai K, Uchida A, Ishida Y** (1996). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus sociabilis*. **FEBS Lett** **392**, 148-152.
- Sánchez AJ, Sienna A, Ruíz-López N, Echevarría C, Feria AB** (2015). Grain production and quality in *A. thaliana* lines with T-DNA insertion in gene coding *PEPC* and *PPCK*. Póster presentado al **XIV Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**; 14-17 de junio de 2015; Toledo, España.
- Sánchez R, Cejudo FJ** (2003). Identification and expression analysis of a gene encoding a bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase from arabidopsis and rice. **Plant Physiol** **132**, 949-957.
- Sánchez R, Flores A, Cejudo FJ** (2006). *Arabidopsis* phosphoenolpyruvate carboxylase genes encode immunologically unrelated polypeptides and are differentially expressed in response to drought and salt stress. **Planta** **223**, 901-909.
- Santolini J, André F, Jeandroz S, Wendehenne D** (2017). Nitric oxide synthase in plants: where do we stand? **Nitric Oxide** **63**, 30-38.
- Schlieper D, Förster K, Paulus JK, Groth G** (2014). Resolving the activation site of positive regulators in plant phosphoenolpyruvate carboxylase. **Mol Plant** **7**, 437-440.

- Schreiber A, Peter M** (2014). Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. **Biochim Biophys Acta** **1843**, 163-181.
- Schuller KA, Werner D** (1993). Phosphorylation of soybean (*Glicine max* L.) nodule phosphoenolpyruvate carboxylase *in vitro* decreases sensitivity to inhibition by L-malate. **Plant Physiol** **101**, 1267-1273.
- Schulz M, Klockenbring T, Hunte C, Schnabl H** (1993). Involvement of ubiquitin in phosphoenolpyruvate carboxylase degradation. **Bot Acta** **106**, 143-145.
- Seglen PO, Gordon PB** (1982). 3-methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. **Proc Natl Acad Sci USA** **79**, 1889-1892.
- Serpa V, Vernal J, Lamattina L, Grotewold E, Cassia R, Terenzi H** (2007). Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. **Biochem Biophys Res Commun** **361**, 1048-1053.
- Serrato AJ, Romero-Puertas MC, Lázaro-Payo A, Sahrawy M** (2018). Regulation by S-nitrosylation of the Calvin-Benson cycle fructose-1,6-bisphosphatase in *Pisum sativum*. **Redox Biol** **14**, 409-416.
- Seth D, Stamler JS** (2010). The SNO-proteome: causation and classifications. **Curr Opin Chem Biol** **15**, 1-8.
- Shane MW, Fedosejevs ET, Plaxton WC** (2013). Reciprocal control of anaplerotic phosphoenolpyruvate carboxylase by *in vivo* monoubiquitination and phosphorylation in developing proteoid roots of phosphate-deficient harsh hakea. **Plant Physiol** **161**, 1634-1644.
- Shen Q, Liu Z, Song F, Xie Q, Hanley-Bowdoin L, Zhou X** (2011). Tomato SlSnRK1 protein interacts with and phosphorylates  $\beta$ C1, a pathogenesis protein encoded by a geminivirus  $\beta$ -satellite. **Plant Physiol** **157**, 1394-1406.
- Shenton M, Fontaine V, Hartwell J, Marsh JT, Jenkins GI, Nimmo HG** (2006). Distinct patterns of control and expression amongst members of the PEP carboxylase kinase gene family in C<sub>4</sub> plants. **Plant J** **48**, 45-53.
- Shin JH, Yoshimoto K, Ohsumi Y, Jeon JS, An G** (2009). *OsATG10b*, an autophagosome component, is needed for cell survival against oxidative stresses in rice. **Mol Cells** **27**, 67-74.
- Shin KD, Lee HN, Chung T** (2014). A revised assay for monitoring autophagic flux in *Arabidopsis thaliana* reveals involvement of *AUTOPHAGY-RELATED9* in autophagy. **Mol Cells** **37**, 399-405.

- Sickmann A, Meyer HE** (2001). Phosphoamino acid analysis. **Proteomics** **1**, 200-206.
- Sima BD, Desjardins Y** (2001). Sucrose supply enhances phosphoenolpyruvate carboxylase phosphorylation level in *in vitro* *Solanum tuberosum*. **Plant Cell Tiss Org** **67**, 235-242.
- Slack CR, Hatch MD** (1967). Comparative studies on the activity of carboxylases and other enzymes in relation to the new pathway of photosynthetic carbon dioxide fixation in tropical grasses. **Biochem J** **103**, 660-665.
- Sláviková S, Shy G, Yao Y, Glozman R, Levanony H, Pietrokovski S, Elazar Z, Galili G** (2005). The autophagy-associated *Atg8* gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in *Arabidopsis* plants. **J Exp Bot** **56**, 2839-2849.
- Sorek N, Poraty L, Sternberg H, Bar E, Lewinsohn E, Yalovsky S** (2007). Activation status-coupled transient S acylation determines membrane partitioning of a plant Rho-related GTPase. **Mol Cell Biol** **27**, 2144-2154.
- Souza JM, Choi I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, Obin M, Ara J, Horwitz J, Ischiropoulos H** (2000). Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. **Arch Biochem Biophys** **380**, 360-366.
- Spadaro D, Yun BW, Spoel SH, Chu C, Wang YQ, Loake GJ** (2010). The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications. **Physiol Plant** **138**, 360-371.
- Stamler JS, Toone EJ, Lipton SA, Sucher NJ** (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron** **18**, 691-696.
- Stiborová M, Leblová S** (1985). Activation of maize (*Zea mays* L.) phosphoenolpyruvate carboxylase by glucose-6-phosphate and glycine: effects of pH and Mg<sup>2+</sup>. **Photosynthetica** **19**, 177-182.
- Stiborová M, Leblová S** (1986). Structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. **FEBS Lett** **205**, 32-34.
- Stuehr DJ, Santolini J, Wang ZQ, Wei CC, Adak S** (2004). Update on mechanism and catalytic regulation in the NO synthases. **J Biol Chem** **279**, 36167-36170.
- Sun G, Mei Y, Deng D, Xiong L, Sun L, Zhang X, Wen Z, Liu S, You X, Nasrullah, Wang D, Wang NN** (2017). N-terminus-mediated degradation of ACS7 is negatively regulated by senescence signaling to allow optimal ethylene production during leaf development in *Arabidopsis*. **Front Plant Sci** **8**, 2066.

- Sun J, Morgan M, Shen RF, Steenbergen C, Murphy E** (2007). Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetics and calcium transport. **Circ Res** **101**, 1155-1163.
- Suttangkakul A, Li F, Chung T, Vierstra RD** (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in *Arabidopsis*. **Plant Cell** **23**, 3761-3779.
- Svenning S, Lamark T, Krause K, Johansen T** (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. **Autophagy** **7**, 993-1010.
- Svensson P, Bläsing OE, Westhoff P** (2003). Evolution of C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase. **Arch Biochem Biophys** **414**, 180-188.
- Sweetlove LJ, Beard KFM, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Ratcliffe RG** (2010). Not just a circle: flux modes in the plant TCA cycle. **Trends Plant Sci** **15**, 462-470.
- 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**, 952-956.
- Takatsuka C, Inoue Y, Matsuoka K, Moriyasu Y** (2004). 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. **Plant Cell Physiol** **45**, 265-274.
- Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A** (2012). Oxidative and nitrosative-base signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. **Plant J** **72**, 585-599.
- Tanou G, Job C, Belghazi M, Molassiotis A, Diamantidis G, Job D** (2010). Proteomic signatures uncover hydrogen peroxide and nitric oxide cross-talk signaling network in citrus plants. **J Proteome Res** **9**, 5994-6006.
- Tanou G, Job C, Rajjou L, Arc E, Belghazi M, Diamantidis G, Molassiotis A, Job D** (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. **Plant J** **60**, 795-804.
- Tasaki M, Asatsuma S, Matsouka K** (2014). Monitoring protein turnover during phosphate starvation-dependent autophagic degradation using a photoconvertible fluorescent protein aggregate in tobacco BY-2 cells. **Front Plant Sci** **5**, 172.

- Taybi T, Nimmo HG, Borland AG** (2004). Expression of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes. Implications for genotypic capacity and phenotypic plasticity in the expression of crassulacean acid metabolism. **Plant Physiol** **135**, 587-598.
- Terada K, Kai T, Okuno S, Fujisawa H, Izui K** (1990). Maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase: phosphorylation of Ser<sup>15</sup> with a mammalian cyclic AMP-dependent protein kinase diminishes sensitivity to inhibition by malate. **FEBS Lett** **259**, 241-244.
- Tesnier K, Strookman-Donkers HM, van Pijlen JG, van der Geest AHM, Bino RJ, Groot SPC** (2002). A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. **Seed Sci Technol** **30**, 149-165.
- Testerink C, Dekker HL, Lim ZY, Johns MK, Holmes AB, de Koster CG, Ktistatis NT, Munnik T** (2004). Isolation and identification of phosphatidic acid targets from plants. **Plant J** **39**, 527-536.
- Testerink C, Munnik T** (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. **Trends Plant Sci** **10**, 368-375.
- The Arabidopsis Genoma Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature** **408**, 796-816.
- Thingholm TE, Jensen ON, Larsen MR** (2009). Analytical strategies for phosphoproteomics. **Proteomics** **9**, 1451-1468.
- Thomas M, Crépin C, Vidal J, Keryer E, Gadal P, Monsinger E** (1990). Light regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase mRNA in leaves of C<sub>4</sub> plants: evidence for phytochrome control on transcription during greening and for rhythmicity. **Plant Sci** **69**, 65-78.
- Thompson AR, Doelling JH, Suttangkakul A, Vierstra RD** (2005). Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. **Plant Physiol** **138**, 2097-2110.
- Ting MK, She YM, Plaxton WC** (2017). Transcript profiling indicates a widespread role for bacterial-type phosphoenolpyruvate carboxylase in malate-accumulating sink tissues. **J Exp Bot** **68**, 5857-5869.
- Tischner R, Galli M, Heimer YM, Bielefeld S, Okamoto M, Mack A, Crawford NM** (2007). Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in *Arabidopsis* extracts. **FEBS J** **274**, 4238-4245.



- Tocquin P, Corbesier L, Havelange A, Pieltain A, Kurtem E, Bernier G, Périlleux C** (2003). A novel high efficiency, low maintenance, hydroponic system for synchronous growth and flowering of *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biol** 3:2.
- Toh H, Kawamura T, Izui K** (1994). Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Cell Environ** 17, 31-43.
- Toledo JC, Augusto O** (2012). Connecting the chemical and biological properties of nitric oxide. **Chem Res Toxicol** 25, 975-989.
- Tovar-Méndez A, Mújica-Jiménez C, Muñoz-Clares RA** (2000). Physiological implications of the kinetics of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol** 123, 149-160.
- Tripodi KE, Turner WL, Gennidakis S, Plaxton WC** (2005). *In vivo* regulatory phosphorylation of novel phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in endosperm of developing castor oil seeds. **Plant Physiol** 139, 969-978.
- Ueno Y, Hata S, Izui K** (1997). Regulatory phosphorylation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase: role of a conserved basic residue upstream of the phosphorylation site. **FEBS Lett** 417, 57-60.
- Uhrig RG, O'Leary B, Spang E, MacDonald JA, She YM, Plaxton WC** (2008a). Coimmunopurification of phosphorylated bacterial- and plant-type phosphoenolpyruvate carboxylase with the plastidial pyruvate dehydrogenase complex from developing castor oil seeds. **Plant Physiol** 146, 1346-1357.
- Uhrig RG, She YM, Plaxton WC** (2008). Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds. **J Biol Chem** 283, 29650-29657.
- Van Quy L, Foyer C, Champigny ML** (1991). Effect of light and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> on wheat leaf phosphoenolpyruvate carboxylase activity. **Plant Physiol** 97, 1476-1482.
- Vance CP, Gregerson RG, Robinson DL, Miller SS, Gantt JS** (1994). Primary assimilation of nitrogen in alfalfa nodules: molecular features of the enzymes involved. **Plant Sci** 101, 51-64.
- Vidal J, Bakrim N, Hodges M** (2002). The regulation of plant phosphoenolpyruvate carboxylase by reversible phosphorylation. **En:** Foyer CH, Noctor G (eds.). *Advances in photosynthesis and respiration: photosynthetic nitrogen assimilation and associated carbon metabolism*, 135-150. **Ed. Kluwer Academic Publisher.** Dordrecht, Países Bajos.

- Vidal J, Chollet R (1997). Regulatory phosphorylation of C<sub>4</sub> PEP carboxylase. **Trends Plant Sci** 2, 230-237.
- Vierstra RD (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. **Plant Physiol** 160, 2-14.
- Walker GH, Ku MSB, Edwards GE (1986). Activity of maize leaf phosphoenolpyruvate carboxylase in relation to tautomerization and nonenzymatic decarboxylation of oxaloacetate. **Arch Biochem Biophys** 248, 489-501.
- Walker RP, Paoletti A, Leegood RC, Famiani F (2016). Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) in the flesh of fruits. **Plant Physiol Biochem** 108, 323-327.
- Wang DA, Sebt SM (2005). Palmitoylated cysteine 192 is required for RhoB tumor-suppressive and apoptotic activities. **J Biol Chem** 280, 19243-19249.
- Wang X, Gowik U, Tang H, Bowers JE, Westhoff P, Paterson AH (2009a). Comparative genome analysis of C<sub>4</sub> photosynthetic pathway evolution in grasses. **Genome Biol** 10, R68.
- Wang Y, Nishimura MT, Zhao T, Tang D (2011). ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis*. **Plant J** 68, 74-87.
- Wang Y, Yu B, Zhao J, Guo J, Li Y, Han S, Huang L, Du Y, Hong Y, Tang D, Liu Y (2013). Autophagy contributes to leaf starch degradation. **Plant Cell** 25, 1383-1399.
- Wang Y, Yun BW, Kwon E, Hong JK, Yoon J, Loake GJ (2006). S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. **J Exp Bot** 57, 1777-1784.
- Wang YH, Chollet R (1993a). *In vitro* phosphorylation of purified tobacco-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. **FEBS Lett** 328, 215-218.
- Wang YH, Chollet R (1993b). Partial purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase protein-serine kinase from illuminated maize leaves. **Arch Biochem Biophys** 304, 496-502.
- Wang YH, Duff SMG, Lepiniec L, Créatin C, Sarath G, Condon SA, Vidal J, Gadal P, Chollet R (1992). Site-directed mutagenesis of the phosphorylatable serine (Ser<sup>8</sup>) in C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. **J Biol Chem** 267, 16759-16762.

- Wang YQ et al.** (2009b). S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. **J Biol Chem** **284**, 2131-2137.
- Wawer I et al.** (2010). Regulation of *Nicotiana tabacum* osmotic stress-activated protein kinase and its cellular partner GADPH by nitric oxide in response to salinity. **Biochem J** **429**, 73-83.
- Wen X, Klionsky DJ** (2016). The proteasome subunit RPN10 functions as a specific receptor for degradation of the 26S proteasome by macroautophagy in *Arabidopsis*. **Autophagy** **12**, 905-906.
- Willeford KO, Wu MX, Meyer CR, Wedding RT** (1990). The role of oligomerization in regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity. **Biochem Biophys Res Commun** **168**, 778-785.
- Williams B, Njaci I, Moghaddam L, Long H, Dickman MB, Zhang X, Mundree S** (2015). Trehalose accumulation triggers autophagy during plant desiccation. **PLoS Genet** **11**, e1005705.
- Wink DA, Miranda KM, Espey MG, Pluta RM, Hewett SJ, Colton C, Vitek M, Feelisch M, Grisham MB** (2001). Mechanisms of the antioxidant effects of nitric oxide. **Antioxid Redox Signal** **3**, 203-213.
- Wong CM, Marcocci L, Liu L, Suzuki YJ** (2010). Cell signaling by protein carbonylation and decarbonylation. **Antioxid Redox Signal** **12**, 393-404.
- Woo J, Park E, Dinesh-Kumar SP** (2014). Differential processing of *Arabidopsis* ubiquitin-like Atg8 autophagy proteins by Atg4 cysteine proteases. **Proc Natl Acad Sci USA** **111**, 863-868.
- Xia K, Liu T, Ouyang J, Wang R, Fan T, Zhang M** (2011). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of autophagy-associated gene homologues in rice (*Oryza sativa* L.). **DNA Res** **18**, 363-377.
- Xia T, Xiao D, Liu D, Chai W, Gong Q, Wang NN** (2012). Heterologous expression of ATG8c from soybean confers tolerance to nitrogen deficiency and increases yield in *Arabidopsis*. **PLoS One** **7**, e37217.
- Xie Q, Tzfadia O, Levy M, Weithorn E, Peled-Zehavi H, Van Parys T, Van der Peer Y, Galili G** (2016). hfAIM: a reliable bioinformatics approach for *in silico* genome-wide identification of autophagy-associated Atg8-interacting motifs in various organisms. **Autophagy** **12**, 876-887.

- Xiong Y, Contento AL, Bassham DC** (2005). AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J** **42**, 535-546.
- Xiong Y, Contento AL, Nguyen PQ, Bassham DC** (2007). Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** **143**, 291-299.
- Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng D, Xie Y, Robert Y, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng J** (2009). Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. **Cell** **137**, 133-145.
- Xu W, Ahmed S, Moriyama H, Chollet R** (2006). The importance of the strictly conserved, C-terminal glycine residue in phosphoenolpyruvate carboxylase for overall catalysis. **J Biol Chem** **281**, 17238-17245.
- Xue Y, Liu Z, Gao X, Jin C, Wen L, Yao X, Ren J** (2010). GPS-SNO: computational prediction of protein S-nitrosylation sites with a modified GPS algorithm. **PLoS ONE** **5**, e11290.
- Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, Kato T, Tabata S, Noda T, Ohsumi Y** (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. **Plant Cell** **16**, 2967-2983.
- Yue J, Sun H, Zhang W, Pei D, He Y, Wang H** (2015). Wheat homologs of yeast ATG6 function in autophagy and are implicated in powdery mildew immunity. **BMC Plant Biol** **15**, 95.
- Zhan N et al.** (2018). S-nitrosylation targets GSNO reductase for selective autophagy during hypoxia responses in plants. **Mol Cell** **71**, 142-154.
- Zhang SQ, Li B, Chollet R** (1995). *In vivo* regulatory phosphorylation of soybean nodule phosphoenolpyruvate carboxylase. **Plant Physiol** **108**, 1561-1568.
- Zhang W, Yu L, Zhang Y, Wang X** (2005). Phospholipase D in the signaling networks of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. **Biochim Biophys Acta** **1736**, 1-9.
- Zhao MG, Tian QY, Zhang WH** (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiol** **144**, 206-217.
- Zhong X, Wang ZQ, Xiao R, Cao L, Wang Y, Xie Y, Zhou X** (2017). Mimic phosphorylation of a  $\beta$ C1 protein encoded by TYLCCNB impairs its functions as

a viral suppressor of RNA silencing and a symptom determinant. *J Virol* **91**, e00300-17.

**Zhou J, Wang J, Cheng Y, Chi YJ, Fan B, Yu JQ, Chen Z** (2013). NBR1-mediated selective autophagy targets insoluble ubiquitinated protein aggregates in plant stress responses. *PLoS Genetics* **9**, e1003196.

**Zhou J, Wang J, Yu JQ, Chen Z** (2014). Role and regulation of autophagy in heat stress responses of tomato plants. *Front Plant Sci* **5**, 174.

**Zhuang X, Chung KP, Jiang L** (2016). Origin of the autophagosomal membrane in plants. *Front Plant Sci* **7**, 1655.

**Zhuang X, Chung KP, Cui Y, Lin W, Gao C, Kang BH, Jiang L** (2017). ATG9 regulates autophagosome progression from the endoplasmic reticulum in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E426-E435.

**Zhuang X, Wang H, Lam SK, Gao C, Wang X, Cai Y, Jiang L** (2013). A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **25**, 4596-4615.

# AGRADECIMIENTOS

---

## **RESUMEN**

La elaboración de la tesis doctoral es fruto de cuatro años de trabajo durante los cuales he vivido multitud de experiencias en las que han intervenido todo tipo de personas. Durante este tiempo, cada una de estas personas ha contribuido, en mayor o menor medida, a mi enriquecimiento científico y/o a mi desarrollo como persona. Por eso, me gustaría darles las gracias a todas esas personas.

## **INTRODUCCIÓN**

Mi inmersión en la ciencia comenzó gracias a la Dra. Cristina Echevarría, que hace más de seis años me aceptó como alumno interno, y posteriormente fue mi directora del trabajo fin de máster. Agradezco profundamente esa gran oportunidad. Durante esos dos primeros años antes de comenzar la tesis, fue la Dra. Isabel Ruiz, posteriormente codirectora de mi trabajo fin de máster, la que me acogió en el laboratorio de Fisiología Vegetal y la que fue capaz de enseñarme a cómo trabajar allí. No sólo me enseñó las técnicas y recetas, sino que me enseñó a organizarme, a pensar para solucionar los problemas que podían surgir, a conocer dónde estaban mis límites, a discutir apasionadamente de ciencia. Y además quiso compartir conmigo muchas más cosas fuera del laboratorio, e indudablemente puedo decir que gracias a ti he crecido mucho como persona. Muchas gracias Isa, tú me descubriste la pasión por la ciencia, y sin ti no hubiera sido posible haber llegado hasta aquí. Fue un honor trabajar a tu lado y siempre estaré dispuesto a escuchar un consejo tuyo.

La realización de una tesis doctoral es básicamente un proceso de aprendizaje. Durante el periodo que comprende, se aprenden cosas de aspectos muy diferentes; no sólo en el campo científico, sino también en el personal. Además del empleo de las técnicas, el procesamiento de los datos y la redacción, se aprende a desenvolverse en el laboratorio; se aprende a trabajar con los compañeros; se aprende a reaccionar frente a determinadas situaciones; se aprende a saber lo que puedes hacer, y lo que no debes; se aprende a recibir conocimiento; se aprende a transmitir conocimiento; se aprende a tener paciencia y ser perseverante; se aprende a discutir (científicamente); se aprende a gestionar el tiempo. Se aprenden muchas más cosas, y todas serían prácticamente imposibles de aprender sin la implicación de otras personas. En este apartado agradezco a todas las personas que me han ayudado en algún aspecto u otro durante los últimos cuatro años (y pico).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Los apoyos, gestos, ayudas y momentos que son motivo de agradecimiento en esta tesis se muestran a continuación en una lista, cuya numeración servirá para hacer referencia a lo que tengo que agradecerle a cada persona en los resultados. En general, se pueden englobar en dos grupos:

## 1. En el laboratorio

Dentro del laboratorio, mayormente de Fisiología Vegetal pero también durante las estancias en Brisbane y Viena, son muchas cosas las que tengo que agradecer:

- 1.1. La confianza en mi capacidad y la oportunidad de realizar esta tesis
- 1.2. La ayuda con el aprendizaje y el desarrollo de los experimentos
  - 1.2.1. La explicación de las técnicas y métodos
  - 1.2.2. La localización de productos, reactivos o aparatos
  - 1.2.3. La resolución de dudas y problemas
  - 1.2.4. La ayuda con la realización de los experimentos
- 1.3. La contribución a mejorar mi razonamiento científico
  - 1.3.1. La planificación y diseño de los experimentos
  - 1.3.2. La discusión de los resultados que me ayudaran a obtener diferentes puntos de vista para comprenderlos mejor
  - 1.3.3. La ayuda en la elaboración de manuscritos
- 1.4. El apoyo moral durante la tesis
  - 1.4.1. Las charlas para despejar la mente
  - 1.4.2. El apoyo y los consejos durante los problemas que surgieron
  - 1.4.3. Las risas y las bromas
  - 1.4.4. La motivación
- 1.5. La ayuda con mi docencia

## 2. Ocio y vida personal

Fuera del laboratorio, son muchas las personas a las que tengo que agradecer su amistad, su apoyo y su compañía. Las cosas que tengo que agradecer son incontables, así que intentaré nombrar al menos las más globales y relevantes:

- 2.1. Las reuniones
  - 2.1.1. Los momentos durante las comidas en la facultad
  - 2.1.2. Los “cafés”
  - 2.1.3. Las cervezas (mayormente en El Aljibe)
  - 2.1.4. Los *relíos*
  - 2.1.5. Eventos varios de comidas/cenas/salidas/fiestas
  - 2.1.6. Los congresos
  - 2.1.7. Las quedadas
- 2.2. Las relaciones en mi vida personal
  - 2.2.1. Esos buenos momentos vividos que nos unieron
  - 2.2.2. Las conversaciones
  - 2.2.3. El ánimo y el apoyo en las situaciones difíciles



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Mis directores me han mostrado el camino a seguir en la ciencia

Mis dos directores de tesis, la Dra. Sofía García-Mauriño y el Dr. José A. Monreal fueron los que hicieron que me apasionara por la Fisiología Vegetal después de sus excelentes clases.

Sofía (1.1, 1.2.3, 1.3, 1.4.2, 1.4.3, 1.5, 2.1.1, 2.1.5, 2.1.6), muchas gracias por confiar en mí y darme esta gran oportunidad. Gracias por transmitirme parte de tu gran sabiduría científica, y de mostrarme el camino a seguir durante tanto tiempo. Gracias por tu implicación y tu profesionalidad. Monre (1.1, 1.2.1, 1.2.2, 1.2.3, 1.3, 1.4.2, 1.4.3, 1.5, 2.1.1, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.6, 2.2.3), gracias por integrarme en el grupo cuando llegué al departamento, por los consejos, las bromas y, por supuesto, las cervezas.

De nuevo tengo que agradecer en este apartado a Cristina (1.1, 1.2.3, 1.3.2, 1.4.2, 1.5, 2.1.6) por apostar por mí, transmitirme tus conocimientos y por enseñarme a exprimir los resultados al máximo. Por darme ejemplo con tu voluntad para solucionar los problemas y por no negarte nunca a discutir una idea.

### 2. Mis *compis* del lab, un caso (digno) de estudio

Durante el transcurso de la tesis he compartido laboratorio con personajes de todo tipo.

Nadja (2.1.3, 2.1.5, 2.1.6) (gracias por hacer que me gustara la cerveza), y Alfonso (1.4.3, 2.1.6), mis *compis* de TFM. Se puede decir que esta tesis fue posible gracias a vosotros. Gracias al gran grupo de *Precarios FV* (1.4, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.7): Anabel, Kike, Víctor, María, Raquel; qué buena época y qué bien me lo pasé durante el tiempo que estuvisteis aquí. Gracias a Ana (*Wall*) (1.2.4, 1.4, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3) por su apoyo y por la alegría y motivación que contagia. Al grupo actual: Luis, Jesús, Tadeo y Sea, y los doctores Enrique Maguilla y Antonio J. Alonso (1.2.4, 1.4.3, 1.4.4, 2.1.1, 2.1.7), porque, a pesar de que cada uno de nosotros tenga su particularidad, sois unos grandes compañeros. Gracias en especial a Luis por su colaboración en el último apartado de la tesis. Gracias al Dr. Jacinto Gandullo (1.2, 1.3.2, 1.3.3, 1.4.3, 1.4.4, 1.5, 2.1.1, 2.1.7), por ser tan resolutivo, constante y eficaz. Por compartir el *zulito* conmigo (je je), y por valorarme como investigador. Gracias por esos buenos partidos de pádel junto a Tadeo, Luis, Antonio y algún que otro prenda más. Gracias a todos los alumnos internos y de TFG que me ayudaron en algún momento, en especial a María López, Ani, Fátima y Rocío (1.2.4, 1.4.3, 1.4.4). También a Ángela (1.4, 2.1.1, 2.2.3).

La Dra. Cirenía Arias (1.2, 1.3.2, 1.4, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.7, 2.2.2), con la que coincidí durante el primer año de tesis. Cire, gracias por tu *buen rollo*, tus bromas

y los buenos momentos que pasamos preparando cosas para *la rubia*; y, sobre todo, por preocuparte por mí.

Todas las reglas tienen su excepción, así que con Clara e Isa no pongo números porque sería estúpido ponerlos todos. Isa, también me siento afortunado de haberte conocido. Además de lo que ya he mencionado en la introducción, tu amistad durante el principio de mi tesis fue muy importante para mí. Sé que contigo puedo hablar de cualquier cosa. Muchas gracias. Clara, mi *compi* del *lab* desde el principio, *compi* de tesis después. Gracias por estar siempre a mi lado. Mi paso por el laboratorio habría sido muy diferente sin ti, más difícil, más aburrido. Muchas gracias por tu paciencia conmigo (que te ha hecho falta), por estar a mi lado, por hacerme ameno el día a día, por comprenderme, por preocuparte, por confiar en mí, por tu gran amistad.

### **3. Los miembros del departamento siempre me han facilitado mi trabajo, investigador y docente**

Quisiera agradecer a Pilar (1.2.2, 1.2.3, 1.4.3, 1.5) por la alegría que siempre contagia y su gran voluntad de ayudar y resolver cuanto antes cualquier cosa que me ha hecho falta. Gracias a la Dra. Rosario Álvarez (1.4.2, 1.5) por su empatía y su comprensión, y porque nunca le falta la sonrisa. Y a la Dra. Ana Belén Fera (1.2.1, 1.2.3, 1.2.4, 1.5, 2.1.1), por su ayuda con la docencia y los protocolos. Gracias al Dr. Alfredo Rubio (1.4.1, 1.4.2, 1.4.3, 2.1.3), por las cervecitas, sus siempre entretenidos momentos *frikis* y peculiaridades, y sus consejos.; al Dr. Alfonso de Cires (1.4.3, 2.1.3) y al Dr. Javier Ávila (1.5).

### **4. Research visits, experiences in which I discovered different cultures and different ways to make science**

I am deeply grateful to Dr. Brett Williams (1.1, 1.2, 1.3, 1.4.3, 1.4.4, 2.1.5, 2.2.1) and Dr. Lalehvash Moghaddam (1.4.3, 1.4.4, 2.1.5, 2.2.1, 2.2.3) for taking care of me during my visit to Brisbane and QUT. Thank you for showing me lots of places around Brisbane. Thank you for your support during and after my visit, thank you for your friendship. I would like to thank Dr. Sagadevan Mundree (1.1, 1.4.4), and again, Brett, for accepting me into your lab and making me feel part of the group. It was an honour for me. Thank you Brett for your trust, for the opportunities given and for everything you taught me. Thanks to all the lab members that I met at CTCB, particularly to Hao (1.2, 1.3.2, 1.4.2) and Asami (1.4, 2.1.5, 2.1.2, 2.2.2).

Thanks to Dr. Yasin Dagdas (1.1, 1.2.1, 1.2.3, 1.3) for letting me work in his lab and for everything he taught me, especially for showing me his efficient way to make science. I was really pleased to work for you. Also, thanks to all the members who I met in the autophagy group at GMI (1.2, 1.3.2, 1.4, 2.1.3, 2.1.5): Dr. Haifeng Wang, Dr. Fabian Künzler, Madlen, Natascha, Dr. Christian Loeffke, Annu and Zemran. I learnt so

many innovative techniques and I loved the good ambient that you had in the lab, and of course, outside the lab. Gracias a Belén (2.1.7, 2.2.2) por acompañarme a descubrir Viena.

### **5. Amigos, un apoyo constante y una fuente de diversión en la vida**

Gracias al grupo de *la riñonera* (1.2.4, 1.4.2, 1.4.3, 1.4.4, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3, 2.1.5, 2.1.7, 2.2): Pablo, Pilar, Raquel, Julia y María; por tantos miércoles (¿o jueves?) de diversión. Por las risas, las anécdotas, las tonterías, el apoyo y por tantos buenos momentos. Gracias al resto de microbiólogos (1.2.4, 1.4.3, 2.1.1, 2.1.5), siempre dispuestos a ayudar y con la escopeta cargada de bromas. Y a la Dra. Clara Parejo (1.4.2, 1.4.3, 1.4.4, 2.1.1, 2.1.2, 2.1.3).

A mis amigos del *bitches* (2.1.3, 2.1.4, 2.1.5, 2.1.7, 2.2). Estefi y Manu, Segura, Quevedo, Cinta, Pablo y Ali. Mi tesis empezó con vosotros, con las parcelas, las playas, las salidas, los conciertos. Gracias por todos esos momentos. También gracias a Débora, Miguel y Pili (2.1.5, 2.1.7, 2.2.1).

A todos mis amigos de la carrera (2.1.5, 2.2): Anabel, Siomara, Isa, Luisa Mari, las Saras, Myriam, Ale Fuentes, Jaime, etc. Con vosotros empezó la pasión por la biología.

A mis amigos de San Fernando (aunque no quede nadie allí ya). Gracias a Patri y a Mercedes (2.1.5, 2.1.7, 2.2), porque siempre he podido contar con vosotras para todo. A Carlos, Fran y Noelia y a Jesús (2.1.5, 2.1.7, 2.2) por todos los momentos juntos.

Gracias a la gente de Alcalá (2.1.5, 2.1.7, 2.2.1, 2.2.2) por tantos buenos momentos y acogerme como uno más. Gracias al *Cabeza* y Sandra, a Frodo y Ana, a Santi, a Emma, a Cris. Gracias a Violeta y a Ricardo (2.1.5, 2.2), y a sus familias. Gracias a María (2) por todo lo que vivimos juntos.

### **6. La familia, la base de lo que soy**

Quisiera agradecer a mis padres (2.2), el Dr. José Manuel Baena y Hermi, el apoyo constante que me han brindado durante la tesis. A ellos les debo todo lo que he conseguido hoy en día y gran parte de mi personalidad. A mi familia de Ceuta, mi abuela y todos los *primitos y titos* (2.2), por su apoyo incondicional y lo bien que me lo paso cada vez que los veo.

## **CONCLUSIONES**

Perdón por este peculiar formato de agradecimientos. Pero la mayoría ya sabréis que no me gusta hacer las cosas como los demás, y que me gusta hacer pensar a la gente. Y si veis que me he olvidado o me he equivocado en algo, perdonadme. Los que me conocen bien saben que ésta es una parte que normalmente no me es fácil. Muchas gracias a todos por la comprensión.

