

Ana Saiz Rodríguez

Glutación peroxidadas y  
tiorredoxinas en la  
leguminosa modelo *Lotus  
japonicus*

Departamento  
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es  
Becana Ausejo, Manuel  
Matamoros Galindo, Manuel Ángel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

**GLUTATIÓN PEROXIDASAS Y  
TIORREDOXINAS EN LA  
LEGUMINOSA MODELO *LOTUS*  
*JAPONICUS***

Autor

Ana Saiz Rodríguez

Director/es

Becana Ausejo, Manuel  
Matamoros Galindo, Manuel Ángel

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2016





**Consejo Superior de  
Investigaciones Científicas**



Departamento de Nutrición Vegetal  
**Estación Experimental de Aula Dei**  
**Zaragoza**

Tesis Doctoral

**Glutación Peroxidasas y Tiorredoxinas en la Leguminosa Modelo**  
***Lotus japonicus***

Memoria presentada por

Dña. Ana Saiz Rodríguez

Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor

Zaragoza, octubre, 2015



D. Manuel Becana Ausejo, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

D. Manuel Ángel Matamoros Galindo, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “Glutación Peroxidasas y Tiorredoxinas en la Leguminosa Modelo Lotus japonicus” ha sido realizada por la Licenciada Doña Ana Saiz Rodríguez en el Departamento de Nutrición Vegetal de la Estación Experimental de Aula Dei (CSIC) bajo nuestra dirección y reúne, a nuestro juicio, las condiciones para optar al grado de Doctor.

Zaragoza, octubre de 2015

Dr. Manuel Becana Ausejo

Dr. Manuel Ángel Matamoros Galindo



## ***Agradecimientos***

Parecía que nunca iba a llegar el momento, pero aquí está. Hace ya 6 años que llegué a Zaragoza para empezar esta tesis. Venía con ilusión por investigar, con pasión por las plantas, con ganas de aprender, con curiosidad por saber. Pero, justo cuando cumplía 30 años y un día, llegaste tú a mi vida, y lo pusiste todo del revés. Y me hiciste la persona más feliz del mundo. Esta tesis y tú habeis crecido juntas. Al principio érais sólo unos bebés, y no sabía ni por dónde cogeros, y ahora, después de todo este tiempo, no me puedo creer cómo habeis crecido. Por eso, mi pequeña Esther, esta tesis está dedicada a ti por completo, como toda mi vida. Porque llegué aquí queriendo convertirme en doctora, y acabé convirtiéndome en madre, que es el mejor título de todos.



## **Abreviaturas**

ABA	Ácido abscísico
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
Apx	Ascorbato peroxidasa
ASC	Ascorbato
BSA	Albúmina sérica bovina
CAT	Catalasa
CKs	Citoquininas
DDAM	<i>Data-dependent acquisition mode</i>
DHA	Deshidroascorbato
DR	Deshidroascorbato reductasa
FBN	Fijación biológica de nitrógeno
FTR	Ferredoxina tiorredoxín reductasa
GFP	Proteína fluorescente verde
Gpx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutarredoxina
GSH	Glutación
GSHS	Glutación sintetasa
GSTs	Glutación-S-transferasas
hGSH	Homoglutación
hGSHS	Homoglutación sintetasa
IPTG	Isopropilo- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
Lb	Leghemoglobina
LC-MS/MS	Espectrómetro de masas en tándem
Lotus	<i>Lotus japonicus</i>
MDHA	Monodeshidroascorbato
MR	Monodeshidroascorbato reductasa
NTRs	NADPH tiorredoxín reductasas
ORF	Marco de lectura abierto
Prx	Peroxirredoxina
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
qRT-PCR	RT-PCR cuantitativa
RNAi	RNA interferente
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SA	Ácido salicílico

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SNOs	Nitrosotioles
SOD	Superóxido dismutasa
TC	Secuencia consenso
TM	<i>Target mode</i>
Trx	Tiorredoxina
WT	Tipo silvestre
$\gamma$ ECS	$\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa

# ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN .....	1
1.1	Leguminosas y fijación biológica de nitrógeno .....	1
1.1.1	Las leguminosas .....	1
1.1.2	<i>Lotus japonicus</i> como leguminosa modelo .....	2
1.1.3	Fijación biológica de nitrógeno .....	3
1.1.4	Simbiosis rizobio-leguminosa .....	3
1.2	Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo .....	7
1.2.1	Tipos de especies reactivas de oxígeno .....	7
1.2.2	Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas .....	9
1.2.3	Especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo a biomoléculas .....	13
1.2.4	Especies reactivas de nitrógeno .....	15
1.3	Sistemas antioxidantes en nódulos de leguminosas .....	17
1.3.1	Ascorbato .....	17
1.3.2	Tioles .....	18
1.3.3	Ciclo ascorbato-glutatión .....	19
1.3.4	Superóxido dismutasas y catalasas .....	20
1.3.5	Tiol peroxidadas: peroxirredoxinas y glutatión peroxidadas .....	20
1.3.6	Tiorredoxinas y glutarredoxinas .....	21
1.3.7	Glutatión-S-transferasas .....	22
1.4	Glutatión peroxidadas .....	22
1.4.1	Clasificación de las glutatión peroxidadas .....	22
1.4.2	Actividad enzimática de las glutatión peroxidadas de plantas .....	23

1.4.3	Función de las glutatión peroxidasas .....	24
1.4.4	Filogenia y evolución de las glutatión peroxidasas de plantas.....	26
1.4.5	Glutatión peroxidasas en <i>Lotus japonicus</i> .....	27
1.5	Tiorredoxinas.....	28
1.5.1	Tiorredoxinas en <i>Lotus japonicus</i> .....	30
2	OBJETIVOS.....	33
3	MATERIAL Y MÉTODOS .....	37
3.1	Reactivos químicos.....	37
3.2	Material biológico, tratamientos y condiciones de cultivo .....	37
3.2.1	Plantas.....	37
3.2.2	Tratamientos .....	39
3.2.3	Microorganismos.....	40
3.3	Análisis de la expresión génica.....	41
3.3.1	Extracción de RNA.....	41
3.3.2	Síntesis de cDNA.....	41
3.3.3	Cuantificación de cDNA mediante qRT-PCR.....	42
3.4	Expresión y purificación de proteínas de plantas en <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.4.1	Diseño de oligonucleótidos .....	43
3.4.2	Amplificación del fragmento de interés .....	43
3.4.3	Clonaje del fragmento de interés.....	44
3.4.4	Transformación de células competentes .....	44
3.4.5	Análisis de los transformantes .....	45
3.4.6	Expresión piloto.....	45
3.4.7	Purificación de las proteínas recombinantes .....	46
3.5	Complementación de levaduras.....	46
3.5.1	Construcción del vector y transformación de levaduras.....	46
3.5.2	Tratamientos de estrés .....	47
3.5.3	Lisis de levaduras.....	48
3.6	Electroforesis.....	48
3.6.1	Geles de agarosa .....	48
3.6.2	Geles desnaturalizantes .....	49
3.6.3	Análisis western .....	49
3.7	Actividades enzimáticas .....	50
3.7.1	Actividad glutatión peroxidasa.....	50
3.7.2	Actividad tiorredoxina.....	51

3.7.3	Actividad monodeshidroascorbato reductasa .....	51
3.8	Detección de S-nitrosilación .....	51
3.8.1	<i>Switch</i> de biotina .....	51
3.8.2	Método de Saville-Griess .....	52
3.8.3	<i>Switch</i> de histidina .....	53
3.8.4	Purificación de proteínas biotiniladas.....	53
3.9	Producción de anticuerpos frente a proteínas de plantas.....	53
3.10	Localización de transcritos y de proteínas de plantas .....	54
3.10.1	Hibridación <i>in situ</i> .....	54
3.10.2	Inmunolocalización .....	59
3.10.3	Fusión con GFP y transformación de protoplastos .....	60
3.10.4	Transformación y expresión en <i>Nicotiana</i> .....	61
3.11	Identificación de proteínas diana de tiorredoxinas .....	61
3.11.1	Obtención de LjTrxh4WT recombinante.....	61
3.11.2	Obtención de LjTrxh4MUT recombinante .....	61
3.11.3	Preparación de la columna de afinidad .....	62
3.11.4	Preparación de los extractos de proteínas de nódulos de Lotus .....	63
3.11.5	Obtención de las proteínas diana .....	63
3.11.6	Identificación de las proteínas diana .....	63
3.12	Obtención de plantas transgénicas. Silenciamiento de Trxo mediante RNA interferente (RNAi) .....	63
3.12.1	Diseño, amplificación y clonaje del fragmento RNAi .....	63
3.12.2	Transformación de <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	64
3.12.3	Obtención de plantas transgénicas por el sistema de <i>hairy roots</i> .....	64
4	RESULTADOS .....	71
4.1	Sobreexpresión y purificación de LjGpx1 y LjGpx3 .....	71
4.2	Caracterización bioquímica de LjGpx1 y LjGpx3 .....	75
4.3	Expresión de los genes <i>LjGpx1</i> y <i>LjGpx3</i> .....	76
4.3.1	Respuesta a estrés salino.....	76
4.3.2	Respuesta a estrés por metales pesados.....	77
4.3.3	Respuesta a estrés nitrosativo .....	78
4.3.4	Respuesta a fitohormonas .....	79
4.4	Complementación con LjGpx1 y LjGpx3 en levaduras .....	80
4.5	Producción de anticuerpos policlonales frente a LjGpx1 y LjGpx3 .....	84
4.6	Localización de transcritos y proteínas LjGpx1 y LjGpx3 .....	86

4.6.1	Hibridación <i>in situ</i> .....	87
4.6.2	Inmunolocalización .....	89
4.6.3	Expresión de proteínas de fusión con GFP .....	89
4.7	Detección de S-nitrosilación y efecto en la actividad enzimática .....	91
4.8	Estructura y función de las tiorredoxinas.....	97
4.9	Dianas moleculares de <i>Trxh4</i> .....	101
4.10	Silenciamiento de <i>Trxo</i> mediante RNA interferente .....	110
4.11	Sobreexpresión y purificación de <i>LjTrxo</i> .....	115
5	DISCUSIÓN.....	123
5.1	Caracterización de glutatión peroxidadas de <i>Lotus</i> .....	123
5.2	Regulación de <i>LjGpx1</i> y <i>LjGpx3</i> .....	125
5.3	Localización de <i>LjGpx1</i> y <i>LjGpx3</i> .....	127
5.4	Regulación por S-nitrosilación de <i>LjGpx1</i> y <i>LjGpx3</i> .....	129
5.5	Estructura y función de <i>Trx</i> .....	131
5.6	Dianas moleculares de <i>Trxs</i> .....	132
5.7	Líneas silenciadas y mutantes <i>knockout</i> de <i>Trxo</i> .....	134
6	CONCLUSIONES .....	139

# **1. INTRODUCCIÓN**



## 1 INTRODUCCIÓN

### 1.1 Leguminosas y fijación biológica de nitrógeno

#### 1.1.1 Las leguminosas

Las leguminosas (*Leguminosae*) son una familia de plantas del orden *Fabales*. Tienen diversos hábitos de crecimiento, pudiendo ser árboles, arbustos, herbáceas o incluso enredaderas, con hojas casi siempre alternas, por lo general compuestas y con estípulas, flores de corola actinomorfa o zigomorfa, amariposada en muchas especies, y fruto en legumbre con varias semillas sin albumen. Existen entre 670 y 750 géneros, y entre 18000 y 19000 especies de leguminosas, incluyendo especies con importancia como grano, pasto y agroforestal.

Durante miles de años las leguminosas se han utilizado para el consumo humano. La lenteja (*Lens culinaris*) fue una de las primeras especies en ser domesticada, habiéndose encontrado en yacimientos en Irán que datan de 8500 a 9000 a.C. (Cohen, 1977). También existen datos de domesticación de soja (*Glycine max*) y judía (*Phaseolus vulgaris*) en Asia y América, respectivamente, hace más de 3000 años (Kaplan y Lynch, 1999; Hymowitz y Singh, 1987). Y el uso de leguminosas como pasto y como mejora para el suelo se observa ya en la época romana, en la que Varro (37 a.C.) apunta “Las leguminosas se deben plantar en suelos pobres, no tanto por su propia cosecha sino por el bien que hacen a las siguientes cosechas”(Fred *et al.* 1932).

## 1. Introducción

---

Las leguminosas de grano y forrajeras se cultivan en unas 180 millones de hectáreas, lo que supone entre el 12 y 15% de la superficie cultivable mundial, y suman el 27% de la producción agrícola primaria, siendo sólo superadas por los cereales. Su importancia se debe a que son una fuente esencial de proteínas de consumo humano y animal. También se utilizan en la producción de aceites, suponiendo el 35% del aceite vegetal procesado, así como en la elaboración de materias primas tales como plásticos biodegradables, gomas y tintes (Graham y Vance, 2003).

Entre las leguminosas de mayor importancia agrícola destacan leguminosas de grano como la soja, judía, guisante (*Pisum sativum*), garbanzo (*Cicer arietinum*), haba (*Vicia faba*) y lenteja, y leguminosas forrajeras como la alfalfa (*Medicago sativa*), trébol rojo (*Trifolium pratense*) y distintas especies del género *Lotus*. Las leguminosas de interés agronómico y diversas leguminosas arbustivas y arbóreas juegan un papel medioambiental fundamental al ser capaces de fijar (reducir) el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) a amonio, tras establecer simbiosis con los rizobios del suelo.

### 1.1.2 *Lotus japonicus* como leguminosa modelo

*Lotus japonicus* (*Lotus*) es una leguminosa salvaje, perenne, proveniente del lejano oriente (Japón, Corea y China). No se usa como planta cultivada, pero algunas otras especies del género *Lotus*, como *L. corniculatus*, *L. glaber* y *L. uliginosus*, son cultivadas como forraje y, gracias a su alto contenido en taninos, utilizadas para la obtención de antiinflamatorios (Szczyglowski y Stougaard, 2008).

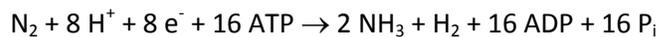
*Lotus* tiene un genoma de tamaño pequeño, alrededor de 470 Mb. Es una especie diploide, con 6 cromosomas (genoma haploide) y un ciclo de vida de 2-3 meses (Sato *et al.*, 2008; Márquez *et al.*, 2005). Además, algunas variedades como "Gifu" se pueden transformar fácilmente con *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*, lo que permite investigar la función de genes manipulando sus niveles de expresión. Estas características, junto con su tamaño y su fácil manejo en el laboratorio, hacen que sea una especie ideal como leguminosa modelo. Además de *Lotus*, *Medicago truncatula* es utilizada como planta modelo en muchos laboratorios.

### 1.1.3 Fijación biológica de nitrógeno

El nitrógeno es un elemento limitante para el crecimiento y la producción vegetal. Forma parte de moléculas tan importantes como la clorofila, los aminoácidos y los ácidos nucleicos. Aunque es uno de los elementos más abundantes (forma el 78% de la atmósfera en forma de N<sub>2</sub>), las plantas sólo pueden asimilar el nitrógeno en forma combinada, siendo éste solamente el 1-2% del nitrógeno disponible en la litosfera.

Las plantas pueden obtener nitrógeno asimilable de diferentes maneras: 1) a partir de fertilizantes de nitrato y/o amonio producidos por el proceso de Haber-Bosch, 2) mediante la liberación de nitrato y amonio durante la descomposición de la materia orgánica, 3) mediante la conversión del nitrógeno atmosférico en estos compuestos por procesos naturales, por ejemplo la oxidación por la acción de los rayos forma óxidos de nitrógeno, y 4) la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Vance, 2001).

La FBN, descubierta por Beijerinck (1901), es llevada a cabo de forma exclusiva por un grupo especializado de procariontas. El número de organismos que fijan N<sub>2</sub> o diazotrofos es muy amplio. Algunos llevan a cabo este proceso en vida libre y otros en simbiosis, pero todos ellos utilizan el complejo enzimático nitrogenasa para reducir el N<sub>2</sub> a amoniaco (que al pH celular está en forma de amonio):



### 1.1.4 Simbiosis rizobio-leguminosa

#### Rizobios

Los rizobios del suelo son un grupo heterogéneo de bacterias pertenecientes a cuatro familias: *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Bradyrhizobiaeae* (Madigan *et al.*, 2014). Dentro de estas familias, sólo determinados géneros son capaces de realizar la FBN: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (*Enfiser*), *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (Velázquez *et al.*, 2006) (Tabla 1.1).

## 1. Introducción

**Tabla 1.1** Algunos rizobios y sus hospedadores.

Género	Especie	Planta hospedadora
<i>Allorhizobium</i>	<i>undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>japonicum</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>loti</i>	<i>Lotus japonicus</i>
	<i>ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>plurifarum</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>leguminosarum</i>	<i>Medicago</i> spp. <i>Phaseolus</i> spp. <i>Pisum</i> spp.
	<i>tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
	<i>terangae</i>	<i>Acacia taeta</i>

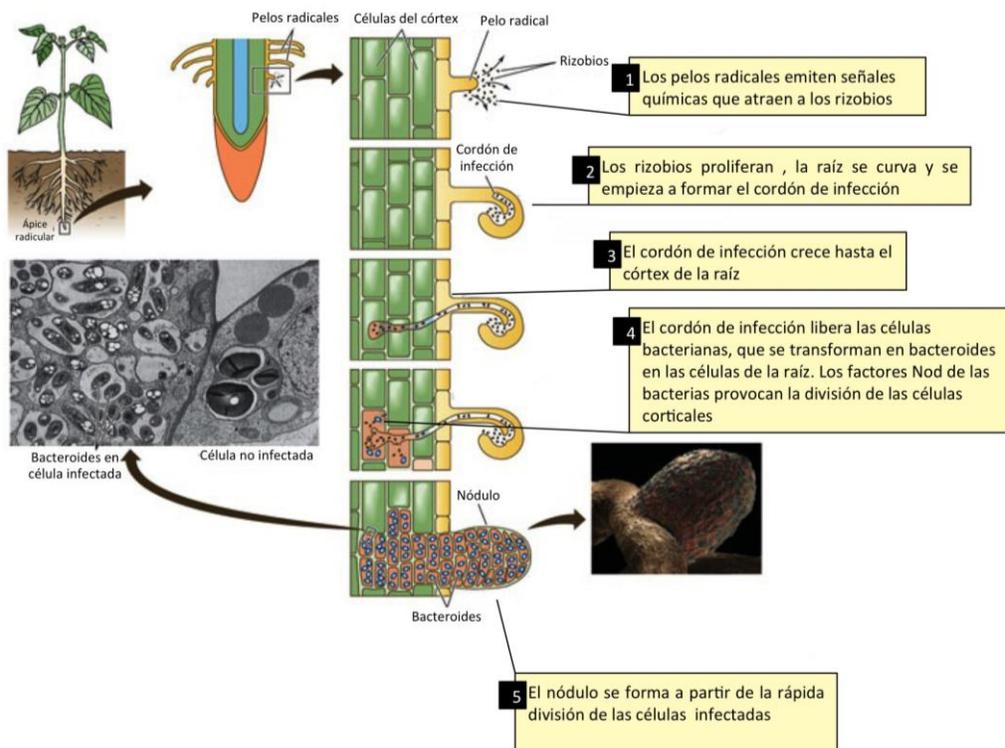
A diferencia de otros diazotrofos, como cianobacterias y bacterias del género *Frankia*, los rizobios no pueden generar un ambiente anaerobio o microaerobio donde realizar la FBN, por lo que deben interactuar con las raíces de las leguminosas y desencadenar una serie de respuestas en la planta que culminarán con la formación de un nuevo órgano, el nódulo, que proporciona el ambiente y los nutrientes necesarios para que tenga lugar la FBN.

### Formación y estructura de los nódulos de leguminosas

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa tiene lugar gracias al intercambio de señales moleculares entre la planta y los rizobios del suelo. Este proceso comienza con la liberación de exudados por las raíces, que contienen flavonoides, ácidos orgánicos y aminoácidos (Morón *et al.*, 2006). Los flavonoides secretados a la rizosfera provocan, en concentraciones nanomolares, la quimiotaxis de los rizobios hacia los pelos radicales, y en concentraciones micromolares activan los genes *nod* en las bacterias, que son los responsables de la nodulación. Los genes *nod* provocan la síntesis y secreción de los factores Nod, constituidos por lipoquitín-oligosacáridos (Morón *et al.*, 2006), que se unen a receptores específicos de la planta. A continuación, otras proteínas transmiten la señal de percepción del factor Nod a un canal de  $Ca^{2+}$ , causando oscilaciones del nivel de  $Ca^{2+}$  intracelular que son percibidas por una proteín-quinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  y calmodulina (Tirichine *et al.*, 2006;

Oldroyd y Downie, 2008). Este hecho inicia la cascada de fosforilación de factores de transcripción e inducción de genes implicados en la formación del nódulo.

En las etapas tempranas del reconocimiento planta-bacteria los pelos radicales se curvan y atrapan los rizobios, que degradan la pared celular mediante la secreción de celulasas y penetran en los pelos radicales por invaginaciones de la membrana plasmática. Así se forma una estructura llamada cordón de infección, que progresa hacia la base del pelo radical llevando a las bacterias invasoras hasta las células del córtex, donde quedan rodeadas de una membrana peribacteroidal derivada de la planta formando los simbiosomas. En el interior de los simbiosomas las bacterias se diferencian en bacteroides capaces de realizar la FBN (figura 1.1).

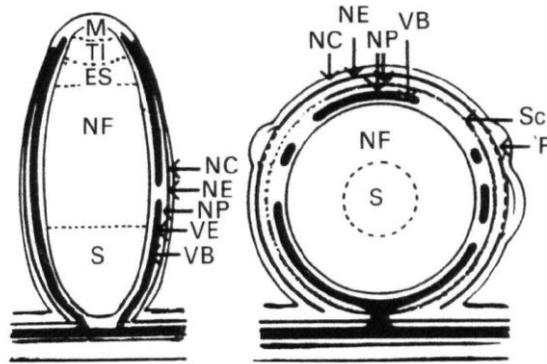


**Figura 1.1** Esquema de la formación del nódulo. Se puede observar también una micrografía donde se aprecian los simbiosomas y los bacteroides. [Adaptado de <http://cropview.wordpress.com/tag/nitrogen-inoculation>].

Las leguminosas pueden formar dos tipos de nódulos, determinados e indeterminados, diferentes estructural y metabólicamente (Hirsch, 1992; Hadri *et al.*,

## 1. Introducción

1998; Aparicio-Tejo *et al.*, 2000). En la figura 1.2 y en la tabla 1.2 se muestran las diferencias entre ambos tipos de nódulos.



**Figura 1.2** Principales diferencias estructurales entre nódulos indeterminados (izquierda) y determinados (derecha). M, meristemo; TI, zona de infección; ES, simbiosis temprana; NF, zona de fijación de  $N_2$ ; S, zona senescente; NC, córtex nodular; NE, endodermis nodular; NP, parénquima nodular; VE, endodermis vascular; VB, vasos vasculares; Sc, esclerénquima; P, peridermis. (Adaptado de Hirsch, 1992).

**Tabla 1.2** Características principales de los nódulos determinados e indeterminados. (Adaptado de Hirsch, 1992).

	Indeterminados	Determinados
<b>Inicio de las divisiones celulares</b>	Córtex interno	Córtex externo
<b>Crecimiento nodular</b>	División celular; meristemo persistente	Expansión celular
<b>Cordón de infección</b>	Ancho	Estrecho
<b>Origen geográfico</b>	Regiones templadas	Regiones tropicales y subtropicales
<b>Transporte del nitrógeno</b>	Amidas	Ureidos
<b>Inductores de los genes <i>nod</i></b>	Flavonas, flavononas	Isoflavonas
<b>Ejemplos</b>	Alfalfa, guisante, <i>M. truncatula</i>	Judía, soja, <i>L. japonicus</i>

En el interior de los bacteroides tiene lugar la FBN, catalizada por la nitrogenasa. Este proceso es muy costoso energéticamente. Los bacteroides producen el ATP necesario mediante fosforilación oxidativa, por lo que requieren grandes cantidades de  $O_2$ . Sin embargo, el complejo nitrogenasa necesita trabajar en condiciones anaerobias o microaerobias, puesto que cantidades mínimas de  $O_2$  son capaces de inactivarlo irreversiblemente. Por lo tanto, los nódulos deben, por un lado, mantener concentraciones mínimas de  $O_2$  libre en las células infectadas y, por otro,

garantizar el suministro de O<sub>2</sub> a los bacteroides para la producción de ATP. Para ello, existen tres mecanismos (Aparicio-Tejo *et al.*, 2000): una alta actividad metabólica, que consume grandes cantidades de O<sub>2</sub>; una barrera variable a la difusión de O<sub>2</sub>, que controla la cantidad de O<sub>2</sub> que llega a la zona infectada; y un sistema de transporte de O<sub>2</sub> eficiente mediante la proteína leghemoglobina (Lb).

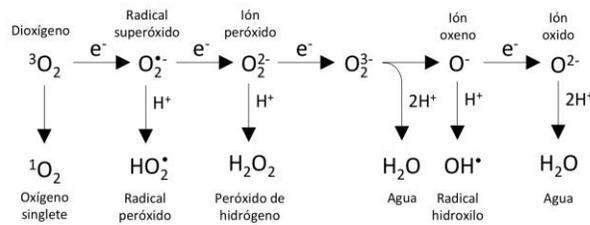
## 1.2 Especies reactivas de oxígeno y estrés oxidativo

Los procesos metabólicos que implican transporte de electrones, como la respiración y la fotosíntesis, conllevan inevitablemente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Una característica común de todas ellas es su capacidad para producir daño oxidativo a proteínas, DNA y lípidos. Estas propiedades citotóxicas explican la evolución de toda una serie de mecanismos de desintoxicación, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en las plantas. Por otro lado, cada vez hay más evidencias que indican que las ROS también están implicadas en procesos de señalización molecular, regulando procesos como el desarrollo y la respuesta de defensa frente a patógenos (Apel y Hirt, 2004).

### 1.2.1 Tipos de especies reactivas de oxígeno

En su estado fundamental como triplete (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>), la molécula de oxígeno tiene sus dos orbitales de mayor energía (orbitales  $\pi$ ) parcialmente ocupados por dos electrones desapareados con spines paralelos. Para oxidar otro átomo o molécula, el oxígeno triplete necesita que éstos presenten dos electrones con spines paralelos que encajen en sus orbitales  $\pi$  parcialmente ocupados (Apel y Hirt, 2004; Sharma *et al.*, 2012). Este hecho explica la relativa baja reactividad del oxígeno con la mayoría de las moléculas. Sin embargo, las ROS pueden producirse a partir del <sup>3</sup>O<sub>2</sub> por transferencia de energía o de electrones (figura 1.3).

## 1. Introducción

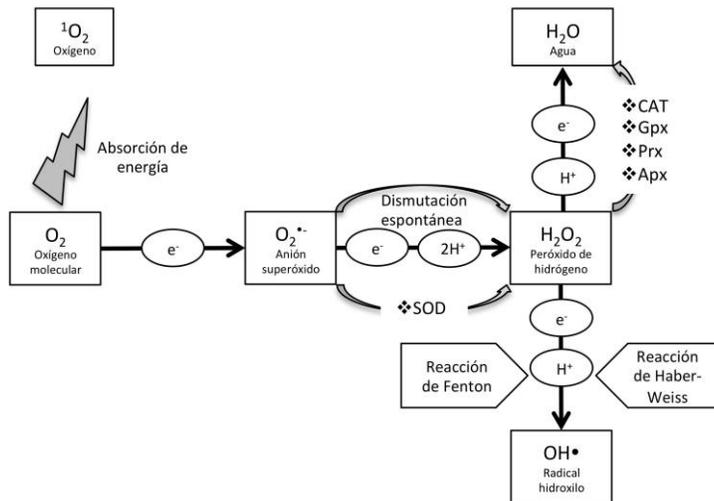


**Figura 1.3** Producción de las diferentes ROS por transferencia de energía o por reducción secuencial univalente del estado fundamental como triplete de oxígeno. (*Adaptado de Apel y Hirt, 2004*).

Existen diferentes tipos de ROS, detalladas en la tabla 1.3. Las más comunes son  ${}^1\text{O}_2$  (oxígeno singlete),  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (radical superóxido),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno) y  $\cdot\text{OH}$  (radical hidroxilo). La activación del  $\text{O}_2$  puede tener lugar por dos mecanismos diferentes: 1) absorción de suficiente energía para cambiar el spin de uno de los electrones desapareados, o 2) reducción monovalente paso a paso. En el primer mecanismo se forma  ${}^1\text{O}_2$ , mientras que en el segundo el  $\text{O}_2$  es reducido secuencialmente a  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\cdot\text{OH}$  (figura 1.3, figura 1.4).

**Tabla 1.3** Características y fuentes de las principales ROS (*Adaptada de Scandalios, 2005*).

ROS		Principales fuentes y características
Oxígeno molecular (triplete)	$\text{O}_2$	Forma gaseosa del oxígeno.
Oxígeno singlete	${}^1\text{O}_2$	Fotoinhibición; radiación UV; reacciones de transferencia de electrones del fotosistema II (cloroplastos).
Radical superóxido	$\text{O}_2^{\bullet-}$	Mayoría de reacciones de fotooxidación, reacción de Mehler en cloroplastos, transferencia de electrones en mitocondrias, fotorrespiración glioxisomal, actividad peroxisomal, fijación de nitrógeno, reacciones de $\text{O}_3$ y $\cdot\text{OH}$ en el apoplasto, defensa contra patógenos, oxidación de xenobióticos.
Peróxido de hidrógeno	$\text{H}_2\text{O}_2$	Dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$ , fotorrespiración, $\beta$ -oxidación, descomposición del $\text{O}_2^{\bullet-}$ inducida por $\text{H}^+$ , defensa frente a patógenos.
Radical hidroxilo	$\cdot\text{OH}$	Descomposición de $\text{O}_3$ en el apoplasto, defensa contra patógenos, reacción de Haber-Weiss. Altamente reactivo con todas las macromoléculas.
Ozono	$\text{O}_3$	Radiación UV y descargas eléctricas en la estratosfera, combustión de productos fósiles, radiación UV en la troposfera.



**Figura 1.4** Representación esquemática de la producción de ROS en plantas. La activación del  $O_2$  ocurre a través de dos mecanismos diferentes. La reducción paso a paso del  $O_2$  conduce a la formación de  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\bullet}$ , mientras que la transferencia de energía al  $O_2$  genera  $^1O_2$ . El  $O_2^{\bullet-}$  dismuta fácilmente a  $H_2O_2$ , tanto de forma no enzimática como por la reacción catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El  $H_2O_2$  es convertido en  $H_2O$  por la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (Gpx), peroxirredoxina (Prx) y ascorbato peroxidasa (Apx). (*Adaptado de Sharma et al., 2012*).

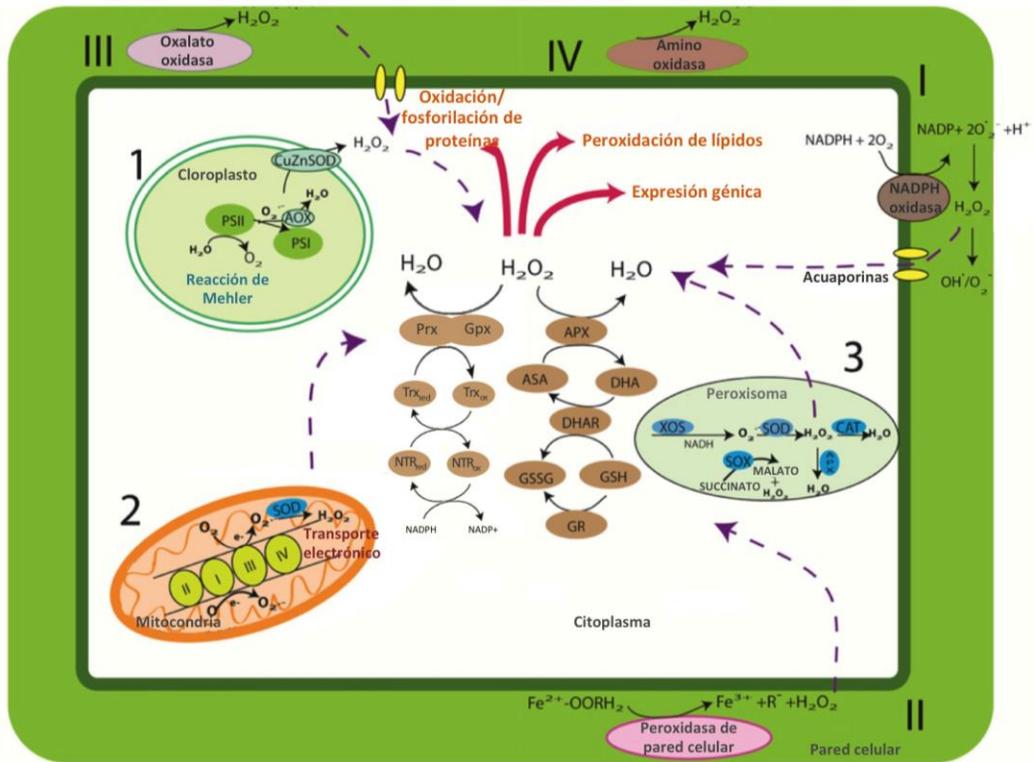
## 1.2.2 Producción de especies reactivas de oxígeno en plantas

Las ROS se generan inevitablemente durante el metabolismo celular y su producción es exacerbada en células sometidas a estrés. La producción de ROS tiene lugar en los cloroplastos, mitocondrias, membrana plasmática, peroxisomas, apoplasto, retículo endoplasmático y pared celular (figura 1.5).

### Cloroplastos

En los cloroplastos se generan diversas formas de ROS, siendo su principal fuente la cadena de transporte de electrones de los fotosistemas I y II. La producción de ROS aumenta en condiciones de fijación de  $CO_2$  limitante, como sequía, salinidad y estrés por temperatura, así como durante la combinación de estas situaciones con estrés por exceso de luz. En condiciones normales, el flujo de electrones va desde los centros excitados de los fotosistemas al NADP, que se reduce a NADPH. Éste es utilizado en el ciclo de Calvin para reducir el aceptor final de electrones, el  $CO_2$ . En el

## 1. Introducción



**Figura 1.5** Generación de ROS y su regulación en células vegetales. Se muestra la producción y desintoxicación de ROS por medio de varios sistemas enzimáticos. (1) Una oxidasa alternativa (AOX) reduce la producción de  $O_2^{\bullet-}$  en tilacoides. En algunas plantas, la hierro superóxido dismutasa (FeSOD) sustituye a la CuZnSOD en el cloroplasto. El  $H_2O_2$  que escapa de este ciclo es eliminado en el ciclo ascorbato-glutatión en el estroma y citosol. Las peroxirredoxinas (Prxs) y glutatión peroxidasa (Gpxs) también están implicadas en la eliminación de  $H_2O_2$ . (2) En las mitocondrias, la MnSOD y los componentes del ciclo ascorbato-glutatión se inducen tras la producción de ROS. (3) En los peroxisomas, las ROS se eliminan a través de la SOD, catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (Apx). La sobreproducción de  $H_2O_2$  también tiene lugar (I) vía NADPH oxidasas de membrana, (II) peroxidasas de pared celular, (III) oxalato oxidasas y (IV) amino oxidasas. Aunque estos mecanismos pueden ocurrir en diferentes compartimentos celulares, el  $H_2O_2$  puede difundir fácilmente a través de las membranas, y antioxidantes como el glutatión y el ácido ascórbico (reducidos u oxidados) pueden ser transportados entre los diferentes compartimentos. (Adaptado de Ma et al., 2013).

caso de sobrecarga del sistema de transporte de electrones, debido al descenso de NADP resultante de las condiciones de estrés, hay una fuga de electrones desde la ferredoxina al  $O_2$ , que se reduce a  $O_2^{\bullet-}$  (Eltner, 1991).



La fuga de electrones al  $O_2$  también puede tener lugar desde los centros 2Fe-2S y 4Fe-4S en la cadena de transporte de electrones del fotosistema I y desde el sitio aceptor del fotosistema II (Cleland y Grace, 1999).

Una vez formado, el  $O_2^{\bullet-}$  genera ROS más agresivas. El  $O_2^{\bullet-}$  se puede protonar a  $HO_2^{\bullet}$  en la superficie interna de la membrana (en el lumen) o ser dismutado enzimáticamente por la superóxido dismutasa (SOD) o espontáneamente a  $H_2O_2$  en la superficie externa de la membrana (en el estroma). En los centros Fe-S, donde está disponible  $Fe^{2+}$ , el  $H_2O_2$  se puede transformar en  $HO^{\bullet}$ , que es mucho más reactivo, a través de la reacción Fenton.

### **Mitocondrias**

Las mitocondrias pueden producir ROS en varios puntos de la cadena de transporte de electrones. La reducción directa del oxígeno a  $O_2^{\bullet-}$  tiene lugar en la región flavoproteína del segmento NADH deshidrogenasa (complejo I) de la cadena respiratoria (Arora *et al.*, 2002). Cuando los sustratos del complejo I son limitados puede ocurrir un flujo inverso de electrones, del complejo II al complejo I. Este proceso aumenta la producción de ROS en el complejo I y está regulado por hidrólisis de ATP (Turrens, 2003). El complejo III (región ubiquinona-citocromo) también produce  $O_2^{\bullet-}$  a partir de oxígeno. La ubiquinona reducida dona un electrón al citocromo *c1* y deja una semiubiquinona parcialmente reducida altamente inestable que provoca la fuga de electrones al  $O_2$  (Murphy, 2009). En plantas, bajo condiciones aerobias normales, la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP están perfectamente acopladas. Sin embargo, diversas situaciones de estrés pueden derivar en la inhibición y modificación de sus componentes, dando lugar a la sobrerreducción de los transportadores de electrones y, por lo tanto, a la formación de ROS (Noctor *et al.*, 2007; Blokhina y Fagerstedt, 2010).

### **Peroxisomas**

Los peroxisomas son un sitio importante de producción de  $H_2O_2$  intracelular como resultado de un metabolismo esencialmente oxidativo (Del Río *et al.*, 2006). Los principales procesos responsables de la producción de  $H_2O_2$  en los diferentes tipos de peroxisomas son la reacción de la glicolato oxidasa, la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, las flavina oxidasas y la dismutación de radicales  $O_2^{\bullet-}$ .

## 1. Introducción

---

Durante la fotorrespiración, que se origina en el cloroplasto, se libera glicolato. La oxidación de este glicolato en los peroxisomas por la glicolato oxidasa produce la mayor parte del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular (Noctor *et al.*, 2002).

Además, existen dos posibles sitios de producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: uno en la matriz, por la xantina oxidasa, que cataliza la oxidación de xantina o hipoxantina a ácido úrico, y otro en las membranas peroxisomales, en una pequeña cadena de transporte de electrones compuesta por una flavoproteína, NADH y citocromo *b* (López-Huertas *et al.*, 1999). El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> que se forma es convertido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por la SOD.

### **Membrana plasmática**

En la membrana plasmática existen oxidorreductasas que producen ROS. La NADPH oxidasa cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH citoplasmático hasta el O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. El O<sub>2</sub><sup>•-</sup> se dismuta a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bien de forma espontánea, o por actividad SOD. La NADPH oxidasa parece tener un papel principal en la producción y acumulación de ROS en plantas bajo condiciones de estrés (Apel y Hirt, 2004; Torres *et al.*, 2002; Kwak *et al.*, 2003).

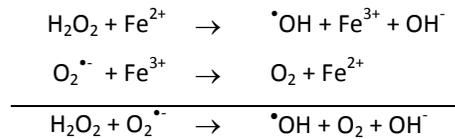
### **Apoplasto**

Las enzimas localizadas en la pared celular son las responsables de la producción de ROS en el apoplasto (Heyno *et al.*, 2011; Apel y Hirt, 2004). La oxalato oxidasa produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> a partir del ácido oxálico (Wojtaszek, 1997). Las enzimas del tipo amino-oxidasa catalizan la desaminación oxidativa de poliaminas usando FAD como cofactor, produciendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que contribuye a la respuesta frente a estreses bióticos (Cona *et al.*, 2006). Por último, prácticamente toda la producción de <sup>•</sup>OH en el apoplasto se debe a una peroxidasa localizada en la pared celular (Heyno *et al.*, 2011).

### **En nódulos de leguminosas**

En la zona infectada de los nódulos existe una concentración de O<sub>2</sub> muy baja (5-60 nM) que permite a los bacteroides mantener en funcionamiento simultáneamente la cadena respiratoria y la actividad nitrogenasa. Los nódulos tienen una capacidad muy alta de producir ROS debido a la alta actividad respiratoria de las mitocondrias y bacteroides, a la abundancia de Lb (1-5 mM) y a la presencia de

enzimas que forman  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ . Además, los nódulos son muy ricos en Fe (forma parte de la nitrogenasa y de la Lb), por lo que se puede generar  $\bullet OH$  mediante la reacción Fenton, en la que el  $Fe^{2+}$  es oxidado a  $Fe^{3+}$  por  $H_2O_2$ . A su vez, el  $O_2^{\bullet-}$  puede actuar como reductor del  $Fe^{3+}$ . La suma de estas dos reacciones se conoce como reacción Haber-Weiss:



### 1.2.3 Especies reactivas de oxígeno y daño oxidativo a biomoléculas

La producción y eliminación de ROS debe estar estrictamente controlada para evitar el estrés oxidativo, que ocurre cuando los niveles de ROS sobrepasan los mecanismos de defensa. El equilibrio entre la producción y la eliminación de ROS se rompe en diversas situaciones de estrés, como la salinidad, sequía, alta luminosidad, toxicidad por metales y ataque de patógenos (Sharma *et al.*, 2012). El aumento de los niveles de ROS puede causar daños a los lípidos, proteínas y DNA. Estas reacciones pueden alterar las propiedades de membrana, como fluidez y transporte iónico, o dar lugar a pérdida de actividad enzimática, entrecruzamiento de proteínas, inhibición de la síntesis de proteínas, daño en el DNA y, finalmente, muerte celular.

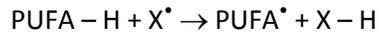
#### Lípidos

La producción excesiva de ROS puede provocar la peroxidación de lípidos de la membrana plasmática y de las membranas de los orgánulos y, por tanto, afectar al funcionamiento celular. La peroxidación de lípidos agrava el estrés oxidativo debido a la producción de aldehídos reactivos que, a su vez, dañan las proteínas y el DNA. El nivel de peroxidación de lípidos se utiliza comúnmente como indicador de daño en las membranas celulares (Sharma y Dubey, 2005; Han *et al.*, 2009; Tanou *et al.*, 2009; Mishra *et al.*, 2011). Las ROS atacan a los fosfolípidos en dos lugares: la insaturación (el doble enlace) entre dos átomos de carbono y el enlace éster entre el glicerol y el ácido graso. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs, de sus siglas en inglés) presentes en los fosfolípidos de membrana son particularmente sensibles al ataque

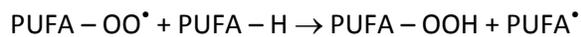
## 1. Introducción

---

por ROS. Un único  $\cdot\text{OH}$  puede provocar la peroxidación de muchos PUFAs porque se originan reacciones en cadena. El proceso de peroxidación de lípidos incluye tres etapas diferenciadas: iniciación, propagación y terminación. En la fase inicial el  $\cdot\text{OH}$  pueden reaccionar con los grupos metileno de los PUFAs formando dienos conjugados, radicales peroxilipídicos e hidroperóxidos (Smirnoff, 1995):



El radical peróxido que se forma es altamente reactivo y puede propagar la reacción en cadena:



La peroxidación de PUFAs puede llevar a la ruptura de las cadenas y alterar la permeabilidad y fluidez de membrana.

### **Proteínas**

El ataque de las ROS a proteínas puede causar su modificación de diversas formas, algunas reversibles y otras irreversibles. Las modificaciones reversibles incluyen la modulación de la actividad mediante formación de puentes disulfuro, oxidación de residuos de Met a metionina sulfóxido y glutationilación (Dean *et al.* 1997). La oxidación irreversible de residuos de Lys, Arg, Pro y Thr origina grupos carbonilo (Stadtman y Levine, 2003). Además, las proteínas pueden ser modificadas indirectamente por conjugación con los productos de degradación de la peroxidación de lípidos (Yamauchi *et al.*, 2008), o con azúcares reductores (glicación) mediante la reacción de Maillard y posterior formación de productos de glicación. Las proteínas oxidadas sufren cambios en la estructura tridimensional que las hace más susceptibles a la digestión proteolítica. Además, la oxidación predispone a las proteínas para la ubiquitinación, lo que las convierte en dianas para la degradación proteosomal (Cabiscol *et al.*, 2000). En general, los tejidos dañados por estrés oxidativo contienen altas concentraciones de proteínas carboniladas (Møller y Kristensen, 2004).

### **DNA**

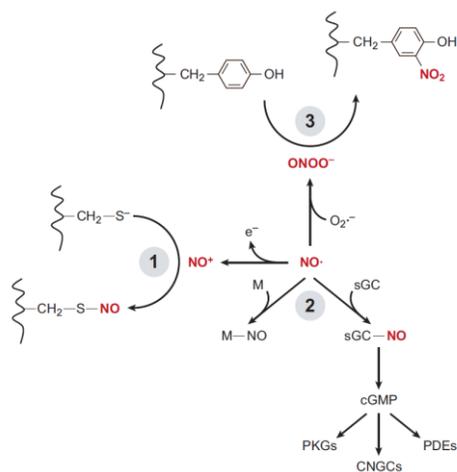
El daño oxidativo al DNA provoca alteración tanto en las bases nitrogenadas (frecuentemente, ataque del radical  $\cdot\text{OH}$  a los dobles enlaces) como en las pentosas

(eliminación del hidrógeno de la desoxirribosa), y conduce a la fragmentación y ruptura de las cadenas de DNA (Roldán-Arjona y Ariza, 2009). Aparte de la oxidación directa, el DNA puede ser dañado por los residuos formados tras la peroxidación de lípidos, produciéndose modificaciones de las bases nitrogenadas.

### 1.2.4 Especies reactivas de nitrógeno

Las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) incluyen el óxido nítrico (NO) y otras moléculas relacionadas, como el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), el dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), el trióxido de dinitrógeno ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) y los *S*-nitrosotioles. El NO es un radical libre gaseoso. Puede reaccionar con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y es capaz de difundir a través de las membranas celulares. Es una molécula fundamental en procesos como la regulación del crecimiento, señalización hormonal, homeostasis del hierro y defensa de la planta frente a patógenos. El  $\text{ONOO}^-$  se origina en la reacción entre el NO y el  $\text{O}_2^{\bullet-}$ . Es un potente oxidante y es capaz de oxidar grupos tiol y catalizar la nitración de proteínas (adición de un grupo  $\text{NO}_2$  a las tirosinas), alterando su estructura y actividad.

Otras modificaciones postraduccionales que son capaces de inducir las RNS son la *S*-nitrosilación y la *S*-glutacionilación (figura 1.6).



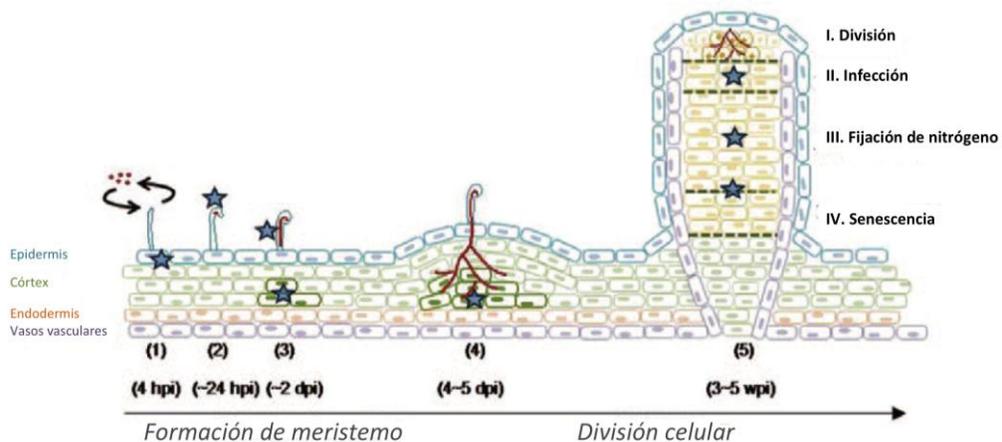
**Figura 1.6** Modificaciones postraduccionales producidas por el NO. (1) La *S*-nitrosilación de una Cys en una proteína conduce a la formación reversible de un *S*-nitrosotiole y puede promover o inhibir la formación de puentes disulfuro entre tioles próximos. El mecanismo corresponde al ataque electrofílico del catione nitrosonio ( $\text{NO}^+$ , resultante de la oxidación del NO) al tiolato. (2) El radical  $\cdot\text{NO}$  puede donar electrones y después reaccionar con metales de transición. La interacción covalente y reversible del NO con los grupos Fe-S, hemo y proteínas con dedos de zinc (M) conduce a la formación de metaloproteínas nitrosiladas (M-NO). Por ejemplo, la interacción reversible del NO con el hierro hemo de la

guanilato ciclasa (sGC) aumenta la síntesis de cGMP, por lo que el efecto del NO se traduce a través de la unión del cGMP con proteínas quinasas dependientes de cGMP (PKGs), canales de nucleótidos cíclicos (CNGCs) y fosfodiesterasas (PDEs). (3) La nitración de Tyr es producida por especies derivadas de NO, sobre todo peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que se forma en presencia de aniones superóxido. La nitración tiene lugar en uno de los dos carbonos equivalentes (carbono 3) en el anillo aromático de la Tyr, con formación de 3-nitrotirosina. Este proceso parece ser irreversible. (Adaptado de Besson-Bard et al., 2008).

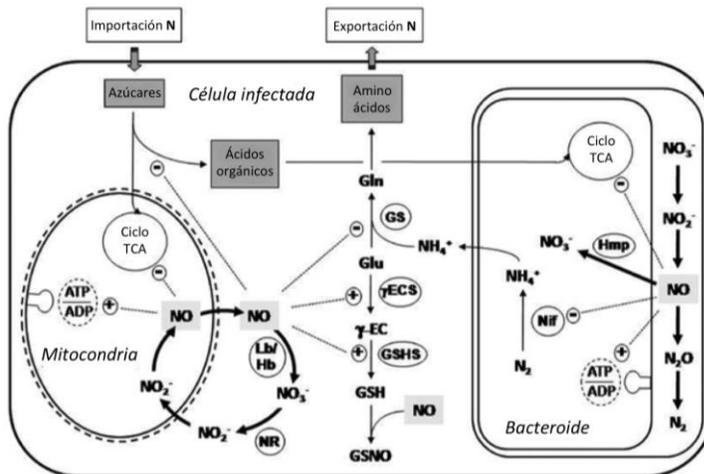
## 1. Introducción

La S-nitrosilación consiste en la unión covalente de un grupo NO a un residuo de Cys, lo que conduce a la formación de un S-nitrosotiol. Es una modificación reversible y regulada en el tiempo y en el espacio y confiere especificidad a los efectos del NO (Lindermayr y Durner, 2009). La reacción entre NO y glutatión (GSH) produce nitrosoglutatión (GSNO), que está implicado en la S-glutationilación de proteínas (unión de una molécula de GSH al grupo tiol de una Cys), y puede transferir NO a grupos tiol de proteínas mediante trans-nitrosilación (Martínez-Ruiz y Lamas, 2007).

El NO ha demostrado tener un papel importante en la FBN (Hichri *et al.*, 2015). Está implicado en el reconocimiento del rizobio, la modulación de la respuesta de la planta frente a la invasión, la división celular y la organogénesis durante el establecimiento de la simbiosis, el metabolismo energético en los nódulos maduros y la senescencia. El NO interacciona con otros reguladores del crecimiento y del desarrollo como las fitohormonas y las ROS. En la figura 1.7 se muestran los lugares de producción de NO durante las distintas fases de la formación del nódulo, y en la figura 1.8 algunos de los efectos del NO en la fijación de N<sub>2</sub>.



**Figura 1.7** Sitios de producción de NO en las diferentes etapas de la simbiosis rizobio-leguminosa. La producción de NO (★) se induce 4 h después de la inoculación (1) y durante cada etapa del proceso de infección: en la curvatura del pelo radicular (2), en el cordón de infección (3) y en el primordio nodular (4). En el nódulo maduro (en el esquema se muestra un nódulo de tipo indeterminado, como el de *M. truncatula*) se detecta NO en la zona de infección, en la zona de fijación de N<sub>2</sub> y en la interzona III-IV. (Adaptado de Hichri *et al.*, 2015).



**Figura 1.8** Representación esquemática de algunos efectos del NO en los nódulos maduros. El NO inhibe la fijación de  $N_2$ , afecta al metabolismo de carbono y de nitrógeno, y activa la síntesis de GSH. En cuanto a las vías de desnitrificación y el ciclo hemoglobina (Hb)-NO, el NO favorece un estado de elevada energía (cociente ATP/ADP). Las líneas con el símbolo + indican efecto de activación/inducción/preservación; las líneas con el símbolo - indican efecto de inhibición/represión del NO. Las líneas gruesas indican las vías metabólicas del NO. (*Adaptado de Hichri et al., 2015*).

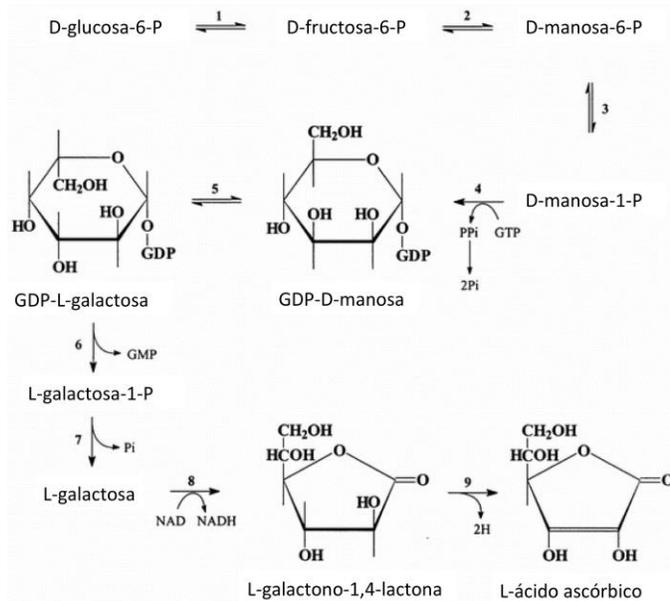
### 1.3 Sistemas antioxidantes en nódulos de leguminosas

#### 1.3.1 Ascorbato

La vitamina C (ascorbato) es un metabolito hidrosoluble, ubicuo y abundante en plantas. Su concentración en el nódulo es de 1-2 mM (Dalton *et al.*, 1986), 5-25 mM en hojas y 25-50 mM en cloroplastos (Smirnoff, 2000). El ascorbato es un potente antioxidante que elimina ROS, tanto de forma directa como participando en el ciclo ascorbato-glutatión. También actúa como cosustrato de varias dioxigenasas relacionadas con la hidroxilación de prolinas y con la síntesis de flavonoides y fitohormonas (Arrigoni y De Tullio, 2002). La concentración basal de ascorbato está muy regulada a diversos niveles (síntesis, degradación, transporte, regeneración y compartimentalización), afecta a la progresión del ciclo celular (Potters *et al.*, 2000) y es crítica para la percepción de condiciones de estrés en el apoplasto.

En la figura 1.9 se muestra la ruta principal de biosíntesis del ascorbato en plantas (ruta Smirnoff-Wheeler).

## 1. Introducción



**Figura 1.9** Principal ruta de biosíntesis del ascorbato en plantas. Enzimas: 1, fosfoglucosa isomerasa; 2, fosfomanosa isomerasa; 3, fosfomanosa mutasa; 4, GDP-D-manosa pirofosforilasa; 5, GDP-D-manosa epimerasa; 6, GDP-L-galactosa fosforilasa; 7, L-galactosa-1-P-fosfatasa; 8, L-galactosa deshidrogenasa; 9, L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (*Adaptado de Wheeler et al., 1998*).

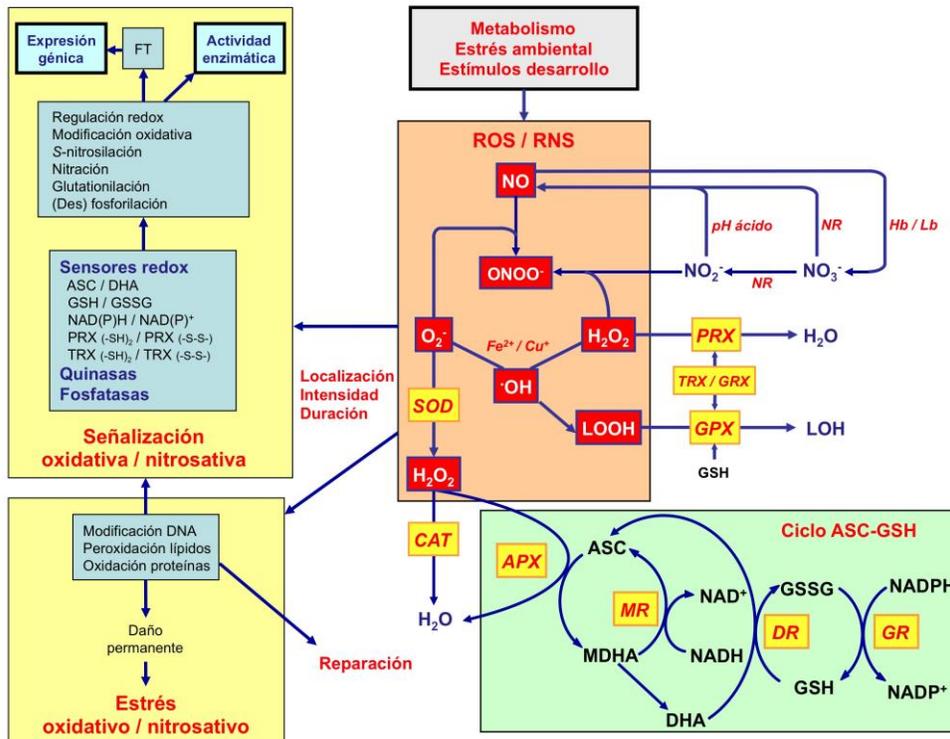
### 1.3.2 Tioles

El GSH ( $\gamma$ Glu-Cys-Gly) es un tripéptido soluble en agua, muy abundante, que tiene funciones críticas en la regulación del ciclo celular, desarrollo, transporte y almacenaje de azufre, respuesta a estrés y desintoxicación de metales pesados (Maughan y Foyer, 2006). En las leguminosas, el glutatión puede ser sustituido parcial o totalmente por el homoglutatión (hGSH;  $\gamma$ Glu-Cys- $\beta$ Ala) (Frendo *et al.*, 2001; Matamoros *et al.*, 2003).

La síntesis de GSH tiene lugar a través de dos reacciones dependientes de ATP catalizadas por la  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ ECS) y la glutatión sintetasa (GSHS), mientras que la síntesis de hGSH comparte la primera enzima con la síntesis del GSH, pero la segunda reacción tiene lugar gracias a la homoglutatión sintetasa (hGSHS). La expresión de los genes *GSHS* y *hGSHS* depende del tejido y de la especie de leguminosa (Frendo *et al.*, 1999; Matamoros *et al.*, 1999).

### 1.3.3 Ciclo ascorbato-glutatión

El ciclo ascorbato-glutatión o ciclo Halliwell-Asada comprende las enzimas ascorbato peroxidasa (Apx), monodeshidroascorbato reductasa (MR), deshidroascorbato reductasa (DR) y glutatión reductasa (GR) (figura 1.10), que utilizan NAD(P)H para reducir  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  (Noctor y Foyer 1998; Mittler *et al.*, 2004).



**Figura 1.10** Esquema general que muestra el proceso de generación y eliminación de ROS y RNS en nódulos de leguminosas. ASC, ascorbato; APX, ascorbato peroxidasa; CAT, catalasa; DHA, deshidroascorbato; DR, deshidroascorbato reductasa; Gpx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; Grx, glutarredoxina; GSH/GSSG, glutatión reducido/oxidado; LOOH, peróxido de lípidos; MDHA, monodeshidroascorbato; MR, monodeshidroascorbato reductasa; Prx, peroxirredoxina; SOD, superóxido dismutasa; FT, factor(es) de transcripción; Trx, tiorredoxina. (Adaptado de Becana *et al.*, 2010).

Se han encontrado isoformas de las cuatro enzimas en varios compartimentos celulares, incluyendo citoplasma, plastidios, mitocondrias y peroxisomas, y los genes de estas enzimas tienen altos niveles de expresión en nódulos.

Este ciclo fue el primer mecanismo antioxidante descrito en nódulos de leguminosas (Dalton *et al.*, 1986), y desde entonces se ha demostrado su importancia

## 1. Introducción

---

para la fijación de N<sub>2</sub> y la simbiosis rizobio-leguminosa. Existe una correlación entre la efectividad del nódulo y las actividades enzimáticas de esta ruta (Dalton *et al.*, 1993).

### 1.3.4 Superóxido dismutasas y catalasas

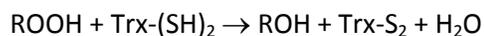
Las SODs son metaloenzimas que catalizan la dismutación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Se clasifican en tres grupos según cual sea su metal cofactor: CuZnSOD, FeSOD y MnSOD. Los tres tipos están presentes en nódulos, en diferentes localizaciones subcelulares: CuZnSOD en citosol, plastidios y espacio periplásmico del bacteroide; FeSOD en citosol, plastidios y bacteroides; y MnSOD en bacteroides, mitocondrias y peroxisomas (Rubio *et al.*, 2004).

Las catalasas son hemoproteínas tetraméricas que catalizan la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, y se localizan principalmente en peroxisomas y glioxisomas. Debido a su baja afinidad por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sólo son eficaces a altas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y son esenciales para el mantenimiento del balance *redox* durante el estrés oxidativo (Willekens *et al.*, 1997).

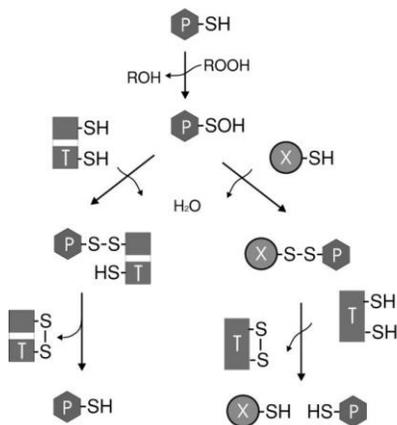
### 1.3.5 Tiol peroxidadas: peroxirredoxinas y glutatión peroxidadas

Las tiol peroxidadas incluyen dos grupos de enzimas, las peroxirredoxinas (Prxs) y las glutatión peroxidadas (Gpxs). Ambas son proteínas de bajo peso molecular (17-24 kDa) que utilizan dadores externos de electrones para realizar su función catalítica.

Las Prxs catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o alquil-hidroperóxidos (ROOH) a agua o los correspondientes alcoholes (ROH), respectivamente, utilizando preferentemente tiorredoxinas (Trxs) como dador de electrones:



En plantas existen cuatro clases de Prxs, denominadas 1Cys-Prx, 2Cys-Prx, PrxQ y PrxII, según el número de residuos de Cys catalíticos y sus secuencias de aminoácidos (Dietz, 2003). El mecanismo de reacción de las Prxs que contienen dos cisteínas catalíticas (2Cys-Prx, PrxQ y PrxII) se describe en la figura 1.11.



**Figura 1.11** Mecanismo de reacción y de regeneración de las Prxs. Un grupo sulfhidrilo es oxidado por el peróxido a ácido sulfénico con la liberación de agua. Un segundo grupo sulfhidrilo ataca al ácido sulfénico formando un puente disulfuro, que es reducido a través de Trx u otras proteínas como Grx o ciclofilinas (*Adaptado de Dietz, 2003*).

La reacción catalizada por las Gpxs se suele describir igual que la catalizada por las Prxs, pero con GSH como dador de electrones. Sin embargo, se ha determinado que las Gpxs utilizan Trxs de modo más eficiente, y en algunos casos de forma exclusiva, como reductores (Herbette *et al.*, 2002). Por lo tanto, las Gpxs deben ser denominadas “Trx peroxidasas” (Rouhier y Jacquot, 2005) y consideradas como un quinto grupo de Prxs (Navrot *et al.*, 2006). Las Gpxs serán tratadas con más detalle en el apartado 1.4 de esta introducción.

### 1.3.6 Tiorredoxinas y glutarredoxinas

Las Trxs son una familia de proteínas de bajo peso molecular (12-14 kDa) que contienen un centro activo conservado (Trp-Cys-Gly-Pro-Cys) que puede reducir puentes disulfuro en sus proteínas diana. Las Trxs serán tratadas con más detalle en el apartado 1.5 de esta introducción.

Las glutarredoxinas (Grxs) son proteínas de bajo peso molecular. Se localizan en los mismos tejidos que las Trxs y sus funciones pueden solaparse (Meyer *et al.*, 1999). Estas proteínas reducen peróxidos directamente, regeneran el ascorbato a partir de deshidroascorbato, actúan como dador de electrones de determinadas Prxs y participan en la protección de grupos tiol en las reacciones de glutationilación/desglutinationilación. Sin embargo, hay poca información sobre la presencia de Grxs en nódulos.

### 1.3.7 Glutati3n-S-transferasas

Las glutati3n-S-transferasas (GSTs) son unas enzimas conocidas por su papel en la desintoxicaci3n de xenobi3ticos, sobre todo herbicidas como la atrazina. Las GSTs pueden eliminar per3xidos directamente, actuando como las Gpxs. Adem3s, son capaces de conjugar el (h)GSH con las mol3culas diana, facilitando su metabolismo, secuestro o eliminaci3n (Edwards *et al.*, 2000; Dalton *et al.*, 2009).

### 1.4 Glutati3n peroxidasas

Las Gpxs catalizan la reducci3n de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o de hidroper3xidos org3nicos a agua o los correspondientes alcoholes utilizando GSH o Trx como dadores de electrones (Herbette *et al.*, 2007). La primera Gpx fue descrita por Mills (1957) como una enzima que protegía a los eritrocitos del daño oxidativo. M3s tarde se fueron descubriendo el resto de Gpxs de mamíferos, que al final resultaron estar presentes en todo tipo de organismos, como se describir3 a continuaci3n.

#### 1.4.1 Clasificaci3n de las glutati3n peroxidasas

En mamíferos, la familia de Gpxs se divide en ocho clases, seg3n su secuencia de amino3cidos, especificidad por el sustrato y localizaci3n subcelular: cl3sica o citos3lica (Gpx1); gastrointestinal (Gpx2); plasm3tica (Gpx3); fosfolípido-hidroperoxidasa (PHGpx o Gpx4); epididimal (Gpx5); típica del epitelio olfatorio (Gpx6); y asociadas al retículo endoplasm3tico (Gpx7 y Gpx8).

Salvo Gpx5, algunas Gpx6, Gpx7 y Gpx8, todas las Gpxs de mamíferos contienen un residuo de selenocisteína (SeCys) en vez de un residuo de Cys. La SeCys se considera como el amino3cido n3mero 21. Su incorporaci3n ocurre en la traducci3n y est3 mediada por un tRNA específico debido a la presencia de un bucle situado corriente abajo de su cod3n UGA (elemento SECIS: *SeCys insertion sequence*). Adem3s requiere el reclutamiento de un factor específico de elongaci3n.

Se han encontrado selenoproteínas en arqueas, eubacterias y eucariotas, pero no en todos los organismos. Por ejemplo, aparte de en mamíferos, se han hallado Gpxs con SeCys en otros vertebrados como el gallo bankiva (*Gallus gallus*; Kong *et al.*,

2003) y el pez cebra (*Danio rerio*; Thisse *et al.*, 2003). Fuera de vertebrados, se han localizado Gpxs con SeCys en helmintos, nemátodos y artrópodos (Maiorino *et al.*, 1996; Singh y Rathaur 2005; Cossio-Bayugar *et al.*, 2005). En cuanto a plantas, el único organismo en el que se ha encontrado Gpx con SeCys es la alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (Fu *et al.*, 2002).

Las Gpxs sin SeCys se encuentran en plantas superiores (Criqui *et al.*, 1992; Holland *et al.*, 1993; Depège *et al.*, 1998; Roedel-Devret *et al.*, 1998), levaduras (Inoue *et al.*, 1999), algunos protozoos (Wilkinson *et al.*, 2000), nemátodos (Cookson *et al.*, 1992) y cianobacterias (Gaber *et al.*, 2001). En los organismos mencionados en estos estudios no se han encontrado ni selenoproteínas ni el sistema de inserción de la SeCys. En los procariotas *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* y en el eucariota *Plasmodium falciparum* sólo se han encontrado Gpxs sin SeCys y, sin embargo, sí pueden expresar selenoproteínas (Aho y Kelly, 1995; Mourier *et al.*, 2005).

#### 1.4.2 Actividad enzimática de las glutatión peroxidasas de plantas

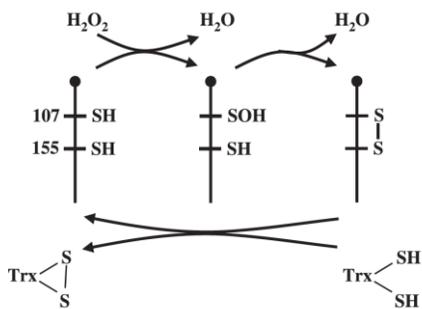
En los estudios iniciales, se definió al GSH como el sustrato reductor de las Gpxs. La cuestión de un sustrato reductor alternativo se planteó por primera vez en seleno-Gpxs de mamíferos. La Gpx3 humana se secreta al plasma. Sin embargo, la concentración plasmática de GSH es muy baja ( $< 0,5 \mu\text{M}$ ), por lo que se sugirió que la actividad de Gpx3 tenía que ser dependiente de otros dadores de electrones. En este caso Trxs y Grxs mostraron ser donadores de electrones eficaces (Bjornstedt *et al.*, 1994). Por otra parte, la baja afinidad de las Gpxs sin SeCys por el GSH llevó a reconsiderar su función como sustrato reductor. La primera vez que se describió una Gpx que usaba Trx para reducir  $\text{H}_2\text{O}_2$  o hidroperóxidos orgánicos fue en *P. falciparum* (Sztajer *et al.*, 2001). A partir de este hallazgo, se ha demostrado que las Gpxs de plantas, levaduras e incluso *Drosophila* muestran actividad Trx-peroxidasa.

Las Gpxs de plantas tienen normalmente tres Cys, pero solamente la primera (*peroxidatic*) y tercera (*resolving*) son necesarias para la catálisis y regeneración de las Gpxs (Navrot *et al.*, 2006; Koh *et al.*, 2007).

El mecanismo enzimático propuesto (Herbette *et al.*, 2007) se muestra en la figura 1.12. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  (o peróxido orgánico) oxida la primera Cys que, una vez oxidada,

## 1. Introducción

reacciona con la tercera Cys. El puente disulfuro resultante es reducido entonces por la Trx.



**Figura 1.12** Mecanismo de reducción de peróxidos de las Gpxs. El extremo N-terminal de la proteína se muestra redondeado. (Adaptado de Herbette et al., 2007).

Debido a este mecanismo de acción, las Gpxs parecen actuar más bien como algunas Prxs. Esta relación entre las Gpxs y las Prxs se puede explicar por sus coincidencias estructurales. Ambas enzimas pertenecen a la misma superfamilia, las *thioredoxin fold*, que comprende glutatión-S-transferasas, Trxs, Grxs y otras. Los miembros de esta superfamilia poseen el motivo conservado CxxC, o motivos derivados de éste: CxxS, SxxC, CxxT o TxxC (Fomenko y Gladishev, 2003). También poseen una estructura secundaria similar.

### 1.4.3 Función de las glutatión peroxidadasas

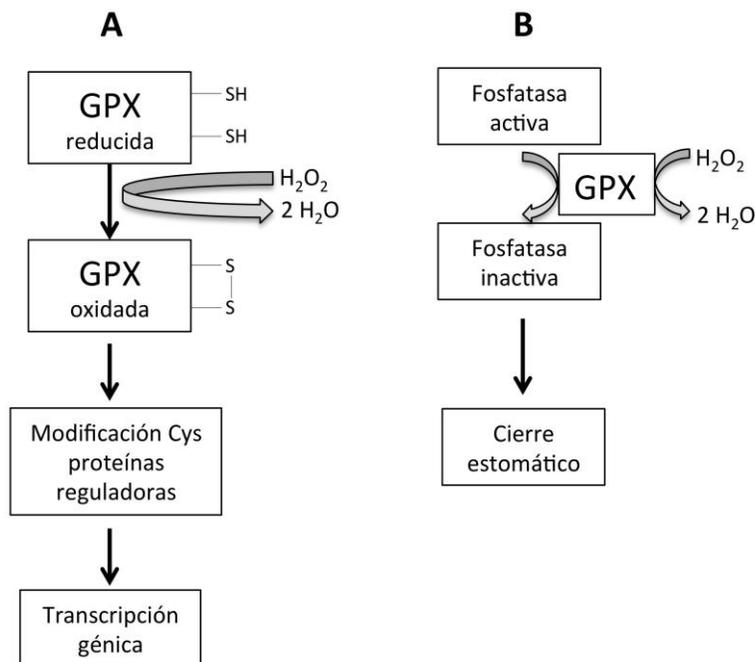
#### Protección de membranas

Debido a su pequeño tamaño y superficie hidrofóbica, así como a su actividad peroxidasa, las Gpxs pueden jugar un papel importante en la protección de membranas en situaciones de estrés oxidativo (Herbette *et al.*, 2002). Se ha observado que las Gpxs utilizan preferentemente como sustrato hidroperóxidos de lípidos, lo que apoya esta posible función.

#### Sensor redox

Otra de sus funciones es la de actuar como sensores *redox* (figura 1.13). Comparadas con la catalasa y con las Gpxs que contienen SeCys, las Gpxs con Cys no eliminan de forma muy eficiente los peróxidos. Sin embargo, la alta reactividad de la Cys con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hace que las Gpxs con Cys y las Prxs actúen como sensores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y,

por lo tanto, participan en cascadas de señalización *redox* (Passaia y Margis-Pinheiro, 2015).



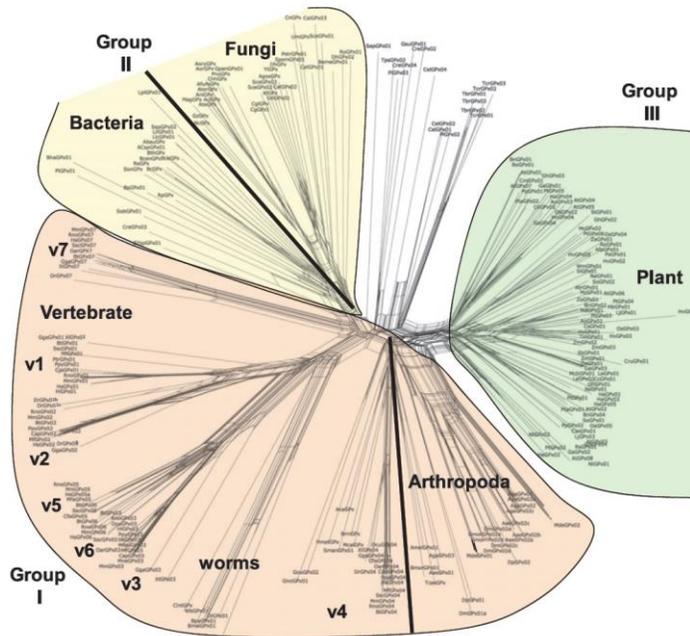
**Figura 1.13** Función de sensor *redox* de las Gpxs. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa como molécula señal. **(A)** Se muestra la señalización mediada por Gpxs en levaduras: la Gpx, a través de la formación de un puente disulfuro con una Cys de la proteína diana, da lugar a una forma inactiva de la misma, que puede promover la transcripción génica en el núcleo. **(B)** Se muestra el mecanismo de acción de la Gpx3 de Arabidopsis en la señalización *redox*, a través de la interacción con la proteína diana. Esta interacción promueve un cambio en el estado *redox* de la proteína diana; como consecuencia, la actividad fosfatasa de la proteína diana se inhibe, dando lugar al cierre estomacal. Señal *redox* = H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; sensor *redox* = Gpx; transductor de señal = proteína reguladora (Modificado de Passaia y Margis-Pinheiro, 2015).

## Desarrollo

Existen numerosos estudios que indican que las fitohormonas pueden regular la expresión de los genes *Gpx* en diversas especies (Li *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013). Asimismo, los datos de *microarrays* disponibles para *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) muestran diferencias en los niveles de expresión dependiendo del tejido analizado y del estado de desarrollo. Por ejemplo, durante la germinación algunos genes se activan (*AtGpx2*, *AtGpx3* y *AtGpx8*) mientras que otros (*AtGpx1*, *AtGpx4*, *AtGpx 6* y *AtGpx7*) se reprimen (Bela *et al.*, 2015).

### 1.4.4 Filogenia y evolución de las glutatión peroxidasas de plantas

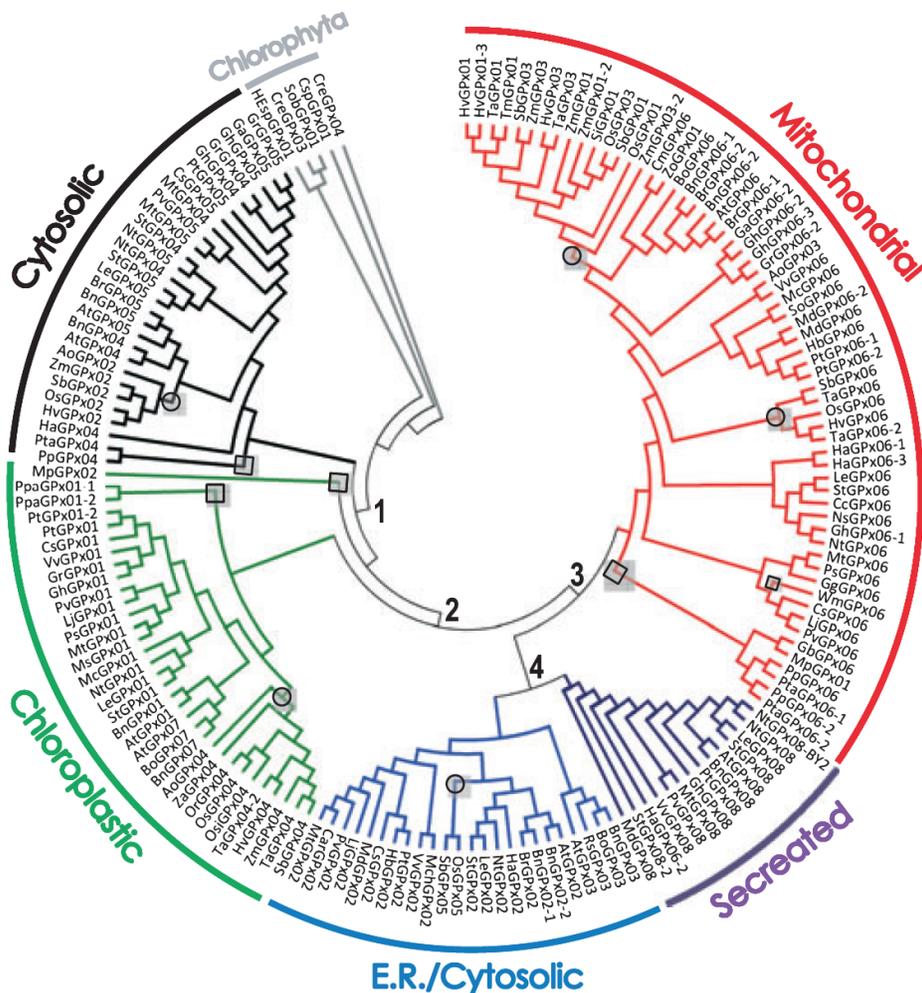
La familia génica de las Gpxs tiene un origen desconocido y no sigue una evolución lineal (Margis *et al.*, 2008). Parece que sus miembros derivan de caminos evolutivos diferentes e independientes, por lo que es difícil establecer un antepasado común para la mayoría de las clases de Gpxs. Sin embargo, se pueden distinguir tres grupos principales con posibles orígenes polifiléticos (figura 1.14). En el grupo III están englobadas las Gpxs de plantas y en el grupo II se encuentran las de hongos, bacterias, cianobacterias y dos tipos de algas. El resto de algas se encuentran en un grupo independiente más disperso.



**Figura 1.14** Árbol filogenético global elaborado a partir de las secuencias de aminoácidos de 204 Gpxs presentes en la base de datos PeroxiBase. Los tres grandes grupos corresponden a vertebrados (v1 a v7) e invertebrados (grupo I), bacterias y hongos (grupo II) y plantas (grupo III). (Adaptado de Margis *et al.*, 2008).

Analizando únicamente las Gpxs de plantas, se observan cinco grupos principales (figura 1.15). Los genes clasificados como citosólicos son más divergentes y están situados fuera del grupo que engloba las otras cuatro clases. Cada grupo está compuesto por Gpxs localizadas en diferentes compartimentos subcelulares: mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplasmático / citosol y vía secretoria. Excepto

en el grupo de las Gpxs secretadas, existe al menos un representante de Gpx de monocotiledóneas y de dicotiledóneas en cada rama.



**Figura 1.15** Árbol filogenético creado a partir de un alineamiento de 166 secuencias de aminoácidos de Gpxs de plantas, utilizando CLUSTALX con el método de *neighbour-joining*. Se han añadido cinco secuencias de algas verdes como grupo externo. Las ramas correspondientes a los diferentes compartimentos subcelulares se indican de acuerdo a datos experimentales existentes en la literatura. Las posiciones correspondientes a cuatro eventos ancestrales de duplicación se indican del 1 al 4. Los círculos corresponden a grupos que sólo contienen representantes de monocotiledóneas. Los cuadrados indican la posición basal de los miembros de gimnospermas en las ramas principales. (Adaptado de Margis et al., 2008).

#### 1.4.5 Glutatión peroxidasas en *Lotus japonicus*

En *Lotus* se han descrito seis Gpxs (Ramos et al., 2009). Todos estos genes, exceptuando *LjGpx4*, contienen seis exones interrumpidos por 5 intrones. La composición de exones es común para los ocho genes de *Arabidopsis* (Rodríguez-Milla

## 1. Introducción

*et al.*, 2003), los seis genes del álamo (*Populus trichocarpa*) (Navrot *et al.*, 2006) y el único gen del naranjo (*Citrus sinensis*) (Avsian-Kretchmer *et al.*, 2004). La longitud de los exones también está muy conservada.

A partir de los datos disponibles en las bases de datos, se ha logrado predecir *in silico* la localización subcelular de las Gpxs de Lotus, así como otras propiedades (tabla 1.4).

**Tabla 1.4** Predicción de las propiedades de las Gpxs de Lotus (*Adaptada de Ramos et al.*, 2009).

Proteína	Longitud (aa)*	Peso molecular (kDa)*	pl*	TP (aa)†	Localización subcelular	UniProt ‡
LjGpx1	236 (156)	26,2 (17,3)	8,78 (5,58)	80	Mito / clorop	Q56VU1
LjGpx2	171	19,4	5,28	-	Cit	I3T8U1
LjGpx3	211 (167)	24,2 (18,9)	7,61 (7,59)	44	Secrec (cit)	Q56VS3
LjGpx4	170	19,0	9,58	-	Cit	I3S0Y9
LjGpx5	171	19,1	9,37	-	Cit	I3SK85
LjGpx6	235	26,3 (18,6)	9,01 (7,85)	71	Clorop	I3T0Y0

\* Longitud (número de aminoácidos), peso molecular y punto isoeléctrico (pl) deducidos de las ORF. Los valores para las proteínas maduras se indican entre paréntesis.

† Péptidos señal (TP de sus siglas en inglés) (número de aminoácidos) y localizaciones subcelulares (mito, mitocondria; secrec, secretoria; cit, citosol; clorop, cloroplasto).

‡ Número de accesión en la base de datos *Universal Protein Resource* ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

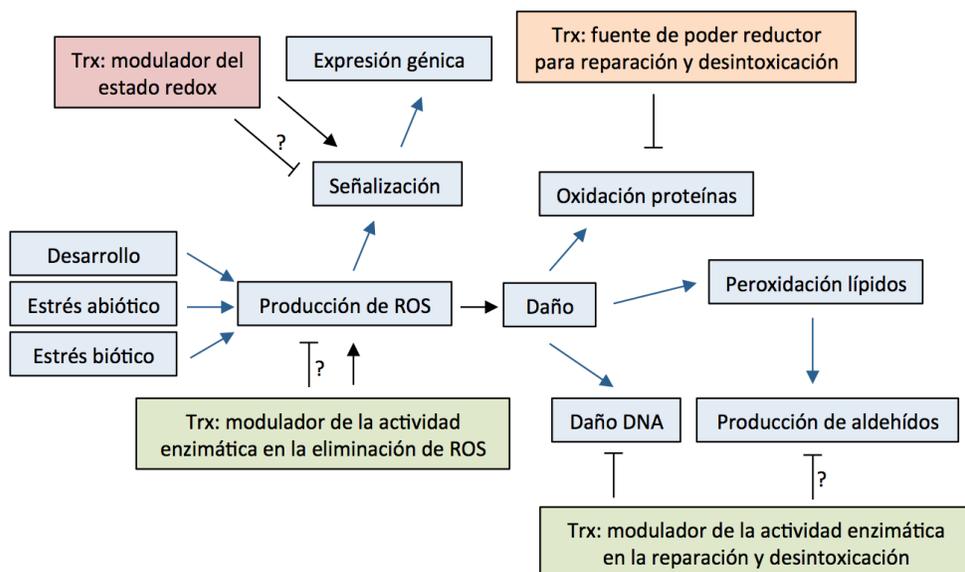
## 1.5 Tiorredoxinas

Las Trxs fueron descritas por primera vez en 1964, junto a las NADPH tiorredoxina reductasas (NTRs), como el sistema de transferencia de poder reductor a la ribonucleótido reductasa (Laurent *et al.*, 1964). En algunos organismos, esta última enzima es la única vía de producción de desoxirribonucleótidos, por lo que su función es fundamental para la división celular. Posteriormente, se descubrió su función como reguladores de la fijación de carbono durante la fotosíntesis (Buchanan, 1980). Además, las Trxs citosólicas participan en la movilización de las reservas de la semilla durante la germinación (Wong *et al.*, 2002), y otras Trxs tienen funciones muy específicas, como la HCF164 en la síntesis del citocromo *b<sub>6</sub>f* en Arabidopsis (Lennartz *et al.*, 2001).

En plantas las Trxs se clasifican en varios grupos según sus secuencias y localización en cloroplastos (*m*, *f*, *x*, *y*, *z*), citosol o floema (*h*) y mitocondrias (*o*).

Dependiendo de su localización son reducidas por diferentes sistemas donadores de electrones: en tejidos no fotosintéticos y en el citosol de células fotosintéticas los electrones provienen del NADPH y son reducidas por las NTRs, mientras que las Trxs de cloroplastos y de procariontas fotosintéticos son reducidas con electrones que provienen de la cadena de transporte de electrones fotosintética, por medio de la ferredoxina-Trx reductasa (FTR).

Las Trxs tienen una gran cantidad de proteínas diana, relacionadas con todo tipo de procesos metabólicos (Montrichard *et al.* 2009). En la figura 1.16 se representa de forma esquemática la participación de las Trxs en la respuesta frente al estrés oxidativo.

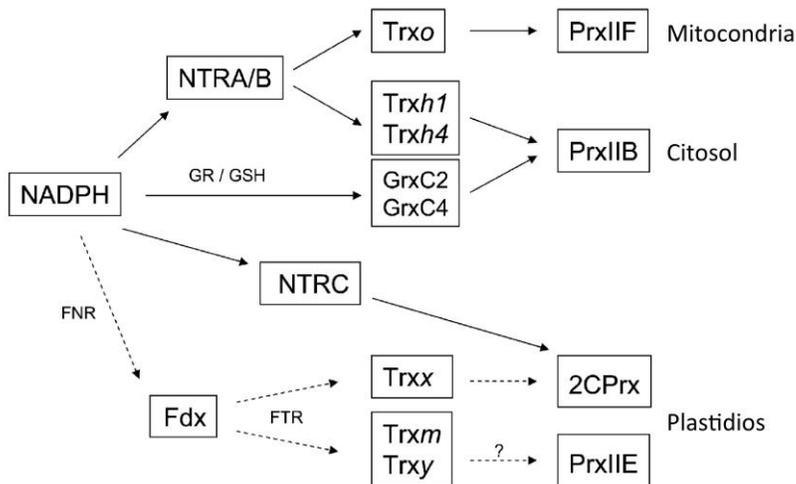


**Figura 1.16** Modelo de la participación de las Trxs en las respuestas frente a estrés oxidativo en plantas. El modelo representa las distintas funciones que pueden tener las Trxs: (1) fuente de poder reductor necesario para desintoxicar los hidroperóxidos de lípidos y para reparar las proteínas; (2) regulación de la actividad de enzimas implicadas en mecanismos de desintoxicación y reparación; (3) control del estado *redox* de los componentes implicados en rutas relacionadas con el estrés oxidativo y regulación de la expresión génica. Las flechas azules indican rutas ligadas a oxidación durante el desarrollo o estrés oxidativo. Las flechas negras indican las funciones confirmadas o posibles (señaladas con interrogante) de las Trxs. (Adaptado de Vieira Dos Santos y Rey, 2006).

**1.5.1 Tiorredoxinas en *Lotus japonicus***

En el genoma de Lotus se han identificado 14 genes que codifican seis isoformas de *Trxh*, tres de *Trxm*, y una isoforma de *Trxf*, *Trxx*, *Trxy*, *Trxz* y *Trxo*, siendo *LjTrxh4* la que muestra mayores niveles de expresión en nódulos (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). En otra leguminosa modelo, *M. truncatula*, se ha descrito una nueva *Trx*, denominada *s*, localizada en el retículo endoplasmático, que parece estar implicada en el proceso de nodulación (Alkhalfioui *et al.*, 2008). Sin embargo, no se han encontrado genes homólogos a *Trxs* en otras leguminosas analizadas.

También se han caracterizado tres genes de Lotus que codifican NTRs: *NTRA*, *NTRB* y *NTRC* (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). En la figura 1.17 se representan los sistemas NTR-Trx que funcionan en el nódulo y sus proteínas diana.



**Figura 1.17** Modelo de los sistemas *redox* NTR-Trx y sus probables Prx diana en las mitocondrias, citosol y plastidios de las células del nódulo. Se indica también un posible sistema FTR-Trx de plastidios en línea discontinua. FNR, ferredoxina-NADP reductasa; Fdx, ferredoxina; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión. (Adaptado de Tovar-Méndez *et al.*, 2011).

## **2. OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

1. Determinar la función de las glutatión peroxidasas en los nódulos de leguminosas.
  - 1.1. Caracterizar bioquímicamente las dos glutatión peroxidasas (LjGpx1 y LjGpx3) más abundantes en los nódulos de Lotus.
  - 1.2. Determinar posibles modificaciones postraduccionales e investigar su efecto en la actividad biológica.
  - 1.3. Estudiar la implicación de LjGpx1 y LjGpx3 en la respuesta al estrés abiótico y en mecanismos de señalización mediados por fitohormonas y óxido nítrico.
  - 1.4. Producir anticuerpos altamente específicos frente a LjGpx1 y LjGpx3.
  - 1.5. Localizar LjGpx1 y LjGpx3 en las células y tejidos de los nódulos utilizando diferentes aproximaciones experimentales.
2. Estudiar la familia de las tioredoxinas (Trxs) en Lotus y determinar la función de la isoforma mitocondrial Trxo en el establecimiento y funcionamiento de la simbiosis.
  - 2.1. Identificar y caracterizar los genes que codifican Trxs.
  - 2.2. Determinar las dianas moleculares de Trxs de nódulos.
  - 2.3. Producción de Trxo (isoforma mitocondrial) recombinante.
  - 2.4. Determinar la función de Trxo en las leguminosas mediante el uso de plantas transgénicas (RNAi) y mutantes *knockout* deficientes en Trxo.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



## **3 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Reactivos químicos**

Los reactivos utilizados para las soluciones nutritivas fueron de grado analítico de Panreac (Barcelona). Las soluciones se prepararon con agua desionizada por ósmosis inversa, mientras que para los ensayos bioquímicos y de biología molecular se utilizó agua MilliQ (Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU). La procedencia de la mayoría de los reactivos bioquímicos fue de Sigma-Fluka (St. Louis, MO, EEUU), y fueron de la máxima calidad disponible. Las referencias de los reactivos empleados figuran en el texto, entre paréntesis, junto a cada producto.

### **3.2 Material biológico, tratamientos y condiciones de cultivo**

#### **3.2.1 Plantas**

Las semillas de Lotus (*Lotus japonicus* ecotipos MG-20 o Gifu B-129) se escarificaron con papel de lija para favorecer su germinación, se esterilizaron con una solución de hipoclorito sódico 2,5% durante 20 min, se lavaron con abundante agua desionizada estéril y se dejaron en agua y en oscuridad durante 1 h a 37°C para que se embebiesen. Tras comprobar que las semillas habían doblado su volumen, se realizó otro lavado con agua desionizada estéril, se transfirieron a placas Petri con agar 0,5%

### 3. Material y métodos

---

(p/v), se incubaron a 4°C durante 48 h para sincronizar su germinación, y se germinaron a 28°C en oscuridad durante 3 días.

#### **Crecimiento en macetas**

Las plántulas de Lotus (MG-20) se transfirieron a macetas de 1 L de capacidad, utilizando como sustrato vermiculita de dos grosores diferentes. Las tres cuartas partes inferiores de la maceta se rellenaron con vermiculita de tamaño 1-4 mm. La parte superior se rellenó con vermiculita más fina (0,5-3 mm), para favorecer un entorno suficientemente húmedo para la raíz en sus primeros días. Las macetas fueron regadas dos días por semana con solución nutritiva B&D (Broughton y Dilworth, 1971) suplementada con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,25 mM. Las plantas crecieron en una cámara de cultivo de ambiente controlado, con las siguientes condiciones: 23°C/18°C día/noche (16 h de fotoperiodo), 70% de humedad relativa y  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa, suministrada por una mezcla de lámparas fluorescentes (Sylvania WHO 'coolwhite', 215 w y Sylvania GROLUX F30 w).

Siete días después de la germinación (cuatro días después de transferir las plántulas a las macetas) se inocularon con 1 mL de cultivo líquido de *Mesorhizobium loti* R7A, y se dejaron crecer durante el tiempo necesario para cada experimento.

#### **Crecimiento en cultivo hidropónico**

Las plántulas de Lotus (MG-20) se transfirieron a placas Petri (10 cm x 10 cm) con medio sólido Fahraeus modificado (Boisson-Dernier *et al.*, 2001) y siete días después de la germinación se inocularon con cultivo líquido de *M. loti* R7A (100-200  $\mu\text{L}$  por raíz). Dos días después de la inoculación, las plántulas se transfirieron a contenedores de polipropileno de 5 L de capacidad (33 cm x 19 cm x 11 cm). Para el cultivo hidropónico se utilizaron 4 L de solución nutritiva B&D sin nitrógeno combinado diluida cuatro veces en agua desionizada. La solución se renovó cada 3-4 días y se mantuvo su aireación utilizando un compresor de aire para acuarios 'Rena Air' 200 (Chalfont, EEUU) con un caudal de 160 L/h y una potencia de 4 w.

Las plantas crecieron en una cámara de cultivo de ambiente controlado con las condiciones descritas anteriormente.

### 3.2.2 Tratamientos

Todos los tratamientos se realizaron en plantas de Lotus (MG-20).

#### Tratamiento con fitohormonas

Los tratamientos se hicieron en plantas de 44 días de edad crecidas en medio hidropónico. Las plantas se trataron durante 48 h con 50  $\mu$ M de ácido abscísico (ABA), salicílico (SA), jasmónico (JA), 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, precursor del etileno) y citoquininas (CKs). El control consistió en añadir a las plantas el mismo compuesto en el que está disuelta cada hormona.

Las soluciones stock de los compuestos (todos los reactivos de Sigma) fueron: 0,5 M de CKs (mezcla equimolar de kinetina y 6-bencilaminopurina) en NaOH 1 M; 0,1 M de ABA, ACC y SA en etanol absoluto, y 0,1 M de JA en dimetilsulfóxido.

#### Tratamiento con NaCl o cadmio

El tratamiento se hizo en plantas de 46 días de edad crecidas en maceta. Las plantas se regaron con NaCl 150 mM o CdCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ M en agua desionizada y se cosecharon sus nódulos a las 0 h, 24 h, 48 h y 4 días. El tratamiento control se hizo con agua desionizada.

#### Tratamiento con S-nitrosoglutatión

El tratamiento se hizo en plantas de 46 días de edad crecidas en maceta. Las plantas se transfirieron a matraces Erlenmeyer con 250 mL de tampón HEN [HEPES 100 mM (pH 8,0); EDTA 1mM; neocuproína 0,1 mM] diluido 10 veces y suplementado con GSNO 5 mM. Los matraces se protegieron de la luz y las plantas fueron tratadas durante 6 h. El tratamiento control se hizo con 250 mL de tampón HEN diluido 10 veces y suplementado con glutatión oxidado (GSSG) 5 mM.

#### 3.2.3 Microorganismos

##### Rizobios

Las plántulas de Lotus (MG-20) se inocularon con *M. loti* R7A. Los rizobios crecieron en medio líquido preparado a base de manitol y extracto de levadura (Vincent, 1970) a 28°C en agitación a 125 rpm durante 2 días.

Las plántulas de Lotus (Gifu), procedentes de los experimentos de transformación por *Agrobacterium rhizogenes*, se inocularon con *M. loti* MAFF303099 con el marcador *DsRed* (Singh *et al.*, 2014). Los rizobios crecieron en medio líquido preparado a base de manitol y extracto de levadura (Vincent, 1970) suplementado con gentamicina a 28°C en agitación a 125 rpm durante 3-4 días.

##### *Escherichia coli*

Las células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (TOP10 y BL21) crecieron en medio líquido Luria-Bertani (LB) a 37°C en agitación a 200 rpm en un incubador orbital (New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, EEUU). En el caso de células transformadas, se añadió el antibiótico de resistencia correspondiente a cada caso. La selección de células transformadas se hizo en placas Petri con medio sólido LB con el antibiótico de resistencia. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h.

##### Levaduras

Los ensayos con levaduras se realizaron empleando la cepa silvestre de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 y su mutante de triple delección *gpx1 $\Delta$ /2 $\Delta$ /3 $\Delta$*  (*MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$  $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0 gpx1::URA3 gpx2::His3MX6 gpx3::KanMX6*). Estas células crecieron en medio *rich yeast extract-peptone-dextrose* (YPD) o en medio mínimo SD (Guthrie y Fink, 1991) complementado con los requerimientos nutricionales de cada cepa.

### 3.3 Análisis de la expresión génica

#### 3.3.1 Extracción de RNA

El material utilizado para la extracción de RNA total fue previamente esterilizado en un autoclave a 120°C durante 30 min. El material no apto para autoclave se limpió con NaOH 1 M. La extracción se realizó utilizando el *RNAqueous Isolation Kit* (Ambion, Carlsbad, California, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA aislado se incubó con 15 U de DNasa I (Roche, Penzberg, Alemania) durante 30 min a 37°C. Posteriormente, la DNasa se inactivó con EDTA 10 mM (pH 8,0) a 75°C durante 10 min. La ausencia de contaminación con DNA genómico se confirmó mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR) del RNA aislado, utilizando oligonucleótidos frente a *ubiquitina* (tabla 3.1) tal y como se describe en el apartado 3.3.3. El RNA se conservó a -80°C hasta su uso.

**Tabla 3.1** Oligonucleótidos empleados para el análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia
QLjGpx1 Fw	ACTATGGCTGCCCCACAT
QLjGpx1 Rv	TCTGGCATCTTTGACGGTGA
QLjGpx3 Fw	TGGGAAGAATGCAGAACCACT
QLjGpx3 Rv	CCCCCTTCTGATCCTTCAAA
QLjTrxo Fw	AGCTTGTAGGCGCTGATGTT
QLjTrxo Rv	CAGCCATTCCCAAAGTCAGT
QLjUbiq Fw	TTCACCTTGTGCTCCGTCTTC
QLjUbiq Rv	AACAACAGCACACACAGACAA
QLjeIF4A Fw	AGAGGGTTTAAAGATCAAAT
QLjeIF4A Rv	ATGTCAATTCATCACGTTTT
QLjPP2A Fw	TGAGCTATGTGAAGCTGTTGGT
QLjPP2A Rv	CAGCCTCATTATCACGCAGTAG

#### 3.3.2 Síntesis de cDNA

Para sintetizar el cDNA a partir del RNA extraído, se incubaron 20 µL de RNA con 2 µL de oligo-dT (CTCGAGGATCCGCGGCCG(T)<sub>20</sub>) 10 µM (Invitrogen, Waltham, Massachusetts) durante 10 min a 65°C, poniendo la mezcla en hielo inmediatamente después de la incubación. Tras la unión del oligo-dT, se incubó la mezcla con 1 µL de *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (MMLV-RT; 200 U/µL;

### 3. Material y métodos

---

Promega, Madison, Wisconsin, EEUU); 10  $\mu\text{L}$  de tampón MMLV-RT 5x; 2  $\mu\text{L}$  de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs, Invitrogen) 25 mM; 0,25  $\mu\text{L}$  de inhibidor de RNasa y agua milliQ esterilizada hasta completar un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , durante 1 h a 42°C. El cDNA sintetizado se cuantificó mediante qRT-PCR utilizando *ubiquitina* como gen control (tabla 3.1), de la forma descrita en el siguiente apartado.

#### 3.3.3 Cuantificación de cDNA mediante qRT-PCR

La cuantificación de cDNA se realizó con un equipo 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, California, EEUU). Los oligonucleótidos se diseñaron con el software *Primer Express v2* (Applied Biosystems). El cDNA utilizado en la reacción se diluyó hasta obtener un  $C_t$  (*threshold cycle*) de *ubiquitina* de ~18 ciclos. La mezcla de reacción contenía 5  $\mu\text{L}$  del reactivo *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, Hercules, California, EEUU), 2,5  $\mu\text{L}$  de la mezcla de oligonucleótidos (sentido y antisentido) 3  $\mu\text{M}$  (tabla 3.7), 1  $\mu\text{L}$  de cDNA y 4  $\mu\text{L}$  de agua milliQ estéril.

El programa de PCR consistió en un primer paso de desnaturalización del cDNA y activación de la *Taq* polimerasa a 95°C durante 5 min, seguido de 50 ciclos con un paso a 95°C durante 15 s y otro de 1 min a 60°C, tras el cual se midió la emisión del fluoróforo *SYBR-Green* en cada ciclo. La especificidad de los oligonucleótidos se determinó realizando una curva de desnaturalización. Los datos se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de cDNA de las muestras control, a los que se les asignó arbitrariamente el valor de 1, utilizando el método de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak y Schmittgen, 2001). La estabilidad de la expresión del gen de la *ubiquitina* durante los tratamientos se confirmó utilizando otros genes de referencia, *eIF4A* (*eukaryotic initiation factor 4A*) y *PP2A* (subunidad de la Ser/Thr proteína fosfatasa 2A).

### 3.4 Expresión y purificación de proteínas de plantas en *Escherichia coli*

#### 3.4.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar los ORFs (*Open Reading Frame* o marco abierto de lectura) de las diferentes proteínas, añadiendo CACC en el oligonucleótido sentido para su clonaje direccional en el vector pET200 TOPO (Invitrogen). Se tuvo en cuenta la predicción de la localización subcelular de las proteínas y se diseñaron los oligonucleótidos de forma que amplificaran la región codificante sin las secuencias de direccionamiento subcelular, en el caso de que las hubiese, para que la proteína purificada fuera la versión madura. Las secuencias de los oligonucleótidos se muestran en la tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Oligonucleótidos empleados para la clonación en pET200 TOPO/pENTR D-TOPO

Oligonucleótido	Secuencia
LjGpx1 Fw	CACCATGGCTGCCCCACAT
LjGpx1 Rv	TCATGCACCCAACAATTCAC
LjGpx3 Fw	CACCATGGCTGAACAAACCT
LjGpx3 Rv	TCAAGAAGATTGTAAGAGCT
LjTrxh4WT Fw	CACCATGGGCGGAGTCCTCTCT
LjTrxh4WT Rv	CTAAGCTCGGAGCTGCTCA

#### 3.4.2 Amplificación del fragmento de interés

La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo mediante PCR con una DNA polimerasa de alta fidelidad (*proofreading*) PfuUltra II (Agilent, Santa Clara, California, EEUU). La reacción, con un volumen final de 50  $\mu$ L, consistió en 5  $\mu$ L de tampón comercial 10x; dNTPs 0,2  $\mu$ M; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; *primer forward* 0,3  $\mu$ M; *primer reverse* 0,3  $\mu$ M; 1  $\mu$ L de cDNA y 1  $\mu$ L de DNA polimerasa (2,5 U). Se utilizó un termociclador PTC-200 (*Peltier Thermal Cycler* – Bio-rad) con el siguiente programa: 30 s a 94°C, 39 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 55°C y 1 min a 72°C, seguidos de un ciclo de elongación de 30 min a 72°C. Para comprobar la amplificación del fragmento, se cargó

### 3. Material y métodos

la reacción de PCR en un gel de agarosa 1%. La banda de tamaño correcto se cortó y se purificó con el kit *Agarose Gel DNA Extraction* (Roche).

#### 3.4.3 Clonaje del fragmento de interés

El clonaje del fragmento de interés se llevó a cabo utilizando el *Champion pET200 Directional TOPO Expression Kit*.

En primer lugar se realizó la *TOPO cloning reaction*. En ella se mezclaron 1  $\mu\text{L}$  de producto de PCR purificado, 1  $\mu\text{L}$  de *Salt Solution*, 3  $\mu\text{L}$  de agua estéril y 1  $\mu\text{L}$  de vector TOPO (fig 3.1). Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente e inmediatamente se puso en hielo.

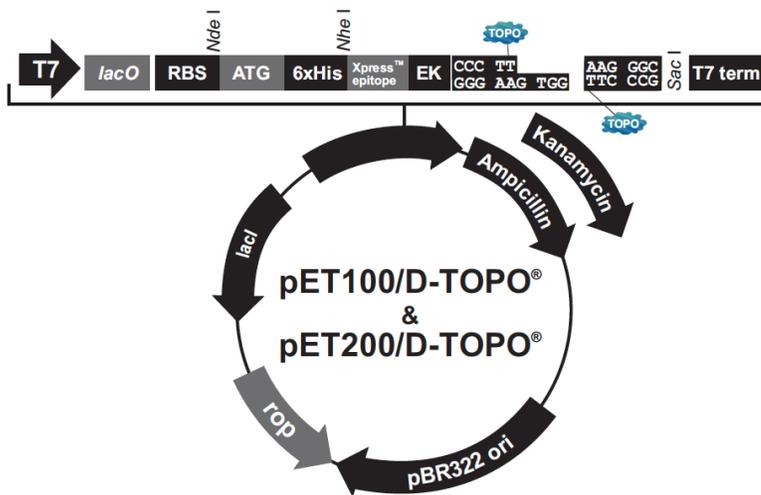


Figura 3.1 Mapa del vector pET200/D-TOPO.

#### 3.4.4 Transformación de células competentes

Una vez clonado el fragmento de interés en el vector, se transformaron células quimio-competentes *One Shot TOP10*. Para ello, se añadieron 3  $\mu\text{L}$  de la *TOPO cloning reaction* a un vial de células. Se mezcló con cuidado y se incubó en hielo entre 5 y 30 min. Tras la incubación, se sometió a las células a un choque térmico de 42°C durante 30 s. Se añadieron 250  $\mu\text{L}$  de medio SOC [medio SOB (Hanahan, 1983) suplementado con glucosa 20 mM] al vial y se incubó durante 1 h a 37°C en agitación a 200 rpm. Tras la incubación, el cultivo se sembró en medio LB sólido con el antibiótico kanamicina. Se dejó crecer a 37°C durante una noche y se procedió a analizar los transformantes.

### 3.4.5 Análisis de los transformantes

Para comprobar la adecuada transformación de las células competentes y determinar si la secuencia del inserto era la correcta, se procedió a analizar las colonias obtenidas. Para ello, se seleccionaron algunas colonias para extraer el plásmido y comprobar el inserto mediante un análisis de restricción. Una vez comprobado, se secuenció para verificar la exactitud de la secuencia de nucleótidos. Con la confirmación de la secuencia, se procedió a transformar las células competentes de *E. coli* BL21 Star (DE3) One Shot con 7 ng de plásmido mediante choque térmico a 42°C como se describió anteriormente.

### 3.4.6 Expresión piloto

Se seleccionó una colonia de células BL21. Se inocularon 3 mL de medio LB con kanamicina y las bacterias crecieron a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 10 mL de medio LB con kanamicina con 500 µL del cultivo anterior y se incubó a 37°C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una  $DO_{600nm}$  de 0,5-0,8. Se dividió el cultivo en dos partes de 5 mL. Se añadió isopropilo-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, concentración final de 1 mM) a uno de los cultivos dejando el otro sin inducir. Se centrifugó una alícuota de 500 µL de cada cultivo a máxima velocidad 30 s, se eliminó el sobrenadante y se congeló el pellet a -20°C. Se continuó la incubación de los cultivos y se tomaron alícuotas de 500 µL cada hora durante 4-6 h.

Una vez obtenidos los pellets de los cultivos inducidos y sin inducir, se procedió a su lisis. Para ello, las bacterias se resuspendieron en 500 µL de tampón de lisis [ $KP$  ( $K_2HPO_4 + KH_2PO_4$ ) 50 mM (pH 7,8); NaCl 400 mM; KCl 100 mM], se sonicaron 6 x 30 s, con 30 s de descanso entre pulso y pulso, con un sonicador Ultrasonic Processor XL (Misonix, Farmingdale, New York, EEUU), y se centrifugaron a 17000 *g* x 2 min. Se transfirió el sobrenadante (fracción soluble) a un tubo limpio y se guardó el pellet (fracción insoluble) a -20°C. La proteína soluble se determinó por el método de Bradford (1976), utilizando el micro-ensayo de Bio-Rad. Además, se corrió un gel desnaturizante de poliacrilamida (ver 3.6.2) con 20 µg de proteína total de cada muestra. Tras la electroforesis, se tiñó el gel con reactivo *Coomassie brilliant blue* R-250 [0,05% (p/v) en 40% etanol, 10% ácido acético] durante 30 min y se destiñó con

### 3. Material y métodos

---

etanol 40%-ácido acético 10%. Se determinó el tiempo de inducción necesario para la máxima expresión de cada proteína y se utilizó en los experimentos a mayor escala para purificar las proteínas recombinantes.

#### 3.4.7 Purificación de las proteínas recombinantes

El pellet de células BL21 con el inserto de interés se obtuvo tras centrifugar 8 L de cultivo a 7000  $g \times 10$  min (rotor JLA 10500). Se resuspendió en tampón A1 [KP 50 mM (pH 8,0); NaCl 300 mM; imidazol 40 mM], se congeló-descongeló y se sonicó con pulsos de 30 s, con 30 s de descanso entre pulsos, durante 20 min. Se repitió el proceso hasta que se observó el cambio de consistencia de viscoso a líquido. Se centrifugó a 20000  $g \times 20$  min y se procedió a purificar la proteína a partir del sobrenadante.

Para ello, se utilizó una columna *HiTrap Chelating HP* (Roche). Primero, se cargó la columna con  $\text{NiSO}_4$  0,1 M, ya que la cola de His N-terminal que contienen las proteínas recombinantes tiene afinidad por  $\text{Ni}^{2+}$ . Seguidamente, se pasó el extracto de proteínas por la columna y, posteriormente, se hizo un lavado con tampón A1. Tras el lavado, se eluyeron las proteínas recombinantes con tampón A2 (tampón A1 con imidazol 250 mM). La proteína eluida se concentró con *Vivaspin 2 Centrifugal Concentrators* (MW 10,000; Sartorius, Goettingen, Alemania), sustituyendo el tampón A2 por el adecuado para cada experimento.

### 3.5 Complementación de levaduras

#### 3.5.1 Construcción del vector y transformación de levaduras

##### Clonaje del fragmento de interés

Para la construcción de vectores de expresión de nuestras proteínas de interés en levaduras se utilizó el *pENTR/D-TOPO Cloning Kit* (Invitrogen). Al ser un vector D-TOPO, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el ORF de la proteína de interés (tabla 3.2) de la misma forma que en el caso del pET200. El proceso de clonaje y transformación de células competentes Top10 se describió anteriormente (ver 3.4.3-3.4.5).

Una vez comprobada la fidelidad del inserto, se procedió a introducirlo en el vector de expresión de levaduras pAG425GDP-ccdB. Para ello, se utilizó la *GATEWAY LR Clonase II Enzyme Mix* (Invitrogen). En un tubo eppendorf, a temperatura ambiente, se mezclaron 150 ng de vector pENTR/D-TOPO con nuestro fragmento de interés y 150 ng del vector destino (pAG425GDP-ccdB) en tampón TE [Tris 10 mM (pH 8,0); EDTA 1 mM]. A continuación, se añadió la *LR Clonase* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras se incubaron a 37°C durante 10 min.

La reacción anterior (1 µL) se utilizó para transformar células competentes Top10 (ver 3.4.4) que crecieron en placas Petri con medio LB suplementado con ampicilina. Se seleccionó una de las colonias, se creció en cultivo líquido (LB) y se realizó la extracción de DNA plasmídico.

#### **Transformación de levaduras**

El vector pAG425GDP con el fragmento de interés se utilizó para transformar la cepa de levadura mutante. Para ello, se utilizó el método del litio acetato-polietilenglicol (Gietz y Woods, 2002). En primer lugar, se preparó el *Single-stranded Carrier DNA (SS-Carrier DNA, 2 mg/mL)*. Se resuspendieron 200 mg de DNA de esperma de salmón (Sigma) en 100 mL de tampón TE y se incubaron en agitación durante 1-2 h a 4°C. El DNA se desnaturalizó hirviendo durante 5 min y enfriando inmediatamente en hielo. Por otro lado, se crecieron las levaduras en medio SD líquido. Se centrifugaron 2 mL de cultivo, se descartó el sobrenadante y se añadieron al pellet los componentes de la mezcla de transformación en este orden: 240 µL de PEG3350 (50% p/v), 36 µL de acetato de litio 1 M, 50 µL de *SS-carrier DNA* y 34 µL de plásmido (0,1-1 µg). Se incubó durante 40-60 min a 42°C, se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 s y se eliminó la mezcla de transformación. Se añadió 1 mL de agua milliQ estéril y se resuspendieron las células.

#### **3.5.2 Tratamientos de estrés**

Los ensayos de crecimiento se realizaron en medio sólido. Para ello, se hicieron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) de cada pre-cultivo líquido en placas de 96 pocillos, en condiciones de esterilidad. Con un replicador manual (Sigma) se transfirió una gota (~3 µL) de cada dilución a las placas con cada tratamiento (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3. Material y métodos

---

500  $\mu\text{M}$ ; *t*-butilhidroperóxido 30  $\mu\text{M}$ ; NaCl 0,9 M; ácido linolénico 1,5 mM y cafeína 16 mM). Tras la absorción de las gotas, las placas se incubaron a 28°C entre dos y cinco días.

El análisis del crecimiento diferencial entre las distintas colonias de levadura se realizó según el tamaño y la mayor dilución en la que se observaba crecimiento. Las fotografías de las placas fueron tomadas en un transiluminador Uvitec (Cambridge, Reino Unido).

#### 3.5.3 Lisis de levaduras

Una vez crecidas, las levaduras se cosecharon con asa de siembra, se resuspendieron en PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM) y se liofilizaron para su conservación. Para extraer las proteínas, se resuspendió el material liofilizado en PBS y se centrifugó a 20000 *g* x 10 min a 4°C. Se repitió este lavado tres veces, se eliminó el sobrenadante, se añadieron tres bolas de 3 mm de diámetro a cada tubo eppendorf sobre el pellet seco y se congeló en nitrógeno líquido. Una vez congelados, los tubos se agitaron en un molino de bolas MM400 (Retsch, Haan, Alemania), con una frecuencia de 30 Hz durante 30 s. Se congelaron otra vez en nitrógeno líquido y se repitió el proceso tres veces. Posteriormente, se resuspendieron los pellets junto a las bolas en 125  $\mu\text{L}$  de tampón de lisis [Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), DMSO 1%, NaCl 50 mM, EDTA 1 mM, 1 pastilla de cóctel de inhibidores de proteasas *Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets*, Roche] y se agitaron en el molino con una frecuencia de 30 Hz durante 3 min. Los tubos se enfriaron en hielo y se repitió la agitación otras dos veces. Se sacaron las bolas de los tubos eppendorf y se centrifugó la muestra a 20000 *g* x 10 min. Se recogió el sobrenadante y se midió la concentración de proteína.

### 3.6 Electroforesis

#### 3.6.1 Geles de agarosa

Las bandas de DNA se separaron por electroforesis a 100 V en geles de agarosa 1% (p/v) en tampón TAE [Tris 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA (pH 8,0) 1

mM], con *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen) como agente de tinción. Una vez separadas, las bandas se visualizaron en un *Molecular Imager GelDOC XR Imaging System* (Bio-Rad).

### 3.6.2 Geles desnaturalizantes

Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE, *polyacrylamide gel electrophoresis*) de 0,75 mm de espesor con un Mini-Protean III (Bio-Rad). En la tabla 3.3 se indica la composición de los geles.

**Tabla 3.3** Composición de los geles de poliacrilamida

	<b>Gel concentrador (4%)</b>	<b>Gel separador (15%)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,59 mL	1,48 mL
<b>AA/Bis 40%</b>	0,41 mL	1,52 mL
<b>Tampón separador</b>	-	1 mL
<b>Tampón concentrador</b>	1 mL	-
<b>Temed</b>	4 µL	4 µL
<b>APS 10%</b>	40 µL	40 µL

Tampón separador: Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8); SDS 0,4%

Tampón concentrador: Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8); SDS 0,4%

Temed: *N,N,N,N'*-tetrametilnediamina

APS: Persulfato de amonio

Las muestras se mezclaron con tampón de carga 5x [Tris-HCl 250 mM (pH 6,8); glicerol 50% (v/v); SDS 5% (p/v); azul de bromofenol 0,05 % (p/v); DTT 250 mM], se desnaturalizaron en agua hirviendo durante 10 min y se enfriaron inmediatamente en hielo para evitar la renaturalización. El tampón de electroforesis consistió en Tris 25 mM Gly 192 mM y SDS 1% (p/v). Para controlar el progreso de la electroforesis, y la posterior transferencia, se utilizaron marcadores de peso molecular *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range* (Bio-Rad). Los geles se corrieron durante ~90 min a 100 V.

### 3.6.3 Análisis western

Una vez resuelto el gel, las proteínas se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF; Pall Corporation, Port Washington, New York, EEUU) en frío durante 75 min a 100 V en un tampón Tris 25 mM, Gly 192 mM y etanol 20% (v/v). La membrana se tiñó con Ponceau S (Sigma) para comprobar la correcta transferencia de las proteínas y, a continuación, se bloqueó durante un mínimo de 1 h

### 3. Material y métodos

---

a 4°C con leche desnatada en polvo 5% (p/v) en TTBS [Tris 20 mM; NaCl 0,5 M; Tween-20 0,05% (v/v)]. Tras el bloqueo, se hizo un lavado de la membrana con TTBS.

El anticuerpo primario se diluyó en TTBS y la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en un agitador orbital Polymax 2040 (Heidolph, Schwabach, Alemania). Después, se realizaron tres lavados con TTBS de 5, 10 y 15 min. El anticuerpo secundario se diluyó en TTBS con leche desnatada en polvo 5%, la membrana se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en agitación y se hicieron tres lavados con TTBS de 5, 10 y 15 min.

Para la detección de las bandas de proteína, la membrana se incubó con el reactivo *Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU) durante 5 min a temperatura ambiente, según las instrucciones del fabricante, y se expuso en oscuridad a una película fotográfica *CL-Xposure Blue X-ray Film* (Pierce). El revelado de la película se realizó en un baño de revelador Ilfosol 3 (Ilford, Knutsford, Reino Unido) durante 3 min, seguido de un baño de paro en agua y un baño de fijador *Rapid Fixer* (Ilford) durante 3 min.

## 3.7 Actividades enzimáticas

### 3.7.1 Actividad glutatión peroxidasa

Se midió la variación de absorbancia a 340 nm, correspondiente a la desaparición de NADPH, durante 10 min. Se utilizó como dador de electrones la *Trxh1* de *Populus tremula* y como sustratos, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, *t*-butil-hidroperóxido e hidroperóxido de cumeno. La reacción se realizó en Tris-HCl 30 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM a 25°C. Se anotaron los valores de la pendiente de la recta.

### Síntesis de hidroperóxido de fosfatidilcolina

Para comprobar la capacidad de las LjGpxs para reducir peróxidos complejos derivados de lípidos, se sintetizó hidroperóxido de fosfatidilcolina. Se hizo reaccionar desoxicolato de sodio 3 mM, fosfatidilcolina 0,3 mM y 0,1 mg de lipoxigenasa tipo IV de soja en borato de sodio 0,3 M (pH 9,0) durante 3-4 h en agitación a temperatura ambiente. A continuación, se equilibró una columna C18 Sep-Pak (Waters, Mildorf, Massachusetts, EEUU) con agua. Se cargó la muestra y se lavó con 10 volúmenes de

agua. El peróxido de fosfatidilcolina se eluyó con 1+1 mL de metanol y se almacenó a -20°C.

Para medir la concentración de peróxido de fosfatidilcolina sintetizado se utilizó el método de Wolff (1994). A continuación, se midió la actividad tiorredoxina peroxidasa de LjGpx1 y LjGpx3 siguiendo el método descrito anteriormente y utilizando este peróxido como sustrato.

#### 3.7.2 Actividad tiorredoxina

La medida de la actividad de las Trxs se realizó con el método de la insulina (Chi *et al.*, 2008) en la siguiente mezcla de reacción: KP 100 mM (pH 7,0); EDTA 1 mM; 0,5 mg insulina; DTT 0,5 mM y 1-10 µg Trx. Se midió el aumento de absorbancia a 650 nm durante 60 min a temperatura ambiente. Como control negativo se utilizaron 10 µg de BSA y como control positivo 0,5 µg de Trx de *E. coli* (Sigma).

La insulina en polvo se disolvió en KP 50 mM (pH 7,0). Se añadió HCl hasta su completa disolución y se subió el pH con KOH hasta 7,0.

#### 3.7.3 Actividad monodeshidroascorbato reductasa

La medida de la actividad MR de arroz (Wang y Hargrove, 2013) se realizó midiendo el consumo de NADH a través de la disminución de la absorbancia a 340 nm en 1 mL de la siguiente mezcla de reacción: KP 50 mM (pH 8,0); NADH 0,2 mM; ácido ascórbico 3 mM; ascorbato oxidasa 0,125 U/mL; MR 1,22 µM. Se hicieron dos controles (sin MR y sin ascorbato oxidasa).

### 3.8 Detección de S-nitrosilación

#### 3.8.1 *Switch* de biotina

Se incubaron 90 µg de proteína recombinante purificada con GSNO 1 mM en tampón HEN durante 1 h en oscuridad, a 37°C en un agitador a 700 rpm. El exceso de GSNO se eliminó añadiendo 4 volúmenes de acetona fría y precipitando las proteínas durante, al menos, 1 h a -20°C. Tras centrifugar a 17000 *g* x 10 min, 4°C, el pellet se

### 3. Material y métodos

---

lavó 2 veces con 1 mL de acetona fría. Finalmente, la acetona residual se eliminó secando el pellet a 37°C durante 20 min.

Los residuos de Cys libres se bloquearon con N-etilmaleimida 100 mM (NEM) en tampón HEN y 2,5% SDS. Las muestras se incubaron a 37°C en oscuridad durante 1 h en agitación. El exceso de reactivos se eliminó mediante precipitación y lavados con acetona fría.

Posteriormente, se procedió al marcaje con biotina. Para ello, el pellet seco se resuspendió en 240 µL de tampón HENS (HEN+ 1%SDS) y se añadieron 30 µL de *biotin-HPDP* 2,5 mg/mL (Pierce). La reacción de marcaje se inició con 30 µL de ascorbato sódico 200 mM. Como control negativo se utilizó la misma concentración de NaCl. Las muestras se incubaron a 37°C, 700 rpm, en oscuridad durante 1 h. El exceso de reactivos se eliminó como se describió anteriormente y la S-nitrosilación se analizó mediante inmunodetección de biotina por *western blot* (ver apartado 3.6.3).

Las muestras se cargaron en un gel SDS-PAGE utilizando un tampón de carga libre de reductores y, tras la electroforesis, se transfirieron a una membrana. Se utilizó un anticuerpo anti-biotina (Sigma) 1:10000. El bloqueo de la membrana se realizó con BSA 2% en tampón TTBS.

#### 3.8.2 Método de Saville-Griess

Las proteínas recombinantes (225 µg) se nitrosilaron con GSNO como se describe en el apartado anterior. Una vez eliminado el exceso de GSNO, los pellets se resuspendieron en 250 µL de HENS. La mitad de la muestra se mezcló con 125 µL de solución A [sulfanilamida 1% (p/v) en HCl 0,5 M] y la otra mitad con 125 µL de solución B [solución A + HgCl<sub>2</sub> 0,2% (p/v)]. Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se añadieron 250 µL de solución C [*N*-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato 0,02% (p/v) en HCl 0,5 M]. Transcurridos 5 min, se determinó la A<sub>540</sub> de cada muestra en un espectrofotómetro. La concentración de S-NO se calculó restando la A<sub>540</sub> de las muestras en solución A (nitrito) de la A<sub>540</sub> de muestras en solución B (nitrito + S-NO). Los valores de absorbancia se compararon con los de una recta patrón hecha con diferentes concentraciones de GSNO.

### 3.8.3 *Switch* de histidina

La incubación con GSNO y derivatización de tioles con NEM se realizó de la misma forma que se ha descrito para el *switch* de biotina. La biotina se reemplazó por el péptido I-CH<sub>2</sub>-CO-Gly-Arg-Ala-(His)<sub>6</sub> (Camerini *et al.*, 2007). Tras una incubación de 1 h a 37°C y 700 rpm en oscuridad, las proteínas se dializaron en NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10 mM, se concentraron y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight*).

### 3.8.4 Purificación de proteínas biotiniladas

Las plantas noduladas se trataron con GSNO como se indica en el apartado 3.2.2. Se cosecharon los nódulos, se hizo un extracto de proteínas en tampón HEN con SDS 0,2% e inhibidores de proteasas y se realizó el *switch* de biotina. El pellet con las proteínas marcadas se resuspendió en *binding buffer* [HEPES 25 mM (pH 7,7); EDTA 1 mM; NaCl 100 mM; Triton X-100 0,8%]. Posteriormente, se añadieron 50 µL de estreptavidina-agarosa (Sigma) a la resuspensión. Las muestras se incubaron durante toda la noche a 4°C, se centrifugaron a 2500 *g* x 2 min y se realizaron diez lavados con un tampón que contenía HEPES 25 mM (pH 7,7); EDTA 1 mM; NaCl 600 mM y Triton X-100 0,8%. Las proteínas biotiniladas se extrajeron de la resina hirviendo las muestras durante 10 min en tampón de carga 1x [Tris-HCl 50 mM (pH 6,8); glicerol 10%; SDS 1%; azul de bromofenol 0,01%; DTT 50 mM]. Se centrifugó a 17000 *g* x 10 min, el sobrenadante se cargó en un gel SDS-PAGE y se analizó mediante análisis *western blot* utilizando los anticuerpos frente a LjGpx1 o LjGpx3.

## 3.9 Producción de anticuerpos frente a proteínas de plantas

Se generaron anticuerpos frente a proteínas recombinantes. Las proteínas se sobreexpresaron, purificaron y se enviaron a un servicio comercial (BioGenes, Berlin, Alemania) para producir anticuerpos policlonales monoespecíficos. Se inmunizaron dos conejos con ~1 mg de proteína cada uno y se obtuvieron los correspondientes antisueros.

### 3. Material y métodos

---

Se utilizaron ≈6 mg de proteína recombinante para preparar una columna de afinidad *CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow* (Ge Healthcare, Freiburg, Alemania) y las IgGs monoespecíficas se eluyeron con tampón Gly-HCl 200mM; NaCl 250 mM (pH 2,2). El eluido se ajustó inmediatamente a pH 7,5 con tampón Tris-HCl 2 M.

Los anticuerpos obtenidos se purificaron mediante técnicas de inmunoadsorción para descartar la presencia de anticuerpos específicos frente a proteínas de *E. coli* que pueden aparecer como contaminantes durante el proceso de purificación. Para ello, se inocularon 4 L de medio LB líquido con una muestra de *E. coli* BL21. Se centrifugó y se resuspendió el pellet en KP 50 mM pH (8,0); NaCl 300 mM; Imidazol 40 mM. Se procedió de la misma forma que se describe en el apartado 3.4.8. para la purificación de proteínas recombinantes. Tras varios lavados, las proteínas de *E. coli* BL21 que permanecieron retenidas en la columna se eluyeron con imidazol 250 mM, se dializaron en KP 20 mM (pH 7,0) y se centrifugaron en concentradores *VivaSpin 2*. A la fracción obtenida la denominamos Ecoli250. Posteriormente, se incubó un exceso de 60 veces de proteína Ecoli250 con el anticuerpo en un volumen de 250 µL (1 mg IgG/mL = 1,35 OD<sub>280</sub>), en agitación suave a 4°C durante toda la noche. Tras la incubación, se centrifugó a 21000 g x 10 min a 4°C y se recogió el sobrenadante.

## 3.10 Localización de transcritos y de proteínas de plantas

### 3.10.1 Hibridación *in situ*

#### Composición de las soluciones

En la tabla 3.4 se muestra la composición de las soluciones empleadas en la hibridación *in situ*.

**Tabla 3.4** Soluciones empleadas en la hibridación *in situ*.

Solución o tampón	Composición
Solución estabilizadora de microtúbulos	Ácido piperazina-1,4-bis(2-etanosulfónico) 50 mM Ácido etilenglicol-bis-(2-aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético 5 mM MgSO <sub>4</sub> 5 mM pH 7,0 con KOH
Solución salina	NaCl 0,85 % p/v

### 3. Material y métodos

---

TBS 10x	Tris-HCl 1 M (pH 7,5) NaCl 1,5 M
Tampón sustrato 10x	Tris-HCl 1 M (pH 9,8) NaCl 1 M
Tampón Pronasa 20x	Tris-HCl 1 M (pH 7,5) EDTA 0,1 M
Solución Pronasa	Pronasa 0,13 mg/mL en tampón Pronasa 1x
PBS 10x	NaCl 1,3 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 70 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 30 mM pH 6,5-7,0
Solución anhídrido acético	Trietanolamida 1,25% (v/v) HCl 0,5% (v/v) Anhídrido acético 0,5% (v/v)
Solución de sales 10x	NaCl 3 M Tris-HCl 0,1 M NaPO <sub>4</sub> 0,1 M EDTA 50 mM
Tampón de prehibridación	Solución salina 10x 1,25% (v/v) Formamida 50% (v/v) Sulfato de dextrano (50%) 2,5% (v/v) Solución Denhardt's 50x 0,25% (v/v)
Tampón de hibridación	Solución salina 10x 1,25% (v/v) Formamida 50% (v/v) Sulfato de dextrano (50%) 2,5% (v/v) tRNA 100 mg/mL 0,13% (v/v) Solución Denhardt's 50x 0,25% (v/v)
SSC 10x	NaCl 3 M Citrato sódico 0,3 M
NTE 10x	NaCl 5 M Tris-HCl 100 mM (pH 7,5) EDTA 10 mM
Tampón de anticuerpos	BSA 1% (p/v) Triton X-100 0,3% (v/v) En tampón TBS 1x
Solución de tinte (10 mL)	9,7 mL tampón sustrato 1x 250 µL MgCl <sub>2</sub> 2 M 15 µL NTB 100 mg/mL 33 µL BCIP 50 mg/mL
Solución de revelado	777 µL tampón sustrato 19 µL MgCl <sub>2</sub> 2M 1 µL NTB (100 mg/mL en <i>N,N</i> -dimetilformamida 70%) 3 µL 5-bromo-4-cloro-3-indoilo-fosfato (50 mg/mL

---

#### **Fijación de los nódulos**

Se cosecharon nódulos de plantas de Lotus (MG-20) cultivadas en maceta 45 días desde la inoculación con el rizobio. Los nódulos se fijaron a 4°C durante toda la noche con agitación suave por balanceo en paraformaldehído 4% disuelto en solución estabilizadora de microtúbulos, Tritón X-100 (0,1%) y Tween-20 (0,1%).

#### **Deshidratación de los nódulos**

Se hizo una primera incubación con solución salina durante 30 min, dos incubaciones de 3 h con etanol 50% y 70% en solución salina y una incubación en etanol 85% en solución salina durante toda la noche. Posteriormente, se incubó con etanol 95% en agua destilada durante 4 h y se finalizó con dos incubaciones con etanol absoluto, una durante 4 h y otra durante toda la noche.

#### **Tinción e inclusión en parafina**

Tras la deshidratación, se procedió a la tinción de los nódulos. Para ello, se incubaron a temperatura ambiente con agitación suave en etanol absoluto durante 2 h, en solución con eosina [1,6 µL de eosina Y (Sigma) en 100 mL de etanol absoluto: Histo-Clear II, 1:1 (v/v)] 1 h y en Histo-Clear II 100% durante 1 h tres veces.

La inclusión en parafina se realizó a 60°C en placas Petri. Se realizó una incubación durante toda la noche en Histo-Clear II: Paraplast X-Tra 1:1 (v/v). Durante el día siguiente se fue sustituyendo el Histo-Clear II por Paraplast X-Tra fundido cada media hora y, durante 3 días más, dos veces al día. Los nódulos se colocaron en moldes desechables *Peel-A-Way* (Ted Pella, California, EEUU) con Paraplast X-tra, se dejaron a temperatura ambiente hasta que solidificó la parafina y se guardaron a 4°C hasta su utilización.

#### **Obtención de las secciones de nódulos**

Se hicieron secciones de 10 µm del bloque de parafina utilizando un microtomo Leica RH 2155 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se depositaron sobre una gota de agua en un portaobjetos *Superfrost Plus* (ThermoFisher Scientific,

Braunschweig, Alemania) de 25 x 75 mm y 1 mm de grosor. Los portaobjetos se depositaron sobre una placa a 42°C para evaporar la gota de agua y facilitar que las secciones se adhriesen al portaobjetos.

### Diseño y síntesis de las sondas

El diseño de las sondas se hizo a partir de las secuencias del cDNA de LjGpx1 y LjGpx3. Las secuencias se alinearon con ClustalW y se determinaron fragmentos de 208 y 197 pb para LjGpx1 y LjGpx3, respectivamente, que presentaban baja homología con el resto de Gpxs de Lotus.

Los fragmentos se amplificaron utilizando oligonucleótidos diseñados con *OligoPerfect Designer* (Life Technologies, Carlsburg, California, EEUU). Se añadió la secuencia del promotor T7 al oligonucleótido sentido y antisentido (tabla 3.5).

**Tabla 3.5** Secuencia de los oligonucleótidos para la síntesis de sondas de RNA.

Oligonucleótido	Secuencia
LjGpx1_F	TCTGTACTCGCATCTTGTTCCTTCT
LjGpx1_R	TGATCTGGTCTGAGAGTGAAAGAG
LjGpx3_F	AGTTGTTGACTTTCTGGAATTGG
LjGpx3_R	ACTCACATCATTTCACGGAT
LjGpx1_T7_F	ATTATGCTGAGTGATATCCCCTCTGTACTCGCATCTTGTTCCTTCT
LjGpx1_T7_R	ATTATGCTGAGTGATATCCCCTGATCTGGTCTGAGAGTGAAAGAG
LjGpx3_T7_F	ATTATGCTGAGTGATATCCCAGTTGTTGACTTTCTGGAATTGG
LjGpx3_T7_R	ATTATGCTGAGTGATATCCCCTCACATCATTTCACGGAT

Las secuencias que sirvieron como moldes para sintetizar las sondas de RNA fueron amplificadas con la combinación de oligonucleótidos descrita en la tabla 3.6.

**Tabla 3.6** Combinación de oligonucleótidos para amplificar la secuencia de cada sonda RNA.

Sonda	Oligonucleótidos
LjGPX1 sense	LjGPX1_T7_F / LjGPX1_R
LjGPX1 antisense	LjGPX1_F / LjGPX1_T7_R
LjGPX3 sense	LjGPX3_T7_F / LjGPX3_R
LjGPX3 antisense	LjGPX3_F / LjGPX3_T7_R

Las sondas marcadas se sintetizaron utilizando el *DIG RNA Labeling Kit* y la eficacia de la síntesis se comprobó con el *DIG Nucleic Acid Detection Kit* (Roche). Las sondas se congelaron a -20°C hasta su uso.

#### **Hibridación *in situ***

La hibridación *in situ* se realizó en el sistema automatizado InsituProVS (Intavis, Colonia, Alemania). En primer lugar, se hizo el pretratamiento de las secciones a temperatura ambiente. Se hicieron dos incubaciones con Histo-Clear II de 10 min para eliminar la parafina, y luego un paso por etanol absoluto para retirar los restos de Histo-Clear II. Después, se procedió a la hidratación del tejido incubando 5 min con etanol 90%, 80%, 60%, 50% y 30% en solución salina, con una incubación final de 10 min en solución salina. A continuación, las secciones se incubaron durante 5 min en tampón de Pronasa 1x y se trataron con la solución de Pronasa durante 10 min. La reacción se paró con dos incubaciones en PBS de 2 min cada una.

Para mejorar la preservación del tejido, las secciones se incubaron en formaldehído 4% en PBS durante 30 min. Se lavaron tres veces durante 2 min con PBS y se incubaron en una solución de anhídrido acético durante 10 min. Después, se hicieron dos lavados con PBS, seguidos de un lavado de 2 min con solución salina. Por último, el tejido volvió a deshidratarse mediante lavados de 2 min con etanol 30%, 50%, 80%, 90% en solución salina y un lavado final en etanol absoluto.

En la fase de hibridación, todas las reacciones se realizaron a una temperatura de 50°C y todos los reactivos se prepararon utilizando agua desionizada autoclavada. Los portaobjetos con las secciones se lavaron durante 10 min con solución de sales 1x. Posteriormente, cada portaobjetos se preincubó durante 30 min con 250 µL de tampón de prehibridación. A continuación, se calentó la sonda a 80°C durante 5 min y se enfrió en hielo. Se añadieron 5 µL de sonda a 220 µL de tampón de hibridación, se colocó sobre las secciones y se llevó cabo la hibridación con la sonda durante 14 h.

Para eliminar la solución de hibridación, se lavó tres veces (30, 60 y 60 min) a 50°C con formamida:SSC 1x 1:1 (v/v). Después, se lavó tres veces con tampón NTE durante 5 min a 37°C, se llevó a cabo una digestión con RNasaA 20 µg/mL en tampón NTE durante 30 min a 37°C y, a continuación, se hicieron nuevamente dos lavados de 5 min con el tampón. Se incubó de nuevo durante 1 h a 50°C con formamida:SSC 1x 1:1 (v/v). Finalmente, se hizo un lavado de 5 min a temperatura ambiente con SSC 1x.

Tras los lavados, se procedió a la incubación con el anticuerpo a temperatura ambiente. En primer lugar, se hicieron tres lavados de 5 min con tampón TBS y se incubó durante 30 min con el *Blocking Reagent* (Roche), 0,5% en TBS. A continuación,

se hizo un lavado de 30 min con el tampón del anticuerpo y se incubó durante 90 min con 0,5 µL/mL del anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina *Anti-digoxigenin-AP fab fragments* (Roche). La reacción se paró con cinco lavados de 5 min en TBS. Se equilibraron las secciones lavando en tampón sustrato durante 5 min.

La señal se visualizó incubando cada portaobjetos con 800 µL de solución de revelado durante 2,5 h a temperatura ambiente. A continuación, la reacción se paró con agua y se realizaron incubaciones de 2 min en etanol 40%, 50%, etanol absoluto, 70%, 40% y agua destilada. Las secciones se tiñeron con Azul Alcian 8GX (Sigma-Fluka) para la contra-coloración. Se pasaron los portaobjetos por el colorante y se lavaron tres veces con agua destilada. Las secciones se dejaron secar protegiéndolas de la luz y, una vez secas, se añadieron 150 µL de solución neutra de poliestireno y plastificantes en xileno (DPX; Sigma-Fluka) y se montaron los cubreobjetos. Las secciones se observaron con un microscopio invertido Leica DMI6000 B provisto de una cámara Leica DFC 350 FX.

#### **3.10.2 Inmunolocalización**

La inmunolocalización de las LjGpx se realizó según se describe en Rubio *et al.*, (2009). Los nódulos de Lotus (MG-20) se fijaron en paraformaldehído 4% y glutaraldehído 0,1% y se deshidrataron en etanol, bajando progresivamente la temperatura desde 0 a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron incluidas en la resina LR White durante 2 días a -20°C. La resina se polimerizó usando radiación ultravioleta durante 24 h a -20°C y durante otras 24 h a 16°C. Todas estas etapas fueron realizadas en un equipo automatizado de *freeze-substitution* Leica AFS2 (Leica Microsystems). Se obtuvieron secciones ultrafinas de las muestras, que fueron incubadas con cada anticuerpo purificado por inmunoadsorción diluido 1:10 durante 1h. A continuación, se lavaron y se incubaron con partículas de 15 nm de oro conjugadas con la proteína A (BBInternational, Cardiff, Reino Unido) durante 1 h. Las secciones se fotografiaron usando un microscopio de transmisión electrónica JEM 1400 (JEOL, Akishima, Tokyo, Japón). La inmunolocalización de las LjGpx se realizó en colaboración con el Dr. E. K. James (The James Hutton Institute, Invergowrie, Reino Unido).

#### 3.10.3 Fusión con GFP y transformación de protoplastos

Se diseñaron oligonucleótidos (tabla 3.7) para amplificar los ORFs de las proteínas LjGpx1 y LjGpx3, manteniendo las secuencias correspondientes a los péptidos señal. El fragmento resultante se clonó en el vector pENTR utilizando el *pENTR/D-TOPO Cloning Kit* (Invitrogen). Tras el clonaje, se transfirió el fragmento al vector pGWB5 (Nakagawa *et al.*, 2007) por medio de la LR clonase II (ver 3.5.1).

**Tabla 3.7** Oligonucleótidos utilizados para el clonaje en el vector pGWB5.

Oligonucleótido	Secuencia
LjGpx1 Fw	CACCATGCTCTGTACTCGCATC
LjGpx1 Rv	TGCACCCAACAATTTACCA
LjGpx3 Fw	CACCATGCAGTTGTTGACTTTC
LjGpx3 Rv	AGAAGATTGTAAGAGCTTCT

Se aislaron protoplastos del mesófilo de hojas de *Arabidopsis*. Para ello, se cortaron las hojas en tiras de 1 mm y se infiltraron en vacío durante 3 min con solución enzimática [celulasa R10 1,5% (p/v); maceroenzima R10 0,4% (p/v) (Serva, Alemania); manitol 0,4 M; MES 20 mM (pH 5,7); KCl 20 mM; CaCl<sub>2</sub> 10 mM; BSA 0,1% (p/v)]. Los protoplastos se resuspendieron en solución de lavado [NaCl 154 mM; KCl 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 125 mM; manitol 0,4 M; MES 2 mM (pH 5,7)].

Para la transfección, se añadieron 5 µg de plásmido a 100-300 µL de suspensión de protoplastos en solución manitol-MgCl<sub>2</sub> [manitol 0,4 M; MgCl<sub>2</sub> 15 mM; MES 4 mM (pH 5,7)] y 120 µL de solución PEG [PEG-4000 40% (p/v); manitol 0,2 M; CaCl<sub>2</sub> 0,1 M]. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, se añadieron 0,5 mL de solución de lavado y se incubó otros 15 min. Tras repetir el paso anterior, se añadieron 2 mL de solución de lavado y se incubó durante 15 min. Finalmente, se añadieron 4 mL de solución de lavado y se incubó a 25°C durante 24-30 h.

La localización subcelular se determinó con un microscopio confocal (LSM 780, Zeiss, Alemania), con una longitud de onda de excitación de 488 nm (GFP y clorofila) y de emisión de 499-535 nm (GFP) y 650-700 nm (clorofila).

Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Prof. Karl-Josef Dietz, de la Universidad de Bielefeld (Alemania).

### 3.10.4 Transformación y expresión en *Nicotiana*

Se transformó *Agrobacterium tumefaciens* con el vector pGWB5 conteniendo la secuencia de LjGpx1 o LjGpx3 (ver apartado anterior). Se inocularon 5 mL de medio YEB (extracto de levadura 1 g/L; extracto de carne 5 g/L; peptona 5 g/L; sacarosa 5 g/L; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,5 g/L; pH 7,0) con antibiótico, se crecieron una noche a 28°C, 200 rpm, se tomaron 1,5 mL y se centrifugaron a 1000 g, 10 min a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de infiltración (250 mg D-glucosa; 5 mL MES 500 mM; 5 mL Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 20 mM; 5 mL acetosiringona 1M; para un volumen de 50 mL en agua destilada). Se diluyó el cultivo en medio de infiltración hasta obtener una OD<sub>600nm</sub> de 0,01-0,1 en un volumen de 0,5-5 mL. La infiltración se realizó en plantas de *Nicotiana benthamiana* crecidas en cámara de crecimiento en condiciones normales. Las plantas se pusieron bajo luz fluorescente una hora antes de la infiltración para maximizar la apertura de los estomas. Se eliminó con cuidado la capa de ceras de la cutícula del envés de la hoja y se marcó el sector con bolígrafo. Se tomó 1 mL de muestra de *Agrobacterium* con jeringuilla (sin aguja), se puso en la zona marcada del envés de la hoja y se presionó suavemente, observándose la difusión del líquido por el mesófilo. Las plantas se crecieron en condiciones normales y cada 24 horas durante 4-5 días se cortaron 1-2 cm<sup>2</sup> de hoja y se examinó la expresión utilizando un microscopio LSM780 axio observer de Zeiss.

## 3.11 Identificación de proteínas diana de tiorredoxinas

### 3.11.1 Obtención de LjTrxh4WT recombinante

El clonaje, sobreexpresión y purificación de la proteína LjTrxh4WT se realizó según se describe en el apartado 3.4.

### 3.11.2 Obtención de LjTrxh4MUT recombinante

La versión mutada de LjTrxh4, en la cual se sustituyó la segunda Cys del motivo conservado WCGPC por una Ser, se obtuvo mediante mutagénesis dirigida. Para ello, se seleccionó una zona de 25 pb alrededor de la base a mutar y se diseñaron

### 3. Material y métodos

oligonucleótidos específicos (Trxh4MUT Fw y Trxh4MUT Rv, tabla 3.8) con el fin de sustituir la T en posición 178 de la ORF por A. Además, se diseñaron cebadores específicos para amplificar la secuencia de la proteína WT (Trxh4WT Fw y Trxh4WT Rv, ver tabla 3.2). En primer lugar, se realizaron dos PCRs paralelas utilizando como molde el plásmido pET200Trxh4WT, una utilizando los oligonucleótidos Trxh4WT Fw y Trxh4MUT Rv, y otra utilizando Trxh4MUT Fw y Trxh4WT Rv. En segundo lugar, se realizó una *overlap extension PCR* usando como molde una mezcla a partes iguales de los productos de las primeras PCRs y los oligonucleótidos utilizados para amplificar la secuencia completa (Trxh4WT Fw y Trxh4WT Rv). Así se obtuvo como producto la secuencia completa T178A que codifica la proteína mutada. Finalmente, esta secuencia se clonó en el vector pET200 para la posterior sobreexpresión de la proteína de la forma descrita en los apartados 3.4.3-3.4.8.

**Tabla 3.8** Oligonucleótidos específicos para la mutagénesis dirigida.

Oligonucleótidos	Secuencia
LjTrxh4MUT Fw	TGGTGC GGGCCGAGCCGGTTCATAG
LjTrxh4MUT Rv	CTATGAACCGGCTCGGCCCGCACCA

#### 3.11.3 Preparación de la columna de afinidad

En primer lugar, se dializaron 7 mg de LjTrxh4WT y LjTrxh4MUT frente a 1 L de NaHCO<sub>3</sub> y se transfirieron a un tubo falcon de 15 mL. Para preparar la columna de afinidad, se pesaron 2,5 g de *CNBr-activated Sepharose* (GE-Healthcare), se resuspendieron en HCl 1 mM, se lavaron con 200 mL de HCl 1 mM en vacío y con 500 mL de NaHCO<sub>3</sub> 50 mM. Se dividió el gel resultante en dos porciones, que se añadieron a los tubos falcon que contenían las proteínas. Éstos se incubaron con agitación horizontal a temperatura ambiente durante ~2 h. Tras la incubación, el contenido de los tubos se vació en dos soportes de columna y se dejó compactar por gravedad. A continuación, se realizó un lavado con NaHCO<sub>3</sub> 50 mM y se cargaron 10 mL de Tris-HCl 1 M (pH 8,0). Las columnas se cerraron y se incubó 1-2 h para bloquear los grupos activos restantes. Posteriormente, las columnas se lavaron con 10 mL de tampón TE al que se le añadió DTT 2 mM para reducir las proteínas. Después, las columnas se lavaron abundantemente con tampón TE para eliminar los restos de DTT. Para

comprobar que el DTT se había eliminado completamente, se añadieron 10  $\mu$ L de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 10 mM a 500  $\mu$ L de eluido y se comprobó que no mostraba color amarillo.

#### **3.11.4 Preparación de los extractos de proteínas de nódulos de Lotus**

Los extractos se hicieron en mortero, en tampón TE al que se le añadió cóctel de inhibidores de proteasas. Una vez hecho el extracto, se centrifugó y se midió la concentración de proteína en el sobrenadante.

#### **3.11.5 Obtención de las proteínas diana**

En cada columna se cargaron 25-40 mg de proteína. El extracto pasó varias veces por la columna, ya que se dejó reciclando durante toda la noche con ayuda de una bomba peristáltica (Bio-Rad). A continuación, se realizó un lavado con 30 mL de tampón TE, seguido de otro con 30 mL de tampón TE + NaCl 0,5 M. Tras los lavados, las proteínas del extracto pegadas a las proteínas de las columnas se eluyeron con tampón TE + DTT 10 mM.

#### **3.11.6 Identificación de las proteínas diana**

Las proteínas obtenidas (~2  $\mu$ g de proteína) se identificaron por medio de cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS) equipado con una fuente de ionización microelectrospray (Velos LTQ, Thermo Scientific).

### **3.12 Obtención de plantas transgénicas. Silenciamiento de Trxo mediante RNA interferente (RNAi)**

#### **3.12.1 Diseño, amplificación y clonaje del fragmento RNAi**

A partir de la secuencia de cDNA que codifica la proteína que queremos silenciar, LjTrxo, se seleccionaron dos fragmentos específicos de 250 pb con baja homología con otras LjTrxs. Se diseñaron oligonucleótidos para su amplificación (tabla

### 3. Material y métodos

---

3.9) y se clonaron en el vector pENTR/D-TOPO de la forma descrita en los apartados 3.4.3-3.4.5.

**Tabla 3.9** Oligonucleótidos para el clonaje de fragmentos de RNAi.

Oligonucleótidos	Secuencia
Trxo RNAi1 Fw	CACCCGTAAACCCTAAACCCCGAT
Trxo RNAi1 Rv	GGAGGGAGGAGAGTGGAGG
Trxo RNAi2 Fw	CACCTGACGGCCCATGAAGTACA
Trxo RNAi2 Rv	TTCTTTTCATATATAAAAAAGCATCACG

Se comprobó la fidelidad del inserto mediante secuenciación, se purificó el DNA plasmídico y se linealizó con la enzima de restricción *EcoRV*. La secuencia de interés se introdujo en el vector pUB\_GWS\_GFP por medio de la *LR Clonase II*, de la forma descrita en el apartado 3.5.1. La fidelidad y la correcta orientación del inserto se comprobaron mediante secuenciación.

#### **3.12.2 Transformación de *Agrobacterium rhizogenes***

Se utilizaron células electrocompetentes de *A. rhizogenes* LBA1334 (resistente a rifampicina y espectomicina). Se añadió 1 µL de plásmido a una cubeta de electroporación con una alícuota de células electrocompetentes en hielo. Se utilizó un electroporador *GenePulser II* (Bio-Rad) con los siguientes parámetros: capacitancia 25 µF; voltaje 1,8 V; resistencia 400 Ω y un pulso de 5-10 ms. Tras la electroporación, se añadieron 100 µL de medio líquido SOC y se incubó durante 1 h a 28°C en agitación a 200 rpm. Finalmente, las células se cultivaron en placas Petri con medio LB con los antibióticos de selección rifampicina, estreptomycin y kanamicina, y se dejaron crecer a 28°C.

#### **3.12.3 Obtención de plantas transgénicas por el sistema de *hairy roots***

Las plantas con raíces y nódulos transgénicos se obtuvieron siguiendo los protocolos descritos por Díaz *et al.* (2005).

**Medios de cultivo**

En la tabla 3.10 se muestra la composición de los medios de cultivo utilizados para la obtención de plantas transgénicas.

**Tabla 3.10** Composición de los medios de cultivo para *hairy roots*.

<b>SOLUCIÓN</b>	<b>COMPOSICIÓN (1L)</b>	
<b>Jensen</b>	CaHPO <sub>4</sub>	1,0 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	NaCl	0,2 g
	FeCl <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,1 g
	Solución elementos traza	2,5 mL
	Agar	9 g
<b>Solución elementos traza</b>	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	35,4 mg
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	609,0 mg
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	97,4 mg
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1269,0 mg
	NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	398,0 mg
<b>HRE (<i>hairy roots emergence</i>)</b>	Sales SH-A 20x	50 mL
	Vitaminas UM-C 20x	50 mL
	Sacarosa	10 g
	MES 1 M	3 mL
	Agar	9 g
	pH 5,8 con KOH	
<b>Sales SH-A 20x</b>	KNO <sub>3</sub>	50 g
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8 g
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4 g
	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,2 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,1 g
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02 g
	KI	0,02 g
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,004 g
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,002 g
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,002 g
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3 g
	NaEDTA	0,4 g
<b>Vitaminas UM-C 20x</b>	Mioinositol	2,0 g
	Ácido nicotínico	0,1 g
	Piridoxina HCl (vitamina B6)	0,2 g
	Tiamina HCl	0,2 g
	Glicina	0,04 g

#### **Crecimiento de las plantas**

La esterilización y germinación de las semillas de Lotus (Gifu) fue como se describe en el apartado 3.2.1. Una vez germinadas, las plántulas se expusieron a la luz durante 4 h para permitir la expansión de los cotiledones y facilitar la eliminación de la cubierta de la semilla. A continuación, se transfirieron a placas Petri con medio Jensen suplementado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,5 mM con un papel de filtro estéril en su superficie. El papel se humedeció con el mismo medio y la placa se cerró con una doble capa de plástico *Parafilm* en su mitad inferior, y con esparadrapo *Leukopor* en su mitad superior. Las placas se colocaron en una bandeja, se cubrió la parte inferior con una cartulina negra para proteger las raíces de la luz y se mantuvieron durante 2 días en una cámara de cultivo de ambiente controlado con las siguientes condiciones: 23°C/18°C día/noche (16 h de fotoperiodo), 70% de humedad relativa y  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de radiación fotosintéticamente activa, suministrada por una mezcla de lámparas fluorescentes (Sylvania WHO *coolwhite*, 215 w, y Sylvania GROLUX F30 w).

#### **Infección con *Agrobacterium rhizogenes***

En primer lugar, se inocularon las distintas cepas de *A. rhizogenes* (WT LBA1334, LBA + plásmido pUB-GWS-GFP-RNAi y LBA + plásmido pUB-GWS-GFP vacío) en placas Petri con medio sólido LB con sus correspondientes antibióticos de selección. Se dejaron crecer a 28°C, de forma que el día de la infección hubieran crecido en forma de césped por toda la placa.

Las plántulas se infectaron una a una, arrastrando parte del cultivo de *Agrobacterium* con la punta doblada de una pipeta Pasteur estéril y colocándolo en la zona del hipocótilo. Una vez infectadas, se cortó la raíz desde la zona del hipocótilo con una hoja de bisturí estéril, se humedeció la placa con medio Jensen líquido suplementado con  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1,5 mM y se cerró como se describió anteriormente.

Las plántulas y el *Agrobacterium* se cocultivaron durante 5 días en la cámara de cultivo de ambiente controlado, protegiendo la parte radicular de la luz con cartulinas de color negro.

### **Crecimiento de las raíces *hairy-roots***

Las plántulas infectadas se transfirieron a placas Petri (10 x 10 cm) con medio sólido HRE suplementado con 300 mg/L de cefotaxima, con papel de filtro estéril en su superficie. Para asegurar una humedad elevada, las plántulas se cubrieron con papel de filtro estéril humedecido con medio líquido HRE suplementado con 300 mg/L de cefotaxima, dejando sin cubrir los cotiledones y el meristemo apical. Las placas se cerraron de la forma habitual y se mantuvieron durante 12 días en cámara de cultivo de ambiente controlado.

### **Nodulación de las raíces transgénicas**

Las plantas que presentaron raíces transgénicas se transfirieron a macetas y se inocularon con *M. loti* MAFF303099 como se describe en el apartado 3.2.1. Las macetas se cubrieron con plástico para mantener la humedad. Tras una semana de crecimiento, se procedió a la aclimatación de las plantas a la humedad relativa de la cámara, haciendo pequeños agujeros en el plástico todos los días durante una semana, tras la cual se retiró el plástico y se crecieron normalmente.

### **Análisis de las raíces transgénicas y sus nódulos**

Las raíces transgénicas noduladas se observaron 21 días después de la inoculación con la ayuda de una lupa Leica DFC420C.

### **Análisis del grado de silenciamiento del gen de *LjTrxo* en las raíces transgénicas**

Se analizó la expresión del mRNA de *LjTrxo* en una muestra de cada lote de raíces transgénicas (y los diferentes controles) mediante qRT-PCR (ver 3.3.3).



## **4. RESULTADOS**



## 4 RESULTADOS

### 4.1 Sobreexpresión y purificación de LjGpx1 y LjGpx3

Trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro laboratorio mostraron que los genes que codifican LjGpx1 y LjGpx3 tienen una elevada expresión en los nódulos de Lotus (Ramos *et al.*, 2009). Además, el análisis transcriptómico reveló que el nivel de mRNA de LjGpx3 en nódulos es 6,8 veces superior al de raíces no infectadas (Colebatch *et al.*, 2002). Por esta razón, en esta tesis nos propusimos investigar en profundidad la función de estas dos LjGpxs en la simbiosis rizobio-leguminosa.

Para ello, se clonaron los genes y se sobreexpresaron las proteínas recombinantes de ambas LjGpxs. En un estudio preliminar, se analizó *in silico* la posible localización subcelular de las dos proteínas utilizando diversas herramientas informáticas, tal y como se muestra en la tabla 4.1. De acuerdo con los resultados obtenidos, LjGpx1 se localiza probablemente en las mitocondrias y/o cloroplastos y LjGpx3 en el retículo endoplásmico y ruta secretora. Por otra parte, el análisis bioinformático indicó que ambas proteínas contienen un péptido señal que podría desestabilizar su expresión en *E. coli*. Por lo tanto, se diseñaron cebadores para amplificar las secuencias que codifican las proteínas maduras teóricas. En el caso de LjGpx1, se eliminaron 72 aminoácidos del N-terminal y se consideró una segunda Met en posición 73 como el inicio de la proteína madura. En cuanto a LjGpx3, se estimó

#### 4. Resultados

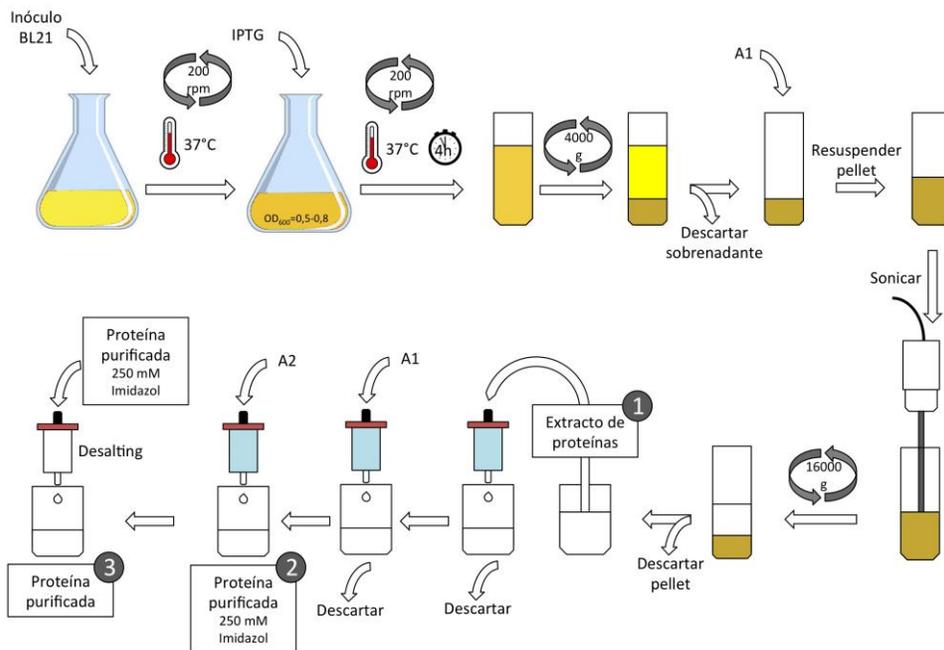
que la proteína madura comienza en la Met-45, por lo que se eliminaron los 44 aminoácidos anteriores.

**Tabla 4.1** Posible localización subcelular de LjGpx1 y LjGpx3 según las herramientas de análisis de predicción subcelular ChoroP (Emanuelsson *et al.*, 1999), MitoProt (Claros y Vincens, 1996), Predotar (Small *et al.*, 2004), SignalP (Emanuelsson *et al.*, 2007), TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2007) y PSORT (Nakai y Horton, 1999). *Abreviaturas:* Clor, cloroplasto; RE, retículo endoplasmático; Mit, mitocondria; Secr, ruta secretoria.

		PROGRAMA DE PREDICCIÓN SUBCELULAR					
		ChloroP	MitoProt	Predotar	SignalP	Target P	PSORT
LjGpx1	Localización	Clor	Mit	Mit	No Secr	Clor	Mit/Clor
	Score	0,576	0,9441	0,64		0,626	0,92/0,86
LjGpx3	Localización	Clor	No Mit	RE	RE	Secr	Secr
	Score	0,540	0,13	0,99	0,877	0,961	0,820

En ambos casos, el producto de PCR resultó ser una banda única, que se purificó y clonó en el vector de expresión pET200/D-TOPO®. Se transformaron células de *E. coli* BL21 y se realizó un experimento preliminar de expresión para determinar las condiciones óptimas de sobreexpresión. Éstas fueron las mismas para LjGpx1 y LjGpx3: crecimiento del cultivo hasta una  $DO_{600nm}=0,5-0,8$ , inducción con IPTG 1mM y crecimiento durante 4 h a 37°C.

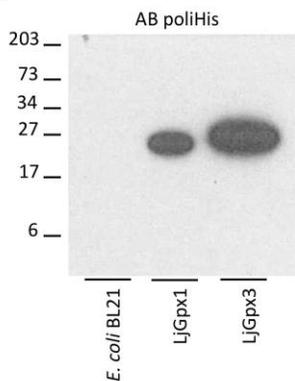
Una vez establecidas las condiciones óptimas, se procedió a la sobreexpresión y purificación como se describe en el apartado 3.4.8 y en la figura 4.1.



**Figura 4.1** Representación esquemática del proceso de sobreexpresión y purificación de LjGpxs. A1, KP 50 mM (pH 7,8), NaCl 300 mM, imidazol 40 mM; A2, KP 50 mM (pH 7,8), NaCl 300 mM, imidazol 250 mM. Los números señalados en círculos indican las distintas fracciones que se analizaron mediante SDS-PAGE.

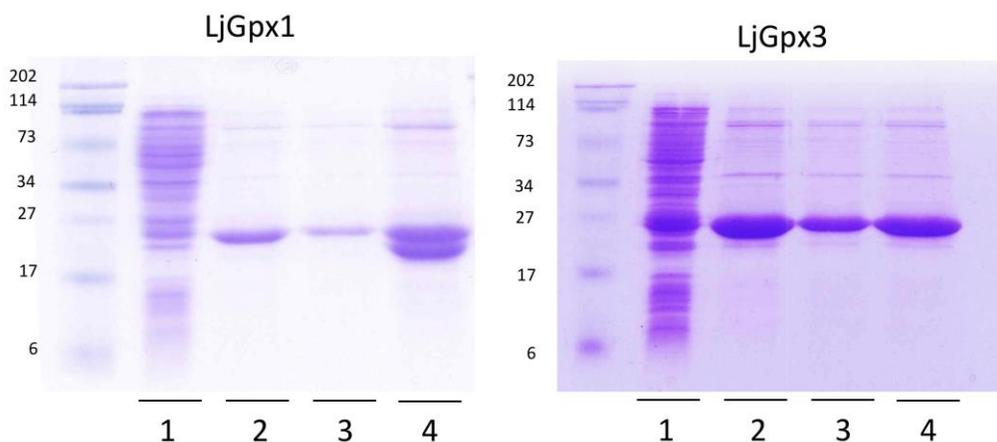
Para comprobar que las proteínas recombinantes con la cola de poli-His se sobreexpresaban correctamente, se corrió un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) en el que se cargaron extractos de cultivos inducidos de BL21 transformados con LjGpx1 y LjGpx3. Como control negativo se cargó un extracto de BL21 sin transformar. Las proteínas se transfirieron a una membrana y se realizó un *western blot*, utilizando un anticuerpo anti-poli-His (Roche) (figura. 4.2). Se puede observar que en ambos casos está presente la proteína recombinante del tamaño adecuado. Además, como era de esperar, en el cultivo de BL21 sin transformar el anticuerpo no reconoce ninguna proteína.

## 4. Resultados



**Figura 4.2** Western blot en el que se observa la presencia de LjGpx1 y LjGpx3 recombinantes en los cultivos inducidos. En el carril del cultivo de BL21 sin transformar no se observa señal. Anticuerpo primario: anti-poli-His (1:5000). Anticuerpo secundario: *antimouse*-HRP (1:5000). Proteína: 0,1  $\mu$ g por carril.

Para determinar el grado de purificación, se corrió un SDS-PAGE para cada proteína recombinante. En cada gel se cargaron las diferentes fracciones de la purificación, y se hizo una tinción con Azul de Coomassie para observar las proteínas (figura. 4.3). Las proteínas purificadas se guardaron en alícuotas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 4.3** SDS-PAGE con tinción Coomassie en el que se observan las distintas fracciones del proceso de purificación de las proteínas recombinantes LjGpx1 y LjGpx3, así como su grado de pureza. 1, Extracto de proteínas de *E. coli*; 2, proteína eluida con 250 mM de imidazol; 3, proteína tras el paso por la columna de desalado; 4, proteína concentrada por centrifugación con concentrador Vivaspin. Proteína en gel LjGpx1: 40  $\mu$ g en carril 1; 6  $\mu$ g en carril 2; 2  $\mu$ g en carril 3; 4  $\mu$ g en carril 4. Proteína en gel LjGpx3: 40  $\mu$ g en carril 1; 13  $\mu$ g en carril 2; 6  $\mu$ g en carril 3; 10  $\mu$ g en carril 4.

## 4.2 Caracterización bioquímica de LjGpx1 y LjGpx3

Los estudios cinéticos de las enzimas pueden aportar una información valiosa sobre sus funciones *in vivo*. Por lo tanto, una vez obtenidas las proteínas recombinantes, se calcularon sus parámetros cinéticos. En experimentos preliminares, ninguna de las dos proteínas mostró actividad con GSH como dador de electrones y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o peróxidos orgánicos como sustratos. En cambio, sí se detectó actividad cuando el GSH fue sustituido por Trxs. En consecuencia, las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado 3.7.1, utilizando PtTrx*h1* como dador de electrones.

A partir de los valores de la pendiente de la recta, que representa el consumo de NADPH, se calculó la velocidad de la reacción en cada punto, expresada como micromoles de sustrato consumidos por miligramo de proteína y minuto ( $v = \mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{min}$ ). Los valores de  $K_m$  y  $V_{\text{max}}$  se calcularon mediante la representación doble inversa o de Lineweaver-Burke.

**Tabla 4.2** Parámetros cinéticos de LjGpxs con diferentes hidroperóxidos como sustratos y Trx*h1* como dador de electrones.

Enzima	Peróxido	$V_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}} / K_m$
LjGpx1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3,8	15,6	0,24
	<i>t</i> -Butil hidroperóxido	7,8	330,8	0,02
	Cumeno hidroperóxido	4,8	64,9	0,07
	Hidroperóxido de fosfatidilcolina	3,2	1,6	2,00
LjGpx3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	4,0	20,5	0,20
	<i>t</i> -Butil hidroperóxido	3,6	166,6	0,02
	Cumeno hidroperóxido	14,7	213,5	0,07
	Hidroperóxido de fosfatidilcolina	7,2	1,6	4,50

El análisis cinético indica que las dos isoformas de LjGpx catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y peróxidos orgánicos (*t*-butil hidroperóxido, cumeno hidroperóxido) usando Trx como reductor (tabla 4.2). Las afinidades aparentes de las dos LjGpxs por los

## 4. Resultados

---

peróxidos orgánicos ( $K_m \sim 60-300 \mu\text{M}$ ) fueron más bajas que por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $K_m \sim 20 \mu\text{M}$ ). Las velocidades máximas ( $V_{\text{max}}$ ) mostraron valores aparentes de  $\sim 4 \mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y de  $4-15 \mu\text{mol min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  para peróxidos orgánicos.

Ya que una de las posibles funciones de las Gpxs es proteger a las células de los peróxidos de lípidos potencialmente tóxicos derivados de la oxidación de las membranas, se sintetizó hidroperóxido de fosfatidilcolina y se utilizó como sustrato para calcular las constantes cinéticas y compararlas con las de los otros peróxidos. La afinidad aparente por hidroperóxidos de fosfolípidos fue mucho mayor ( $K_m \sim 1,6 \mu\text{M}$ ) que por el resto de peróxidos, y la  $V_{\text{max}}$  aparente de LjGpx3 fue el doble que la de LjGpx1. Los cocientes  $V_{\text{max}}/K_m$ , que son indicativos de la eficiencia catalítica, fueron muy altos para los peróxidos de lípidos (2-4,5), bajos para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,2) y muy bajos para los peróxidos orgánicos (0,02-0,07). Estos datos sugieren que en las células de los nódulos LjGpx1 y LjGpx3 funcionan como fosfolípido hidroperoxidasas dependientes de Trxs.

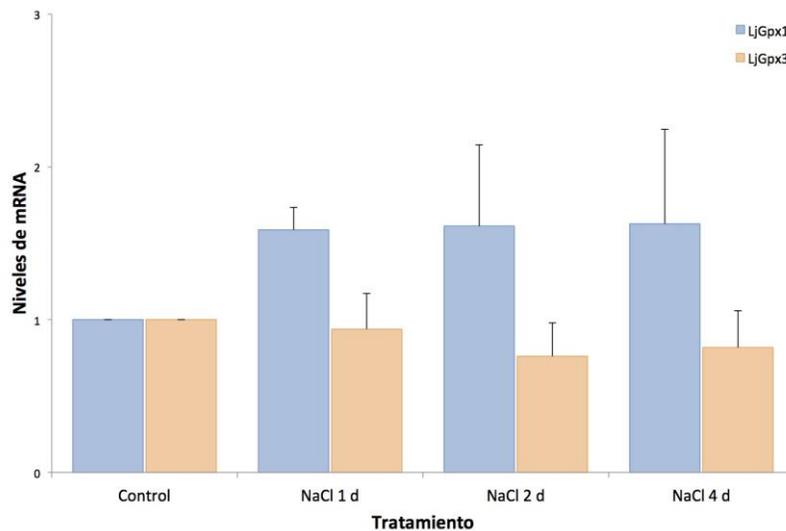
### 4.3 Expresión de los genes *LjGpx1* y *LjGpx3*

Los datos presentados en la sección anterior indican que LjGpx1 y LjGpx3 pueden tener un papel protector frente al daño oxidativo. Para comprobarlo, se analizaron los niveles de expresión génica de *LjGpx1* y *LjGpx3* bajo condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo. El estrés oxidativo se indujo con cadmio (Cd), un metal pesado muy tóxico para las plantas, y con sal (NaCl), ya que se ha demostrado que ambos tratamientos provocan producción de ROS (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Pang y Wang, 2008). El estrés nitrosativo se indujo con GSNO, un metabolito que libera NO y que está implicado en reacciones de transnitrosilación (Perazzolli *et al.*, 2004). Además, se analizó el efecto de diversas fitohormonas sobre la expresión génica, ya que algunas de ellas están implicadas en la respuesta a estrés y, en algunos casos, su efecto está regulado por NO (Bright *et al.*, 2006).

#### 4.3.1 Respuesta a estrés salino

Se determinaron los niveles de mRNA de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de 46 días de edad tratadas con NaCl 150 mM durante 1, 2 y 4 días (figura 4.4).

Estos experimentos no mostraron efectos significativos en los niveles de expresión de ambos genes.

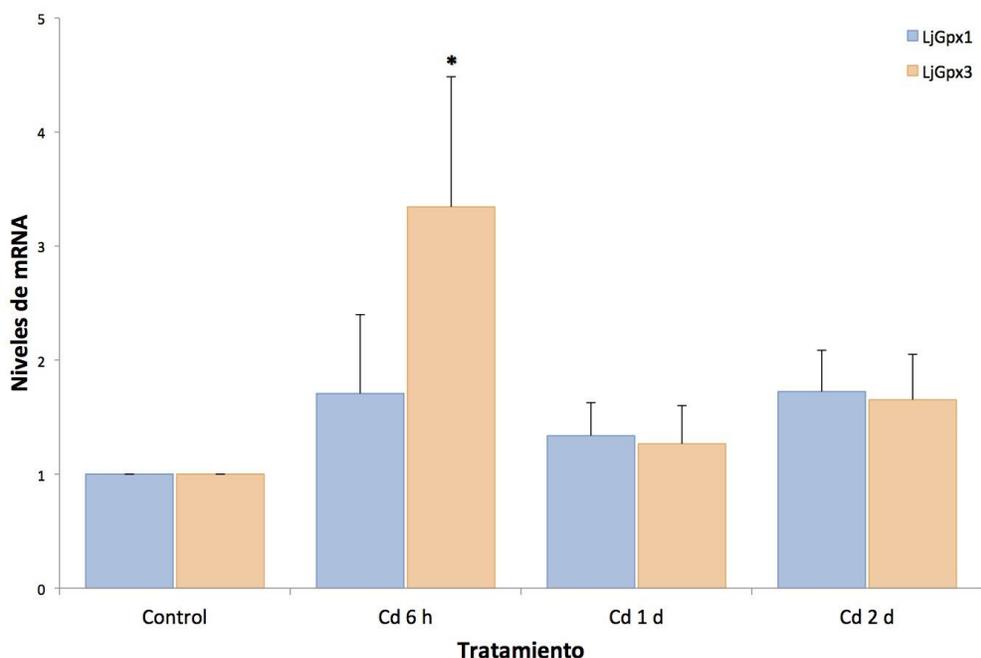


**Figura 4.4** Expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de *Lotus* sometidas a estrés salino con NaCl 150 mM durante 4 días. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control (plantas no tratadas con NaCl), a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3-6 réplicas.

### 4.3.2 Respuesta a estrés por metales pesados

Las plantas de 46 días de edad se trataron con  $\text{CdCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  durante 6 h, 1 día y 2 días y se estudió su efecto en los niveles de mRNA de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de *Lotus* (figura 4.5). Únicamente el tratamiento con  $\text{CdCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  durante 6 h produjo un aumento significativo en los niveles de expresión de *LjGpx3*.

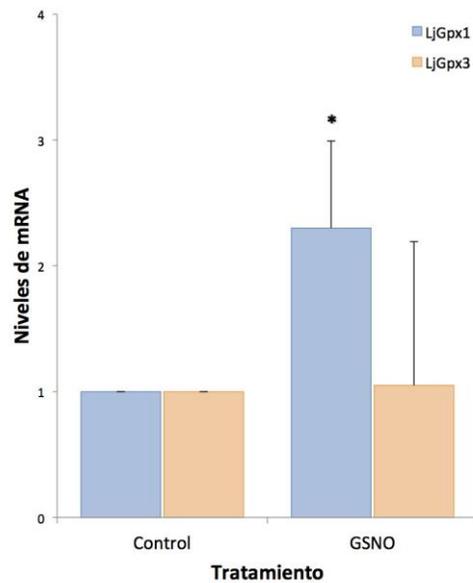
## 4. Resultados



**Figura 4.5** Expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de *Lotus* sometidas a estrés con  $\text{CdCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  durante 2 días. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control (plantas no tratadas con  $\text{CdCl}_2$ ), a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3-6 réplicas. El asterisco indica un aumento significativo de los niveles de expresión (> 2 veces).

### 4.3.3 Respuesta a estrés nitrosativo

Se estudió el efecto del estrés nitrosativo en la expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de 46 días de edad tratadas con GSNO 5 mM durante 6 h. En este caso, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de *LjGpx1* (figura 4.6).

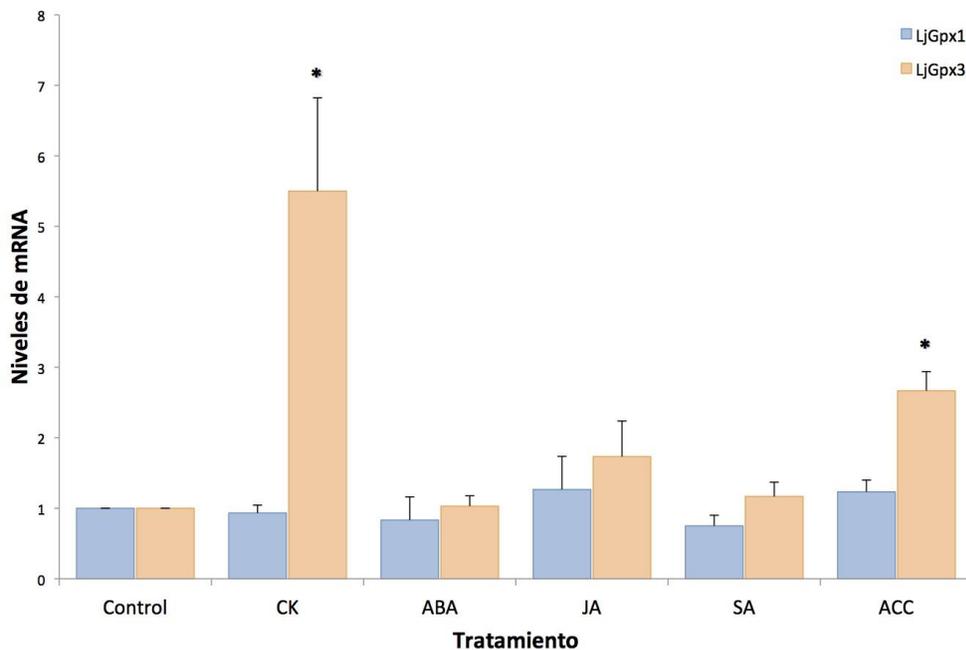


**Figura 4.6** Expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de Lotus sometidas a estrés nitrosativo con GSNO 5 mM durante 6 h. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control (tratadas con GSSG 5 mM), a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3-6 réplicas. El asterisco indica un aumento significativo de los niveles de expresión ( $> 2$  veces).

#### 4.3.4 Respuesta a fitohormonas

El efecto de concentraciones relevantes fisiológicamente de diferentes fitohormonas sobre la expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* se investigó en nódulos de plantas de 44 días de edad crecidas en medio hidropónico. Las plantas se trataron durante 48 h con 50  $\mu$ M de ácido abscísico (ABA), salicílico (SA), jasmónico (JA), 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC, precursor del etileno) o citoquininas (CKs, mezcla equimolar de kinetina y 6-bencilaminopurina) (figura 4.7). La expresión de *LjGpx1* no fue afectada por ninguno de los tratamientos con fitohormonas, mientras que la expresión de *LjGpx3* se incrementó significativamente en respuesta a etileno y CKs.

## 4. Resultados



**Figura 4.7** Expresión de *LjGpx1* y *LjGpx3* en nódulos de plantas de *Lotus* tratadas con fitohormonas (50  $\mu$ M). CK, citoquininas; ABA, ácido abscísico; JA, ácido jasmónico; SA, ácido salicílico; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control (plantas no tratadas con fitohormonas), a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a la media  $\pm$  error estándar de 3-6 réplicas. El asterisco indica un aumento significativo de los niveles de expresión (> 2 veces).

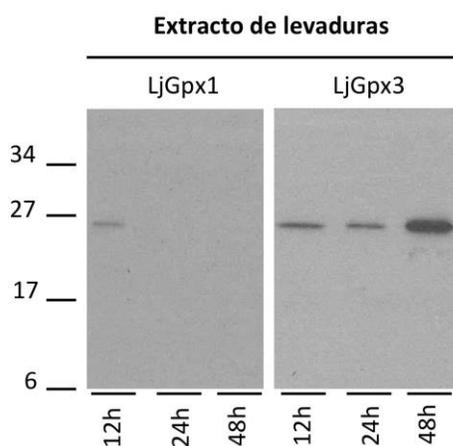
En general, los estudios de expresión génica muestran que ambos genes responden de forma diferencial frente a los distintos tratamientos. Ninguno de los dos muestra cambios en sus niveles de expresión frente a estrés salino. *LjGpx1* es inducido únicamente durante el estrés nitrosativo y *LjGpx3* responde a estrés por metales pesados, etileno y CKs.

### 4.4 Complementación con *LjGpx1* y *LjGpx3* en levaduras

Los experimentos con levaduras son de gran utilidad para investigar la función de proteínas. Esto se debe a la existencia de un gran número de mutantes y a que la mayoría de las proteínas de plantas son funcionales en levaduras (Serrano *et al.*, 1999). Para completar el estudio sobre la función de las *LjGpxs* en los nódulos, se

analizó el efecto de la complementación de levaduras mutantes deficientes en Gpxs con LjGpx1 y LjGpx3 bajo diferentes condiciones. Se estudió el efecto del estrés oxidativo (tratamiento con  $H_2O_2$  y *t*-butilhidroperóxido) en el crecimiento de las levaduras mutantes y las transformadas con LjGpx1 y LjGpx3 (figura 4.9). Las concentraciones de los peróxidos se optimizaron con el fin de obtener las máximas diferencias en el fenotipo. Ambas Gpxs complementaron el crecimiento deficiente del mutante en presencia de  $H_2O_2$  o *t*-butilhidroperóxido. La protección conferida frente a  $H_2O_2$  fue similar para las dos Gpxs, mientras que en el caso del *t*-butilhidroperóxido la LjGpx3 tuvo un mayor efecto protector.

Debido a la diferente tolerancia mostrada frente al *t*-butilhidroperóxido de las levaduras transformadas con LjGpx1 y LjGpx3, decidimos analizar los niveles de expresión de ambas proteínas. Para ello, se hicieron extractos de levaduras crecidas durante 12, 24 y 48 h. La proteína obtenida se cargó en un gel SDS-PAGE y se realizó un *western blot* con anticuerpos específicos frente a LjGpx1 y LjGpx3 generados en nuestro laboratorio, como se describirá en la siguiente sección. Los resultados mostraron la presencia de LjGpx3 a lo largo de las 48 h de crecimiento, mientras que LjGpx1 sólo fue visible a las 12 h, no pudiendo observarse a las 24 y 48 h (figura 4.8). Por lo tanto, es posible que el mayor efecto protector conferido por LjGpx3 se deba a que esta proteína es más estable en las levaduras.



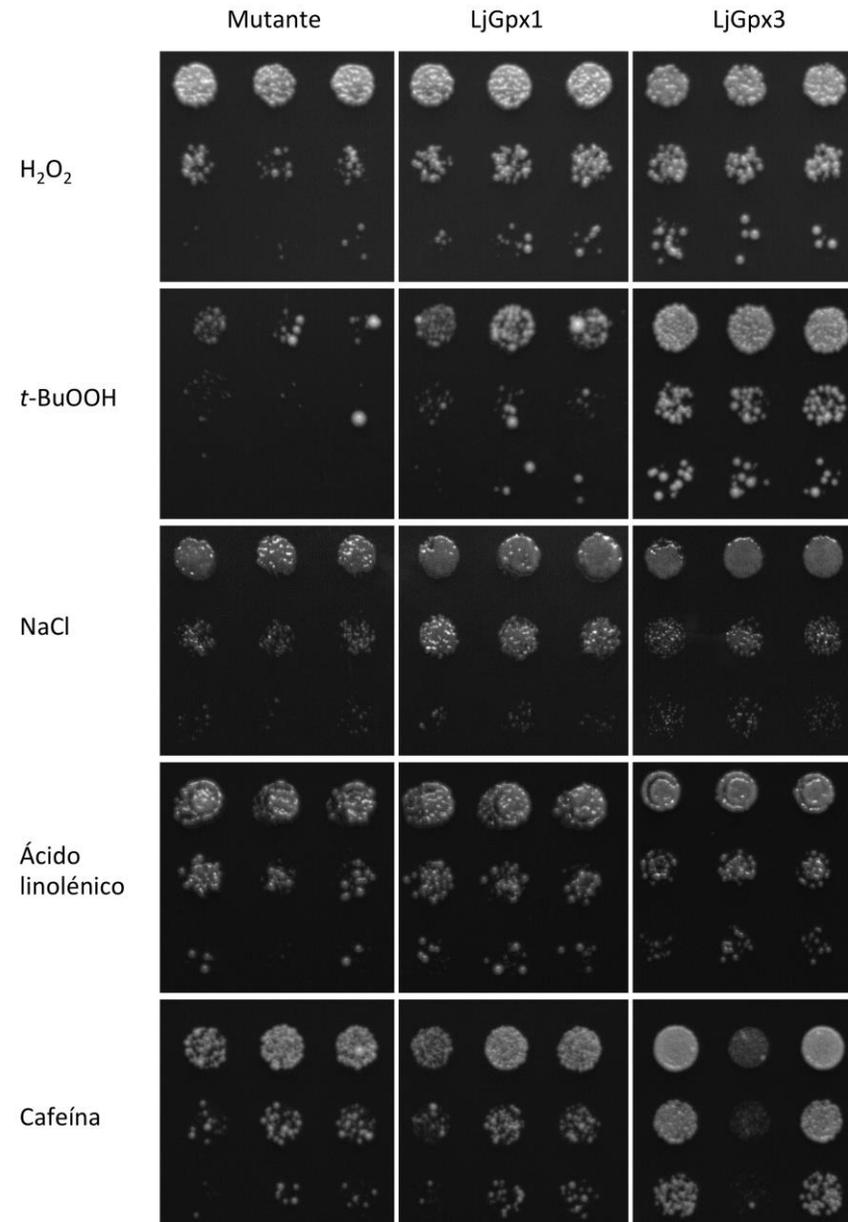
**Figura 4.8** *Western blot* en el que se muestra la expresión de LjGpx1 y LjGpx3 en levaduras a las 12, 24 y 48 h de cultivo. En cada carril se cargaron 40  $\mu$ g de extracto de proteínas. Se utilizó el anticuerpo primario correspondiente a cada proteína diluido 1:500. El anticuerpo secundario *antirabbit peroxidase* se utilizó diluido 1:20000.

También se investigó el efecto del estrés salino en el crecimiento de las levaduras. En este caso, tanto las transformadas con LjGpx1 como con LjGpx3 mostraron mayor crecimiento que las mutantes (figura 4.9).

#### 4. Resultados

---

Por último, se analizó el efecto de LjGpx1 y LjGpx3 en la protección de la membrana plasmática y/o pared celular. Para ello, las levaduras se trataron con ácido linolénico o cafeína. Las levaduras no son capaces de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados, pero pueden incorporar ácido linolénico exógeno a sus membranas haciéndolas susceptibles a la peroxidación (Avery y Avery, 2001). A su vez, la cafeína provoca la alteración de la estructura de la pared celular y puede afectar a la integridad de la membrana (Kuranda *et al.*, 2006). Las levaduras que expresaban LjGpx1 o LjGpx3 mostraron mejor tolerancia al ácido linolénico y a la cafeína que la levadura mutante deficiente en Gpxs (figura 4.9).



**Figura 4.9** Complementación funcional con LjGpx1 y LjGpx3 en levaduras. El mutante deficiente en Gpxs y las células transformadas crecieron en medio YPD durante 48 h a 26°C con diferentes inductores de estrés oxidativo [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 500 μM y *t*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH) 30 μM], de estrés salino (NaCl 0,9M) y de daño a membranas (ácido linolénico 1,5 mM y cafeína 16 mM). Se muestran distintas diluciones seriadas de cultivos saturados (1:10, 1:100 y 1:1000, de arriba a abajo), y tres réplicas (de izquierda a derecha).

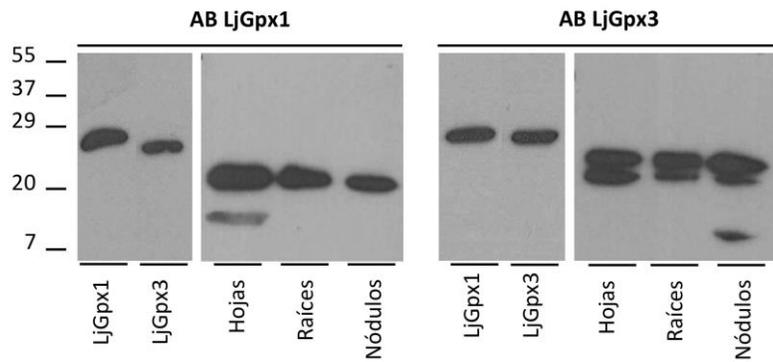
## 4.5 Producción de anticuerpos policlonales frente a LjGpx1 y LjGpx3

Uno de los objetivos de esta tesis fue la localización subcelular de LjGpx1 y LjGpx3 en los nódulos. Por consiguiente, decidimos generar anticuerpos altamente específicos para cada una de las proteínas. Éstos se utilizaron, como se describirá más adelante, en los experimentos de microscopía electrónica.

Las proteínas recombinantes LjGpx1 y LjGpx3 purificadas se enviaron a un servicio comercial (Biogenes) para producir anticuerpos policlonales. Tras la inmunización de dos conejos, se analizaron los antisueros obtenidos para determinar la reactividad frente a LjGpx1 y LjGpx3. En los dos casos se demostró la afinidad por las proteínas recombinantes y nativas (presentes en extractos de hojas, raíces y nódulos de Lotus), así que se procedió a la purificación de los anticuerpos con columnas de afinidad *CNBr-activated Sepharose 4 Fast Flow* (GE Healthcare).

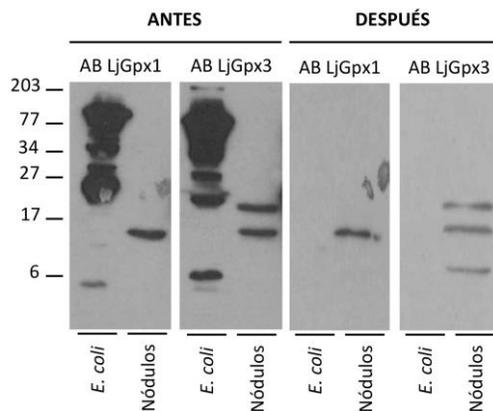
La especificidad de los anticuerpos purificados se comprobó mediante análisis *western blot* (figura 4.10). El anticuerpo frente a LjGpx1 da lugar a una banda intensa en hojas, raíces y nódulos. Además, se observa una banda tenue de menor tamaño del esperado en el extracto de hojas. Ésta puede deberse a un reconocimiento inespecífico o a la presencia de productos de degradación de la LjGpx1 debido a la acción de proteasas durante la homogeneización del tejido, aunque esto último es poco probable debido al uso rutinario de inhibidores de proteasas en nuestros experimentos. El anticuerpo frente a LjGpx3 reconoce dos bandas de tamaño muy similar en los tres tejidos que se deben, probablemente, a diferentes estados *redox* de la proteína.

Por otra parte, aunque los experimentos con extractos de tejidos indican una alta especificidad de los anticuerpos, los *western blots* con las proteínas recombinantes muestran que existe reacción cruzada (figura 4.10).



**Figura 4.10** *Western blot* en el que se muestra la especificidad de los anticuerpos policlonales obtenidos frente a LjGpx1 y LjGpx3. En los carriles de proteína recombinante se cargaron 100 ng de proteína, y en los carriles de extractos de hojas, raíces y nódulos de Lotus se cargaron 30  $\mu$ g de proteína. El anticuerpo primario se utilizó diluido 1:1000 y el anticuerpo secundario *antirabbit peroxidase* se diluyó 1:20000.

En la purificación de proteínas recombinantes a partir de extractos de *E. coli* es inevitable la presencia de pequeñas cantidades de proteínas contaminantes de origen bacteriano. Por lo tanto, decidimos descartar la posibilidad de que los anticuerpos reconocieran de forma inespecífica proteínas bacterianas. Esto es importante para los estudios de inmunolocalización, ya que los nódulos contienen gran cantidad de bacteroides.

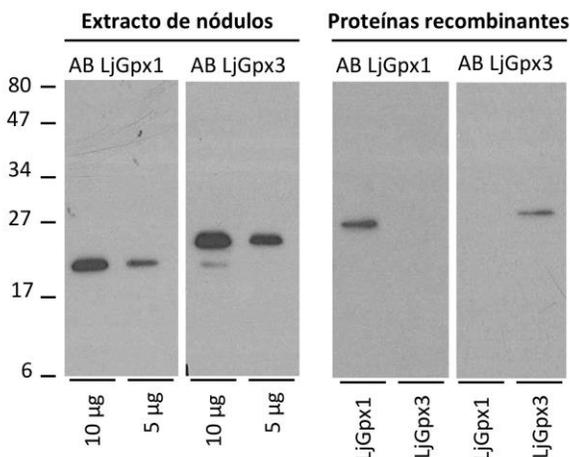


**Figura 4.11** *Western blot* en el que se muestra la reactividad de los anticuerpos frente a las proteínas de *E. coli* antes y después de la inmunoadsorción. Como control positivo se utilizó extracto de nódulos de Lotus. En los geles utilizados para los anticuerpos antes de la inmunoadsorción se cargaron 10  $\mu$ g de extracto de proteínas de *E. coli* y 10  $\mu$ g de extracto de proteínas de nódulos. En los geles utilizados para los anticuerpos después de la inmunoadsorción se cargaron 10  $\mu$ g de extracto de proteínas de *E. coli* y 40  $\mu$ g de extracto de proteínas de nódulos.

El anticuerpo primario se utilizó diluido 1:1000 en el caso de los anticuerpos antes de la inmunoadsorción, y 1:500 en el caso de los anticuerpos tras la inmunoadsorción. El anticuerpo secundario *antirabbit peroxidase* se utilizó diluido 1:20000.

#### 4. Resultados

Nuestros experimentos mostraron que los dos anticuerpos presentaban reactividad frente a proteínas de *E. coli* (figura. 4.11). Por lo tanto se procedió a repurificarlos mediante técnicas de inmunoadsorción (apartado 3.8). Posteriormente, se determinó su reactividad frente a proteínas de *E. coli*, LjGpx1 y LjGpx3 recombinantes y proteínas nativas presentes en extractos de hojas, raíces y nódulos. Se observó que, una vez purificados, los anticuerpos no reconocen proteínas de *E. coli*, lo que valida la técnica de inmunoadsorción (figura 4.11). Además, la especificidad de cada anticuerpo por su proteína (recombinante y nativa) fue muy alta a concentraciones relativamente bajas de proteína. En consecuencia, el anticuerpo frente a LjGpx1 reconoce solo esta proteína cuando se cargan en el gel 5-10  $\mu\text{g}$  de proteína de nódulos. El anticuerpo frente a LjGpx3 reconoce LjGpx1 y LjGpx3 cuando se cargan 10  $\mu\text{g}$  de proteína, mientras que con 5  $\mu\text{g}$  sólo reconoce LjGpx3. En cuanto a las proteínas recombinantes, cada anticuerpo reconoce exclusivamente su proteína cargando en el gel 1 ng de proteína pura (figura 4.12).



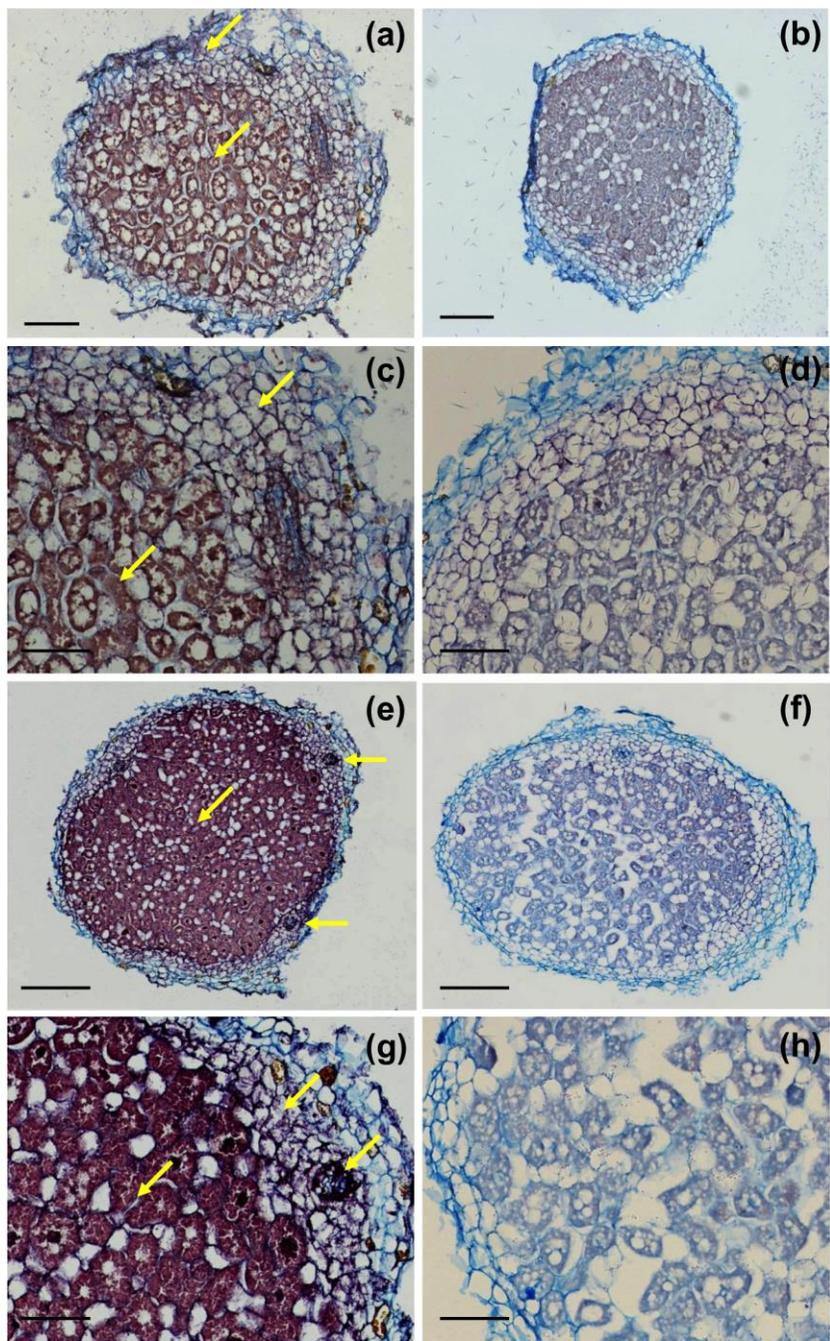
**Figura 4.12** Western blot en el que se muestra la especificidad de los anticuerpos frente a las proteínas recombinantes y nativas presentes en extractos de nódulos de Lotus después del proceso de inmunoadsorción. En el gel de las proteínas recombinantes se cargó 1 ng de proteína por carril. Los anticuerpos primario y secundario se utilizaron diluidos 1:500 y 1:20000, respectivamente.

#### 4.6 Localización de transcritos y proteínas LjGpx1 y LjGpx3

La localización de las enzimas en diferentes tejidos y orgánulos determina, en gran medida, su función biológica. Por esta razón, se investigó la localización de los mRNAs y proteínas LjGpx1 y LjGpx3 utilizando diferentes técnicas experimentales.

#### 4.6.1 Hibridación *in situ*

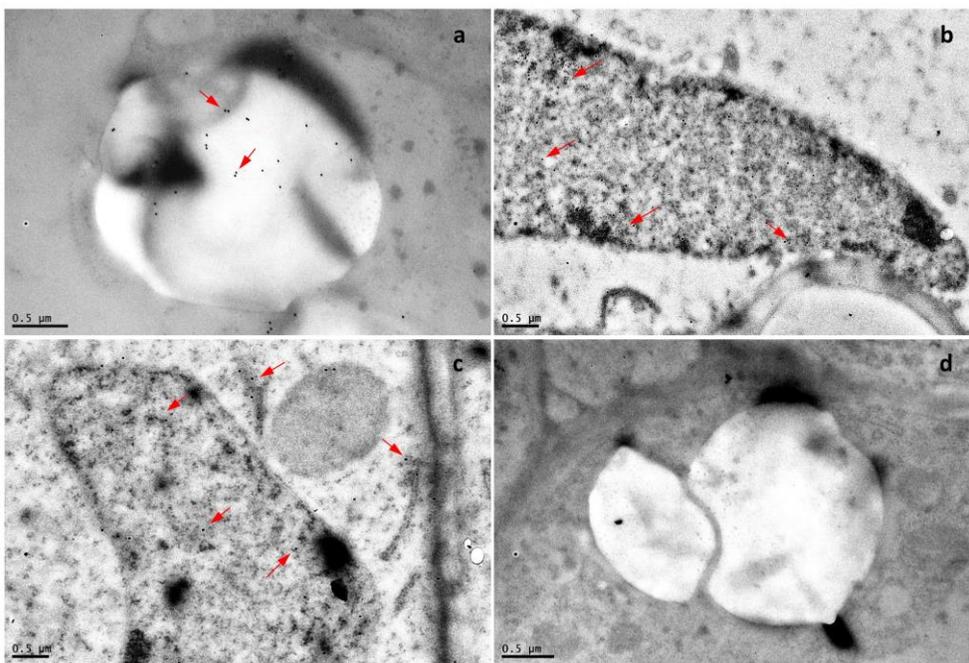
La localización en los nódulos de los mRNAs de los genes *LjGpx1* y *LjGpx3* se determinó por hibridación *in situ*, utilizando sondas de RNA marcadas con digoxigenina. Se diseñaron sondas específicas de 208 pb y 197 pb para *LjGpx1* y *LjGpx3*, respectivamente. Los mRNAs de ambos genes se localizaron preferentemente en la zona infectada (figura 4.13 a,c,e,g). Además, se detectaron cantidades significativas de mRNA de *LjGpx3* en el córtex y en los haces vasculares (figura 4.13 e,g). En el caso de *LjGpx1*, la sonda control produjo señal en el córtex (figura 4.13 b,d) y, por lo tanto, no se puede descartar que el marcaje de *LjGpx1* en este tejido sea inespecífico. Cuando se utilizó la sonda control de *LjGpx3* no se detectó ninguna señal de fondo, lo que sugiere la expresión genuina de este gen en las células del córtex (figura 4.13 f,h).



**Figura 4.13** Hibridación *in situ* de los mRNAs de *LjGpx1* (a-d) y *LjGpx3* (e-h) en nódulos de *Lotus*. En la primera columna (a, c, e, g) se muestra la hibridación de las secciones de nódulos con las sondas antisentido, y en la segunda columna (b, d, f, h) con las sondas sentido (control negativo). Barras, 75  $\mu\text{m}$  (a, b, e y f); 300  $\mu\text{m}$  (c, d, g y h).

### 4.6.2 Inmunolocalización

Las proteínas LjGpx1 y LjGpx3 se inmunolocalizaron en los nódulos utilizando los anticuerpos purificados por inmunoadsorción, que son específicos para cada proteína. En el caso de LjGpx1, el marcaje con partículas de oro fue evidente en amiloplastos (figura 4.14 a) y núcleos (figura 4.14 b) de las células infectadas, células corticales y células de los haces vasculares. En cuanto a LjGpx3, las partículas de oro estuvieron asociadas principalmente al retículo endoplasmático, citosol y núcleo (figura 4.14 c). El control negativo, sustituyendo el anticuerpo primario por suero preinmune, no mostró ninguna señal en amiloplastos o núcleo (figura 4.14 d).



**Figura 4.14** Inmunolocalización de LjGpx1 y LjGpx3 en nódulos de Lotus. Las micrografías señalan la localización de (a) LjGpx1 en amiloplastos, (b) LjGpx1 en núcleo, y (c) LjGpx3 en retículo endoplasmático, citosol y núcleo. (d) Control negativo, con ausencia de marcaje en amiloplastos. Barras, 0,5  $\mu\text{m}$ .

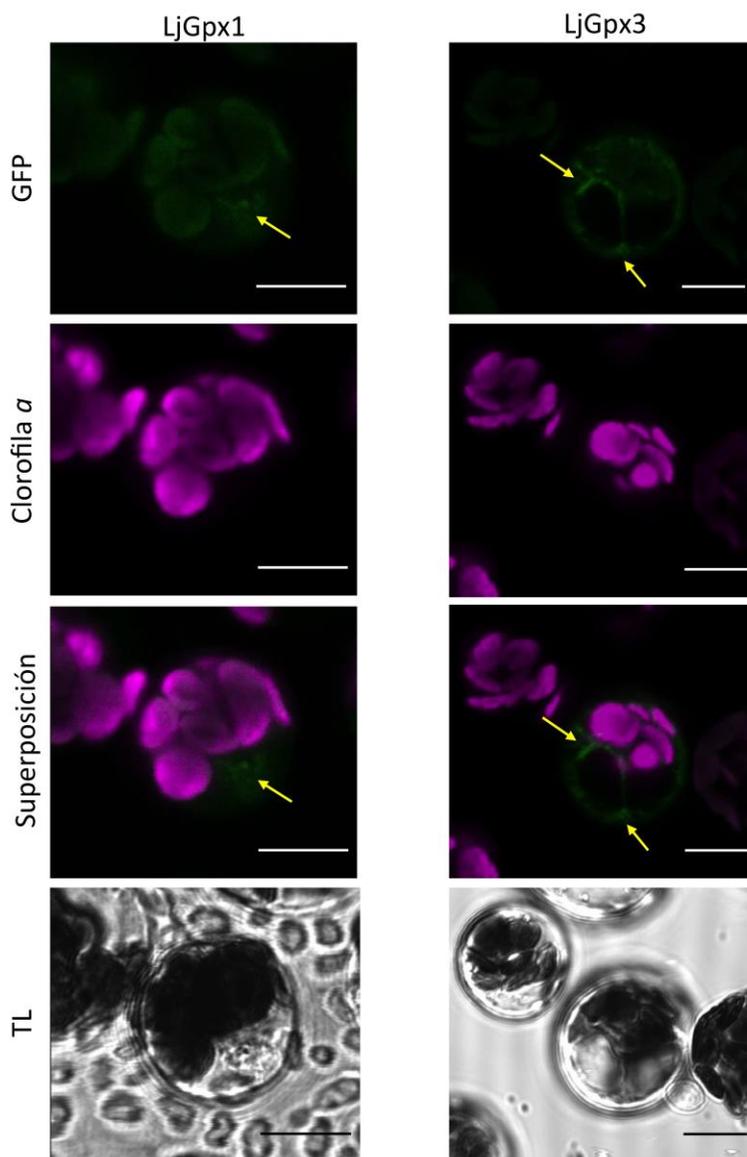
### 4.6.3 Expresión de proteínas de fusión con GFP

El estudio de inmunolocalización se complementó con la detección de la fluorescencia por medio de microscopía confocal de proteínas de fusión LjGpx-GFP

#### 4. Resultados

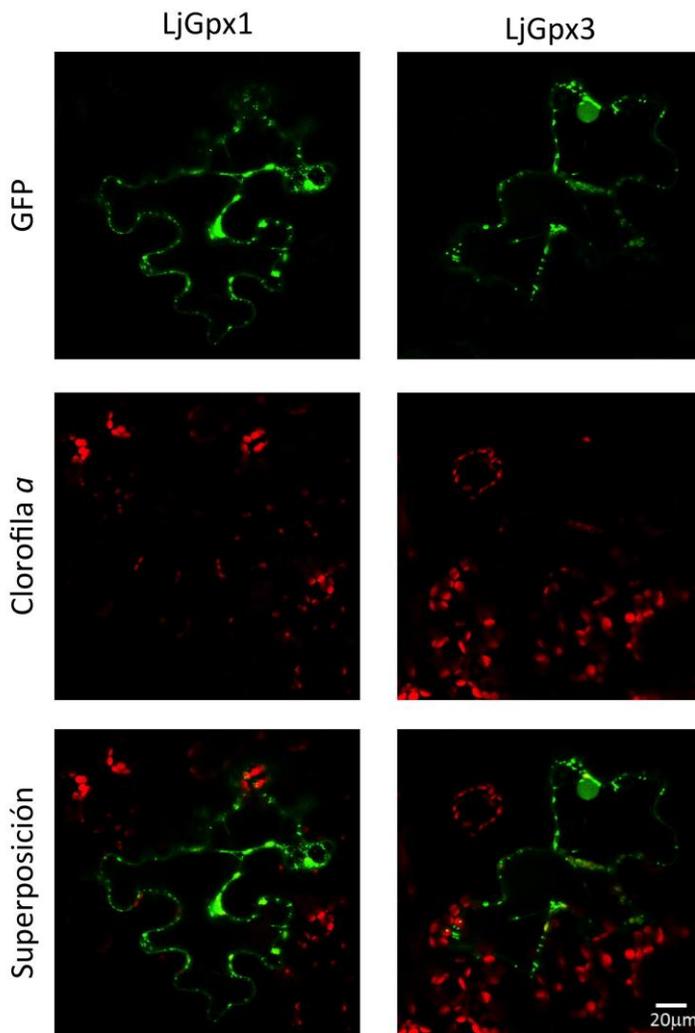
que se expresaron en protoplastos del mesófilo de *Arabidopsis* y en hojas de *Nicotiana benthamiana*.

En los protoplastos la fluorescencia se observó en el núcleo en el caso de LjGpx1 y en el citosol en el caso de LjGpx3 (figura 4.15).



**Figura 4.15** Localización subcelular de LjGpx1 y LjGpx3. Las proteínas de fusión con GFP se expresaron en protoplastos de *Arabidopsis*. La fluorescencia de la GFP se muestra en verde y la autofluorescencia de la clorofila en magenta. Las flechas muestran la localización de LjGpx1 en el núcleo y de LjGpx3 en el citosol. Barras, 10  $\mu\text{m}$ .

En las hojas de *Nicotiana* (figura 4.16) se observa que ambas proteínas se localizan en el citoplasma, vía secretoria y núcleo.



**Figura 4.16** Localización subcelular de LjGpx1 y LjGpx3. Las proteínas de fusión con GFP se expresaron en hojas de *Nicotiana* por medio de infiltración con *Agrobacterium tumefaciens*. La fluorescencia de la GFP se muestra en verde y la autofluorescencia de la clorofila en rojo. Ambas proteínas se localizan en el citoplasma, vía secretoria y núcleo. Barra, 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.7 Detección de S-nitrosilación y efecto en la actividad enzimática

En los últimos años, numerosos trabajos han puesto de manifiesto que el NO participa en la regulación de procesos fisiológicos esenciales en animales y plantas. Una de las formas en que el NO ejerce su función biológica es a través de la

#### 4. Resultados

modificación postraduccional de algunas proteínas. En concreto, la S-nitrosilación de grupos tiol parece ser un mecanismo regulatorio importante (Astier *et al.* 2012). Debido a que LjGpx1 y LjGpx3 contienen residuos de Cys altamente conservados (figura 4.17) imprescindibles para su actividad biológica, decidimos investigar si la actividad de ambas proteínas está modulada por NO.

```

PtGFX3      MLTSRSLRILSQYLNFASLSASFLLSKQSSFNKQTLPLSLHNSFPVSLYSQSIKAGVSRR
AtGFX6      -----MLRSSIRLLYIRRTSPLLRSLSSSSSSSSSKRFDSAKPLFNSHRIISLPISST
LjGFX1      -MLCTRLIFPFSRTIRFAAPLSSSSLHSFVFSNSPITLSRSYHSSLLTTTSFPFKSLVSTS
LjGFX3      -----MQLLTFWNWISLWILAFAPFAFFFFFFFFFFFFFYSQ
AtGFX3      -----MPSRSRWVNRQATSKIKKFIILGLVAFV
BrGFX       ----MASSSYAPFSAVFSGFAATKPNPPPTCSAFLVPKRRNSRNLKNGVSLKSNKHHG

PtGFX3      LLGSVRFNHSMASQSSPQSAHDFTVKDAKGNVDVLSIYKGGVLLIVNVASQCGLTDSNYT
AtGFX6      GAKLSRSEHSMASSEPKSLYDFTVKDAKGNVDVLSIYKGGVLLIVNVASQCGLTNSNYT
LjGFX1      TTPFSFTLRPDHTMAAPTsvyDFTVKDARGNDVNLGDYKGGVLLIVNVASQCGLTNSNYT
LjGFX3      THEASPPSPSTMAEQTSKSLYDFTVKDIRGNDVLSQYSGKVLIIIVNVASQCGLTQNTYK
AtGFX3      FYLYRYPSPSFTVEQSSSTIYNIsvkDIEGKDVLSLskFKGGVLLIVNVASKCGLTHGNyK
BrGFX       FQFTSRNLSVYARATEEKTvHDFTVKDIEGKDVSLDKFKGKPLLLIVNVASKCGLTSSNYT

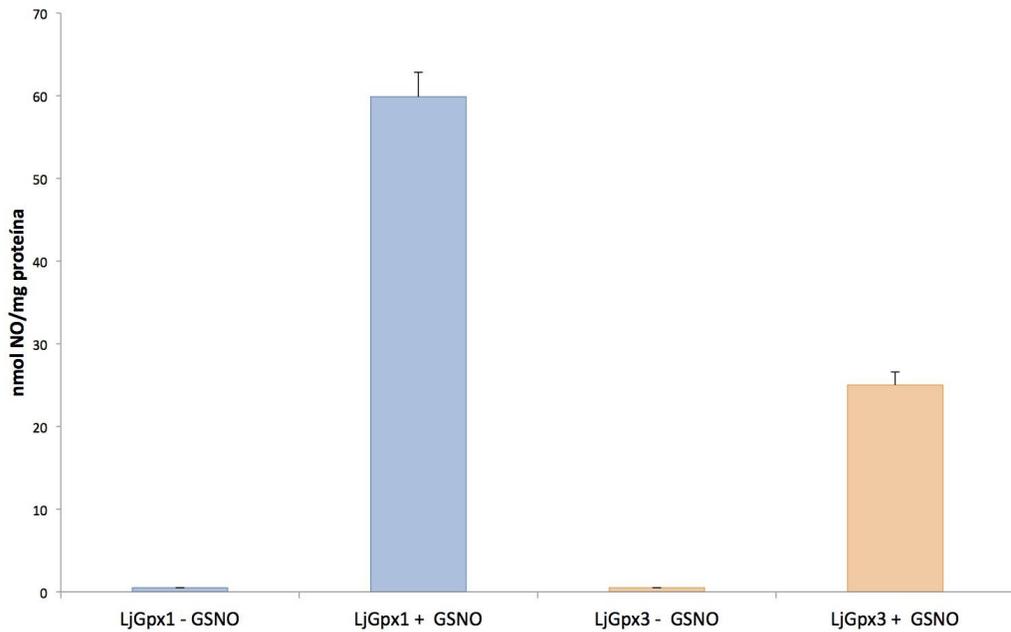
PtGFX3      ELTQLYAKYKDGLEILAFPCNQF*GSQEPGSSEEIVFA*CTRFKAEYPIFDKVEVNGNA
AtGFX6      ELAQLYEKYKGHGFEILAFPCNQF*GNQEPGTNEEIVQFA*CTRFKAEYPIFDKVDVNGDKA
LjGFX1      ELSQLYEKYKSKGLEILGFPCNQF*GAQEPGDNEQIQEFV*CTRFKAEPFVFDKVDVNGDSA
LjGFX3      ELNILEYKYSKGLEILAFPCNQF*GAQEPGTNEIQDVV*CTRFKSEFFVFDKVEVNGKNA
AtGFX3      EMNILEYKYSKGLEILAFPCNQF*GSQEPGSNMEIKETV*CNIFKAEPFPIFDKIEVNGKNT
BrGFX       ELSQLYDKYRNQGFELILAFPCNQF*GGQEPESNPDIKRFV*CTRFKAEPFPIFDKVDVNGPST

PtGFX3      APIYKYLKSSGGGLFGDNI*KNWFSKFLVDKEGKVVDRYAPTTPSLSIEKEVKLLGLIA-
AtGFX6      APVYKFLKSSGGGLFGDGI*KNWFAKFLVDKDGNVVDRYAPTTPSLSIEKDVKLLGVTA
LjGFX1      APLYKYLKSSGGGLFGDKI*KNWFSKFLVDKEGNVVDRYAPTTPSLSIEKDLVKLLGA--
LjGFX3      EPLFKFLKDKQGGIFGCDGI*KNWFTKFLVNKEGKVVDRYAPTTPSMKIEKDLKLLQSS-
AtGFX3      CPLYNFLKQKGGGLFGDAI*KNWFAKFLVDRQGNVDRYAPTTPSLEIEKDIVKLLASA-
BrGFX       APIYQFLKSKSGGLGDLI*KNWFSKFLVDKKGNVVQRYPTTPSPLQIEKDIQKLLVA--

```

**Figura 4.17** Secuencia de aminoácidos de LjGpx1, LjGpx3 y otras Gpxs representativas de diferentes plantas modelo. Las tres Cys conservadas (C85, C114 y C133 en LjGpx3) en las Gpxs de plantas están marcadas en rojo, la triada catalítica está marcada con un asterisco, los dominios conservados están resaltados en amarillo y los aminoácidos que no forman parte de la proteína madura teórica de las LjGpxs están resaltados en azul. At, *Arabidopsis thaliana* (Rodríguez-Milla *et al.*, 2003); Br, *Brassica rapa* (Jung *et al.*, 2002); Lj, *Lotus japonicus* (Ramos *et al.*, 2009); Pt, *Populus trichocarpa* (Navrot *et al.*, 2006).

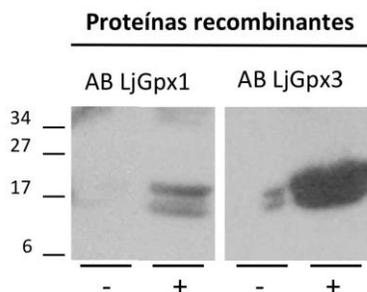
Como primera aproximación, las proteínas recombinantes se trataron con un donador fisiológico de NO (GSNO 1 mM) y se cuantificó indirectamente la cantidad de NO liberada mediante el ensayo de Saviile-Griess. En este método, el NO del enlace S-NO es desplazado en forma de nitrito por Hg<sup>2+</sup>. En medio ácido el nitrito reacciona con sulfanilamida, formando una sal de diazonio que da lugar a un compuesto coloreado que se puede medir a 540 nm tras la reacción con N-(1-naftil)-etilendiamina. Los resultados de la figura 4.18 muestran que ambas proteínas son nitrosiladas *in vitro*.



**Figura 4.18** Representación gráfica de la cantidad de NO liberada por cada mg de proteína recombinante que se nitrosiló tras el tratamiento con GSNO (1 mM) y que fue determinada por el método de Saville-Griess. Los valores son medias  $\pm$  SE ( $n=3-4$ ).

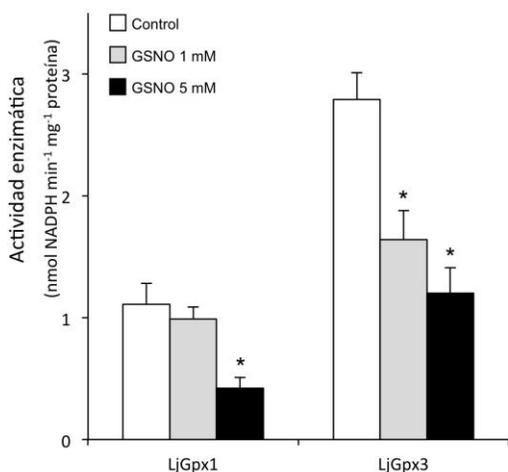
La S-nitrosilación de LjGpx1 y LjGpx3 se confirmó utilizando el *switch* de biotina (Jaffrey *et al.*, 2001). Los *western blots* mostraron que ambas proteínas pueden ser nitrosiladas *in vitro* (fig. 4.19).

Con el fin de investigar el efecto de la S-nitrosilación en la función de LjGpxs, se determinó el efecto del tratamiento con GSNO 1 mM en la actividad enzimática. La S-nitrosilación produjo una reducción del 40% en la actividad de LjGpx3 pero no tuvo efecto en la actividad de LjGpx1. Sin embargo, al aumentar la concentración de GSNO hasta 5 mM se produjo un descenso del 60% en ambas actividades enzimáticas (fig. 4.20).



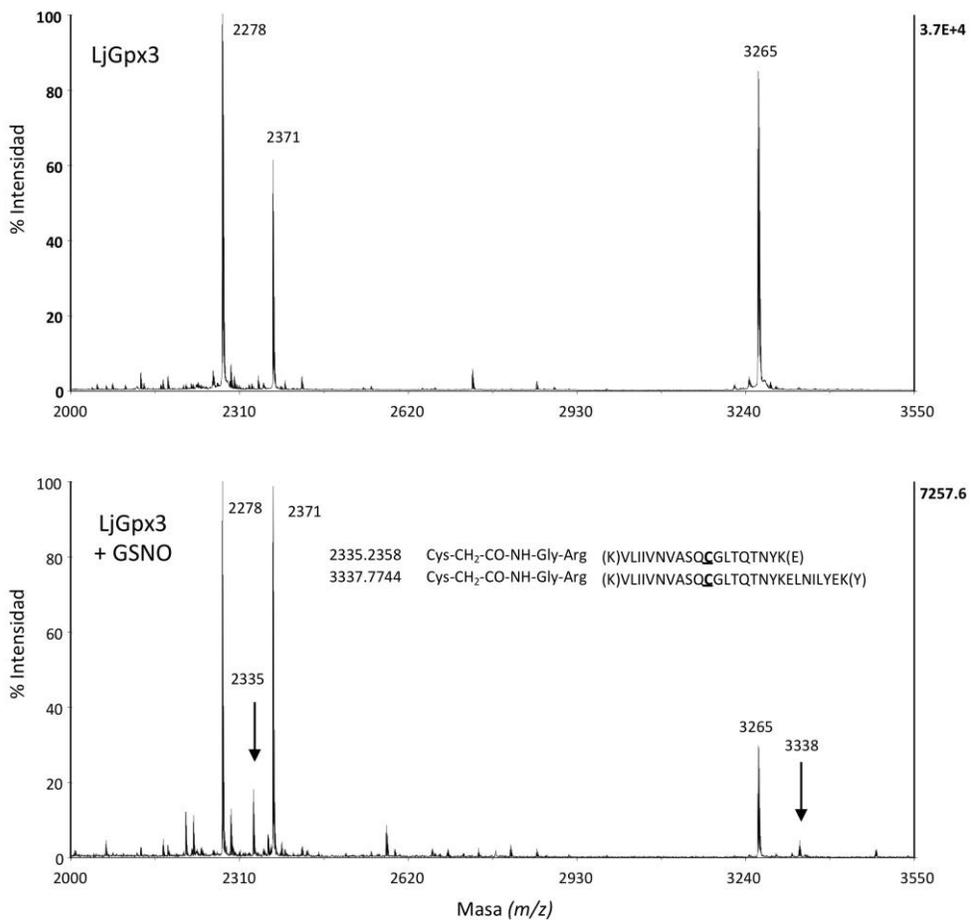
**Figura 4.19** *Western blot* en el que se muestra la S-nitrosilación de LjGpx1 y LjGpx3 recombinantes. Las proteínas se trataron con GSSG 1 mM (control, -) o GSNO 1 mM (+) y se sometieron al *switch* de biotina. Las proteínas S-nitrosiladas se detectaron mediante *western blot* con un anticuerpo anti-biotina.

## 4. Resultados



**Figura 4.20** Efecto de la S-nitrosilación mediada por GSNO en las actividades enzimáticas de LjGpxs. Se midió espectrofotométricamente el consumo de NADPH utilizando PtTrx1 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustratos. Los valores que se muestran son medias  $\pm$  SE ( $n=6-8$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control con  $P < 0,05$  en un test  $t$  de Student.

Debido a que el *switch* de biotina no permite identificar las Cys nitrosiladas, se utilizó una técnica alternativa, el *switch* de histidina, que derivatiza los residuos nitrosilados con un péptido sintético (I-CH<sub>2</sub>-CO-Gly-Arg-Ala-His<sub>6</sub>). Tras la digestión con tripsina, el dipéptido Gly-Arg permanece unido a la Cys y se puede detectar por espectrometría de masas (Camerini *et al.*, 2007). El análisis demostró la S-nitrosilación de la Cys 85 en LjGpx3 (fig. 4.21), pero no la nitrosilación equivalente en LjGpx1. El tiol de la Cys 85 es el que inicialmente dona los electrones al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produciendo H<sub>2</sub>O y Cys85-SOH que, a su vez, forma un puente disulfuro con la Cys-133. Además, se realizaron controles añadiendo DTT para hacer accesibles todas las Cys a la nitrosilación. Estos estudios mostraron que la nitrosilación se produce específicamente en la Cys-85 de LjGpx3.

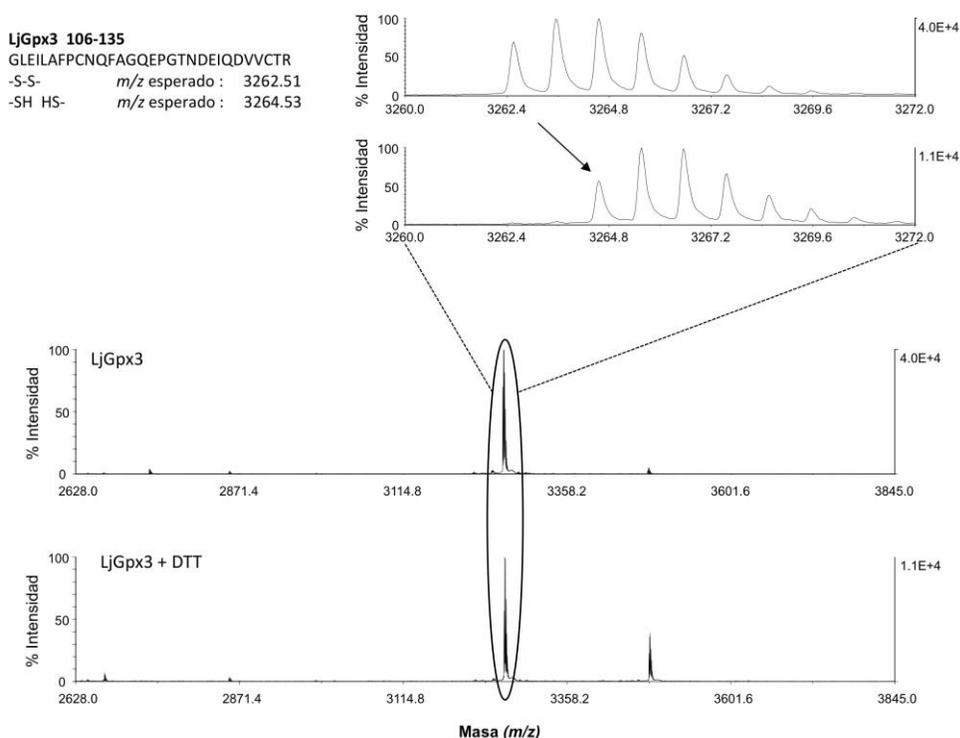


**Figura 4.21** Espectro de masas que muestra la *S*-nitrosilación de la Cys-85 utilizando el *switch* de histidina. Las flechas indican la presencia de dos péptidos encontrados tras la digestión con tripsina de la proteína nitrosilada (LjGpx3+GSNO, *espectro inferior*) que no están presentes en la proteína control no modificada (LjGpx3, *espectro superior*). Las masas moleculares de estos dos péptidos corresponden a la alquilación por el dipéptido Gly-Arg del residuo Cys, como se indica en la figura.

Por otra parte, en este análisis se detectó un puente disulfuro entre las Cys-140 y Cys-159 en LjGpx1 y entre Cys-114 y Cys-133 en LjGpx3. La adición de DTT antes de la tripsinización aumentó en 2 Da la masa molecular del péptido, confirmando la existencia del puente disulfuro (fig. 4.22). La presencia de puentes disulfuro en LjGpx1 y LjGpx3 se puede inferir por la aparición de dos bandas inmunorreactivas (forma oxidada y forma reducida) en los *western blots* (fig. 4.17). De hecho, experimentos en los que se efectuó una incubación prolongada con altas concentraciones de DTT previa

#### 4. Resultados

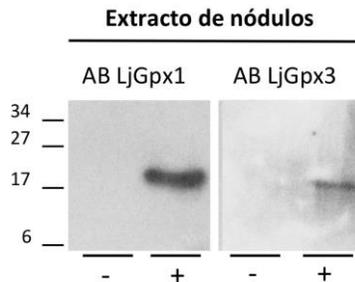
al SDS-PAGE mostraron la desaparición de la banda de menor tamaño aparente, que corresponde a la forma oxidada de la proteína.



**Figura 4.22** Análisis por espectrometría de masas que demuestra la presencia de un puente disulfuro entre Cys-114 y Cys-133 en LjGpx3. La masa molecular del péptido LjGpx3 ( $m/z$  3262,51) se desplazó 2 unidades de masa ( $m/z$  3264,53), correspondientes a los 2 H de los dos grupos tiol, cuando la proteína se incubó con DTT antes de la tripsinización. El mismo método se utilizó para demostrar la presencia de un puente disulfuro entre los residuos Cys equivalentes (Cys-140 y Cys-159) en LjGpx1.

Finalmente, nos propusimos investigar si la S-nitrosilación de LjGpxs es un mecanismo de regulación que ocurre en plantas intactas. Para ello, se crecieron plantas de Lotus en macetas durante 46 días y se incubaron durante 6 h con GSNO 5 mM (GSSG 5 mM como control) en Erlenmeyers, tal como se indica en la sección 3.2.2. Tras el *switch* de biotina, las proteínas biotiniladas se purificaron mediante cromatografía de afinidad y la presencia de LjGpx1 y LjGpx3 se demostró mediante *western blot* utilizando anticuerpos específicos frente a las dos proteínas. No se detectó señal en las muestras provenientes de plantas tratadas con GSSG, lo que

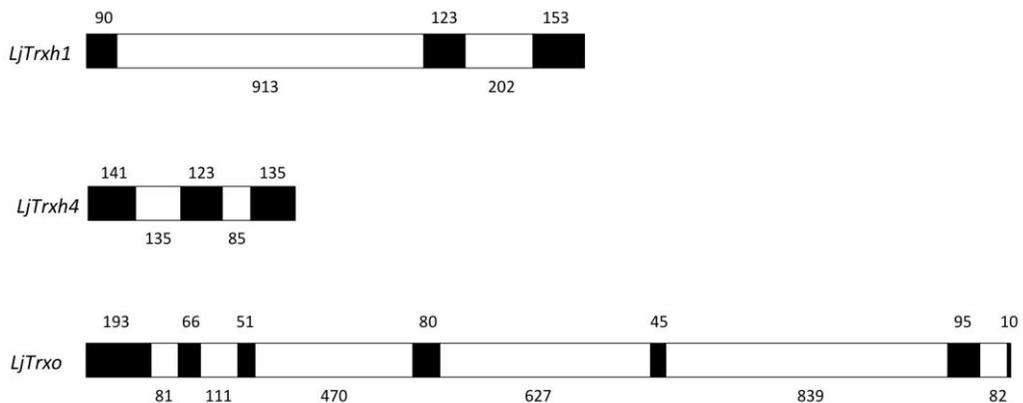
indica que LjGpx1 y LjGpx3 pueden ser reguladas mediante S-nitrosilación *in vivo* (figura 4.23).



**Figura 4.23** *Western blot* que muestra la nitrosilación de LjGpx1 y LjGpx3 en extractos de nódulos de plantas tratadas con GSSG 5 mM (-) o GSNO 5 mM (+). Las proteínas biotiniladas se purificaron por afinidad utilizando estreptavidina-agarosa y se detectaron mediante *western blot* con los anticuerpos de LjGpx1 y LjGpx3.

## 4.8 Estructura y función de las tioredoxinas

Una vez caracterizadas las enzimas LjGpx1 y LjGpx3, nos propusimos estudiar la función de las Trxs en los nódulos, ya que nuestros resultados han demostrado que estas proteínas regulan la actividad de las LjGpxs actuando como su dador de electrones.



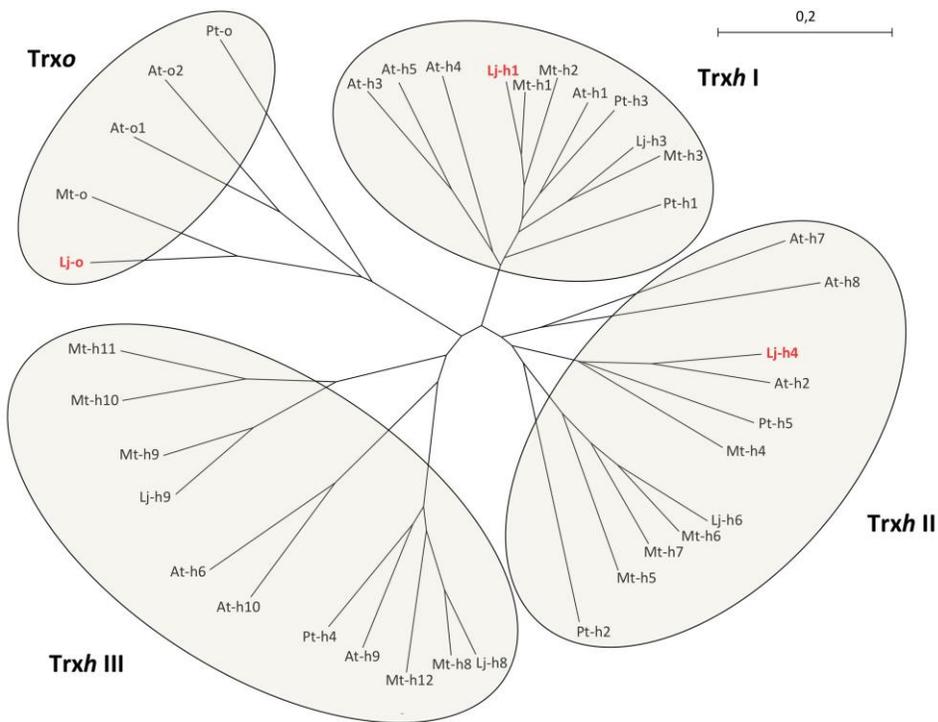
**Figura 4.24** Composición de exones-intrones en las principales Trxs de nódulos de Lotus. Los exones se muestran en negro y los intrones en blanco, y están dibujados a escala. Los números indican el tamaño en pares de bases.

En los nódulos, hojas y raíces de Lotus se expresan 13 Trxs, incluyendo cinco isoformas citosólicas (*h1*, *h3*, *h4*, *h8*, *h9*), siete plastidiales (*f*, *m1*, *m2*, *m4*, *x*, *y*, *z*) y una mitocondrial (*o*). En los nódulos, los mayores niveles de expresión corresponden a

#### 4. Resultados

LjTrxh1, LjTrxh4, LjTrxh9 y LjTrxo (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). En un primer paso, analizamos la estructura de los genes de las Trxs con mayor expresión en nódulos, comparando las secuencias con las TCs (*tentative consensus sequences*) obtenidas del *DFCI Lotus Gene Index* (6.0). Dichas estructuras se muestran en la figura 4.24.

También se realizó un alineamiento y un análisis filogenético de las secuencias de las Trxh y Trxo de Lotus y distintas especies modelo (leguminosas y no leguminosas) para verificar que la asignación a los distintos grupos de Trxs es correcta. En la figura 4.25 se muestra el árbol filogenético, en el que LjTrxh1 pertenece al grupo Trxh I, LjTrxh4 al Trxh II y LjTrxo al grupo de Trx mitocondriales.



**Figura 4.25** Árbol filogenético de las secuencias de aminoácidos de las Trxh y Trxo de Lotus (Lj), *Medicago truncatula* (Mt), *Populus tremula* (Pt) y Arabidopsis (At). En rojo se señalan las Trx de Lotus más significativas estudiadas en esta tesis. El alineamiento de las secuencias se realizó con el software Clustal W 2.1 (Larkin *et al.*, 2007) con el método de *neighbour-joining* y el árbol filogenético se visualizó con NJplot (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/njplot.html>).

En la figura 4.26 se muestra el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de LjTrxh1, LjTrxh4 y LjTrxo y sus ortólogas de *M. truncatula*, *P. tremula* y Arabidopsis. El centro catalítico (WCGPC) está altamente conservado en todas las secuencias.

Todas las *Trxh* presentan un Trp conservado (W17 en *LjTrxh1* y W34 en *LjTrxh4*) gracias al cual exhiben un aumento en la absorbancia a 290 nm. *LjTrxh1* contiene el motivo MAAEE en el extremo N-terminal, característico de transporte entre células y a floema (Ishiwatari *et al.*, 1995). *LjTrxh4* presenta una extensión N-terminal característica de las *Trxh* II (Gelhaye *et al.*, 2004). Las *Trxo* contienen una secuencia de direccionamiento mitocondrial, que no está presente en la proteína madura.

LjTrxh1	-----	
MtTrxh1	-----	
AtTrxh1	-----	
PtTrxh3	-----	
LjTrxh4	-----	
AtTrxh2	-----	
PtTrxh5	-----	
MtTrxh4	-----	
LjTrxo	MSRNLILRS--FALRHAI RN-----AVRPFLNRT-HLPSSLSNSKTTTS	40
MtTrxo	-----MALRNAIKN-----SVRPFLTNTNLPFSRIKSS--S	29
AtTrxo1	-----MKGN--WSIVRKVLHRQFSTLRSSTPSSRLSTSIRPLVLAPNSISSLIARN--S	50
AtTrxo2	-----MKSQ--WSNFHQ-----IGRN--S	15
PtTrxo	-----MRGNKALLVRALIFG-----SHRSSMNSFSRHLHENLISNPSKT	40
LjTrxh1	-----MAAEE---GTVIGVHTVEAWKEHLEKGNVSKK	29
MtTrxh1	-----MAAEE---GHVIGVHTVEAWKEHLEKGNVSKK	29
AtTrxh1	-----MAAEE---GQVIACHTVETWNEQLQKANESKT	29
PtTrxh3	-----MAAED---GQVIGCHTVEAWDEQLQRGNESKK	29
LjTrxh4	-----MGGVLS---SLFGGG--AGAASDPPES---SRVHTFHSPARWQLHFNFKDSSA	46
AtTrxh2	-----MGGALS---TVFGSGEDATAAGTESEF---SRVLKFSSSARWQLHFNEIKESNK	48
PtTrxh5	-----MGAVLSSIGSILSYLFGASAAGEDSASDQSGVTAFHSSARWQLHFNSIKNTNQ	54
MtTrxh4	-----MGSFLS---SVVGGG--PSQSSESEN---SSVKTFFHSSARWQLHFNFKDSDPR	46
LjTrxo	LFAATIASLTLPP-----PFHH--SRSLCS-APAN-PGVVLVNSEEEFNRLTKIQDNL	90
MtTrxo	LFAATLASSSYSS---HLSFHQ--SRSLSS-ASAS-PGFISVNSEEEFNKILTKVQDSSL	82
AtTrxo1	LFTASNIGPISIDFNFSNTSLPH--RRSLCS-EAGGENGVLVVKSEEEFINAMSKAQDGL	107
AtTrxo2	FLAASTVYVSNFNFNLTSLN--RRSFCF-AEGDRSSFVVLKSEAEFNSALS KARDGSL	72
PtTrxo	SHPSKLSLNFTTKHFSTPYLQPFQRTLCSSSSSGASNIVLVKSDEELNSGLKNVQEKSS	100
LjTrxh1	LIVVDFTVSWCGPGRFIAPILAEIAKKLPHVFLKVDVD--ELKTVAEEWVNEAMPTFLF	87
MtTrxh1	LIVVDFTASWCGPGRFIAPILAEIAKKLPNVTFLKVDVD--ELKTVAEEWAVDAMPTFLF	87
AtTrxh1	LIVVDFTASWCGPGRFIAPFFADLAKKLPNVLFLKVDVD--ELKSVASDWAIQAMPTFMF	87
PtTrxh3	LIVVIDFHASWCGPGRVIAFFLAELARKLPDVI FLKVDVD--ELKTVAQDWAVEAMPTFMF	87
LjTrxh4	LLVIDFSASWCGPGRFIEPAIHAMA EKFSVFNKIDVD--ELPDVAKEFEVQAMPTFVL	104
AtTrxh2	LLVVDFSASWCGPGRMIEPAIHAMADKFNVDVFKLDVD--ELPDVAKEFNV TAMPTFVL	106
PtTrxh5	LMVIDFAASWCGPGRKHMEPAVHAMA AKFTDVQFAKIDVD--ELPDVAQEFVQAMPTFVL	112
MtTrxh4	LVVIDFSATWCGPGRKMMEPIIQAMANEFTDVEFIKIDVD--ELSDVAQEFVQAMPTFL	104
LjTrxo	HAIYFTAVWCGPGRFISPIVIGELSKKYPHVTTYKIDIDQAEALRGTTLTKLQISSVPTLHF	150
MtTrxo	NAVLYFTAVWCGPGRFISPIVIGELSKKYPNVTTYKIDIDQAEIQDLSRLQITSVPTLYF	142
AtTrxo1	PSVYFTAAWCGPGRFISPVIVELSKQYPDVTTYKVIDIDEGGINSNTISKLNITAVPTLHF	167
AtTrxo2	PSVYFTAAWCGPGRFISPVILELSNKYPDVTTYKVIDIDEGGLSNAIGKLNVS AVPTLQF	132
PtTrxo	PAVYFTATWCGPGRFISPVIEELSKKYPHATYKVIDIDTEGLQNALASLNIAVPTLDF	160
LjTrxh1	LKEGKAVDKVVGAKKEELQLTITKHAEAPGTSTA-----	121
MtTrxh1	LKEGKLVDKVVGAKDQLQAAITKHATTDA-----	117
AtTrxh1	LKEGKILDKVVGAKKDELQSTIAKHLA-----	114
PtTrxh3	LKEGKIVDKVVGARKDELQQAIAKHTAPAAATASA-----	122
LjTrxh4	VKRKGEVARVIGAKKDELEKKVQLRAEVKDVATRLEIKAMPTFVFLKDGAPLEKLVGAN	164
AtTrxh2	VKRKGEIERIIGAKKDELEKKVSKLRA-----	133
PtTrxh5	VKKGNEVDRVVGAKKEELQRKIEKHRP-----	139

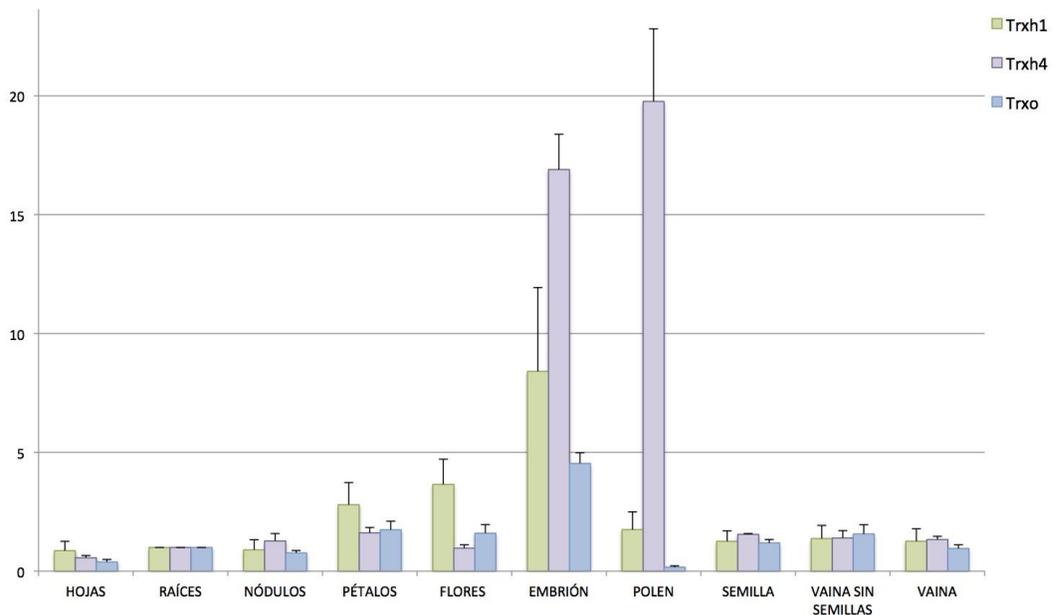
## 4. Resultados

---

MtTrxh4	LKNGKEVDKVVGAKKDELKNKVQKHKA-----	131
LjTrxo	FLNGKKADELVGADVAKLNRITEKLFKKD-----	179
MtTrxo	FQNGKKTDELIGADVARNLHLTEKLFKKD-----	171
AtTrxo1	FKGGSKKGEVVGADVTKLKNLMEQLYK-----	194
AtTrxo2	FKGGVKKAEIVGVVVRLKSVMEQLYK-----	159
PtTrxo	YKNGKKEETTIVGADVAKLKNTEMESLYRED-----	189
LjTrxh1	-----	
MtTrxh1	-----	
AtTrxh1	-----	
PtTrxh3	-----	
LjTrxh4	PEEIKKRIDGFVHSTHASIA 184	
AtTrxh2	-----	
PtTrxh5	-----	
MtTrxh4	-----	
LjTrxo	-----	
MtTrxo	-----	
AtTrxo1	-----	
AtTrxo2	-----	
PtTrxo	-----	

**Figura 4.26** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de LjTrxh1, LjTrxh4, LjTrxo y sus ortólogos de *Medicago*, *Arabidopsis* y *Populus*. En verde, el centro catalítico, altamente conservado. En azul, el Trp característico de las Trxh. En gris, el motivo N-terminal MAAEE. En amarillo, la extensión N-terminal característica de las Trxh II. Subrayado, péptido señal de direccionamiento a la mitocondria, presente en las Trxo. Alineamiento realizado con Clustal W 2.0.

Con el fin de obtener información sobre la diversidad funcional de LjTrxh1, LjTrxh4 y LjTrxo en las leguminosas, se purificó RNA a partir de diferentes tejidos y se determinaron los niveles de expresión mediante qRT-PCR (figura 4.27). Los resultados mostraron que LjTrxh1, LjTrxh4 y LjTrxo no sólo se expresan en los nódulos sino también en las hojas, raíces, pétalos, flores, embriones, polen, semillas y vainas. En concreto, los niveles de mRNA de LjTrxh1 fueron particularmente altos en los pétalos, flores y embrión y los de LjTrxh4 en embrión y polen, lo que sugiere que estas proteínas participan en procesos relacionados con la reproducción y desarrollo de las plantas. De forma similar, Trxo mostró niveles de expresión elevados en el embrión, aunque fueron significativamente más bajos en el polen y en las hojas.



**Figura 4.27** Expresión de *LjTrxh1*, *LjTrxh4* y *LjTrxo* en distintos tejidos de *Lotus*. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las raíces, a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  SE ( $n=3-6$ ). El indica aumento o disminución significativos de los niveles de expresión ( $> 2$  veces o  $< 0,5$  veces).

## 4.9 Dianas moleculares de *Trxh4*

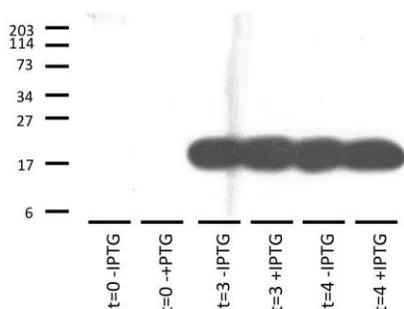
Para profundizar en el estudio de la función de las Trxs de nódulos, nos propusimos determinar y caracterizar sus dianas moleculares. Para ello, utilizamos cromatografía de afinidad en la que una versión mutada de *Trxh4* (una de las isoformas que presenta expresión más elevada en los nódulos) es capaz de formar puentes disulfuro intermoleculares estables con sus proteínas diana. Éstas pueden ser eluidas posteriormente e identificadas mediante espectrometría de masas.

En primer lugar se sobreexpresó y purificó la *LjTrxh4WT* (*wild type* o silvestre), tal y como se indica en el apartado 3.4. Se diseñaron cebadores específicos para amplificar su ORF y el producto de PCR resultó ser una banda única, que se purificó y se clonó en el vector pET200/D-TOPO®. Se realizó una expresión piloto para determinar las condiciones óptimas de sobreexpresión, siendo éstas las mismas que para *LjGpx1* y *LjGpx3*: crecimiento del cultivo hasta una  $DO_{600nm}=0,5-0,8$ ; inducción con IPTG 1 mM; y crecimiento durante 4 h a 37°C. Una vez establecidas las condiciones

#### 4. Resultados

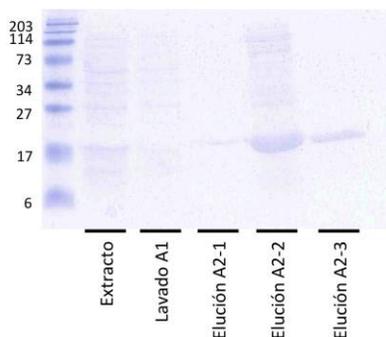
óptimas, se procedió a la sobreexpresión y purificación como se describe en el apartado 3.4.8 (figura 4.1).

Para comprobar que la proteína recombinante con la cola de poli-His se sobreexpresaba correctamente, se corrió un gel SDS-PAGE en el que se cargó extracto de cultivo inducido de BL21 que sobreexpresaba LjTrxh4WT. Las proteínas se transfirieron a una membrana y se realizó un *western blot*, utilizando como anticuerpo primario un anticuerpo anti-poli-His 1:5000 (Roche) y como secundario un anticuerpo *antimouse-HRP* 1:5000 (Roche) (figura 4.28). Se puede observar que hay presencia de proteína recombinante del tamaño adecuado.

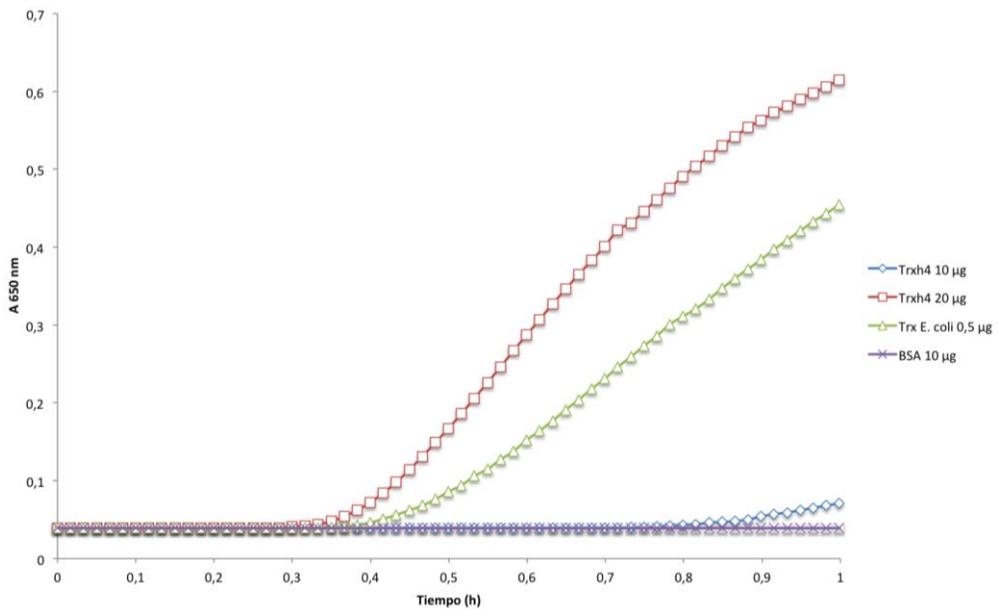


**Figura 4.28** *Western blot* en el que se observa la presencia de proteína recombinante cuando se cargaron en el gel 5  $\mu$ g de proteínas de extractos de las distintas alícuotas de la expresión piloto. Se muestran los tiempos 0, 3 y 4 h, cultivos sin inducir e inducidos con IPTG.

Para analizar el grado de purificación, se corrió un gel SDS-PAGE en el que se cargaron diferentes fracciones y se hizo una tinción con Azul de Coomassie para observar las proteínas (figura 4.29). Además, se comprobó que la LjTrxh4WT recombinante obtenida tenía actividad disulfuro reductasa debido a su capacidad para reducir la cadena  $\beta$  de la insulina, que es un sustrato artificial de las Trxs. En la figura 4.30 se muestra el aumento de absorbancia a 650 nm, correspondiente a la reducción de la cadena  $\beta$  de la insulina.



**Figura 4.29** Gel SDS-PAGE con tinción Coomassie en el que se observan las distintas fracciones del proceso de purificación de LjTrxh4 y su grado de pureza. Los distintos carriles son: extracto de proteínas de *E. coli*, proteínas presentes en el lavado con A1, fracción 0-8 mL de elución con A2, fracción 8-11 mL de elución con A2, fracción 11-16 mL de elución con A2.

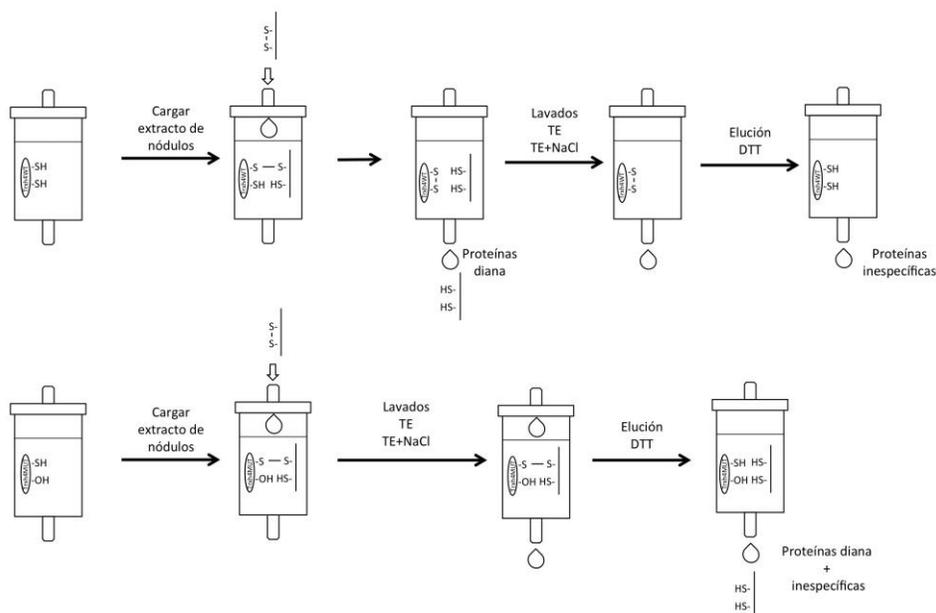


**Figura 4.30** Actividad reductora de insulina dependiente de LjTrxh4WT. La mezcla de reacción contenía 10 µg o 20 µg de LjTrxh4WT. Como control positivo se utilizaron 0,5 µg de Trx de *E. coli* comercial, y como control negativo 10 µg de BSA.

En segundo lugar, se obtuvo una LjTrxh4 mutante (LjTrxh4MUT), tal y como se describe en el apartado 3.11.2. La sobreexpresión y purificación de la LjTrxh4MUT fue igual que la de su versión silvestre. En el motivo conservado WCGPC del centro activo de las Trx hay dos Cys (Fig 4.26). En el caso de LjTrxh4MUT, se sustituyó la segunda Cys por una Ser. De esta forma, las proteínas que interaccionan con la LjTrxh4WT forman un puente disulfuro con la primera Cys y la segunda Cys rompe el enlace, quedando separadas (fig. 4.31). Por el contrario, las proteínas que interaccionan con la LjTrxh4MUT quedan unidas a la primera Cys, sin que exista una segunda Cys que rompa el enlace.

Una vez obtenidas las dos proteínas, WT y MUT, se procedió a montar las columnas de afinidad y se obtuvieron e identificaron las proteínas diana tal y como se describe en los apartados 3.11.3 y 3.11.6, y se muestra de forma esquemática en la figura 4.31.

## 4. Resultados



**Figura 4.31** Representación esquemática del proceso seguido para la obtención de las proteínas diana de LjTrxh4. Las dos columnas de *CNBr-Sepharose* llevaron unidas covalentemente LjTrxh4WT o LjTrxh4MUT. Se cargaron con la fracción soluble de un extracto de nódulos de Lotus, se lavaron con TE y TE + NaCl y las proteínas retenidas se eluyeron con TE + DTT. Las proteínas unidas a LjTrxh4MUT que no se unieron a LjTrxh4WT son las que se consideraron proteínas diana de LjTrxh4.

Se realizaron tres réplicas y el análisis por LC-MS/MS utilizando el modo DDAM (*data-dependent acquisition mode*) dio lugar a una larga lista de proteínas. Las proteínas retenidas por la columna con LjTrxh4WT son proteínas que se unen de forma inespecífica a la LjTrxh4, por lo que no se tuvieron en cuenta como proteínas diana. En cambio, se consideraron uniones específicas y, por lo tanto, posibles proteínas diana de LjTrxh4, las proteínas retenidas por la columna con LjTrxh4MUT y que no lo fueron por la columna con LjTrxh4WT. En la tabla 4.3 se muestran las proteínas diana obtenidas con este método.

**Tabla 4.3** Relación de proteínas de nódulos de Lotus que interaccionan con LjTrxh4. Se indica la descripción de la proteína, el número de acceso en la base de datos *The Universal Protein Resource* (www.uniprot.org) y el número de réplicas en que se ha procesado. Se indican con un asterisco las proteínas no descritas anteriormente como dianas de Trx.

<b>Descripción</b>	<b>UniProt</b>	
<b>Transporte</b>		
Coatómero subunidad alfa *	Q70I39	++
Coatómero subunidad delta *	I3SGX9	+
RAB1B *	Q40202	+
Transportador de fosfato mitocondrial *	Q8VWY1	+
Proteína de unión a selenio	I3SZA8	+
Proteína nuclear de unión a GTP Ran1A	P54765	+
<b>Señalización</b>		
Calmodulina *	I3SZV2	+
Calreticulina	I3SZX0	+
Proteína tipo ras	I3ST29	++
<b>Estrés</b>		
Sulfurotransferasa*	I3S1J7	+
Proteína universal de estrés tipo A *	I3SSP0	+
	I3SUH8	+
<b>Degradación proteica</b>		
Subunidad del proteosoma	I3S4X3	+
Inhibidor de la tripsina	I3S0E9	+
<b>Síntesis de proteínas</b>		
Proteína ribosomal 40S	I3S2J1	+
	I3S397	++
	I3T8Q2	+
	I3TA49	++
	I3S2E6	+
	I3SQF0	++
	I3S6J8	++
	I3S428	+
	I3S398	++
	I3SZ76	+
Proteína ribosomal 60S	I3T3P4	+++
	I3SAF6	++
	I3T397	+
	I3SB83	+
Factor de iniciación de la traducción *	I3T4X7	+
	I3T7Y1	+++
ATPasa 1 tipo Obg *		
<b>Biogénesis / degradación pared celular</b>		
Endo-1,3;1-4-beta-D-glucanasa *	I3SLZ3	+
<b>Organización celular</b>		
Actina 97	I3SK98	+
Factor despolimerizador de la actina*	I3SI08	+
Tubulina alfa	I3RZN5	+
<b>Modificaciones postraduccionales</b>		
Caseín quinasa II subunidad alfa *	I3SUL7	+

## 4. Resultados

<b>Desarrollo</b>		
Proteína relacionada con la madurez*	I3SQK0	+
Proteína específica de tallo TSjT1*	I3SXD3	++
	I3STI1	+
Tiol proteasa tipo aleuraina*	I3S1A0	+
<b>Metabolismo lípidos</b>		
Anexina *	I3SNL5	+
Pirofosfatasa soluble inorgánica *	I3S269	+
<b>Metabolismo secundario</b>		
NSPs *	I3SU61	++
<b>Metabolismo aminoácidos</b>		
Alanina aminotransferasa	I3S901	+
Asparagina sintetasa *	P49092	+
Aspartato aminotransferasa	I3T279	++
Fumarilacetoacetasa *	I3SQB1	+
Proteína de corte de la glicina	I3S7G1	+
Homocitrato sintasa *	D0VY45	+
L,L-diaminopimelato aminotransferasa	W0BWRO	++
Metileno tetrahidrofolato reductasa *	I3S0L6	+
O-metiltransferasa	I3SXR5	++
Peptidil-prolil cis-trans isomerasa	I3STY8	+
S-adenosilmetionina sintasa *	I3SQ78	+
Fosfatasa serina/treonina *	I3SNU6	+
Uricasa	I3T7W2	++
Uridina 5'-monofosfato sintasa *	I3T086	+
Uridina quinasa *	I3T123	+
Carbamoil-fosfato sintetasa (cadena pequeña) *	I3SBA2	+
<b>Ciclo del ácido cítrico</b>		
Malato deshidrogenasa	I3T024	++
<b>Metabolismo de nucleótidos</b>		
Adenina fosforribosil transferasa *	I3S7K2	+
	I3SBJ9	+
Adenilato quinasa	I3SSY8	+
Dominio proteico CBS	I3SU87	+
<b>Redox</b>		
Aldo-ceto reductasa	I3SWS6	+
Citocromo P450 *	O22307	++
Dihidroflavonol 4 reductasa *	I3T3D7	+
NAD(P)H quinona oxidoreductasa	I3T6Q9	+
Oxidoreductasa (teórica)	I3T1A8	+
Hidroxiácido oxidasa peroxisomal *	I3S358	+++
Policétido reductasa *	I3T5M5	+
Protein disulfuro isomerasa L-3b	I3SCT8	+
2CysPrx	I3SQA4	+++
Gpx1	Q56VU1	+++
Gpx2	I3T8U1	+++
Gpx3	Q56VS3	+
Glutación reductasa *	I3T078	+
Monodeshidroascorbato reductasa	I3S8J3	+
Monotiol glutarredoxina	I3T6K0	+
	I3S9I7	+++

<b>Fijación de nitrógeno</b>			
Nodulina *	I3SG45	+++	
Nlj21 *	O22306	++	
<b>Glucólisis</b>			
Gliceraldehído-3-P deshidrogenasa	I3SBE3	+	
<b>Metabolismo C-1</b>			
Gamma-glutamil hidrolasa *	I3T794	+	
<b>Cadena transporte electrónico</b>			
Citocromo c oxidasa	I3SPQ0	+	
<b>Fotosíntesis</b>			
Anhidrasa carbónica tipo A	A7DX12	+	
<b>Fermentación</b>			
Piruvato descarboxilasa	Q684K0	++	
<b>Síntesis vitaminas</b>			
Tiamina C isoforma *	I3SF11	+	
Tiamina tiazol sintasa	I3TAU0	+	

Para confirmar de forma inequívoca la presencia de tres LjGpxs (LjGpx1, LjGpx2 y LjGpx3) como proteínas diana, se utilizó el método TM (*target mode*), mucho más sensible, que busca péptidos específicos en la muestra. De esta forma se identificaron péptidos de las tres LjGpxs previamente identificadas con el método DDAM. Sin embargo, no se detectaron péptidos de LjGpx4, LjGpx5 o LjGpx6. En la tabla 4.4 se muestran los péptidos de las tres LjGpxs localizados con ambos métodos.

**Tabla 4.4** Identificación de péptidos correspondientes a LjGpxs presentes entre las proteínas que interaccionan con LjTrxh4, utilizando el método DDAM o TM. Se indica la relación  $m/z$  (masa/carga) de los iones de los péptidos fragmentados.

Proteínas y péptidos	$m/z$	DDAM	TM
<b>LjGpx1</b>			
FKAEFPVFDKVDVNGDSAAPLYK	853,10	++	+++
AEPVFDKVDVNGDSAAPLYK	761,38	++	+++
VDVNGDSAAPLYK	674,84	++	+++
GNDVNLGDYK	547,76	+++	+++
FLVDKEGNVVER	702,88	++	+++
<b>LjGpx2</b>			
FKSEFPIFDKIEVNGENSAPLYK	891,46	+	+++
SEFPIFDKIEVNGENSAPLYK	799,73	+	+++
IEVNGENSAPLYK	717,37	++	+++
GSDVDLSTYK	1084,52	++	+++
WGIFGDDIQWNFAK	848,90	+++	+++
FLVDKDGQVVDR	695,87	++	+++
<b>LjGpx3</b>			
SLYDFTVK	486,75	+	+++
ELNILEYK	511,28	+	+++

#### 4. Resultados

En la relación de proteínas susceptibles de ser dianas de LjTrxh4 aparecen distintas enzimas con función antioxidante. Entre ellas se encuentra la monodeshidroascorbato reductasa (MR), que participa en la regulación de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la célula a través del ciclo ascorbato-glutatiión. Debido a su importancia, decidimos investigar en profundidad si la actividad MR es regulada por LjTrxh4.

Para el ensayo, utilizamos una MR recombinante de arroz, cedida por el profesor Hargrove (Department of Biochemistry, Biophysics, and Molecular Biology, Iowa State University, Ames, Iowa, EEUU), que es ortóloga de la MR de Lotus que interacciona con la Trxh4. La MR de Lotus tiene dos únicas cisteínas, que podrían ser esenciales para su interacción con Trx, que están conservadas en especies como arroz (*Oryza sativa*), *M. truncatula* y Arabidopsis, entre otras, como se puede observar en la figura 4.32.

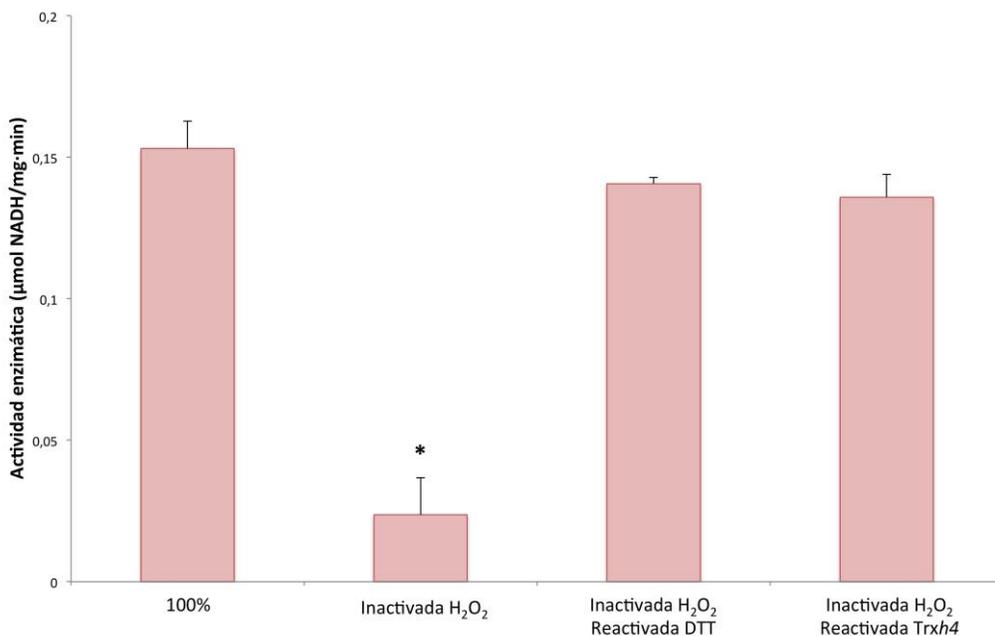
Arabidopsis	-MAEKSFKYIILGGGVSASILKTSDSLVLVLLLLSVRKVYLCKITCRWLIGYAAKEFANQ	59
Lotus	--MAKTFKYVILGGGVSA-----GYAAREFAKQ	26
Oryza	MASEKHPKYVILGGGVAA-----GYAAREFAKQ	28
Medicago	--MGRAFVYVILGGGVSA-----GYAALEFVKR	26
Arabidopsis	GVQPGELAVISKEAVAPYERPALSKEYLFPPEGAARLPGFHCVGS GGKLLPESYKQKGI	119
Lotus	GVKPGELALISKEAVAPYERPALSKEYLFPPEGAARLPGFHCVGS GGKLLPESYKQKGI	86
Oryza	GVKPGELALISKEAVAPYERPALSKEYLFPPEGAARLPGFHCVGS GGKLLPESYKQKGI	88
Medicago	GVSNGELCIIISDESVPYERPALSKEYLFPPEGAARLPSFHTCVGANEERLTPKWYREHGV	86
Arabidopsis	ELILSTEIVKADLSAKSLVSATGDFVKYQTLIIATGSTVLRLLTDFGVKGDADSKNLYLRE	179
Lotus	ELILSTEIVKADLAASLTSKAGETFNQTLVIATGSSVIRLTDGVEGADAKNIFYLRE	146
Oryza	ELILSTEIVKADLASKTLTSAVGATFTYEILIIATGSSVIRLTDGVEGADAKNIFYLRE	148
Medicago	ELVLTGVKSADVKKRKTLLTTTGETISYKVLIVATGARALKLEEFVNGSDAENVCLYLRD	146
Arabidopsis	IDDADKLVIAIKAKKGGKAVVGGGYIGLELSAVLRINLNDVMTVPPEWCMRPLFTADI	239
Lotus	VDDADQLYEAIKAKKNGRAVVGGGYIGLELSAVLRINLNDVMTVPPEWCMRPLFTSGI	206
Oryza	VDDADKLVAIQAKKGGKAVVGGGYIGLELSAALKINDFDVMTVPPEWCMRPLFTADI	208
Medicago	IADANRLVSAIQSSPGGNVAVVGGGYIGMECAASLVINKISVMTVPPEEHCMARLLTPKI	206
Arabidopsis	AAFYETYTNKGVKIIKGTVASGFTAQPNGEVKEVQLKDRGTLEADIVIVGVGAKPLTSL	299
Lotus	AEFYERFYANKGVNIKGTVATGFTASSSSEVKEVQLKDRVLEADLVVGVGGRPLTSL	266
Oryza	AAFYESYTNKGVKIIKGTVASGFTAQPNGEVKEVQLKDRVLEADLVVGVGGRPLTSL	268
Medicago	ASYYEYYKSRGVNFVKGTVLSDFDDNGKVTAVNLKTKISVDMVVVIGIRPNTGL	266
Arabidopsis	FKGQVEEDKGGIKTDAFFKTSVPDVAVAVGDVATFPLKMYGDRRVEHVDHRSKSAEQAVK	359
Lotus	FKGQVEEEKGGIKTDSFKNVFNVAVAVGDVATFPLKLYDELRRVEHVDHARKSAEQAVK	326
Oryza	FKGQVAEEKGGIKTDAFFETSVPGVAVAVGDVATFPMKMYNLRVVEHVDHARKSAEQAVK	328
Medicago	FEGLTLEKGGIKVNGMFMQSSNSVYAIGDVAAPVKAFGEMRRLRHVDSARKSAKHAVS	326
Arabidopsis	AIKAAEGGAAVEEYDYLPPFFYSRSDLSWQFYGDNDVGDVLFPGDSDNPNPKPFGAYVWQ	419
Lotus	AIKAAEDGKTVEEYDYLPPFFYSRSDLSWQFYGDNDVGDVLFPGDSDNPNPKPFGAYVWQ	386
Oryza	AIKKESGESVVEYDYLPPFFYSRSDLSWQFYGDNDVGDVLFPGDSDNPNPKPFGAYVWQ	388
Medicago	ATMEF---GKTGEFDYIIPFFYSRVFTLSWQFFGDNDVGVVYGEISAAGS--TFGAYVWN	381
Arabidopsis	GGKVVGFMEGGSDENKALAKVAKARPSAESLDELVKQGISFAAKI-----	466
Lotus	GGKVIQAFLEGGTPEENKAIKAVARVQPPVENVDQLAKEGLSFASKI-----	433
Oryza	DGKVLGAFLEGGSDENKAIKAVAKTQPPVANIEELKKEGLQFASKI-----	435
Medicago	KGHVVGAFLEGGTKEEYEAIAKVTRLRPAIEDLAELERQGLAFVAVTSQKPVASPPPIEV	441

Arabidopsis	-----
Lotus	-----
Oryza	-----
Medicago	SSSTSVLLLERPLYAWHATAGVVLAAASIAAFAYYYGKRRRRW 483

**Figura 4.32** Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de distintas MRs. En negrita y rojo, las Cys presentes en las secuencias. En negrita, rojo y marcadas en amarillo, las dos cisteínas conservadas.

En primer lugar se incubaron 1,22 nmol de MR con DTT 5 mM durante 30 min, a 25°C en oscuridad y se midió su actividad enzimática. Este valor se tomó como 100% de actividad. Después, se inactivó la MR con distintas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mM, 1 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM), incubando a 25°C durante 15 min. Se centrifugó en concentradores VivaSpin 2 para eliminar el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se recuperó el volumen inicial completando con tampón KP 50 mM (pH 8,0). Se determinó la actividad MR y se calculó el porcentaje de inactivación. Posteriormente, la MR inactivada se incubó con DTT 5 mM durante 30 min y se midió la actividad residual. Se eligieron los valores de concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los que la inactivación de la MR era reversible. Se repitió la inactivación de la MR con estas concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se incubó con exceso de LjTrxh4 durante 15 min a 25°C. Se midió la actividad y se determinó el porcentaje de actividad MR recuperado. Todas las reacciones se realizaron en tampón KP 50 mM (pH 8,0). En la figura 4.33 se muestran los datos obtenidos. La actividad de la enzima inactivada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 25 mM se reduce un 85%. La reactivación con DTT supuso una recuperación del 92% de actividad, mientras que con LjTrxh4 se alcanzó una recuperación del 89% de la actividad enzimática.

## 4. Resultados



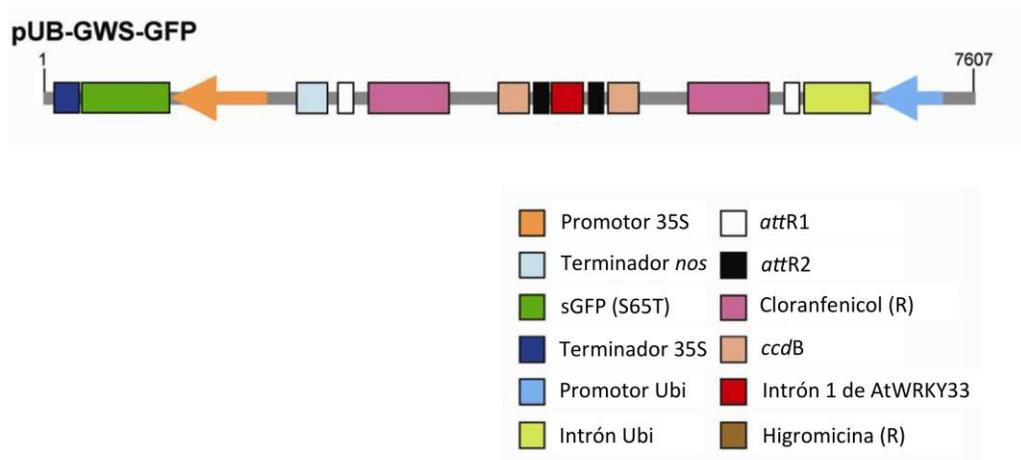
**Figura 4.33** Inactivación de la MR por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y reactivación por Trxh<sub>4</sub>. El 100% de actividad MR (μmol/mg·min) corresponde a la enzima incubada con DTT. Los valores son las medias de las actividades enzimáticas ± SE (n=3). El asterisco señala los datos que muestran diferencias significativas según el test *t* de Student ( $P < 0,05$ ).

### 4.10 Silenciamiento de Trxo mediante RNA interferente

Con el fin de profundizar en el estudio de la función de las LjTrxs en la nodulación, nos propusimos generar plantas transgénicas con Trxs silenciadas mediante RNA interferente (RNAi). Optamos por silenciar el gen *LjTrxo*, que codifica la única Trx mitocondrial descrita hasta ahora en nódulos de Lotus (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). La elección de este gen obedeció a dos razones principales. La primera es que el citosol y los plastidios contienen varias Trxs, por lo que el efecto del silenciamiento de una de ellas podría verse compensado por el resto; la segunda tiene que ver con el papel esencial de las mitocondrias en el metabolismo nodular como fuente de ATP y señales intracelulares. La hipótesis de partida fue que el silenciamiento de Trxo alteraría el estado redox mitocondrial y por tanto la capacidad para establecer simbiosis de las plantas y/o el funcionamiento del nódulo.

Se seleccionaron dos fragmentos de 250 pb específicos del gen *LjTrxo*, con muy baja homología con otras *LjTrxs*, para generar dos líneas diferentes de RNAi. Se amplificaron y se clonaron en el vector pUB-GWS-GFP (figura 4.34). Este vector contiene las secuencias del *cassette Gateway* en tándem, en orientaciones opuestas, y es capaz de producir RNA de doble cadena gracias a la presencia del intrón 1 de AtWRKY33 entre los *cassettes*. Esta estructura da lugar a un silenciamiento génico muy eficaz (Wesley *et al.*, 2001). El mecanismo de silenciamiento tiene lugar de la siguiente manera: el RNA de doble cadena es procesado por una enzima llamada Dicer, que lo corta en fragmentos de unos 22 nucleótidos. Una de las cadenas se incorpora al complejo RISC (*RNA-induced silencing complex*), que escanea la célula en busca de mRNA complementario inhibiendo su traducción, por lo que el gen queda silenciado (Hannon, 2002).

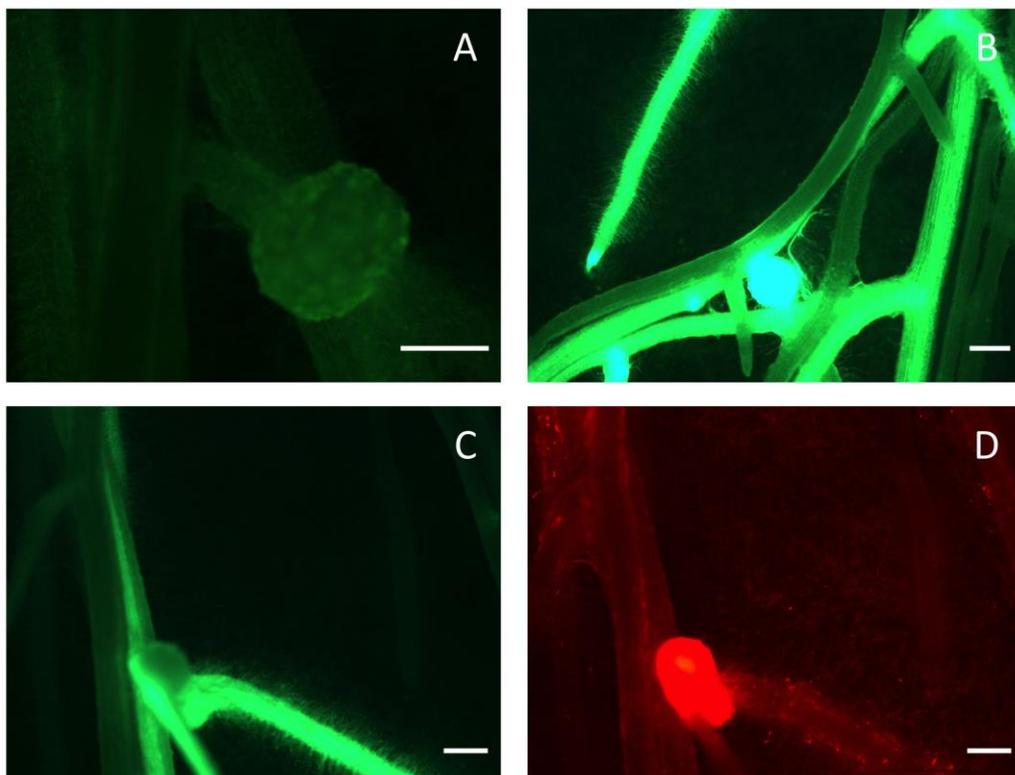
Se transformó *A. rhizogenes* LBA1334 con las construcciones obtenidas y se obtuvieron plantas con raíces transgénicas utilizando el método de *hairy-roots* (apartado 3.12.3). Las líneas de plantas se denominaron: LBA (*A. rhizogenes* sin transformar), pUB (*A. rhizogenes* con pUB-GWS-GFP vacío) RNAi1 (*A. rhizogenes* con pUB-GWS-GFP.Trxo\_secuencia1) y RNAi2 (*A. rhizogenes* con pUB-GWS-GFP.Trxo\_secuencia2).



**Figura 4.34** Estructura del vector pUB-GWS-GFP (Adaptado de Maekawa *et al.*, 2008)

#### 4. Resultados

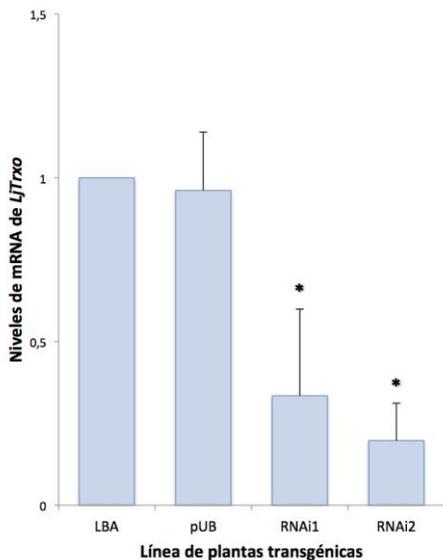
Las plantas con raíces transgénicas se inocularon con *M. loti* y crecieron en una cámara de ambiente controlado como se describe en Material y Métodos. Transcurridos 21 días desde la inoculación, los nódulos de raíces transgénicas y no transgénicas se observaron con una lupa Leica DFC420C (figura 4.35). Se prestó especial atención a su tamaño y morfología, y a simple vista no se observaron diferencias entre las distintas líneas. Para analizar las raíces y nódulos, se procedió entonces a separar raíces transgénicas y no transgénicas, ya que la técnica de *hairy roots* da lugar a que las plantas contengan ambos tipo de raíces.



**Figura 4.35** Microfotografías de plantas transgénicas *hairy roots*. A, raíces y nódulo de planta LBA; B y C, raíces y nódulo de planta RNAi; se observan en color verde intenso las raíces transgénicas por la fluorescencia de la GFP y en color verde pálido las no transgénicas; D, raíces y nódulo de planta RNAi, en rojo intenso los rizobios y el nódulo por la fluorescencia de la DsRED. A, B y C tomadas con el filtro GFP3 y D tomada con el filtro DSR. Barras, 500  $\mu$ m.

En primer lugar, se determinó el grado de silenciamiento obtenido midiendo la expresión de *LjTrxo* en las distintas líneas de plantas con raíces transgénicas mediante qRT-PCR (figura 4.36). Tomamos como control los niveles de mRNA de *LjTrxo* de la línea LBA. La línea pUB mostró el mismo nivel de expresión que el control, mientras que las líneas RNAi-1 y RNAi-2 mostraron un silenciamiento del gen de un 67% y un

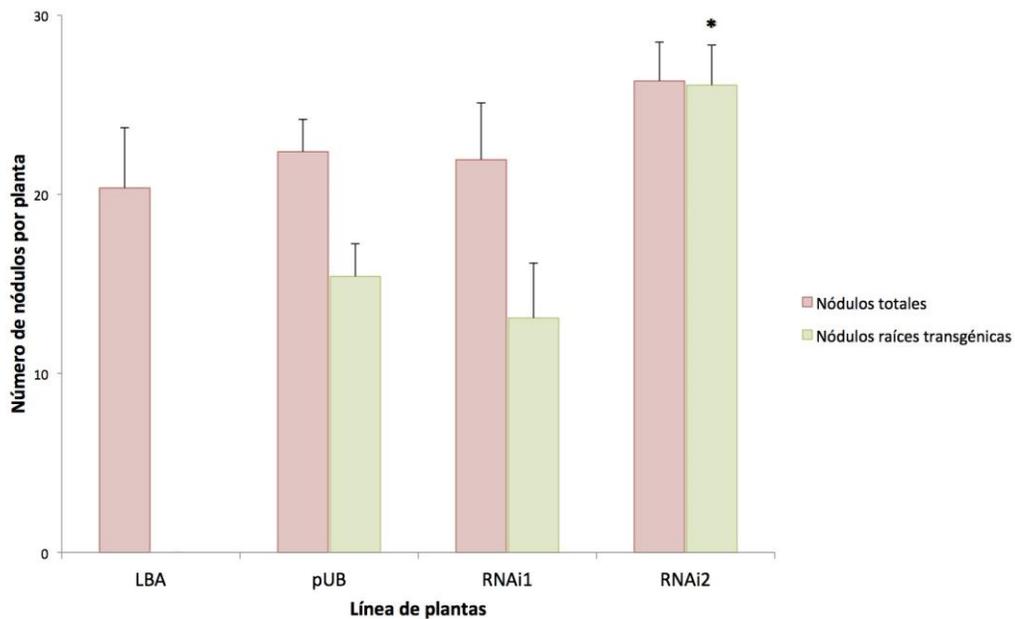
80%, respectivamente. Una vez demostrado que las plantas obtenidas mostraban un alto silenciamiento de *LjTrxo*, se procedió a contar el número de nódulos presentes en las raíces, tanto transgénicas como no transgénicas (figura 4.37).



**Figura 4.36** Análisis del grado de expresión de *LjTrxo* en las diferentes líneas de plantas transgénicas. Los niveles de mRNA se normalizaron frente a *ubiquitina* y se expresaron de forma relativa a los niveles de mRNA de las muestras control, a las que se les asignó el valor de 1, utilizando el método de Livak y Schmittgen (2001). Los valores corresponden a las medias  $\pm$  SE ( $n=4$ ). El asterisco indica una disminución significativa de los niveles de expresión ( $< 0,5$  veces).

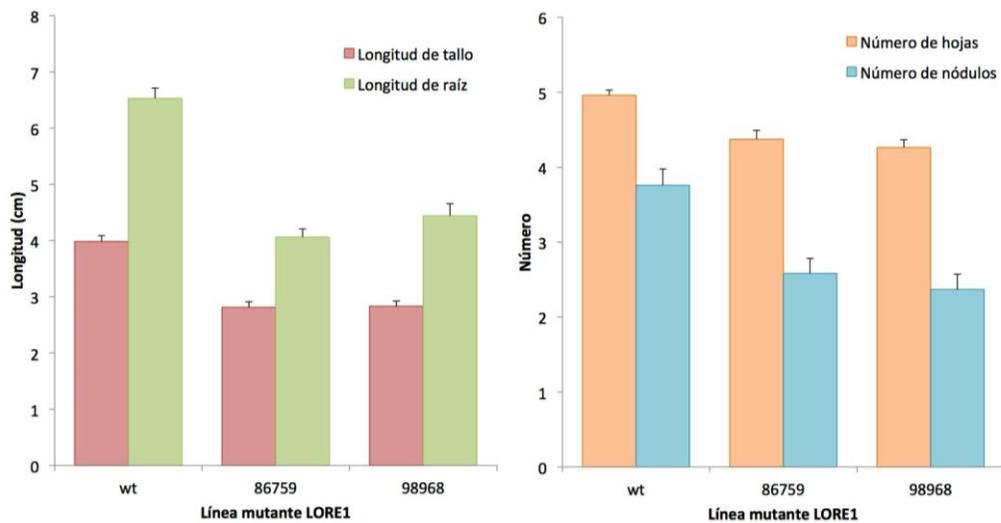
Las raíces de la línea pUB (que no tiene *LjTrxo* silenciado) presentaron una media de 22 nódulos por planta. De forma similar, las raíces de las líneas con niveles reducidos de *Trxo* (RNAi-1 y RNAi-2) mostraron entre 21 y 26 nódulos por planta, respectivamente. La proporción de raíces transgénicas frente a no transgénicas fue variable en las tres líneas. Por ejemplo, la mayoría de plantas de la línea RNAi-2 sólo presentó raíces transgénicas (29 plantas de 30 totales), mientras que RNAi-1 mostró tanto raíces transgénicas como no transgénicas (9 plantas de 32 totales sólo tenían raíces transgénicas, las 23 restantes presentaban ambos tipos de raíces), al igual que la línea pUB (12 plantas de 29 totales sólo tenían raíces transgénicas). De estos resultados concluimos que el silenciamiento de *LjTrxo* en las raíces no provoca cambios en la capacidad de *Lotus* para establecer simbiosis con *M. loti*. En cualquier caso, no podemos descartar alteraciones más sutiles en el desarrollo y/o metabolismo nodular que no han sido investigadas en esta tesis.

## 4. Resultados



**Figura 4.37** Representación gráfica de la media de nódulos totales y nódulos en raíces transgénicas por planta presentes en cada una de las líneas de plantas transgénicas. Los datos representan las medias  $\pm$  SE de 17 plantas de la línea LBA, 29 plantas de la línea pUB, 32 plantas de la línea RNAi-1 y 30 plantas de la línea RNAi-2. El asterisco representa diferencias significativas según el test *t* de Student ( $P < 0,05$ ).

Para completar los estudios de silenciamiento, establecimos una colaboración con el Dr. Niels N. Sandal, de la Universidad de Aarhus (Dinamarca), quien nos cedió semillas de dos líneas independientes de mutantes de Lotus (86759 y 98968) con mutaciones *knockout* por inserción del retrotrasposón LORE1 (Fukai *et al.*, 2012; Urbański *et al.*, 2012) en los exones 1 (línea 86759) y 2 (línea 98968) del gen *Trxo* (Niels Sandal, comunicación personal). Las semillas germinaron y las plántulas nodularon en placa durante 28 días, tras los cuales se procedió a su fenotipado, cuyos resultados se muestran en la figura 4.38. Éstos fueron diferentes a los obtenidos en las plantas transgénicas con *hairy roots*. En concreto, las dos líneas de plantas mutantes mostraron una reducción significativa en el número de nódulos. Además, se observó una disminución de la longitud de tallo, de la raíz y del número de hojas. Por el contrario, el número de raíces laterales no se vio afectado por la ausencia de *Trxo*.



**Figura 4.38** Fenotipo de dos líneas mutantes *Trxo*. A la izquierda, el gráfico muestra la longitud de tallo y raíces de la línea control (wt) y las líneas mutantes LORE1. A la derecha, el gráfico muestra el número de hojas y de nódulos del control (wt) y las mutantes. Los datos son medias  $\pm$  SE ( $n=25$ ).

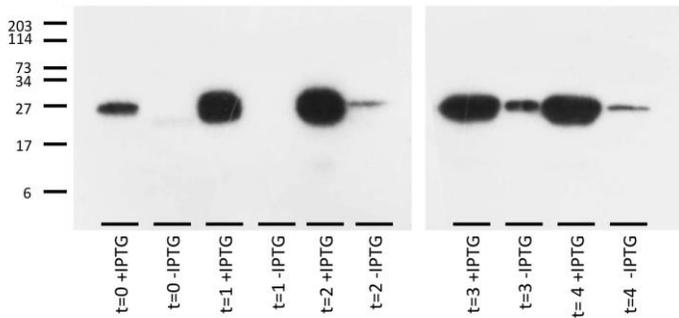
#### 4.11 Sobreexpresión y purificación de LjTrxo

Paralelamente a la obtención de plantas transgénicas con *LjTrxo* silenciado, nos propusimos producir LjTrxo recombinante para poder obtener anticuerpos que nos ayudasen a determinar la expresión de LjTrxo en las plantas transgénicas, así como estudiar en el futuro la función de la proteína en mitocondrias durante el desarrollo y la senescencia de la planta. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos y se amplificó la ORF de la proteína madura. Los programas de predicción de la localización subcelular confirmaron que la LjTrxo es mitocondrial y que el péptido de tránsito incluye probablemente los 18 primeros aminoácidos. Por consiguiente, se amplificó la secuencia codificante a partir del aminoácido 19. El producto de PCR resultó ser una banda única, que se purificó y se clonó en el vector pET200/D-TOPO®.

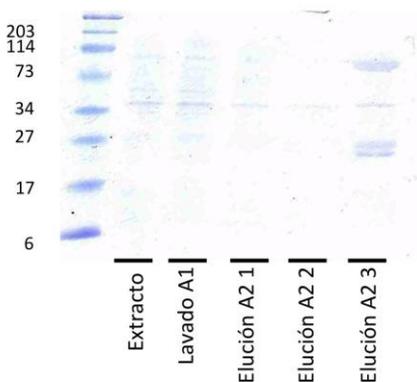
Se realizó un experimento piloto para determinar las condiciones óptimas de expresión de LjTrxo. El cultivo creció a 37°C hasta una  $DO_{600nm} = 0,5-0,8$ , y la expresión se indujo con IPTG 1 mM. En la figura 4.39 se puede observar que la expresión es ya muy alta tras 1 h y que se mantiene a ese nivel hasta al menos 4 h. Sin embargo, a

#### 4. Resultados

partir de las 2 h se aprecia también una débil expresión en ausencia de IPTG. Se repitió el cultivo a gran escala y se procedió a la purificación de la proteína recombinante de la forma descrita en el apartado 3.4.7. Para comprobar el grado de purificación se corrió un gel SDS-PAGE con 20  $\mu$ g de proteína de cada fracción de la purificación (figura 4.40).



**Figura 4.39** Western blot en el que se muestra la presencia de LjTrxo recombinante en cada alícuota de la expresión piloto. Se cargaron 20  $\mu$ g de proteína en cada carril, y se utilizó como anticuerpo primario anti-poli-His.

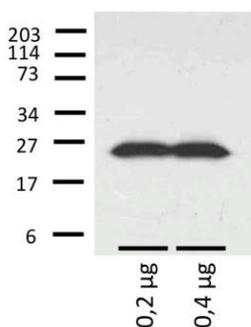


**Figura 4.40** Gel SDS-PAGE con tinción Coomassie en el que se observan las distintas fracciones del proceso de purificación de LjTrxo y su grado de pureza. Los distintos carriles son: extracto de proteínas de *E. coli*, proteínas presentes en el lavado con A1, fracción 0-4 mL de elución con A2, fracción 4-8 mL de elución con A2, fracción 8-12 mL de elución con A2.

En la figura 4.40 (fracción 8-12 mL) observamos dos bandas muy próximas de tamaño aparente similar al de Trxo, y una banda mucho mayor, que podría corresponder a una proteína contaminante o a un oligómero. Las tres bandas mostraron una intensidad similar. Para determinar si las diferentes bandas correspondían a Trxo con distinto estado *redox* la proteína purificada se incubó con DTT 20 mM durante 1 h. El gel SDS-PAGE mostró que el DTT no produce cambios en el patrón de bandas, por lo que concluimos que las dos bandas de menor tamaño no corresponden a la forma oxidada y reducida de Trxo. El tratamiento desnaturalizante

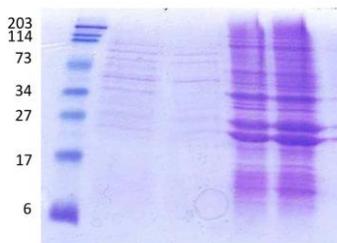
con urea 8 M tampoco varió el patrón de bandas del gel, lo cual sugiere que éste no refleja diferentes conformaciones de la misma proteína.

Para comprobar este supuesto, se cargó un gel SDS-PAGE con la proteína recombinante purificada y se realizó un *western blot*, utilizando como anticuerpo primario anti-poli-His (fig. 4.41). Se observó una sola banda, lo que confirma la presencia de proteínas contaminantes no relacionadas con Trxo tras el proceso de purificación.



**Figura 4.41** *Western blot* en el que se muestra la presencia de LjTrxo recombinante en 0,2 µg y 0,4 µg de proteína purificada. Se utilizó como anticuerpo primario anti-poli-His 1:5000.

Para mejorar la purificación de LjTrxo intentamos optimizar su sobreexpresión aumentando el tiempo de inducción con IPTG. Se tomaron muestras de dos cultivos inducidos durante 5 y 16 h, respectivamente, y se corrió un gel SDS-PAGE con las fracciones solubles e insolubles de los mismos (figura 4.42). Se tiñó con Coomassie y se observó que la proteína recombinante se presentaba principalmente en la fracción insoluble, sin diferencias en cuanto al tiempo de inducción con IPTG.

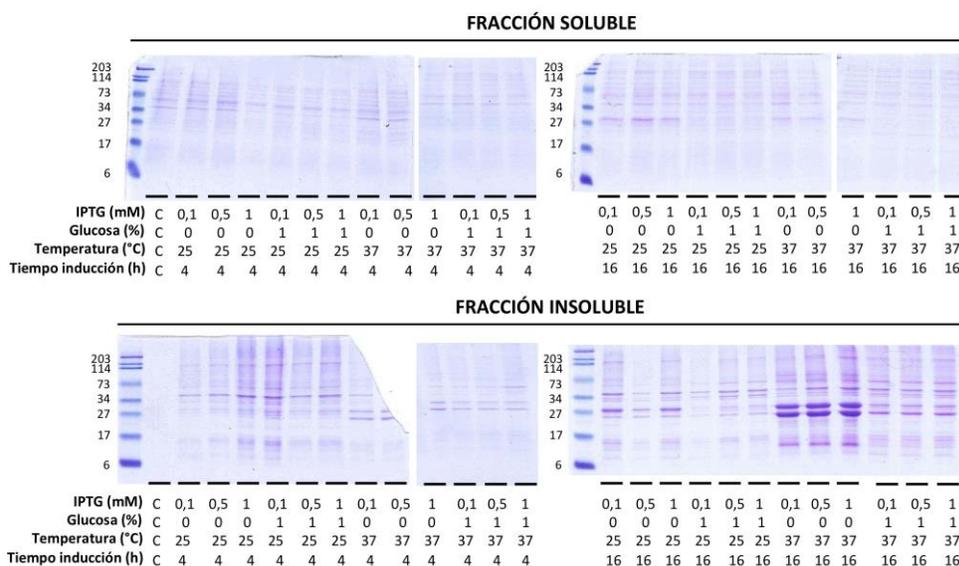


**Figura 4.42** Gel SDS-PAGE mostrando las proteínas presentes en la fracción soluble (carriles 1 y 2) e insoluble (carriles 3 y 4) del extracto de proteínas de *E. coli*, tomadas a las 5 h (carriles 1 y 3) y a las 16 h (carriles 2 y 4) de inducción con IPTG.

A partir de aquí, se intentó optimizar las condiciones de cultivo para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante. En general, la reducción de la tasa de síntesis de la proteína disminuyendo la concentración de inductor o la temperatura de crecimiento, o bien alterando los componentes el medio de cultivo, ha demostrado

#### 4. Resultados

ser eficaz en la obtención de una mayor proporción de proteína soluble. Por lo tanto, se realizó una expresión piloto probando diferentes concentraciones de IPTG (0,1 mM, 0,5 mM y 1 mM), añadiendo glucosa 1% al medio de cultivo y creciendo el cultivo a 25°C o a 37°C. Se prepararon 12 tubos falcon con 3 mL de cultivo con todas las combinaciones posibles de estas condiciones y se recogieron alícuotas a las 4 h y 16 h de inducción. Se centrifugaron y los pellets se resuspendieron en tampón de lisis. Se sonicaron y centrifugaron y se separaron las fracciones soluble e insoluble de todas las alícuotas. Se corrieron varios geles SDS-PAGE y se tiñeron con Coomassie (figura 4.43).

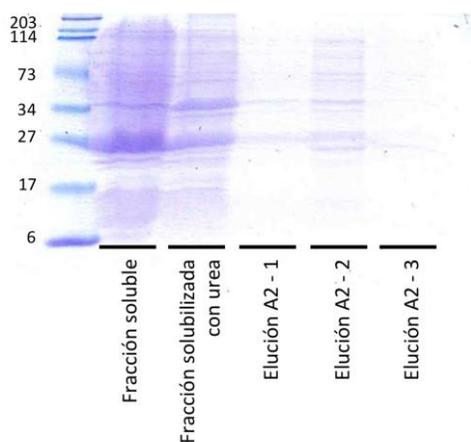


**Figura 4.43** Geles SDS-PAGE mostrando el perfil proteico de la fracción soluble e insoluble, a las 4 h y 16 h de inducción con IPTG, de los cultivos de *E. coli* transformada con LjTrxo crecidos en diferentes condiciones de concentración de IPTG, porcentaje de glucosa y temperatura de crecimiento. Como control (C) se utilizó *E. coli* sin transformar.

La inducción durante 4 h a 25°C apenas produjo proteína recombinante en las fracciones soluble e insoluble. En cambio, en los cultivos crecidos a 37°C se observó una pequeña cantidad de proteína en la fracción insoluble. En la inducción durante 16 h se observó que la mayor parte de la proteína sobreexpresada se encuentra en la fracción insoluble, siendo la proteína soluble una pequeña fracción del total. A partir de los resultados mostrados en la figura 4.43 se determinó que las mejores condiciones para obtener proteína soluble (en cualquier caso, con un rendimiento bajo) son IPTG 0,5 mM, 0% glucosa, 25°C y 16 h de inducción, y las mejores

condiciones para obtener proteína insoluble son IPTG 1 mM, 0% glucosa, 37°C y 16 h de inducción.

Intentamos solubilizar la proteína recombinante de la fracción insoluble. Para ello, se resuspendió el pellet obtenido de 2 L de cultivo con las condiciones mencionadas anteriormente en tampón TE. Se sonicó y se centrifugó. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 10 mL de TE que contenía urea 8 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM. Se incubó durante 2 h, se centrifugó durante 20 min a 20000 g y el sobrenadante se dializó frente a TE con  $\beta$ -mercaptoetanol 20 mM durante toda la noche. Tras la diálisis, se concentró el extracto, se cambió el tampón a solución A1 (KP 50 mM (pH 7,8); NaCl 300 mM; imidazol 40 mM) y se purificó con la columna de afinidad *HiTrap Chelating*. Se corrió un gel SDS-PAGE con la fracción soluble del extracto inicial y con las fracciones de la purificación de la fracción insoluble solubilizada (figura 4.44). Desafortunadamente, estos experimentos no nos permitieron solubilizar cantidades apreciables de Trxo, por lo que tuvimos que descartar la idea de generar anticuerpos específicos para esta proteína.



**Figura 4.44** Gel SDS-PAGE teñido con Coomassie en el que se muestran las fracción soluble del extracto de proteínas de *E. coli*, la fracción de proteínas solubilizadas con urea 8 M y las distintas fracciones de 4 mL de la fase de elución con A2 (KP 50 mM (pH 7,8); NaCl 300 mM; imidazol 250 mM) de la purificación con la columna de afinidad *HiTrap-Chelating*.



## **5. DISCUSIÓN**



## 5 DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización de glutatión peroxidasas de Lotus

Los nódulos de leguminosas cuentan con una amplia variedad de defensas antioxidantes para mantener las ROS/RNS bajo control, permitiendo el establecimiento y correcto funcionamiento de la simbiosis.

LjGpx1 y LjGpx3 son dos isoformas con una elevada expresión en nódulos de Lotus (Colebatch *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2009). Su análisis cinético indica que ambas catalizan la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxidos orgánicos y peróxidos de lípidos a los correspondientes alcoholes utilizando Trx. Además, es de interés destacar que la afinidad aparente y la eficiencia catalítica es mayor con peróxidos de lípidos que con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los peróxidos orgánicos.

Otras Gpxs de plantas muestran actividad glutatión peroxidasa, dependiente de GSH, frente a peróxidos orgánicos, pero no frente a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Herbette *et al.*, 2002). En cualquier caso, la actividad enzimática detectada *in vitro* fue baja. Esto podría explicarse por la falta del residuo SeCys, esencial para la actividad de las Gpxs de animales, que es sustituido por Cys en el centro catalítico de las Gpxs de plantas. En la bibliografía aparecen más ejemplos de baja (Wilkinson *et al.*, 2000; Avery y Avery, 2001; Sztajer *et al.*, 2001) o nula actividad (Gaber *et al.*, 2001; Okamura *et al.*, 1997) de Gpxs seleno-independientes con GSH como donador de electrones. Sin embargo, la Gpx de arroz (*Oryza sativa*) puede actuar con GSH y Trx como donadores de electrones, aunque con Trx sólo es capaz de reducir hidroperóxidos de fosfolípidos,

mientras que con GSH reduce también H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *t*-butil hidroperóxido (Wang *et al.*, 2007).

En nuestro caso, no se detectó actividad con ninguno de los peróxidos cuando se utilizó GSH como dador de electrones, por lo que, basándonos en los datos obtenidos de las cinéticas enzimáticas, concluimos que ambas isoformas son fosfolípido hidroperóxido peroxidasas dependientes de Trxs. Las Gpxs de *Populus* y *Brassica rapa* también dependen de Trxs. Sin embargo, no muestran diferencias catalíticas significativas con los diferentes peróxidos (Jung *et al.*, 2002; Navrot *et al.*, 2006).

En general, la eficiencia catalítica de las Gpxs es más baja que la de catalasas o ascorbato peroxidasas, pero reducen un rango más amplio de sustratos. Asimismo, la presencia de cisteínas reactivas susceptibles de sufrir diferentes tipos de modificaciones oxidativas hace que LjGpx1 y LjGpx3, además de como peroxidasas, probablemente contribuyan a la defensa frente a situaciones de estrés como sensores redox en cascadas de señalización todavía por identificar (Couturier *et al.*, 2013).

La interacción de LjGpx1 y LjGpx3 con Trxs ha sido verificada en esta tesis mediante estudios de cromatografía de afinidad y proteómica. Para ello, se utilizaron una versión mutada de LjTrh4 y dos métodos distintos de espectrometría de masas. Se determinó que, al menos, tres Gpxs (LjGpx1, LjGpx2 y LjGpx3) forman puentes disulfuro con LjTrh4, lo cual indica que las Trxs son los reductores *in vivo* de estas LjGpxs.

Los estudios de complementación llevados a cabo en levaduras apoyan el papel de las LjGpxs como fosfolípido hidroperoxidasas *in vivo*. *Saccharomyces cerevisiae* expresa tres Gpxs, identificadas como fosfolípido hidroperoxidasas (Avery y Avery, 2001). La cepa mutante tiene una triple delección, por lo que carece de Gpxs, y es muy sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al *t*-butil hidroperóxido. La expresión de LjGpx1 y LjGpx3 en la levadura mutante confirió tolerancia frente a ambos peróxidos, lo que demuestra que las proteínas son funcionales y además son capaces de utilizar las Trxs endógenas como reductores. Este hecho sugiere que las estructuras de las Gpxs y Trxs están muy conservadas en los eucariotas. Además, las LjGpxs confirieron tolerancia al ácido linoléico, el cual hace a las membranas más sensibles a la peroxidación lipídica (Avery y Avery, 2001), y a la cafeína, que causa lesiones de membrana (Kuranda *et al.*, 2006),

por lo que parece evidente que las LjGpxs protegen frente a la peroxidación de lípidos. Finalmente, el efecto beneficioso de las LjGpxs en las levaduras sometidas a estrés salino indica que las LjGpxs pueden atenuar el efecto del estrés oxidativo causado por NaCl, como se propone para la Gpx de una línea celular de *Citrus sinensis* tolerante a sal (Gueta-Dahan *et al.*, 1997; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2004).

## 5.2 Regulación de LjGpx1 y LjGpx3

Puesto que las propiedades cinéticas de ambas LjGpxs parecen ser muy similares, es posible que haya una expresión diferencial de las dos proteínas en diferentes etapas del desarrollo de los nódulos, o en respuesta a determinadas condiciones medioambientales. Además, ambas proteínas pueden presentar localizaciones específicas, en diferentes tejidos y/o orgánulos.

Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar se determinó la expresión de los genes en diferentes condiciones. En los nódulos de Lotus, *LjGpx1* aumentó su expresión tras el tratamiento con NO y *LjGpx3* lo hizo tras el tratamiento con Cd y algunas hormonas. Por el contrario, ninguno de los genes varió su expresión en respuesta a NaCl.

Estudios previos en nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento con NaCl 150 mM en Lotus no afecta a la expresión de *LjGpxs* en las raíces, excepto *LjGpx4*, que disminuyó su expresión entre 1 y 24 h (Ramos *et al.*, 2009). En Arabidopsis, los transcritos de algunas Gpxs aumentaron sus niveles tras 3-12 h de tratamiento con NaCl 500 mM (Sugimoto y Sakamoto, 1997; Rodriguez-Milla *et al.*, 2003). En plantas de naranjo (*Citrus sinensis*) sensibles a la salinidad la expresión de Gpx1 aumentó tras 4-7 h de tratamiento con NaCl 200 mM pero no lo hizo en una línea tolerante a sal (Avsian-Kretchmet *et al.*, 1999). Las plantas de Lotus son relativamente tolerantes a sal. Este hecho puede explicar que el tratamiento con concentraciones elevadas no afecte a la expresión de LjGpx1 y LjGpx3. De hecho, estudios previos mostraron que el tratamiento con NaCl 150 mM no causa acumulación de iones ni daño oxidativo en hojas y raíces, aunque sí induce la expresión de SODs y algunas Gpxs en hojas, pero no en raíces (Rubio *et al.*, 2009).

En cuanto al Cd, los principales síntomas de su toxicidad en plantas son menor crecimiento, clorosis, epinastia foliar, alteración de la ultraestructura del cloroplasto, inhibición de la fotosíntesis, supresión de la germinación y del crecimiento del tubo polínico y alteración del metabolismo del N y S (Gill *et al.*, 2011). El Cd induce estrés oxidativo mediante mecanismos indirectos, como la inhibición del sistema antioxidante o la activación de enzimas productoras de ROS como NADPH oxidasas (Chaoui y El Ferjani, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2004). En hojas de *Arabidopsis*, los niveles de proteína de Gpx aumentan en respuesta a Cd (Navrot *et al.*, 2006). Además, estudios de cristalografía muestran la capacidad de dos dímeros de la Gpx5 de *P. trichocarpa* para unir 32 átomos de Cd. Este hecho ha llevado a proponer que algunas Gpxs de plantas podrían actuar como sumidero de Cd (Koh *et al.*, 2007). Estudios previos en nuestro laboratorio (Ramos *et al.* 2009), realizados en raíces de *Lotus corniculatus*, mostraron que el Cd causa una disminución de la expresión de *Gpx1*, *Gpx2*, *Gpx4* y *Gpx6* entre 3 y 24 h de tratamiento, y de *Gpx5* tras 3 h, mientras que aumenta la expresión de *Gpx3*, *Gpx4* y *Gpx5* después de 1 h y de *Gpx3* tras 24 h. Por lo tanto, el Cd provoca una activación muy rápida y transitoria (1 h) de algunas LcGpxs específicas y un descenso posterior (24 h) de los niveles de mRNA de todos los genes (excepto *Gpx3*). En los nódulos observamos una respuesta rápida al Cd de *Gpx3*, que aumenta su expresión a las 6 h de tratamiento y vuelve a sus niveles normales a las 24 h. La diferencia entre la respuesta de las Gpxs de nódulos y raíces se debe, probablemente, a que éstas son el lugar de entrada del Cd a la planta. Parte del Cd puede ser retenido en las paredes celulares, atrapado por fitoquelatinas y metalotioneínas en el citosol o secuestrado en las vacuolas. Por lo tanto, la concentración de Cd a la que son expuestas las células de los nódulos es, seguramente, menor que la presente en las células de la raíz. Tampoco podemos descartar diferencias interespecíficas entre *L. japonicus* y *L. corniculatus* en la respuesta defensiva frente a metales pesados.

Además de por factores ambientales, los genes que codifican Gpxs pueden estar regulados por hormonas y reguladores del crecimiento (auxinas, GA, ABA, SA y JA), como muestran estudios en diferentes especies (Li *et al.*, 2013; Zhai *et al.*, 2013). En *Arabidopsis*, *Gpx3* está relacionada con la respuesta a ABA (Miao *et al.*, 2006). La mutación de *Gpx3* interrumpe la activación por esta hormona de los canales de calcio

y la expresión de los genes de respuesta a ABA y a situaciones de estrés. También en *Arabidopsis*, el tratamiento con auxinas induce la expresión de todas las Gpxs en tallos, excepto *Gpx1* y *Gpx7*, mientras que en raíces disminuye la expresión de *Gpx1* y *Gpx2* y aumenta la de *Gpx4* y *Gpx7*. En nuestro caso, ningún tratamiento con fitohormonas produjo un cambio significativo en los niveles de expresión de *LjGpx1*, mientras que *LjGpx3* es inducida por CKs y en menor medida por ACC, precursor del etileno. Ya que el tratamiento con fitohormonas se llevó a cabo en plantas sanas y no estresadas, la acumulación de transcritos de *LjGpx3* puede ser debida, más allá de la defensa antioxidante, a la activación de cascadas de señalización intracelular relacionadas con el desarrollo. Por ejemplo, en *Arabidopsis* las Gpxs son importantes en el control de la arquitectura radicular, y la pérdida de cualquiera de las isoformas influye en la densidad de las raíces laterales (Passaia *et al.*, 2014).

### 5.3 Localización de LjGpx1 y LjGpx3

Trabajos previos en nuestro laboratorio, en los que se utilizó un anticuerpo frente a una Gpx de *P. trichocarpa* (PtGpx3.2, Navrot *et al.*, 2006) para inmunolocalizar las Gpxs en hojas, raíces y nódulos de *Lotus*, indicaron que estas proteínas se localizan exclusivamente en cloroplastos o amiloplastos de los tres órganos. En los nódulos, el marcaje estuvo asociado con los granos de almidón de las células no infectadas del córtex y de las células intersticiales de la región infectada. De forma similar, se detectó señal en los proplastidios de los ápices de las raíces y en los cloroplastos de las hojas. Sin embargo, el análisis mediante *western blot* en hojas, raíces y nódulos de *Lotus* utilizando este anticuerpo y, paralelamente, un anticuerpo obtenido frente a péptidos sintéticos basados en la secuencia de la Gpx1 de tomate (*Lycopersicon esculentum*, Herbette *et al.*, 2004), reveló que ambos reconocían, al menos, dos isoformas de LjGpx en los tres órganos y que, por lo tanto, carecían de la especificidad requerida para determinar de forma inequívoca la localización subcelular de las diferentes isoformas de Gpxs en *Lotus*.

En esta tesis se ha estudiado la localización a nivel tisular, celular y subcelular de LjGpx1 y LjGpx3 utilizando las técnicas de hibridación *in situ* de mRNA,

## 5. Discusión

---

inmunolocalización con microscopía electrónica y detección por fluorescencia de proteínas de fusión con GFP.

Tanto los niveles de mRNA como de proteína de LjGpx1 y LjGpx3 fueron más altos en la zona infectada del nódulo. En esta zona los requerimientos de protección antioxidante son elevados debido a las altas tasas metabólicas producidas por la fijación de nitrógeno y a la presencia de gran cantidad de membranas simbiosomales, susceptibles de peroxidación debido a su elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Puppo *et al.*, 1991). Además, se detectaron cantidades significativas de mRNA de *LjGpx3* en el córtex y en los haces vasculares.

En otras especies se han descrito Gpxs cloroplásticas, citosólicas y/o mitocondriales. Estudios de expresión de proteínas de fusión de Gpx con YFP (*yellow fluorescent protein*) en protoplastos revelaron que las Gpx1 y Gpx3 de arroz se localizan en mitocondrias, Gpx2 en citosol y cloroplastos, Gpx4 en cloroplastos y Gpx5 en citosol, retículo endoplasmático y cloroplastos. La transformación de callos con construcciones de la fusión del promotor de la Gpx3 de arroz con GUS mostró la localización de esta proteína en la región del floema de raíces adventicias y en los ápices de raíces jóvenes, específicamente en la zona de diferenciación (Passaia *et al.*, 2013). En las células de los tricomas la Gpx1 de tomate se detectó en el citoplasma, cerca de la membrana plasmática, y en menor medida en la pared celular, mientras que en las células de colénquima se localizó principalmente en la pared celular. En el floema se localizó en el citoplasma y en la pared de las células acompañantes (Herbette *et al.*, 2004). En *P. trichocarpa*, utilizando una fusión con GFP, se demostró que dos Gpxs (Gpx1 y Gpx3.2) se localizan en cloroplastos, y la Gpx3.2 también en mitocondrias (Navrot *et al.*, 2006).

Nuestros análisis *in silico* predijeron que LjGpx1 se localiza probablemente en mitocondrias y/o cloroplastos y LjGpx3 en el retículo endoplasmático y ruta secretora. Los estudios de inmunolocalización en los nódulos, realizados con anticuerpos altamente específicos generados en el transcurso de esta tesis, detectaron LjGpx1 en los amiloplastos y núcleo y LjGpx3 en el retículo endoplasmático, citosol y núcleo. Los experimentos con proteínas de fusión con GFP confirmaron la presencia de ambas proteínas en el núcleo de protoplastos de *Arabidopsis* y de células de hojas de *N. benthamiana*. En la bibliografía sólo se ha descrito una Gpx de plantas localizada en el

núcleo, la Gpx8 de Arabidopsis (Gaber *et al.*, 2012). Los diferentes programas de localización subcelular muestran la ausencia de señal de localización nuclear y sugieren una localización citoplásmica. Sin embargo, estos autores mostraron que la proteína fusionada con GFP se localiza en el núcleo y citoplasma de células de epidermis de cebolla (*Allium cepa*). Además, la presencia en el núcleo se confirmó mediante el análisis *western blot* de la fracción nuclear purificada a partir de hojas de Arabidopsis. Como se ha mencionado, tanto en Arabidopsis como en nuestro caso la predicción de la localización es citosólica y las proteínas carecen de una señal de localización nuclear clásica (tipo NLS). Por lo tanto, es posible que, al tratarse de proteínas pequeñas (<40 kDa), entren al núcleo por difusión pasiva o que existan mecanismos alternativos de localización nuclear (Lange *et al.*, 2007). El núcleo es una fuente de producción de ROS (Ashtamker *et al.*, 2007). Por lo tanto, necesita un sistema antioxidante que le permita mantener un estado *redox* estable. Por ejemplo, se ha demostrado que una Gpx localizada en el núcleo de células de mamíferos juega un papel crítico en la protección frente al estrés oxidativo (Del Maestro y McDonald, 1989; Rogers *et al.*, 2002). Además, las Gpxs podrían interactuar con factores de transcripción sensibles al estado *redox*, regulando así la expresión de genes en respuesta a condiciones medioambientales o en diferentes estados de desarrollo.

#### 5.4 Regulación por S-nitrosilación de LjGpx1 y LjGpx3

El NO es reconocido como un regulador fundamental del metabolismo celular y de la fisiología en los animales. Además, en los últimos años numerosos trabajos científicos han puesto de manifiesto que esta molécula es también muy importante en las plantas, donde participa en una gran cantidad de procesos que incluyen la regulación del desarrollo y la señalización intracelular durante la respuesta inmune o a estrés abiótico (Astier *et al.*, 2012).

Las LjGpxs contienen residuos de Cys esenciales para la catálisis y la nitrosilación de Cys es la vía principal de transmisión de la bioactividad del NO. Además, la regulación diferencial de los genes que codifican LjGpx1 y LjGpx3 por GSNO y fitohormonas, así como su localización nuclear, sugieren que las LjGpxs juegan un papel más allá de su capacidad antioxidante. Por lo tanto, las Gpxs son buenos

candidatos para participar como intermediarios de la función biológica del NO, aunque no hay referencias en la literatura a este respecto. Para validar esta hipótesis, nos propusimos determinar en qué grado las LjGpxs están reguladas por S-nitrosilación. Ésta puede regular la función de las proteínas a través de diferentes mecanismos: promoviendo o evitando la formación de puentes disulfuro intra o intermoleculares, previniendo su oxidación irreversible, actuando sobre residuos de Cys catalíticos, impidiendo la unión de cofactores y/o favoreciendo la translocación de las proteínas al núcleo (Astier *et al.*, 2012).

La inactivación de las Gpxs por S-nitrosilación observada en este trabajo contribuye a la idea de que el NO puede regular los niveles de ROS inhibiendo la actividad de diversas enzimas antioxidantes (Clark *et al.*, 2000). La inactivación de las LjGpxs probablemente provoca un aumento transitorio de la concentración de sus sustratos diana, por ejemplo hidroperóxidos de lípidos, que podrían actuar como moléculas señal interconectando las rutas de señalización de NO y ROS, que juegan papeles complementarios, por ejemplo, en la respuesta inmune de las plantas (Zaninotto *et al.*, 2006).

En este sentido, existen diferencias en cuanto al efecto del NO en la actividad de distintas enzimas antioxidantes. La regulación de la Apx por NO está bien estudiada. Así, la Apx de guisante aumenta su actividad cuando está nitrosilada en la Cys-32 (Begara-Morales *et al.*, 2014), de forma similar a lo que ocurre en boniato (*Ipomoea batatas*) y soja (Lin *et al.*, 2011; Keyster *et al.*, 2011). Por el contrario, en tabaco el NO inhibe la actividad Apx (Clark *et al.*, 2000). En Arabidopsis, las auxinas causan la desnitrosilación e inhibición parcial de la actividad Apx1 en las raíces (Lombardo *et al.*, 2006; Kolbert *et al.*, 2007). Además, recientemente, Correa-Aragunde *et al.* (2013) mostraron que la S-nitrosilación de Apx1 en la Cys-32 aumenta su actividad enzimática, dando lugar a un aumento en la resistencia a estrés oxidativo. Por el contrario, la mutación de la Cys-32 causa la reducción de actividad enzimática. Mediante este mecanismo, el NO puede regular la homeostasis del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las plantas, estableciendo de nuevo un lazo molecular entre las rutas de señalización de NO y ROS (Yang *et al.*, 2015). En cualquier caso, el papel del NO como regulador del estado redox celular y de la actividad enzimática parece complejo. Experimentos *in vivo* e *in vitro* mostraron que la S-nitrosilación de la Apx citosólica de tabaco es la

responsable de un rápido descenso de su actividad en el inicio de la muerte celular programada. Es posible que la S-nitrosilación induzca la ubiquitinación y degradación de Apx y actúe como parte de la ruta de señalización que lleva a la muerte celular programada (de Pinto *et al.*, 2013).

En cuanto a otras enzimas antioxidantes, se ha estudiado el efecto de la S-nitrosilación en Prxs. En hojas de Arabidopsis, PrxII B y PrxII E son S-nitrosiladas durante la respuesta inmune (Lindermayr *et al.*, 2005; Romero-Puertas *et al.*, 2007). La S-nitrosilación de PrxII E inhibe su actividad peroxidasa y peroxinitrito reductasa. Los autores proponen que éste es un mecanismo de transducción de la señal mediada por NO y ROS durante la infección por *Pseudomonas syringae* (Romero-Puertas *et al.*, 2007, 2008).

## 5.5 Estructura y función de Trx

Las Trxs son una familia importante de proteínas en plantas que actúan como dador de electrones de enzimas antioxidantes, como por ejemplo las Gpxs, además de ejercer como reguladores *redox* de un gran número de proteínas, como se ha descrito por ejemplo para las enzimas del ciclo de Calvin en la fotosíntesis (Buchanan *et al.*, 2002). El genoma completamente secuenciado de Arabidopsis contiene 22 genes que codifican Trxs (Meyer *et al.*, 2005), y un número similar se ha identificado en *M. truncatula* (Alkhalfioui *et al.*, 2008). En Lotus se expresan 14 Trxs: seis isoformas de Trxh, tres de Trxm y una isoforma de cada de Trxf, Trxx, Trxy, Trxz y Trxo (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). Recientemente, Alkhalfioui *et al.*, (2008) identificaron en *M. truncatula* dos nuevas Trxs que funcionan específicamente en la simbiosis con los rizobios, y que nombraron Trx "s" (de simbiosis). Su secuencia contiene un péptido señal de direccionamiento al retículo endoplásmático, y su centro catalítico difiere del típico de las Trxs, siendo LCSPC o WCGQNC. No se han encontrado ortólogos de estas dos isoformas en los genomas de Arabidopsis, arroz y *P. trichocarpa*, lo cual es esperable ya que estas especies no forman simbiosis fijadoras de nitrógeno. Sin embargo, tampoco existe ninguna Trx "s" en el genoma de Lotus o de soja, lo que sugiere que este tipo de Trx podría realizar alguna función específica en los nódulos de

crecimiento indeterminado, como los de *M. truncatula*. De hecho, se ha especulado que estas Trxs podrían actuar manteniendo los péptidos ricos en Cys (NCR, *nodule-specific cysteine-rich*) en estado reducido (P. Frenedo, Université de Nice, Francia; comunicación personal). Estos péptidos son esenciales para la diferenciación de las bacterias en bacteroides (Maróti *et al.*, 2015).

Para obtener una visión más amplia sobre la función de las Trxs en la fisiología de las plantas, se investigó la expresión de *Trxh1*, *Trxh4* y *Trxo* en distintos órganos y tejidos. Los resultados mostraron una gran abundancia de transcritos en las flores (*Trxh1*), embrión (*Trxh1*, *Trxh4* y *Trxo*) y polen (*Trxh4*). Estos datos son consistentes con su importante función en la fisiología de la semilla y la posterior movilización de reservas durante la germinación (Serrato y Cejudo, 2003; Kobrehel *et al.*, 1991). Además, diversos estudios relacionan expresión de Trxs con tasas elevadas de división celular (Barajas-López *et al.*, 2007). En los nódulos, las Trxs podrían llevar a cabo funciones similares relacionadas con el desarrollo del nódulo y la movilización de nutrientes.

### 5.6 Dianas moleculares de Trxs

El desarrollo de la proteómica ha permitido identificar decenas de proteínas que interactúan con Trxs en diversos tejidos y especies. El marcaje y aislamiento de potenciales dianas y su posterior identificación por espectrometría de masas se ha conseguido mediante el uso de sondas fluorescentes o marcadas con isótopos específicas de tioles y de la cromatografía de afinidad con mutantes de Trx (Montrichard *et al.*, 2009). La información sobre las proteínas que interactúan con las Trxs en nódulos de leguminosas es muy limitada. Sin embargo, la singularidad de este órgano, debido a que en su interior se lleva a cabo la fijación biológica del N<sub>2</sub>, hace muy interesante el estudio de las interacciones *redox*. En el único estudio publicado hasta la fecha del que tenemos conocimiento, Du *et al.*, (2010) identificaron una uricasa específica de nódulos, la nodulina 35, como diana molecular de las Trxs de soja, estableciéndose así la relación entre Trxs y regulación del desarrollo nodular. La uricasa es una enzima que cataliza la oxidación del ácido úrico a alantoína y es esencial en la ruta de síntesis de ureidos. Se sintetiza preferentemente en los polisomas libres

durante el desarrollo nodular y se localiza en los peroxisomas de las células no infectadas del nódulo (Nguyen *et al.*, 1985).

Nuestro análisis también detectó esta uricasa, así como numerosas proteínas relacionadas con diversos procesos metabólicos, detallados en la tabla 4.3. En nuestro caso, utilizamos una LjTrxh4 en la que la Cys-60 (Cys *resolving* del centro catalítico) se sustituyó por una Ser. Con esta proteína mutada se confeccionó una columna de afinidad capaz de retener las posibles dianas moleculares presentes en los extractos de nódulos de Lotus. El análisis por LC-MS/MS utilizando el modo DDAM dio lugar a una lista de unas 75 proteínas, relacionadas sobre todo con el transporte, metabolismo de aminoácidos, síntesis de proteínas y sistema *redox* del nódulo, lo que muestra la amplia función reguladora que tienen las Trxs. De estas proteínas, aproximadamente la mitad se describen, hasta donde sabemos, por primera vez en esta tesis.

Entre las proteínas antioxidantes señaladas como posibles dianas moleculares se encuentra una Prx (denominada 2CysPrx) y tres Gpxs, a las que me he referido en el primer punto de esta discusión. Es sabido que las cuatro proteínas son sustrato directo de las Trxs, que actúan como fuente de poder reductor. Además, hay otra proteína con funciones antioxidantes, la MR, que forma parte del ciclo ascorbato-glutati6n. Por su relevancia, en esta tesis decidimos estudiar la posible regulaci6n de la actividad MR por las Trxs.

Los medios de extracci6n utilizados para determinar actividad MR contienen reductores como el  $\beta$ -mercaptoetanol con el fin de evitar la r6pida inactivaci6n de la enzima en presencia de  $O_2$ . Por lo tanto, es probable que en las células esta enzima sea regulada mediante un mecanismo *redox*. Utilizando una MR recombinante de arroz, ort6loga de la MR de Lotus que interacciona con la Trx, determinamos que LjTrxh4 es capaz de reactivar la MR previamente oxidada con  $H_2O_2$ . Este hecho sugiere que el estado *redox* de la MR es esencial para su actividad enzimática. Hasta donde sabemos, no existen datos sobre la funci6n de las Trxs en la regulaci6n del ciclo ascorbato-glutati6n. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que las Trxs participan en la homeostasis de  $H_2O_2$  en las células, no s6lo actuando como reductores directos de Gpxs y Prxs, sino regulando adem6s la actividad MR.

## 5.7 Líneas silenciadas y mutantes *knockout* de *Trxo*

En nódulos de Lotus se ha identificado una única Trx mitocondrial, *Trxo* (Tovar-Méndez *et al.*, 2011). Sin embargo, existen evidencias de que algunas isoformas *Trxh* también están presentes en las mitocondrias (Gelhay *et al.*, 2004; Martí *et al.*, 2009). Además, en algunos casos se han detectado *Trxo* (Martí *et al.*, 2009) y *Trxh* (Serrato y Cejudo, 2003) en el núcleo. La localización nuclear de las Trxs es consistente con la localización de LjGpxs en el núcleo mostrada en esta tesis.

Hace más de una década se describieron las Trxs como reguladores del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ciclo TCA) en mitocondrias de plantas (Balmer *et al.*, 2004; Yoshida *et al.*, 2013). Además, se observó una relación entre cambios *redox* en la mitocondria, compatibles con un posible papel de las Trxs, y la activación de flujos anapleróticos del ciclo TCA.

Ya que las mitocondrias generan la mayor parte del ATP necesario para el metabolismo y su estado *redox* determina el destino celular (Rhoads y Subbaiah, 2007), nuestra hipótesis de partida fue que *Trxo* desempeña un papel esencial en el metabolismo de las células nodulares y, por lo tanto, en el establecimiento de la simbiosis y el funcionamiento del nódulo.

Se obtuvieron dos líneas independientes RNAi utilizando el sistema de *hairy roots*, con un silenciamiento del mRNA de *Trxo* del 67% (línea RNAi-1) y 80% (línea RNAi-2). A simple vista no se observaron diferencias en la nodulación, ni en el tamaño o la morfología de los nódulos formados en las raíces transgénicas. El número de nódulos tampoco varió significativamente entre las plantas silenciadas y no silenciadas, lo que en un principio nos llevó a proponer que el silenciamiento de *Trxo* no influye en la capacidad de Lotus para establecer simbiosis con *M. loti*.

Sin embargo, en un trabajo muy reciente, Daloso *et al.* (2015) describieron que los mutantes *knockout trxo1* de Arabidopsis presentaban una disminución de peso fresco de la parte aérea durante las cuatro primeras semana de crecimiento, mientras que en la sexta semana el peso fresco era significativamente más alto en los mutantes respecto a la línea *wild-type*. Además, los mutantes mostraron una menor tasa de germinación en presencia de sacarosa, aunque el crecimiento radicular no resultó afectado. Por otra parte, dos enzimas del ciclo TCA, fumarasa y succinato

deshidrogenasa, exhibían mucha mayor actividad en el mutante *trxo1*. Esta observación fue atribuible a que ambas enzimas son inactivadas por *Trxo1* y, junto con otros datos, permitió concluir que *Trxo* regula el TCA *in vivo*, posiblemente a través de modificaciones *redox* de residuos específicos de Cys de dichas enzimas (Daloso *et al.*, 2015).

Aunque en nuestras plantas transformadas de manera transitoria por *hairy roots* no se observó ningún fenotipo, al menos de forma evidente, no podemos descartar cambios metabólicos similares a los descritos en *Arabidopsis*. Estos hipotéticos cambios no se han investigado debido a la heterogeneidad del material obtenido con el sistema *hairy roots*. Por esta razón, en una segunda etapa se obtuvieron dos líneas mutantes *knockout* del gen *Trxo*. La caracterización fenotípica de ambas líneas estables a los 28 días de edad indica que los mutantes *trxo* de *Lotus* presentan una disminución en la longitud del tallo y raíz y en el número de hojas y nódulos, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Daloso *et al.* (2015) y confirma nuestra hipótesis de que *Trxo* contribuye a la capacidad de *Lotus* para formar nódulos. La caracterización detallada de los mutantes *Trxo* de *Lotus* se está llevando a cabo en la actualidad en nuestro laboratorio.

Las diferencias entre los resultados obtenidos con las líneas silenciadas mediante el sistema *hairy roots* (expresión transitoria) y los obtenidos con las líneas mutantes LORE1 (expresión estable) pueden deberse, al menos en parte, a que en las primeras el silenciamiento de *Trxo* no fue completo y, por tanto, la expresión residual de *Trxo* podría haber sido suficiente para mantener la homeostasis mitocondrial, evitando una alteración del fenotipo.



## **6. CONCLUSIONES**



## 6 CONCLUSIONES

1. Las dos glutatión peroxidasas más abundantes en los nódulos (LjGpx1 y LjGpx3) son fosfolípido hidroperóxido peroxidasas dependientes de tiorredoxinas (Trxs).
2. En los nódulos de Lotus LjGpx1 y LjGpx3 participan en la defensa antioxidante y probablemente actúan como intermediarios en las cascadas de señalización mediadas por óxido nítrico y fitohormonas. Esta conclusión se basa en tres resultados obtenidos en esta tesis: la expresión de los genes que codifican LjGpx1 y LjGpx3 es regulada diferencialmente en respuesta metales pesados, óxido nítrico y fitohormonas; LjGpx1 y LjGpx3 son reguladas postrasduccionalmente mediante la S-nitrosilación de cisteínas implicadas en su actividad enzimática; LjGpx1 y LjGpx3 complementan cepas mutantes de levaduras deficientes en glutatión peroxidasas favoreciendo su crecimiento en situaciones de estrés.
3. En los nódulos, los transcritos que codifican LjGpx1 y LjGpx3 se localizan preferentemente en la zona infectada y LjGpx3, además, en el córtex y en los haces vasculares. En las células, LjGpx1 se localiza en los plastidios y núcleo y LjGpx3 en el retículo endoplasmático, citosol y núcleo.
4. Las Trxs interactúan con numerosas proteínas en los nódulos. Éstas están relacionadas con el transporte, metabolismo de aminoácidos, síntesis de proteínas y sistema *redox*. La interacción con una de estas proteínas, la monodeshidroascorbato reductasa, se ha demostrado mediante ensayos

## 6. Conclusiones

---

bioquímicos y apunta a la participación de las Trx en la homeostasis de  $H_2O_2$  a través de la regulación del ciclo ascorbato-glutati6n.

5. Experimentos con plantas transg6nicas (RNAi), con niveles reducidos de una Trx mitocondrial (Trxo), y con mutantes deficientes en esta prote6na muestran que la ausencia de Trxo afecta al desarrollo de las plantas y al establecimiento de la simbiosis con los rizobios.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



## ***Bibliografía***

- Aho EL, Kelly LP** (1995) Identification of a glutathione peroxidase homolog in *Neisseria meningitidis*. *DNA sequence* 6: 55 – 60
- Alkhalfioui F, Renard M, Frendo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C, Montrichard F** (2008) A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiology* 148: 424-435
- Aparicio-Tejo P, Arrese-Igor C, Becana M** (2000) Fijación biológica de nitrógeno. En: *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (J Azcón-Bieto, M Talon, eds), pp 247-260. Interamericana-McGraw-Hill, España-EEUU
- Apel K, Hirt H** (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC** (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82 (10): 1227-1238
- Arrigoni O, De Tullio MC** (2002) Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochimica et Biophysica Acta* 1569: 1-9
- Ashtamker C, Kiss V, Sagi M, Davydov O, Fluhr R** (2007) Diverse subcellular locations of cryptogein-induced reactive oxygen species production in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 143: 1817-1826
- 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 Radical Biology and Medicine* 53 (5): 1101-1110
- Avery AM, Avery SV** (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *Journal of Biological Chemistry* 276: 33730-33735
- Avsian-Kretchmet O, Gueta-Dahan Y, Lev-Yadun S, Ben-Hayyim G** (2004) The salt-stress signal transduction pathway that activates the *gpx1* promoter is

mediated by intracellular  $H_2O_2$ , different from the pathway induced by extracellular  $H_2O_2$ . *Plant Physiology* 135: 1685-1696

**Avsian-Kretchmer O, Eshdat Y, Gueta-Dahan Y, Ben-Hayyim G** (1999) Regulation of stress-induced phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase expression in citrus. *Planta* 209: 469-477

**Balmer Y, Vensel WH, Tanaka CK, Hurkman WJ, Gelhaye E, Rouhier N, Jacquot JP, Manieri W, Schürmann P, Droux M, Buchanan BB** (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101(8):2642-2647

**Barajas-López J, Serrato AJ, Olmedilla A, Chueca A, Sahrawy M** (2007) Localization in roots and flowers of pea chloroplastic thioredoxin f and thioredoxin m proteins reveals new roles in non-photosynthetic organs. *Plant Physiology* 145: 946-960

**Becana M, Matamoros MA, Udvardi M, Dalton DA** (2010) Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. *New Phytologist* 188: 960-976

**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. *Journal of Experimental Botany* 65 (2): 527-538

**Beijerinck, MW** (1901) Über oligonitrophile mikroben. *Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II* 7: 561-582

**Bela K, Horváth E, Gallé A, Szabados L, Tari I, Csiszár J** (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology* 176: 192-201

**Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Reviews in Plant Biology* 59: 21-39

- Bjornstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A** (1994) The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 269: 29382 – 29384
- Blokhina O, Fagerstedt KV** (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiologia Plantarum* 138 (4): 447-462
- Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Bécard G, Rosenberg C, Barker DG** (2001) *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14(6):695-700
- Bradford MM** (1976) A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ** (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *Plant Journal* 45(1): 113-122
- Broughton WJ, Dilworth MJ** (1971) Control of leghaemoglobin synthesis in snake beans. *Biochemical Journal* 125: 1075-1080
- Buchanan BB** (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annual Reviews of Plant Physiology* 31:341-374
- Buchanan BB, Schürmann P, Wolosiuk RA, Jacquot JP** (2002) The ferredoxin/thioredoxin system: from discovery to molecular structures and beyond. *Photosynthesis Research* 73: 215-222
- Cabiscol E, Piulats E, Echave P, Herrero E, Ros J** (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 275 (35): 27393-27398

- Camerini S, Polci ML, Restuccia U, Usuelli V, Malgaroli A, Bachi A** (2007) A novel approach to identify proteins modified by nitric oxide: the HIS-TAG switch method. *Journal of Proteome Research* 6: 3224-3231
- Chaoui A, El Ferjani E** (2005) Effects of cadmium and copper on antioxidant capacities, lignification and auxin degradation in leaves of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings. *Comptes Rendus Biologies* 328 (1): 23-31
- Chi YH, Moon JC, Park JH, Kim HS, Zulfugarov IS, Fanata WI, Jang HH, Lee JR, Lee YM, Kim ST, Chung YY, Lim CO, Kim JY, Yun DJ, Lee CH, Lee KO, Lee SY** (2008) Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin *m* knock-down plants. *Plant Physiology* 148(2): 808-817
- Clark D, Durner J, Navarre DA, Klessig DF** (2000) Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13: 1380-1384
- Claros MG, Vincens P** (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *European Journal of Biochemistry* 241: 779-786
- Cleland RE, Grace SC** (1999) Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS Letters* 457 (3): 348-352
- Cohen MN** (1977) The food crisis in prehistory: overpopulation and the origins of agriculture. New Haven: Yale University Press
- Colebatch G, Kloska S, Trevakis B, Freund S, Altmann T, Udvardi MK** (2002) Novel aspects of symbiotic nitrogen fixation uncovered by transcript profiling with cDNA arrays. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 411-420
- Cona A, Rea G, Angelini R, Federico R, Tavladoraki P** (2006) Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends in Plant Science* 11 (2): 80-88

- Cookson E, Blaxter ML, Selkirk ME** (1992) Identification of the major soluble cuticular glycoprotein of lymphatic filarial nematode parasites (gp29) as a secretory homolog of glutathione peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 89: 5837-5841
- 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. *Journal of Experimental Botany* 64 (11): 3339-3349
- Cossio-Bayugar R, Miranda E, Holman PJ** (2005) Molecular cloning of a phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase gene from the tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 1378-1387
- Couturier J, Touraine B, Briat JF, Gaymard F, Rouhier N** (2013) The iron-sulfur cluster assembly machineries in plants: current knowledge and open questions. *Frontiers in Plant Science* 4: 259
- Criqui MC, Jamet E, Parmentier Y, Marbach J, Durr A, Fleck J** (1992) Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology* 18: 623-627
- Daloso DM, Müller K, Obata T, Florian A, Tohge T, Bottcher A, Riondet C, Bariat L, Carrari F, Nunes-Nesi A, Buchanan BB, Reichheld JP, Araújo WL, Fernie AR** (2015) Thioredoxin, a master regulator of the tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112 (11): 1392-1400
- Dalton DA, Boniface C, Turner Z, Lindahl A, Kim HJ, Jelinek L, Govindarajulu M, Finger RE, Taylor CG** (2009) Physiological roles of glutathione S-transferases in soybean root nodules. *Plant physiology* 150: 521-530
- Dalton DA, Langeberg L, Treneman N** (1993) Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiologia Plantarum* 87: 365-370

- Dalton DA, Russell SA, Hanus FJ, Pascoe GA, Evans HJ** (1986) Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 83: 3811-3815
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ** (1997) Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324: 1-18
- de Pinto MC, Locato V, Sgobba A, Romero-Puertas MC, Gadaleta C, Delledonne M, De Gara L** (2013) S-Nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* 163: 1766–1775
- Del Maestro R, McDonald W** (1989) Subcellular localization of superoxide dismutases, glutathione peroxidase and catalase in developing rat cerebral cortex. *Mechanisms of Ageing and Development* 48: 15-31
- Del Río LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141 (2): 330-335
- Depège N, Devet J, Boyer N** (1998) Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins. *European Journal of Biochemistry* 253: 445-451
- Díaz CL, Grønlund M, Schlaman HRM, Spaink HP** (2005) *Lotus japonicus* Handbook. Márquez, AJ eds. Dordrecht, the Netherlands: Springer
- Dietz KJ** (2003) Plant peroxiredoxins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 93-107
- Du H, Kim S, Nam KH, Lee MS, Son O, Lee SH, Cheon CI** (2010) Identification of uricase as a potential target of plant thioredoxin: implication in the regulation of nodule development. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 397 (1): 22-26
- Edwards E, Dixon DP, Walbot V** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* 5: 193-198

- Elstner EF** (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: *Active Oxygen/Oxidative Stress and Plant Metabolism*, Pell EJ and Steffen KL, eds, pp. 13-25, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md, USA
- Emanuelsson O, Brunak S, Heijne G, Nielsen H** (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2: 953-971
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites *Protein Science*. 8 (5): 978-84
- Fomenko DE, Gladyshev VN** (2003) Identity and functions of CxxC-derived motifs. *Biochemistry* 42: 11214-11225
- Fred EB, Baldwin IL, McCoy E** (1932) Root nodule bacteria and leguminous plants. University of Wisconsin, Madison Libraries Parallel Press. ISBN 1893311287, 9781893311282
- Frendo P, Gallesi D, Turnbull R, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A** (1999) Localisation of glutathione and homoglutathione in *Medicago truncatula* is correlated to a differential expression of genes involved in their synthesis. *Plant Journal* 17: 215-219
- Frendo P, Hernández-Jiménez MJ, Mathieu C, Duret L, Gallesi D, Van de Sype G, Hérouart D, Puppo A** (2001) A *Medicago truncatula* homoglutathione synthetase is derived from glutathione synthetase by gene duplication. *Plant Physiology* 126: 1706–1715
- Fu LH, Wang XF, Eyal Y, She YM, Donald LJ, Standing KG, Ben-Hayyim G** (2002) A selenoprotein in the plant kingdom. Mass spectrometry confirms that an opal codon (UGA) encodes selenocysteine in *Chlamydomonas reinhardtii* glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 277: 25983-25991

- Fukai E, Soyano T, Umehara Y, Nakayama S, Hirakawa H, Tabata S, Sato S, Hayashi M** (2012) Establishment of a *Lotus japonicus* gene tagging population using the exon-targeting endogenous retrotransposon LORE1. *Plant Journal* 69: 720-730
- Gaber A, Ogata T, Maruta T, Yoshimura K, Tamoi M, Shigeoka S** (2012) The involvement of Arabidopsis glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. *Plant Cell Physiology* 53: 1596-1606
- Gaber A, Tamoi M, Takeda T, Nakano Y, Shigeoka S** (2001) NADPH-dependent glutathione peroxidase like proteins (Gpx-1, Gpx-2) reduce unsaturated fatty acid hydroperoxides in *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters* 499: 32-36
- Gelhaye E, Rouhier N, Gérard J, et al.** (2004) A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101 (40): 14545-14550
- Gietz RD, Woods RA** (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods of Enzymology* 350: 87-96
- Gill SS, Khan NA, Tuteja N** (2011) Differential cadmium stress tolerance in five Indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars, an evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signaling & Behavior* 6: 293-300
- Graham P, Vance C** (2003) Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant Physiology* 131: 872-877
- Gueta-Dahan Y, Yaniv Z, Zilinskas BA, Ben-Hayyim G** (1997) Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in citrus. *Planta* 203 (4): 460-469
- Guthrie C, Fink GR** (1991) Guide to yeast genetics and molecular and cell biology. New York: Academic Press

- Hadri AE, Spaink HP, Bisseling T, Brewin NJ** (1998) Diversity of root nodulation and rhizobial infection process. In: *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria* (HP Spaink, A kondorosi, PJJ Hooykaas, eds), pp 347-360. Kluwe Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Han C, Liu Q, Yang Y** (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regulation* 58 (2): 153-162
- Hanahan D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4): 557-580
- Hannon GJ** (2002) RNA interference. *Nature* 418: 244-251
- Herbette S, Brunel N, Prensier G, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P** (2004) Immunolocalization of a plant glutathione peroxidase-like protein. *Planta* 219 (5): 784-789
- Herbette S, Lenne C, Leblanc N, Julien JL, Drevet JR, Roeckel-Drevet P** (2002) Two GPX-like proteins from *Lycopersicon esculentum* and *Helianthus annuus* are antioxidant enzymes with phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase and thioredoxin peroxidase activities. *European Journal of Biochemistry* 269: 2414-242
- Herbette S, Roeckel-Devret P, Devret JR** (2007) Seleno-independent glutathione peroxidases. More than simple antioxidant scavengers. *FEBS Journal* 274: 2163-2180
- Heyno E, Mary V, Schopfer P, Krieger-Liszkay A** (2011) Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 234 (1): 35-45
- Hichri I, Boscari A, Castella C, Rovere M, Puppo A, Brouquisse R** (2015) Nitric oxide: a multifaceted regulator of the nitrogen-fixing symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 66 (10): 2877-2887

- Hirsch AM** (1992) Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist* 122: 211-237
- Holland D, Baen-Hayyim G, Faltin Z, Camoin L, Strosberg AD, Eshdat Y** (1993) Molecular characterization of salt-stress associated protein in citrus: protein and cDNA sequence homology to mammalian glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology* 21: 923-927
- Hymowitz T, Singh RJ** (1987) Taxonomy and speciation. In: JR Wilcox, ed, *Soybeans: Improvement, Production and Uses*. Agronomy Monograph 16. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 23-48
- Inoue Y, Matsuda T, Sugiyama KI, Izawa S, Kimura A** (1999) Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 27002-27009
- Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S et al.** (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195: 456-463
- Jaffrey SR, Erdjument-Bromage H, Ferris CD, Tempst P, Snyder SH** (2001) Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nature Cell Biology* 3: 193-197
- Jung BG, Lee KO, Lee SS, Chi YH, Jang HH, Kang SS, Lee K, Lim D, Yoon SC, Yun DJ, Inoue Y, Cho MJ, Lee SY** (2002) A Chinese cabbage cDNA with high sequence identity to phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases encodes a novel isoform of thioredoxin-dependent peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 277(15): 12572-12578
- Kaplan L, Lynch TF** (1999) Phaseolus (Fabaceae) in archeology: AMS radiocarbon dates and their significance in pre-Colombian agriculture. *Economic Botany* 53: 261-272

- Keyster M, Klein A, Egbichi I, Jacobs A, Ludidi N** (2011) Nitric oxide increases the enzymatic activity of three ascorbate peroxidase isoforms in soybean root nodules. *Plant Signaling & Behaviour* 6: 956-961
- Kobrehel K, Yee BC, Buchanan BB** (1991) Role of the NADP/thioredoxin system in the reduction of alpha-amylase and trypsin inhibitor proteins. *Journal of Biological Chemistry* 266 (24): 16135-16140
- Koh CS, Didierjean C, Navrot N, Panjikar S, Mulliert G, Rouhier N, Jacquot JP, Aubry A, Shawkataly O, Corbier C** (2007) Crystal structures of a poplar thioredoxin peroxidase that exhibits the structure of glutathione peroxidases: insights into redox-driven conformational changes. *Journal of Molecular Biology* 370 (3): 512-29
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L** (2007) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of Plant Physiology* 165: 967-975
- Kong BW, Kim H, Foster DN** (2003) Cloning and expression analysis of chicken phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Animal Biotechnology* 14: 19-29
- Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J** (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/ cAMP signalling pathways. *Molecular Microbiology* 61: 1147-1166
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI** (2003) NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in Arabidopsis. *EMBO Journal* 22(11): 2623-2633
- Lange A, Mills RE, Lange CJ, Stewart M, Devine SE, Corbett AH** (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *Journal of Biological Chemistry* 282 (8): 5101-5105

**Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948

**Laurent TC, Moore EC, Reichard P** (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. iv. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* b. *Journal of Biological Chemistry* 239: 3436-3444

**Lennartz K, Plücken H, Seidler A, Westhoff P, Bechtold N, Meierhoff K** (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome *b(6)f* complex in Arabidopsis. *Plant Cell* 13(11):2539-51

**Li G, Peng X, Wei L, Kang G** (2013) Salicylic acid increases the contents of glutathione and ascorbate and temporally regulates the related gene expression in salt-stressed wheat seedlings. *Gene* 529: 321-325

**Lin CC, Jih PJ, Lin HH, Lin JS, Chang LL, Shen YH, Jeng ST** (2011) Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding. *Plant Molecular Biology* 77: 235-249

**Lindermayr C, Durner J** (2009) S-Nitrosilation in plants: pattern and function. *Journal of Proteomics* 73: 1-9

**Lindermayr C, Saalbach G, Durner J** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 137: 921-930

**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

**Lombardo F, Heckmann AB, Miwa H, Perry JA, Yano K, et al.** (2006) Identification of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus* affected in infection thread growth. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1444-1450

- López-Huertas E, Corpas FJ, Sandalio LM, Del Río LA** (1999) Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation. *Biochemical Journal* 337 (3): 531-536
- Ma NL, Rahmat Z, Lam SS** (2013) A review of the “omics” approach to biomarkers of oxidative stress in *Oryza sativa*. *International Journal of Molecular Sciences* 14(4): 7515-7541
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS** (2014) Brock Biology of Microorganisms 14th Edition. Pearson eds. ISBN 1292018313, 9781292018317
- Maekawa T, Kusakabe M, Shimoda Y, Sato S, Tabata S, Murooka Y, Hayashi M** (2008) Polyubiquitin promoter-based binary vectors for overexpression and gene silencing in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (4): 375-82
- Maiorino M, Roche C, Kiess M, Koenig K, Gawlik D, Matthes M, Naldini E, Pierce R, Flohe L** (1996) A selenium-containing phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Biochemistry* 238: 838-844
- Margis R, Dunand C, Teixeira FK, Margis-Pinheiro M** (2008) Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview. *FEBS Journal* 275 (15): 3959-70
- Maróti G, J Downie A, Kondorosi E** (2015) Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant biology* 26: 57-63
- Márquez AJ, Stougaard J, Udvardi M, Parniske M, Spaink H, Saalbach G, Webb J, Chiurazzi M** (2005) *Lotus japonicus* Handbook. Márquez, AJ (Eds.). Dordrecht, the Netherlands: Springer
- Martí MC, Florez-Sarasa I, Camejo D, Ribas-Carbó M, Lázaro JJ, Sevilla F, Jiménez A** (2009) Response of mitochondrial thioredoxin PsTrxo1, antioxidant enzymes,

and respiration to salinity in pea (*Pisum sativum* L.) leaves. *Journal of Experimental Botany* 62 (11): 3863-3874

**Martínez-Ruiz A, Lamas S** (2007) Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: Convergences and divergences. *Cardiovascular Research* 75: 220-228

**Matamoros MA, Dalton DA, Clemente MR, Rubio MC, Ramos J, Becana M** (2003) Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiology* 133: 1-11

**Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M** (1999) Glutathione and homogluthathione synthesis in legume root nodules. *Plant physiology* 121 (3): 879-888

**Maughan S, Foyer CH** (2006) Engineering and genetic approaches to modulating the glutathione network in plants. *Physiologia Plantarum* 126: 382-397

**Meyer Y, Reichheld JP, Vignols F** (2005) Thioredoxins in Arabidopsis and other plants. *Photosynthesis Research* 86: 419-433

**Meyer Y, Verdoucq L, Vignols F** (1999) Plant thioredoxins and glutaredoxins: identity and putative roles. *Trends in Plant Science* 4: 388-394

**Miao Y, Lv D, Wang P, Wang XC, Chen J, Miao C, Song CP** (2006) An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 18: 2749-2766

**Mills GC** (1957) Hemoglobin catabolism. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry* 266: 20752-20760

**Mishra S, Jha AB, Dubey RS** (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma* 248 (3): 565-577

- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498
- Møller IM, Kristensen BK** (2004) Protein oxidation in plant mitochondria as a stress indicator. *Photochemical and Photobiological Sciences* 3 (8): 730-735
- Montrichard F, Alkhalfioui F, Yano H, Vensel WH, Hurkman WJ, Buchanan BB** (2009) Thioredoxin targets in plants: the first 30 years. *Journal of Proteomics* 72: 452-474
- Morón B, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M** (2006) Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones* (EJ Bedmar, J González, C Llunch, B Rodelas, eds), pp 45-52. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, España.
- Mourier T, Pain A, Barrell B, Griffiths-Jones S** (2005) A selenocysteine tRNA and SECIS element in *Plasmodium falciparum*. *RNA* 11: 119-122
- Murphy MP** (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal* 417 (1): 1-13
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104: 34-41
- Nakai K, Horton P** (1999) PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences* 24 (1): 34-35
- Navrot N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N** (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology* 142: 1364-1379

- Nguyen T, Zelechowska M, Foster V, Bergmann H, Verma DPS** (1985) Primary structure of the soybean nodulin-35 gene encoding uricase II localized in the peroxisomes of uninfected cells of nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82 (15): 5040-5044
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH** (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science* 12 (3) 125-134
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249-279
- Noctor G, Veljovic-Jovanovic S, Driscoll S, Novitskaya L, Foyer CH** (2002) Drought and oxidative load in the leaves of C<sub>3</sub> plants: a predominant role for photorespiration?. *Annals of Botany* 89: 841-850
- Okamura N, Iwaki Y, Hiramoto S, Tamba M, Bannai S, Sugita Y, Syntin P, Dacheux F, Dacheux JL** (1997) Molecular cloning and characterization of the epididymis specific glutathione peroxidase-like protein secreted in the porcine epididymal fluid. *Biochimica et Biophysica Acta* 1336: 99-109
- Oldroyd GE, Downie JA** (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59: 519-546
- Pang CH, Wang BS** (2008) Oxidative stress and salt tolerance in plants. *Progress in Botany* 69: 231-245
- Passaia G, Fonini LS, Caverzan A, Jardim-Messeder D, Christoff AP, Gaeta ML, de Araujo Mariath JE, Margis R, Margis-Pinheiro M** (2013) The mitochondrial glutathione peroxidase GPX3 is essential for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> homeostasis and root and shoot development in rice. *Plant Science* 208: 93-101
- Passaia G, Margis-Pinheiro M** (2015) Glutathione peroxidases as redox sensor proteins in plant cells. *Plant Science* 234: 22-26

- Passaia G, Queval G, Bai J, Margis-Pinheiro M, Foyer CH** (2014) The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 65 (5): 1403-1413
- 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
- Potters G, Horemans N, Caubergs RJ, Asard H** (2000) Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in a tobacco cell suspension. *Plant Physiology* 124: 17-20
- Puppo A, Herrada G, Rigaud J** (1991) Lipid peroxidation in peribacteroid membranes from French-bean nodules. *Plant Physiology* 96: 826-830
- Ramos J, Matamoros MA, Naya L, James EK, Rouhier N, Sato S, Tabata S, Becana M** (2009) The glutathione peroxidase gene family of *Lotus japonicus*: characterization of genomic clones, expression analyses and immunolocalization in legumes. *New Phytologist* 181: 103-114
- Rhoads DM, Subbaiah CC** (2007) Mitochondrial retrograde regulation in plants. *Mitochondrion* 7 (3): 177-194
- Rodriguez-Milla MA, Maurer A, Rodríguez-Huete A, Gustafson JP** (2003) Glutathione peroxidase genes in *Arabidopsis thaliana* are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. *Plant Journal* 36: 602-615
- Roeckel-Devret P, Gagne G, Tourvieille de Labrouhe D, Dufaure JP, Nicolas P, Devret JR** (1998) Molecular cloning, organ distribution and stress-mediated induction of two glutathione peroxidase-encoding mRNAs in sunflower (*Helianthus annuus*). *Physiologia Plantarum* 103: 385-394
- Rogers LK, Gupta S, Welty SE, Hansen TN, Smith CV** (2002) Nuclear and nucleolar glutathione reductase, peroxidase, and transferase activities in livers of male and female Fischer-344 rats. *Toxicological Sciences* 69: 279-285

- Roldán-Arjona T, Ariza RR** (2009) Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research* 681: 169-179
- Romero-Puertas MC, Campostrini N, Matte A, Righetti PG, Perazzolli M, Zolla L, et al.** (2008). Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis thaliana* undergoing hypersensitive response. *Proteomics* 8: 1459-1469
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AME, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M** (2007) S-Nitrosylation of peroxiredoxin IIE promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* 19: 4120-4130
- Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Corpas FJ, Gómez M, Del Río LA, Sandalio LM** (2004) Cadmium-induced subcellular accumulation of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in pea leaves. *Plant Cell and Environment* 27: 1122-34
- Rouhier N, Jacquot JP** (2005) The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1413-1421
- Rubio MC, Becana M, Kanematsu S, Ushimaru T, James EK** (2009) Immunolocalization of antioxidant enzymes in high-pressure frozen root and stem nodules of *Sesbania rostrata*. *New Phytologist* 183: 395-407
- Rubio MC, James EK, Clemente MR, Bucciarelli B, Fedorova M, Vance CP, Becana M** (2004) Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(12): 1294-1305
- Sato S, Nakamura Y, Kaneko T, Asamizu E, Kato T, Nakao M, Sasamoto S, Watanabe A, Ono A, Kawashima K, Fujishiro T, Katoh M, Kohara M, Kishida Y, Minami C, Nakayama S, Nakazaki N, Shimizu Y, Shinpo S, Takahashi C, Wada T, Yamada M, Ohmido N, Hayashi M, Fukui K, Baba T, Nakamichi T, Mori H, Tabata S** (2008) Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research* 15: 227-239

- Scandalios JG** (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 995-1014
- Serrano R, Mulet JM, Ríos G** (1999) A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* 50: 1023-1036
- Serrato AJ, Cejudo FJ** (2003) Type-*h* thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* 217: 392-399
- Sharma P, Dubey RS** (2005) Drought induces oxidative stress and enhances de activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regulation* 46 (3):209-221
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M** (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*. Article ID 217037
- Singh A, Rathaur S** (2005) Identification and characterization of a selenium-dependent glutathione peroxidase in *Setaria cervi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331: 1069-1074
- Singh S, Katzer K, Lambert J, Cerri M, Parniske M** (2014) CYCLOPS, a DNA-binding transcriptional activator, orchestrates symbiotic root nodule development. *Cell Host & Microbe* 15: 139-152
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C** (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581-1590
- Smirnoff N** (1995) Antioxidant systems and plant reponse to the environment. In *Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation*, N Smirnoff, ed., pp. 217-243. Bios Scientific Publishers, Oxford, UK
- Smirnoff N** (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 229-235

- Stadtman ER, Levine RL** (2003) Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218
- Sugimoto M, Sakamoto W** (1997) Putative phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes & Genetic Systems* 72: 311-316
- Szczyglowski K, Stougaard J** (2008). Lotus genome: pod of gold for legume research. *Trends in Plant Science* 13 (10): 515-517
- Sztajer H, Gamain B, Aumann KD, Slomianny C, Becker K, Brigelius-Flohe R, Flohe L** (2001) The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* 276: 7397-7403
- Tanou G, Molassiotis A, Diamantidis G** (2009) Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environmental and Experimental Botany* 65 (2-3): 270-281
- Thisse C, Degraeve A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A** (2003) Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expression Patterns* 3: 525-532
- Tirichine L, Imaizumi-Anraku H, Yoshida S, Murakami Y, Madsen LH, Miwa H, Nakagawa T, Sandal N, Albrektsen AS, Kawaguchi M, Downie A, Sato S, Tabata S, Kouchi H, Parniske M, Kawasaki S, Stougaard J** (2006). Deregulation of a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* 441: 1153-1156
- Torres MA, Dagl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis* gp91<sup>phox</sup> homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99 (1): 517-522

- Tovar-Méndez A, Matamoros MA, Bustos-Sanmamed P, Dietz KJ, Cejudo FJ, Rouhier N, Sato S, Tabata S, Becana M** (2011) Peroxiredoxins and NADPH-dependent thioredoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* 156: 1535-1547
- Turrens JF** (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of Physiology* 552 (2): 335-344
- Urbański DF, Małolepszy A, Stougaard J, Andersen SU** (2012) Genome-wide LORE1 retrotransposon mutagenesis and high-throughput insertion detection in *Lotus japonicus*. *Plant Journal* 69 (4): 731-741
- Vance, C** (2001) Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant Physiology* 127 (2): 390-397
- Velázquez E, Mateos PF, Trujillo M, Rivas R, Martínez-Molina E** (2006) Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. En: *Fijación de Nitrógeno: Fundamentos y Aplicaciones* (EJ Bedmar, J González, C Llunch, B Rodelas, eds), pp 45-52. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno, Granada, España
- Vieira Dos Santos C, Rey P** (2006) Plant thioredoxins are key actors in the oxidative stress response. *Trends in Plant Science* 11(7):329-334
- Vincent JM** (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK
- Wang X, Hargrove MS** (2013) Nitric oxide in plants: the roles of ascorbate and hemoglobin. *PLoS ONE* 8(12): e82611
- Wang Z, Wang F, Duan R, Liu JY** (2007) Purification and physicochemical characterization of a recombinant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from *Oryza sativa*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 40 (3): 412-418

**Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang MB, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbott D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* 27 (6): 581-590

**Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393: 365-369

**Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM** (2000) Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochemical Journal* 352 (3): 755-761

**Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W** (1997) Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO Journal* 16: 4806-4816

**Wojtaszek P** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* 322 (3): 681-692

**Wolff SP** (1994) Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology* 233: 182-189

**Wong JH, Kim YB, Ren PH, Cai N, Cho MJ, Hedden P, Lemaux PG, Buchanan BB** (2002). Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99(25): 16325-16330

**Yamauchi Y, Furutera A, Seki K, Toyoda Y, Tanaka K, Sugimoto Y** (2008) Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (8-9): 786-793

**Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zhou JM, Zuo J** (2015) S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiology* 167 (4): 1604-1615

**Yoshida K, Noguchi K, Motohashi K, Hisabori T** (2013) Systematic exploration of thioredoxin target proteins in plant mitochondria. *Plant & Cell Physiology* 54: 875-892

**Zaninotto F, La Camera S, Polverari A, Delledonne M** (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiology* 141: 379-383

**Zhai CZ, Zhao L, Yin LJ, Chen M, Wang Q Y, Li LC, Xu ZS, Ma YZ** (2013) Two wheat glutathione peroxidase genes whose products are located in chloroplasts improve salt and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerances in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 8(10): e73989