



Caracterización Génica, Proteínica y Funcional de Tiorredoxinas de guisante (*Pisum sativum*)



José A. Traverso Gutiérrez
Tesis Doctoral
Granada, Julio 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: José Ángel Traverso Gutiérrez
D.L.: Gr. 993 - 2005
ISBN: 84-338-3418-5

Universidad de Granada
Tesis Doctoral

**Caracterización Génica, Proteínica y
Funcional de Tiorredoxinas de guisante
(*Pisum sativum*)**



José A. Traverso Gutiérrez
Tesis Doctoral
Granada, Julio 2005

Caracterización Génica, Proteínica y Funcional de

Tiorredoxinas de Guisante (*Pisum sativum*)

Memoria que presenta el licenciado en
Biología José Angel Traverso Gutiérrez
para optar al grado de Doctor

Fdo. José A. Traverso Gutiérrez

VºBº

La directora del Trabajo

Fdo. **Ana Chueca Sancho**

Doctor en Farmacia

Profesor de investigación del C.S.I.C

Esta Memoria ha sido realizada durante los años 2001-2005 en el Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C), gracias a la concesión de una Beca predoctoral (F.P.I) del Ministerio de Educación y Cultura.

*A mi padre y Amada, las
personas que más confían
en mí*

INDICE

Introducción	1
I. Tiorredoxinas: origen de su descubrimiento e interés de su estudio	3
II. ¿Que son las tiorredoxinas?	4
III. La conformación tridimensional de las tiorredoxinas está altamente conservada	6
IV. El mecanismo de acción de las tiorredoxinas	11
V. Las tiorredoxinas están ampliamente distribuidas en los seres vivos	13
a. Algunos organismos no codifican auténticas tiorredoxinas	13
b. <i>Escherichia coli</i>	14
c. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
d. Mamíferos	17
e. Las tiorredoxinas de las plantas, el sistema más complejo	18
VI. Aspectos claves en la funcionalidad de las tiorredoxinas	23
a. Los papeles fisiológicos de las tiorredoxinas pueden ser agrupados en tres apartados bien diferenciados	23
b. Modulación de factores de transcripción	24
c. Mensajeros intercelulares	26
d. El estrés abiótico	27
e. Infecciones y enfermedades	28
f. División celular y apoptosis	29
g. Reproducción y desarrollo	32
h. Fotosíntesis y metabolismo asociado	33
VII. Origen evolutivo de las tiorredoxinas	36
a. Las tiorredoxinas tienen diferentes orígenes evolutivos	36
b. En plantas superiores coexisten tiorredoxinas de origen eucariotas con otras de origen claramente procariota, localizadas en los orgánulos	40
VIII. Tiorredoxinas <i>h</i> , el grupo más numeroso y controvertido	42
a. Tiorredoxinas <i>h</i> , un poco de historia	44
b. Las tiorredoxinas <i>h</i> y sus funciones en la semilla	44
c. Las tiorredoxinas <i>h</i> en los tejidos florales reproductores	49
i. La autoincompatibilidad floral	49
ii. Las tiorredoxinas y la SI en herbáceas, un modelo aún por descifrar	51
iii. Papel molecular de las tiorredoxinas <i>h</i> en el mecanismo de SI en <i>Brassica</i>	52
iv. Otros datos sobre la presencia de tiorredoxinas <i>h</i> en tejidos florales	54
d. Las tiorredoxinas <i>h</i> se expresan en haces vasculares	56
e. Las tiorredoxinas <i>h</i> y el estrés	57
f. Las tiorredoxinas <i>h</i> , clásicamente descritas como citosólicas	58

	pueden localizarse en otros compartimentos celulares.	
g.	Estructuras tridimensional de las tiorredoxinas <i>h</i>	59
h.	Proteínas diana de tiorredoxinas <i>h</i>	59
i.	Origen y agrupación de las tiorredoxinas <i>h</i>	60
Objetivos		67
Materiales y métodos		71
I.	Material Vegetal	73
II.	Cepas microbiológicas	73
	a. <i>Escherichia coli</i>	73
	b. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	73
	c. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
III.	Material nucleico	74
	a. Vectores plasmídicos	74
	b. Oligonucleótidos	77
IV.	Medios de cultivo	77
	a. Cultivo vegetal	77
	b. Cultivos bacterianos	78
	c. Cultivo de levadura	78
V.	Manipulación de <i>P. sativum</i>	79
	a. Condiciones de cultivo	79
	b. Tratamiento de estrés	80
VI.	Manipulación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
	a. Condiciones de cultivo	80
	b. Manipulación de semillas	80
	c. Transformación de plantas por <i>A.tumefaciens</i>	81
	d. Selección de transformantes	83
	e. Test de segregación y búsqueda de líneas homocigotas	83
	f. Autocruzamiento	84
VII.	Manipulación <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
	a. Condiciones de cultivo de levaduras	84
	b. Preparación de levadura competente	84
	c. Transformación de levaduras	85
	d. Metodología de trabajo en la complementación heteróloga	85
VIII.	Manipulación de <i>E. coli</i>	88
	a. Condiciones cultivo de <i>E. coli</i>	88
	b. Preparación de células competentes	88
	c. Transformación de células competentes	89
IX.	Manipulación de <i>A. tumefaciens</i>	89

a.	Condiciones de cultivo de <i>A. tumefaciens</i>	89
b.	Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i>	89
c.	Transformación de <i>A. tumefaciens</i>	90
X.	Manipulación de ADN	90
a.	Metodos de extracción de ADN genómico (ADNg)	90
b.	Métodos de extracción de ADN plasmídico	91
i.	Extracción de ADN plasmídico bacteriano	91
ii.	Extracción de ADN plásmidico de levadura	91
c.	Electroforesis de ADN en geles de agarosa	92
d.	Extracción de ADN de geles de agarosa	93
e.	Cuantificación de ADN	95
f.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	97
i.	Polimerasas termoestables utilizadas para PCR	98
ii.	PCR Walking	99
iii.	Subclonage de producto de PCR	101
iv.	PCR sobre colonias	102
v.	PCR cuantitativa a tiempo real	103
g.	Restricción de ADN	108
h.	Ligación de ADN	109
i.	Secuenciación de ADN	110
XI.	Manipulación de ARN	110
a.	Tratamiento del material	110
b.	Métodos de extracción de ARN	111
i.	Aislamiento de ARN total	111
ii.	Aislamiento de ARNm	111
c.	Cuantificación del ARN	112
d.	RT-PCR	112
XII.	Manipulación de proteínas	113
a.	Extracción de proteínas	113
i.	Plantas.	113
ii.	levadura	113
b.	Producción y purificación de tiorredoxinas recombinantes en <i>E. coli</i>	114
c.	Producción de anticuerpos	115
d.	Electroforesis de proteínas	116
i.	Tinción con Azul Coomasie R-250	118
ii.	Tinción con plata	118
e.	Medida de la concentración de proteínas	119
f.	Transferencia a membrana para inmunodetección (Western-blot)	119
g.	Determinaciones enzimáticas	122
i.	Análisis de activación de FBPasa por tiorredoxinas citosólicas	122
ii.	Análisis de reducción de Insulina por tiorredoxinas.	122

h.	Análisis histoquímico de la actividad GUS	123
i.	Cristalización de proteínas	124
XIII.	Herramientas de bioinformática	124
a.	Programas y bases de datos disponibles a través de la red	126
b.	Programas disponibles en el laboratorio	127
Resultados		133
I.	Caracterización génica de dos tiorredoxinas tipo <i>h</i> de <i>P. sativum</i>	135
a.	Obtención del ADNc correspondiente a dos tiorredoxinas tipo <i>h</i> en guisante.	135
i.	Amplificación del fragmento central de dos tiorredoxinas <i>h</i> de guisante	135
ii.	Amplificación del extremo 3' de los ARNm.	139
iii.	Amplificación del extremo 5' del gen de ambas tiorredoxinas por PCR-Walking	140
iv.	Reconstrucción del ORF final para ambos genes	141
b.	Amplificación de las secuencias genómicas codificantes de las tiorredoxinas <i>h1</i> y <i>h2</i> de guisante	143
c.	Descripción y estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas	145
i.	Estudio de las secuencias nucleotídicas traducibles	145
ii.	Estudio de las secuencias de ARNm no codificantes en 3'	145
iii.	Estudio de las secuencias génicas 5'- <i>upstream</i> : 5'-UTR y posibles secuencias reguladoras.	146
iv.	Estudio de las secuencias intrónicas	151
II.	Caracterización Proteínica	153
a.	Caracterización aminoacídica de ambas tiorredoxinas citosólicas	153
b.	Expresión y purificación de dos tiorredoxinas citosólicas recombinantes en <i>E. coli</i> .	157
c.	Actividad tiorredoxinas por medio de medidas enzimáticas <i>in vitro</i>	161
i.	Reducción de la insulina	161
ii.	Actividad FBPasa cloroplastídica dependiente de tiorredoxinas	162
d.	Estructura tridimensional de tiorredoxinas de guisante.	163
i.	Estudios de modelización	163
ii.	Estudios de cristalización de las proteínas recombinantes	165
III.	Estudios de complementación heteróloga en levadura.	168
a.	Complementación de tiorredoxinas de guisante frente a la presencia de agentes oxidantes.	170
b.	Complementación de tiorredoxinas de guisante en la utilización	174

del S inorgánico como única fuente de S	
c. Complementación de tiorredoxinas de guisante en la reversión del sulfóxido de metionina.	176
IV. Estudios de expresión génica de las tiorredoxinas citosólicas de guisante.	178
a. Cuantificación de la expresión génica de ambas tiorredoxinas citosólicas por PCR en tiempo real	178
b. Localización de la expresión génica en plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> .	180
i. Patrón de expresión de <i>A. thaliana</i> PrTRXh1::GUS	181
ii. Patrón de expresión de <i>A. thaliana</i> PrTRXh2::GUS	184
V. Expresión proteínica de ambas Tiorredoxinas tipo <i>h</i> de guisante	185
a. Cantificación proteínica de plántulas en desarrollo	185
i. PsTRXh1	187
ii. PsTRXh2	189
VI. Papel <i>in planta</i> de las tiorredoxinas de guisante en la defensa frente a agentes oxidantes.	190
a. PCR en tiempo real de raíces y hojas tratadas	190
b. Western blot de raíces y hojas tratadas con peróxido de hidrógeno	192
Discusión	195
I. Justificación del trabajo realizado	198
II. Caracterización de las tiorredoxinas	199
III. Localización tisular	200
IV. Posibles funciones fisiológicas de PsTRXh1 y PsTRXh2	202
a. Metabolismo del azufre	202
b. Estrés oxidativo	202
Conclusiones	211
Bibliografía	215

INTRODUCCIÓN

I. Tiorredoxinas: origen de su descubrimiento e interés de su estudio

En 1960 la prestigiosa revista *The Journal of Biological Chemistry* publicó un trabajo sobre levaduras realizado por Simon Black y colaboradores en el cual se podía leer lo siguiente:

"... Described herein is an enzymatic system isolated from yeast which catalyzes the specific reduction of one of the four isomers of methionine sulfoxide to the corresponding thioether, methionine. This process utilizes TPNH and requires the participation of three separable protein fractions which are designated Enzymes I, II, and III..."

Se describieron tres fracciones proteínicas con la capacidad de reducir *in vitro* un isómero de sulfóxido de metionina, y otros disulfuros. Entre estas fracciones se encontraba una proteína, responsable indirecta de la reducción de este compuesto azufrado y probablemente de los otros disulfuros ensayados (Black *et al.*, 1960). Sin embargo, sería en 1964 cuando esta fracción enzimática fue bautizada con el nombre de tiorredoxina (Trx), en un trabajo presentado por Lauren y colaboradores. Estos consiguieron aislar y describir una proteína homóloga en *E. coli* que mostraba capacidad para reducir a la enzima ribonucleótido reductasa, la cual cataliza la reducción de los monómeros precursores de las hebras de ADN, transformando ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos (Laurent *et al.*, 1964). El nombre de tiorredoxina aludía a su carácter redox vinculado a la presencia de grupos tiólicos, y bajo este epígrafe se inició un campo de trabajo que actualmente se encuentra en pleno auge.

II. ¿Que son las tiorredoxinas?

Las tiorredoxinas son proteínas globulares con un peso molecular alrededor de 12-14 KDa. cuya función principal es reducir puentes disulfuro de otras proteínas (Jacquot *et al.*, 1997). Están presentes en casi todos los seres vivos estudiados hasta la fecha, siendo en la mayoría de los casos de codificación nuclear, mostrando todas ellas sorprendentes analogías. Todas las Trxs cuyas estructuras han sido elucidadas hasta la fecha presentan la misma conformación espacial (Eklund *et al.*, 1991), a pesar de que en algunos casos comparten homología aminoacídica menores al 25%. Poseen un centro activo, también altamente conservado -WCGPC-, cuyas cisteínas pueden presentar dos estados, oxidadas formando un puente disulfuro, o reducidas en forma de ditiol. En estado reducido, son extremadamente reactivas pudiendo reducir puentes disulfuro en multitud de proteínas diana con una eficiencia hasta 10.000 veces mayor que el DTT a igualdad de pH (Holmgren, 1979, Holmgren, 1985).

Cuando la Trx ha ejercido su función reductora, queda en estado oxidado necesitando de la presencia de algún agente externo que sea capaz de regenerar su estado reducido activado. Algunas Trxs son reducidas por moléculas de NADPH, a través de la enzima NADPH-dependiente tiorredoxin reductasa (NTR), conformando un sistema de reducción presente en el citosol denominado como Sistema NADPH/tiorredoxina o NTS (Fig. 1a), ampliamente distribuido en los organismos vivos (Johnson *et al.*, 1987a). Otras Trxs, exclusivas de organismos fotosintéticos son reducidas por moléculas de ferredoxina procedentes de la cadena de transporte fotosintética, son reducidas a través de la enzima ferredoxin-dependiente tiorredoxin reductasa, conformando un sistema cloroplastídico, paralelo al existente en el citoplasma, y denominado como Sistema ferredoxina/tiorredoxina o FTS (Fig. 1b) (Buchanan, 1991). Un último sistema, menos conocido ha sido descrito en las mitocondrias de levadura y

mamíferos, y recientemente en plantas (Laloi *et al.*, 2001). En este sistema la Trx es reducida por una enzima homóloga a la existente en el citosol, la NADPH-dependiente tiorredoxin reductasa mitocondrial, aunque muchas incógnitas quedan pendientes sobre este sistema en plantas (Fig. 1a).

En los seres vivos las Trxs forman una gran familia multigénica que codifican una enorme variedad de isoformas agrupadas en distintas familias, en función de su estructura secundaria y localización celular. Esta complejidad genómica y bioquímica alcanza su máxima expresión en las plantas superiores, donde han sido descritas, tras la finalización del proyecto de secuenciación de *A. thaliana*, más de 25 Trxs englobadas en 8 familias diferentes (Meyer *et al.*, 2002).

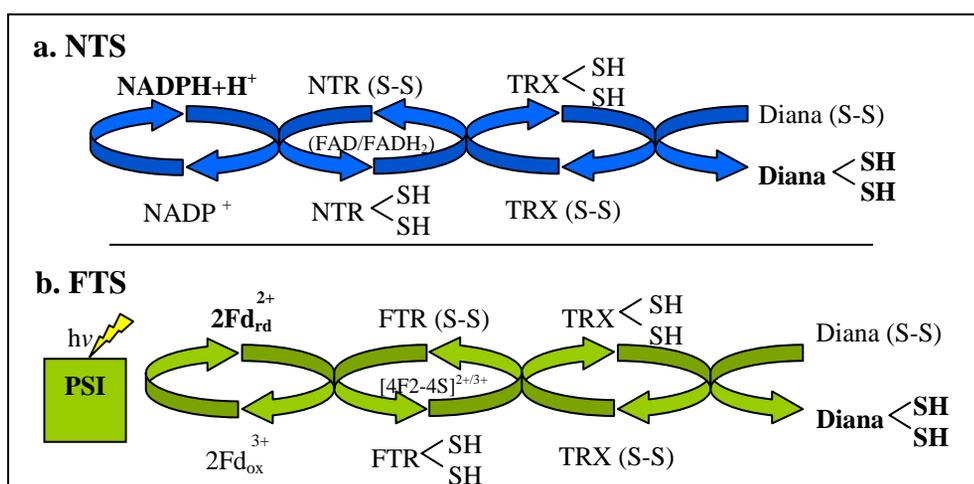


Figura 1. Sistemas Trxs descritos en los seres vivos. Las Trxs (TRX) en su estado reducido rompen eficazmente puentes disulfuro de otras proteínas. (a) Sistema NADPH/tiorredoxina (NTS) presente en el citosol y en la mitocondria: Las moléculas de NADPH inician una cadena de transporte de electrones reduciendo a la enzima NADPH-dependiente tiorredoxin reductasa (NTR), que a su vez reduce el puente disulfuro del centro activo de las Trxs. (b) Sistema ferredoxina/tiorredoxina o FTS descrito en cloroplastos de organismos fotosintéticos. Las moléculas de ferredoxina (Fd) reducidas, procedentes de la cadena de transporte fotosintética, reducen a la enzima ferredoxin-dependiente tiorredoxin reductasa (FTR) que a su vez reduce a la Trx cloroplastídica.

III. La conformación tridimensional de las tiorredoxinas está altamente conservada

Todas las Trxs presentan una estructura terciaria bien definida, muy estable y altamente conservada a lo largo de la evolución. Esta estructura se presenta en todos los grupos de la superfamilia de las Trxs que engloban las glutarredoxinas (Grx), las Trxs y las protein disulfuro isomerasa (PDI), siendo esta conformación conocida como “motivo Trx”.

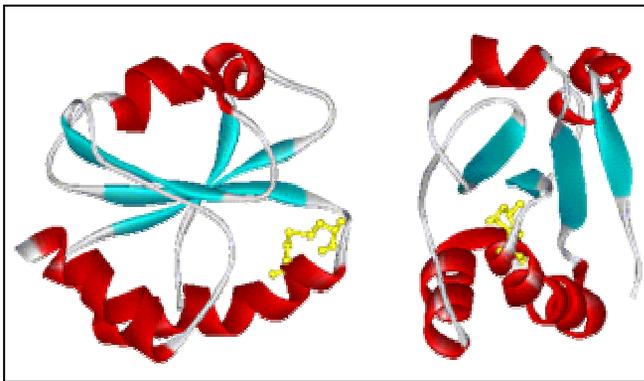


Figura 2. Estructura terciaria de la tiorredoxina de *E. coli*. Se muestran en rojo las hélices α y en celeste las estructuras en lámina β ; en amarillo están representadas las dos cisteínas del centro activo.

Presentan una estructura globular y compacta, compuesta por un núcleo hidrofóbico conformado por una lamina β de cinco hojas, 3 paralelas y 2 antiparalelas. Este núcleo se encuentra rodeado por 4 hélices α (Fig. 2 y 3). La secuencia presentada por la estructura secundaria de todas las Trxs es la misma: $\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ y $\alpha 4$. El centro activo -WCGPC- se encuentra localizado entre las unidades estructurales $\beta 2$ y $\alpha 2$, con la segunda cisteína integrada en la hélice, en una prominencia en el seno de un ambiente principalmente hidrofóbico pero con la presencia de determinados aminoácidos cargados en posiciones conservadas dentro de cada isoforma de Trx. Esta zona se encuentra muy expuesta al medio y presenta unas características superficiales que discriminarán la interacción con las diferentes proteínas diana (Eklund *et al.*,

1984, Wangensteen *et al.*, 2001). Estas similitudes estructurales son muy útiles a la hora de calcular teóricamente las estructuras de otras Trxs que aun no han sido estudiadas, mediante modelización molecular sobre estructuras ya resueltas.

Desde que en 1970 se describiera la estructura tridimensional de la Trx de *E. coli* por difracción de rayos X (Holmgren y Soderberg, 1970), algunas otras estructuras han sido resueltas, bien por esta técnica, bien por resonancia magnética nuclear (RMN). Bacterias como *E. coli* (Holmgren *et al.*, 1975, Dyson *et al.*, 1990, Katti *et al.*, 1990, Jeng *et al.*, 1994) y *Bacillus acidocaldarius* (Nicastro *et al.*, 2000), cianobacterias como *Anabaena sp.* (Saarinen *et al.*, 1995), el alga verde unicelular *Chlamydomonas* (Mittard *et al.*, 1997b, Lancelin *et al.*, 2000), plantas superiores como espinaca (Capitani *et al.*, 2000, Capitani y Schurmann, 2004) o álamo (Coudeville *et al.*, 2005), y estructuras de Trx humana (Qin *et al.*, 1994), son algunas de las especies en las cuales se han conseguido resolver alguna Trx. Todas ellas están disponibles en la base de datos de PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/index.html>) mostrando estructuras terciarias altamente conservadas. Este hecho se manifiesta más singular si tenemos en cuenta que las homologías entre estas secuencias aminoacídicas pueden llegar a ser tan bajas como del 25 %.

Las Trxs son proteínas especialmente indicadas para ser estudiadas por RMN, ya que cumplen los requisitos de pequeño tamaño, alta estabilidad, facilidad de obtención y purificación (recomendable a la hora de obtener proteínas marcadas con ^{15}N y ^{13}C), alta solubilidad y resistencia a pHs ácidos. De hecho fue una de las primeras proteínas en ser estudiadas mediante esta técnica. Además, la RMN ha sido empleada para resolver estructuras mixtas determinándose la estructura de la Trx humana acomplejada con ciertos péptidos (Qin *et al.*, 1995, Qin *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios cristalográficos de la Trx *h* de *Chlamydomonas reinhardtii* han mostrado estructuras similares a las obtenidas por RMN, pero los elementos secundarios se encontraron más definidos en la

estructura cristal (sólido) que en el resultado de la RMN (proteína en solución) debido a determinadas interacciones moleculares presentes en el estado de cristal. Las hélices $\alpha 1$ y las hebras $\beta 4$ y $\beta 5$ son notablemente más largas en las estructuras resueltas por rayos X, además en la resolución por RMN la hebra $\beta 1$ está débilmente definida y las dos cisteína del centro activo están en la hélice $\alpha 2$ (Fig. 3) (Menchise *et al.*, 2001a, Jacquot *et al.*, 2002).

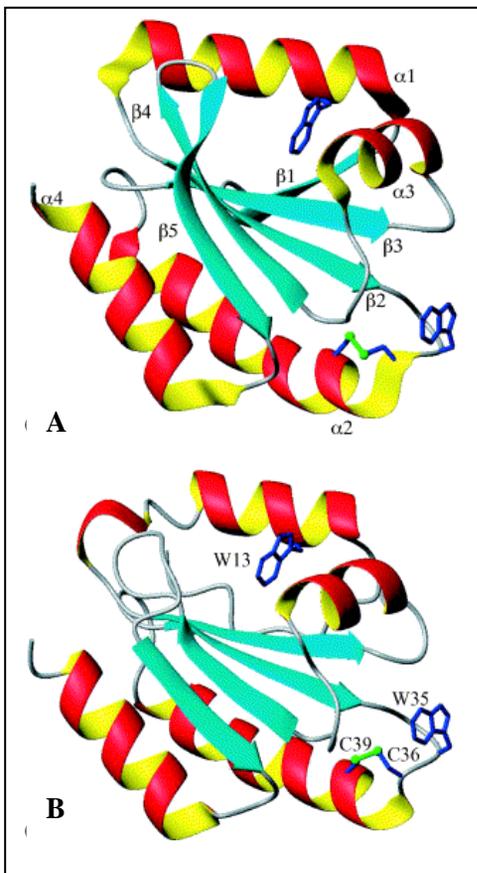


Figura 3. Estructura de la Trx *h* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Comparación de las estructuras resueltas por técnicas cristalográficas (A) y por RMN (B). (Menchise *et al.*, 2001a, Jacquot *et al.*, 2002).

Realizando estudios de homología entre las diferentes estructuras secundarias cabe señalar que los aminoácidos que se conservan en todas las Trxs eucariotas están conservados también en las procariotas y constituyen las señas de identidad de las tioredoxinas. Los aminoácidos conservados ya fueron

estudiados por Eklund, Gleason y Holmgren quienes analizaron, además, el posible papel que cumple cada uno de ellos en la estructura-función de las tiorredoxinas (Eklund *et al.*, 1991). En primer lugar, obviamente, se conserva la secuencia del centro activo -WCGPC-. La glicina y la prolina entre las dos cisteínas contribuyen a mantener una conformación característica del centro activo, principal responsable del elevado potencial reductor de la tiorredoxina. El triptófano 31 (numeración según la Trx de *E. coli*) se encuentra muy expuesto al medio y debe influir también en la conformación del centro activo. Este triptófano se encuentra en interacción mediante un puente de hidrógeno con el aspártico 61, que también está ampliamente conservado. La secuencia -PT- al comienzo de la hoja β 4 también está muy conservada. Estos aminoácidos se encuentran en interacción directa con el centro activo y deben contribuir a la estabilidad de la molécula oxidada. El clúster hidrofóbico previo al centro activo, que constituye la hoja β 2, en la cuál se encuentra el aspártico 26 (que interacciona directamente con el centro activo), también está ampliamente conservado. Esta estructura β 2 se une directamente a la β 4, contribuyendo a mantener la estabilidad de la estructura en lámina β que forma el núcleo de la proteína. Por último, el papel de la prolina 40 y de las dos glicinas, 84 y 92, es estructural. La prolina 40 provoca un doblamiento en la larga hélice α 2, contribuyendo a mantener la conformación del centro activo, que se encuentra al comienzo de esta hélice (Lamotte-Guery *et al.*, 1997). Las dos glicinas se encuentran en sendos giros entre elementos estructurales, donde contribuyen por su pequeño volumen a mantener la estructura cerrada de estos giros. La glicina 84 separa las hojas β 4 y β 5, mientras que la glicina 92 separa la hoja β 5 de la hélice α 4 (Fig. 4).

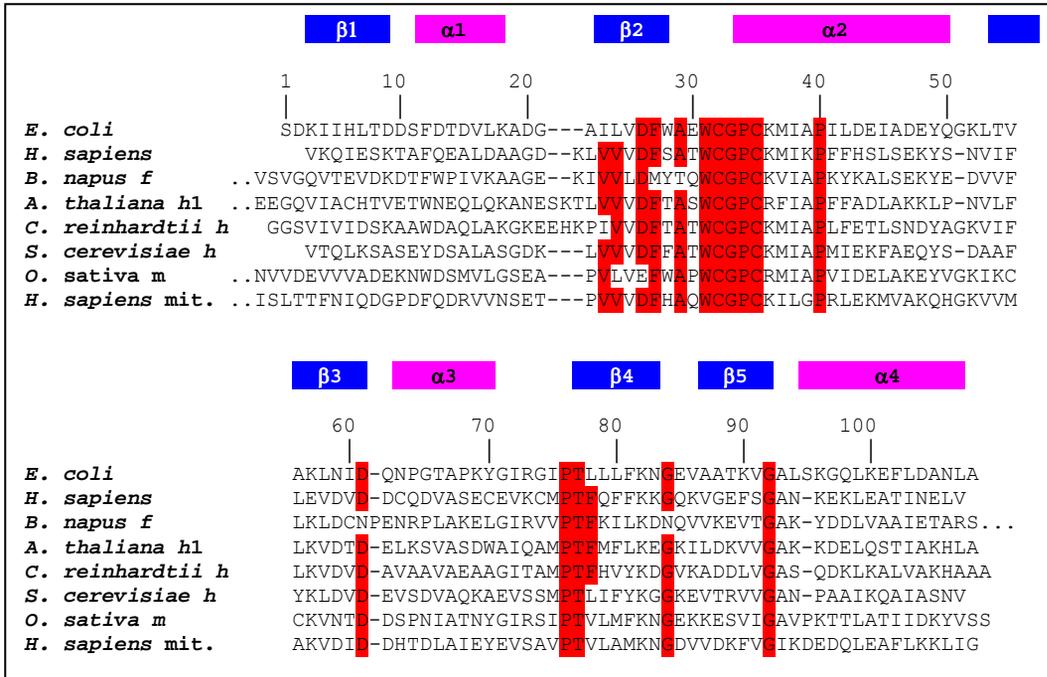


Figura 4. Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de algunas Trxs (tipos *h*, *m*, *f* y mitocondrial). En la parte superior se muestra, de forma aproximada, la estructura secundaria. En rojo se marcan algunos aminoácidos conservados dentro del grupo de las Trxs. La numeración es acorde a la secuencias de *E. coli*.

IV. El mecanismo de acción de las tiorredoxinas

La Trx es un potente agente reductor de puentes disulfuros de otras proteínas y su función redox está relacionada con tal actividad. Existen muy pocos casos conocidos en los que la Trx ejerce una función estrictamente estructural e independiente de su propiedad redox, por ejemplo el ensamblaje de fagos en *E. coli* (Feng *et al.*, 1999) o la formación de vacuolas en levaduras (Xu *et al.*, 1997).

Una vez que ambas proteínas se reconocen e interaccionan, tiene lugar el mecanismo de acción de las Trxs. El hecho fundamental de este mecanismo, es que las dos cisteínas del centro activo actúan de forma diferente debido a que se encuentran en diferentes ambientes (Holmgren, 1985). Normalmente, el valor del pK de los grupos tiólicos de las cisteínas están entre 8.0 y 9.0 (Lindley, 1960), sin embargo una de las cisteínas del centro activo de las Trxs posee un pK más bajo. Por ejemplo, en *E. coli* el pK del grupo tiol de la C32 es 6.75, mientras que la C35 posee un valor de 9.0 (Kallis y Holmgren, 1980). El bajo valor de pK de la C32 (la más próxima al extremo N-terminal y el más expuesto al medio), la convierte en muy reactiva a pH fisiológico. Además, el par de electrones desapareados del S de esta cisteína la convierten en un buen nucleófilo a estos valores de pH. Este grupo tiol (realmente un grupo S⁻) realiza un ataque nucleofílico sobre el puente disulfuro de la proteína diana, reduciéndolo y formándose un enlace disulfuro con una de las cisteínas recién liberada. Este puente mixto es rápidamente atacado por la segunda cisteína de la Trx, dando lugar a la proteína diana reducida y a la Trx en estado oxidado (Fig. 5). Este mecanismo de acción no es exclusivo de la Trxs, las Grx y otros reductores de puentes disulfuro reaccionan de forma similar. Incluso las proteínas NTR y FTR reducen el puente disulfuro de las Trxs oxidadas utilizando un ataque ditiol en dos tiempos (Gan *et al.*, 1990).

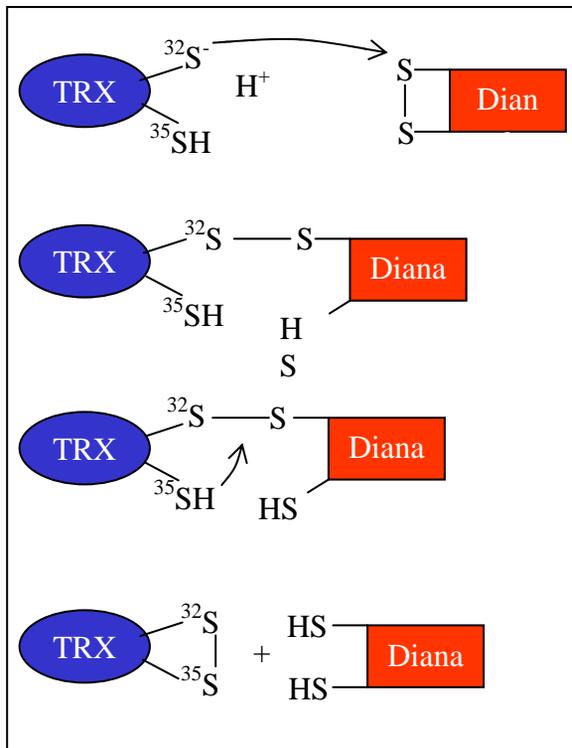


Figura 5. Mecanismo de acción de las Trxs. El mecanismo molecular de las Trxs se realiza en dos pasos, en el primero el sulfuro de la cisteína más cercana al extremo N-terminal realiza un ataque nucleofílico sobre el puente de S de la proteína con la que previamente ha interaccionado. En un segundo paso, la segunda cisteína del centro activo ataca al puente mixto, dando lugar a una Trx oxidada y a la proteína diana en estado reducido.

El descubrimiento del mecanismo de acción supuso, no solo el conocimiento de éste, sino también la posibilidad de producir Trxs recombinantes mutadas en la segunda cisteína del centro activo, lo cual ha permitido la obtención de complejos estables entre Trxs y posibles proteínas dianas que ha conducido a la obtención de nuevos datos en la búsqueda de nuevas funciones de las Trxs (Verdoucq *et al.*, 1999).

V. Las tiorredoxinas están ampliamente distribuidas en los seres vivos

La gran mayoría de los organismos conocidos poseen en su genoma, al menos, un gen de *Trx*. Pocos son los grupos que se escapan a tal afirmación. En este apartado vamos a describir los principales grupos de seres vivos, o especies, en los cuales los estudios de Trxs han sido amplios y ha ayudado a conformar todo el conocimiento actual sobre estas proteínas, aunque para comenzar hablaremos de la excepción, los grupos en los cuales no se han descrito auténticas Trxs.

a. Algunos organismos no codifican auténticas tiorredoxinas

A pesar de que en la literatura científica, las Trxs suelen ser descritas como, proteínas presentes en todos los seres vivos, existen datos fehacientes que demuestran lo contrario. Un reino entero de organismos, los Arqueones o Archaea, no codifican verdaderas tiorredoxinas. La completa secuenciación del genoma de varios Arqueones ha finalizado y su estudio corrobora esta afirmación. Ninguno de ellos codifica una sola proteína que pueda considerarse tiorredoxina, según la definición de la base de datos de motivos de proteínas, Prosite, aunque casi todos codifican unas proteínas remotamente relacionadas, con centros activos parecidos a los de la tiorredoxina cuya única secuencia común es -CXXC-, y la prolina en posición 76 (numeración acorde a la Trx de *E.coli*). El resto de las secuencias de estas moléculas casi no guarda homología con las tiorredoxinas de procariotas y eucariotas, y tampoco parecen estar muy relacionadas entre sí. Por todas estas consideraciones, no parece adecuado considerarlas miembros de la familia de las tiorredoxinas, proponiéndose para ellas el nombre alternativo de "arqueotiorredoxinas" (Bult *et al.*, 1996, Bhattacharyya *et al.*, 2002).

Por otro lado, los tripanosomas poseen como tiol-disulfuro-oxidoreductasa una proteína denominada triparredoxinas. Las primeras triparredoxinas han sido aisladas como reductores de peroxirredoxinas (Nogoceke *et al.*, 1997). Ellas poseen un sitio activo constituido por la sucesión de los aminoácidos -WCPPC-, además su secuencia y características catalíticas parecen estar relacionadas con glutarredoxinas (*grx*) (Ludemann *et al.*, 1998), por estas razones no son consideradas como Trxs en el sentido estricto de la palabra.

b. *Escherichia coli*

En *E. coli*, el sistema Trx está constituido por dos genes, *TRXA* y *TRXC*, que codifican dos Trxs clásicas (*TRX1* y *TRX2*), y por un gen, *TRXB*, que codifica una tiorredoxin reductasa dependiente de NADPH (*NTR*). La primera Trx fue aislada en 1964 como molécula reductora de la enzima ribonucleótido reductasa (RNR) que participa en la síntesis del ADN (Laurent *et al.*, 1964). Los mutantes *trxa* resultaron ser viables, y su estudio puso en evidencia la existencia de otra proteína reductora de la RNR, dependiente de glutatión, la glutarredoxina 1 (*GRX1*) (Holmgren, 1976). Pero no fue hasta 1997 que el segundo gen, *TRXC*, fue clonado y caracterizado. Esta proteína, *TRX2*, posee, además de una secuencia Trx clásica, una extensión N-terminal con dos motivos -CxxC-. Estos dos motivos regulan parcialmente la actividad de la proteína y la vuelven termosensible (Miranda-Vizueté *et al.*, 1997), aunque no son indispensables para la actividad Trx (Ritz *et al.*, 2000). El estudio fenotípico de mutantes *trxa* mostró que la expresión endógena de *TRXC* no permitía ni la reducción de la enzima PAPS (3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato) reductasa, que interviene en la vía de asimilación del sulfato, ni la reducción de la RNR. Sin embargo, la sobreexpresión de *TRXC* complementó ambos fenotipos (Stewart *et al.*, 1998). El gen *TRXB* mostró

regulación por el factor de transcripción OxyR en respuesta al estrés oxidativo, sin embargo, *TRXA* no pareció responder frente a tales estímulos.

c. *Saccharomyces cerevisiae*

En 1970 Gonzalez-Porqué y colaboradores purificaron la primera, Trx y tiorredoxin reductasa de levadura (Gonzalez y Baldeste, 1970). Posteriormente se obtuvieron dos secuencias proteínicas en levadura que fueron caracterizadas y encuadradas como Trxs (TRX1 y TRX2) (Hall *et al.*, 1971). Ambas, muestran un comportamiento fisiológico solapante ya que la delección de alguno de los dos genes no produce ninguna variación fenotípica en particular. Sin embargo, la delección simultánea de los dos genes de *trx* conduce a un fenotipo característico en la levadura, denominada como EMY63 (Muller, 1991). La cepa doble mutante, EMY63, ha sido ampliamente estudiada, mostrando los siguientes fenotipos:

1º) Presentan un ciclo celular perturbado con una fase S anormalmente larga y una fase G1 prácticamente inexistente (Muller, 1991). La prolongación anormal de fase S ha sido relacionado con un error en la replicación del ADN. En el doble mutante *trx1 trx2* este hecho podría ser explicado por una disminución de la actividad de la RNR debido a la ausencia de la Trx reductora, pero la tasa de dNTPs en esta cepa mutante es equivalente a la tasa presentada por la cepa salvaje, lo que no puede explicar el error en el mecanismo de la replicación del ADN (Muller, 1994). En cualquier caso, la función oxidoreductora de alguna de estas Trxs es por tanto necesaria para mantener una correcta replicación del ADN.(ver apartado “Las tiorredoxinas participan en la división, ciclo celular y apoptosis”).

2º) Son incapaces de asimilar el sulfato. El doble mutante es incapaz de crecer en un medio mínimo, necesitando del aporte de azufre orgánico, bajo la forma de metionina o cisteína. Este hecho sugiere una implicación de la Trx en la

reducción de una enzima de la vía de asimilación del sulfato. La PAPS reductasa, es la única enzima poseedora de una cisteína conservada convirtiéndola en un candidato potencial (Muller, 1991).

3º) No pueden utilizar el sulfóxido de metionina (SOMet) como fuente de sulfato orgánico. Las Trxs realizan, probablemente, la reducción de la enzima sulfóxido de metionina reductasa, responsable de la reducción del SOMet (Mouaheb *et al.*, 1998).

4º) Presenta una mayor concentración de glutatión en estado oxidado que la cepa salvaje. El doble mutante *trx1 trx2* presenta una concentración media de glutatión total 1.5 veces mayor que la cepa salvaje, con una proporción de glutatión oxidado:glutatión reducido tres veces mayor. La enzima glutatión reductasa no es suficientemente eficaz para mantener una tasa adecuada de glutatión reducido adecuada y las Trxs parecen jugar un papel complementario a la glutatión reductasa en el mantenimiento de unas tasas elevadas de glutatión reducido en la célula (Muller, 1996).

5º) Aumento de sensibilidad frente a hidroperóxidos. El doble mutante, así como el mutante *trx2*, muestra una sensibilidad más importante frente al peróxido de hidrógeno (Kuge y Jones, 1994). Curiosamente, estas dos cepas mutantes poseen una mayor capacidad de crecer en presencia de agentes oxidantes tales como la diamida (Muller, 1996). Este hecho se explicó alegando que en ambos mutantes la carencia de TRX2 induce constitutivamente una respuesta antioxidante que protege a la célula de los efectos nocivos de la diamida. Por el contrario, en la cepa silvestre la diamida reaccionaría con la TRX2 para dar lugar a un compuesto más tóxico para la célula. La cepa EMY63 posee también, una elevada sensibilidad frente al tercButil hidroperóxido.

6º) Presentan una morfología anormal de la célula debido al gran tamaño presentado por las vacuolas (Muller, 1991). Este tema ha sido objeto de estudio más preciso para Xu y Wickner, que mostraron que el doble mutante de *trx*

presenta un fenotipo denominado *vac*. Esta forma anormal de las células se debe principalmente a errores en la replicación de las vacuolas, siendo las Trxs necesarias para la correcta replicación de estas. En su estudio se demostró que este proceso no implicaba el mecanismo catalítico de la Trx, ya que una Trx con el centro activo mutado era capaz de complementar este fenotipo. (Xu y Wickner, 1996, Xu *et al.*, 1997).

Una tercera Trx fue identificada en levadura, lo cual permitió la caracterización de un sistema Trx mitocondrial completamente funcional, compuesto por la Trx, TRX3, con un centro activo clásico -WCGPC-, así como de una tiorredoxin reductasa (TRR2) con una secuencia de centro activo -CAVC-. Esta secuencia es idéntica a aquella presente en su homóloga citosólica (TRR1) y es característica de tiorredoxin reductasas procarióticas (Pedrajas *et al.*, 1999).

d. Mamíferos

Varios genes distintos codifican *Trxs* en las células de mamíferos. TRX1, la más estudiada, es una Trx clásica de 12 KDa con un centro activo clásico -WCGPC-, además posee tres cisteína adicionales situadas en posición 62, 69 y 73. En estudios de cristalización se han encontrado homodímeros unidos por puentes disulfuro entre las cisteínas en posición 73 (Weichsel *et al.*, 1996), sugiriéndose para esta dimerización una función reguladora de la actividad de la proteína en función del estado redox de la célula. Aunque, estudios de RMN muestran una Trx monomérica, dando lugar a una controversia referente a la posibilidad de la dimerización fisiológica, siendo explicada la unión entre monómeros como un artefacto de la cristalización (Gronenborn *et al.*, 1999). Es principalmente citosólica pero ha sido también localizada en el núcleo o en las mitocondrias según ciertas condiciones (condiciones oxidativas, radiaciones UV,

...), además puede ser excretada al exterior celular (Nordberg y Arner, 2001, Powis y Montfort, 2001, Hirota *et al.*, 2002).

TRX2, es otra Trx de levadura, se presenta en los diferentes tejidos de mamíferos, posee una extensión péptido de tránsito de 60 aminoácidos que dirige la proteína a la mitocondria (Spyrou *et al.*, 1997). Está desprovista de otras cisteína que no sean las del centro activo. Posteriormente, estos mismos autores realizaron un análisis genómico en humanos y describieron un sistema de Trxs y Grxs compuesto por un mayor número de componentes (Spyrou *et al.*, 2001)

Además de éstas, todo un sistema de Trx ha sido y descrito recientemente en tejido testicular de mamíferos, compuesto por cuatro Trxs diferentes (Miranda-Vizuet *et al.*, 2004). La más estudiada de todas se expresa exclusivamente en espermátidas (Miranda-Vizuet *et al.*, 2001), es una proteína compuesta por dos dominios, el dominio N-terminal está compuesto por 23 repeticiones de 15 aminoácidos de función desconocida, mientras que la región C-terminal esta constituida por una Trx.

Otras proteínas con motivos y actividad Trx han sido caracterizadas. Una de ellas es de localización nuclear denominada nucleorredoxina (Kurooka *et al.*, 1997), otra es una Trx extracelular, Trx80, encontrada en el plasma y corresponde a la parte N-terminal de la Trx citosólica, TRX1. Esta Trx troncada actua como una potente citoquina (Pekkari y Holmgren, 2004).

e. Las tiorredoxinas de las plantas, el sistema más complejo

Contrariamente al resto de los organismos, que no poseen más que un número restringido de genes de *Trxs*, las plantas están compuestas por una veintena de Trxs diferentes, todas ellas de codificación nuclear. Pueden ser clasificadas en varios grupos, en función de sus secuencias aminoacídicas y de

sus localizaciones subcelulares. *A. thaliana* supone un excepcional modelo para el estudio de estas, tras la finalización de su proyecto de secuenciación (Tabla 1).

El primer sistema Trx descubierto en las células vegetales fue el sistema cloroplastídico y las Trxs pertenecientes a este sistema se separaron en dos grupos, *m* y *f*, según sus secuencias aminoacídicas. En *A. thaliana* existen dos genes de Trx *f* (Meyer *et al.*, 1999), fueron denominadas con esta letra debido a su alta capacidad para reducir y activar a la fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBPasa) cloroplastídica. El subgrupo de Trx *m* (Mestres-Ortega y Meyer, 1999) fue denominado así por la capacidad de estas de reducir la NADP-malato deshidrogenasa y en *A. thaliana* forman un grupo de cuatro isoformas diferentes. Pero actualmente hay datos que demuestran que la especificidad de cada una de estas Trxs frente a sus dianas clásicas no es tan estricta como inicialmente fue establecido, las Trxs *f* pueden reducir la NADP-malato deshidrogenasa (Geck *et al.*, 1996) y las Trxs *m* poseen una capacidad reducida de activar la FBPasa cloroplastídica (Jaramillo *et al.*, 1997). Además, todos los ensayos enzimáticos realizados hasta el momento demuestran que no existe especificidad *in vitro* frente a las diferentes proteínas ensayadas. Sin embargo, parece que cada tipo de Trx interacciona *in vivo* con diferentes proteínas dianas, ya que la expresión heteróloga de estas Trxs no complementan para el mismo fenotipo en la levadura doble mutante EMY63 (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001). En cualquier caso, son necesarias nuevas experiencias para poder aportar datos definitivos sobre la especificidad de estas proteínas cloroplastídicas.

Las Trxs cloroplastídicas *m* y *f* son reducidas por la misma tiorredoxin reductasa dependiente de ferredoxina, convierten la señal electrónica recibida por la ferredoxina procedente de la cadena de transporte de electrones fotosintética, en señal "tiol" (Ruelland y Miginiac-Maslow, 1999).

El segundo sistema Trx descrito en las plantas es el sistema citosólico, en el cual están implicadas las Trxs *h*, denominadas de esta forma porque fueron

aisladas inicialmente de tejidos heterotrofos de la planta. No poseen ningún péptido señal por lo que se supone que son citosólicas. Son reducidas por una reductasa NADPH-dependiente (NTR), aunque el estudio funcional de estas no está tan focalizado como en el caso de las Trxs cloroplastídicas, ya que su descubrimiento y estudio es reciente. La secuenciación sistemática del genóma de *A. thaliana* reveló la presencia de 8 genes de este tipo de *Trx*, 3 de los cuales codifican proteínas con una secuencia del centro activo diferente -WCPPC- (Meyer *et al.*, 2002). Experiencias de complementación heteróloga con 5 de estas Trxs de *A. thaliana* en la levadura EMY63, reveló que el perfil de complementación de estas Trxs era diferente (Mouaheb *et al.*, 1998). Además, cada uno de estos genes es expresado de forma diferente en los diferentes tejidos y órganos de la planta (Reichheld *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha puesto en evidencia la existencia de un sistema *Trx* mitocondrial en *A. thaliana*, compuesto de un gen nuclear de *Trx* denominado *AtTRXo1* y de un gen de tiorredoxin reductasa NADPH-dependiente, *AtNTRA* que codifica una forma mitocondrial muy relacionada con las tiorredoxin reductasas procarióticas. Se describió también la existencia de un gen *AtTRXo2* cuyo producto proteínico no parece poseer ningún péptido señal que lo dirija ningún orgánulo (Laloi *et al.*, 2001).

Por otro lado, se han descrito numerosos genes que codifican para homólogos de *Trxs*. La *Trx x*, semejante a las *Trxs m* posee una extensión N-terminal que la dirige al cloroplasto (Mestres-Ortega y Meyer, 1999), las *Trxs ch2-1* y *ch2-2*, también de origen tipo procariótico y con una localización presuntamente cloroplastídica. Las *Trxs* denominadas *CxxS1* y *CxxS2* cuyo centro activo no poseen más que una cisteína, que podrían tener una actividad disulfuro isomerasa, o incluso las cuatro *Trxs* de tipo *lilium* cuya actividad reductora de puentes disulfuro no ha sido caracterizada aún (Verdoucq *et al.*, 1999, Meyer *et al.*, 2002).

Otras numerosas proteínas en plantas han sido descritas conteniendo en su estructura uno o varios dominios Trx. La proteína CDSP32 ha sido localizada en cloroplastos de patatas sometidas a estrés por déficit hídrico. Estas proteínas poseen dos dominios Trxs: el dominio C-terminal posee el sitio activo y los aminoácidos estructurales característicos del grupo de las Trxs, mientras que el dominio N-terminal no posee un sitio activo clásico. La actividad Trx de esta proteína se demostró mediante ensayos *in vitro* de su capacidad de reducir la molécula de insulina (Rey *et al.*, 1998, Broin y Rey, 2003).

AtTDX es una proteína de *A. thaliana* descrita por Vignols y colaboradores, durante experiencias de complementación funcional con el doble mutante EMY63. La proteína TDX posee un dominio Trx en su extremo C-terminal con un sitio clásico -WCGPC-, mientras que su dominio N-terminal está compuesto por una secuencia tetratricopeptídica, homóloga a la proteína HIP, una proteína de mamífero relacionada con proteínas de choque térmico (Vignols *et al.*, 2003).

Un gen homólogo a las nucleorredoxinas de mamíferos ha sido caracterizado en maíz localizándose en el núcleo celular. La proteína codificada por este gen posee tres dominios Trx, de los que uno está desprovisto de sitio activo, así como un motivo putativo en dedos de zinc en el dominio C terminal (Laughner *et al.*, 1998).

A pesar de que el guisante ha sido una planta modelo para el estudio de la FBPasa cloroplastídica y de sus activadores fisiológicos las Trxs, actualmente poco se conoce respecto a los sistema Trxs presentes en esta especie. Al iniciar este trabajo se encontraban descritas dos Trxs en *P. sativum*, ambas cloroplastídicas, *f* y *m* (Jaramillo *et al.*, 1997, Pagano *et al.*, 2000). Con fecha de hoy sabemos de la existencia, al menos, de 7 genes de *Trx* en el genoma de guisante, 4 isoformas de *Trx h* citosólica, y una nueva isoforma de *Trx m*, a la que denominaremos *m2*, por ser la segunda en ser descrita. Ninguna isoforma de

tioredoxin reductasa ha sido descrita hasta el momento, y ningún dato existe sobre la existencia de un sistema mitocondrial en esta especie, o de otro tipo de Trx descrito en las otras especies de plantas.

Nombre	Número de acceso	Sitio activo	Localización
THIORREDOXINAS CLÁSICAS			
Trxs <i>m</i>			
<i>m1</i>	O48737	WCGP	Cloropla
<i>m2</i>	AAF15949	WCGP	Cloropla
<i>m3</i>	AAF15950	WCGP	Cloropla
<i>m4</i>	Q9SEU6	WCGP	Cloropla
Trxs <i>f</i>			
<i>f1</i>	Q9XFH8	WCGP	Cloropla
<i>f2</i>	Q9XFH9	WCGP	Cloropla
Trxs <i>h</i>			
<i>h1</i>	P29448	WCGP	Citosólic
<i>h2</i>	S58123	WCGP	Citosólic
<i>h3</i>	S58118	WCPP	Citosólic
<i>h4</i>	S58119	WCPP	Citosólic
<i>h5</i>	S58120	WCPP	Citosólic
<i>h7</i>	AAD39316	WCGP	Citosólic
<i>h8</i>	AAG52561	WCGP	Citosólic
<i>h9</i>	AAG51342	WCGP	Citosólic
TIORREDOXINAS ADICIONALES			
Trxs <i>x</i>			
<i>x</i>	AAF15952	WCGP	Cloropla
Trxs <i>ch2</i>			
<i>ch2</i>	AAF04439	WCGP	Cloropla
<i>ch2</i>	AAD39273	WCGP	Cloropla
Trxs <i>o</i>			
<i>o1</i>	AAC12840	WCGP	Mitocon
<i>o2</i>	AF396650	WCGP	Citosólic
TIORREDOXINAS RELACIONADAS CON LAS <i>h</i>			
<i>Cx</i>	AAD32800	WCLP	Citosólic
<i>Cx</i>	AC011661	WCIP	Citosólic
<i>TD</i>	AB017230	WCGP	?
Tipo <i>lilium</i>			
<i>Lili</i>	AF144387	GCGG	Citosólic
<i>Lili</i>	AF144388	WCGS	Citosólic
<i>Lili</i>	AF144389	GCGG	Citosólic
<i>Lili</i>	AF144390	SGCC	?

Tabla 1. Familia Trx en *A. thaliana* tras la finalización de su proyecto de secuenciación. Se indica el nombre y tipo de Trx, número de acceso en la base de datos, secuencia del centro activo y localización subcelular.

VI. Aspectos claves en la funcionalidad de las tiorredoxinas

La mayoría de los organismos poseen, al menos, una molécula con actividad Trx, aunque son muchas las especies que expresan varias isoformas que coexisten. La estructura terciaria de estas Trxs está altamente conservada entre las diferentes especies y el mecanismo de actuación, dependiente de su centro activo -WCGPC-, la convierte en un potente agente reductor biológico. Sin embargo, no siempre ejercen su actividad dependiente del juego ditiol-disulfuro de su centro activo.

a. Los papeles fisiológicos de las tiorredoxinas pueden ser agrupados en tres apartados bien diferenciados

En general, las funciones de las Trxs pueden ser clasificadas en tres grupos, en los dos primeros casos, su actuación es dependiente de su capacidad para ceder electrones. En primer lugar, las Trxs pueden actuar transfiriendo poder reductor en una cascada secuencial, oxidoreductora, donde los electrones cedidos tienen una finalidad, como por ejemplo en la reducción de agentes oxidantes tóxicos para la célula. También pueden actuar cediendo electrones que rompen puentes disulfuro estructurales de muchas enzimas, como por ejemplo, en la activación fisiológica de la FBPasa cloroplastídica, generalmente, esta ruptura produce un cambio conformacional en la proteína diana y consigue modular su actividad. Por último, las Trxs ejercen funciones independientes de su actividad reductora, realizando papeles estrictamente estructurales. Se conocen varios casos descritos, por ejemplo, la formación de vacuolas en levaduras (Xu *et al.*, 1997), el ensamblaje de fagos en *E. coli* (Feng *et al.*, 1999), y el papel de estimulación del crecimiento celular de Trx80, en el plasma sanguíneo (Pekkari *et al.*, 2000).

b. Modulación de factores de transcripción

Se ha demostrado en varios organismos el papel de las Trxs como reguladores de la actividad de algunos factores de transcripción. Factores como NF-kB, RG, HSF1, AP-1 y p53 en mamíferos, YAP1 en levaduras o OxyR en *E. coli*, son algunos, cuya actuación está modulada por la actividad óxido-reductora de las Trxs.

NF-kB es una proteína multimérica que regula la expresión de genes implicados por ejemplo en la respuesta inmunitaria, así como la expresión de genes víricos como el de la inmunodeficiencia humana, HIV. NF-kB está presente en el citosol celular en su forma inactiva, unido a un inhibidor, I-kB. En respuesta a diferentes estímulos, I-kB es fosforilado y degradado. En este momento el factor de transcripción NF-kB se dirige y se concentra en el núcleo gracias a la presencia en su estructura de un péptido de transito, permitiendo la activación de determinados genes. La capacidad de unión de este factor a las secuencias específicas de ADN está regulado por el estado redox de una cisteína de su estructura. La reducción de esta cisteína por una Trx permite la activación de Nf-kB (Hayashi *et al.*, 1993, Hirota *et al.*, 1999, Hirota *et al.*, 2002).

La expresión de genes regulados por el receptor glucocorticoide (**RG**) es inhibido durante el estado de estrés oxidativo, pero se reactiva por una sobreexpresión de Trxs. Una interacción en el núcleo, entre la Trx y el dominio de unión al ADN del RG, produce una reestructuración, *in vitro* e *in vivo*, de este factor de transcripción así como su activación (Makino *et al.*, 1997, Makino *et al.*, 1999).

El factor de respuesta a choque térmico **HSF1** es activo durante el estado de estrés oxidativo. Sin embargo, una parte de este factor puede ser oxidado, y por consiguiente desactivado por los ROS presentes. Si el desequilibrio redox ocasionado por estos agentes es importante, la Trx es expresada en grandes

cantidades pudiendo reducir y reactivar el factor HSF1 (JacquierSarlin y Polla, 1996).

La Trx citosólica de mamíferos regula indirectamente la actividad de unión al ADN del factor de transcripción. La Trx interacciona con el factor Ref-1, a través de dos cisteínas de esta proteína. Esta asociación produce la estimulación de la actividad del factor de transcripción **AP-1** (Hirota *et al.*, 1997, Hirota *et al.*, 2002). La asociación entre la Trx y Ref-1 estimula también la regulación de otro factor, **p53**, que regula la expresión de genes implicados en la apoptosis. P53 es inactivo por la existencia en su estructura de un puente disulfuro intramolecular. Para romper este enlace, p53, necesita de la intervención de Ref-1 y de la Trx reducida (Pearson y Merrill, 1998, Ueno *et al.*, 1999, Hu *et al.*, 2001).

En las células de levadura, la actividad de **YAP1**, un factor de transcripción que regula la expresión de genes de respuesta al estrés oxidativo también es regulado por Trxs (Lee *et al.*, 1999). Está compuesto de un dominio bZIP en N-terminal y de un dominio rico en cisteínas en C-terminal (CRD). En el dominio CRD está incluida una señal peptídica de exportación al núcleo (NES). En condiciones normales, YAP1 esta presente mayoritariamente en el citoplasma, cuando aumentan los niveles de peróxido de hidrógeno, YAP1 se concentra en el núcleo. En experiencias con el doble mutante de levadura *trx1 trx2* se pudo apreciar que YAP1 está constitutivamente en el núcleo. Sin embargo cuando esta cepa es cultivada en condiciones de anaerobiosis, YAP1 es nuevamente exportado hacia el citoplasma. Además, cepas de levadura que expresaban *yap1* mutado a nivel de los tripletes codificantes de cisteínas, mostraron ausencia total de regulación del factor YAP1. Parece que el estado de oxidación de las cisteínas de CRD funciona como un sensor de los peróxidos presentes en la célula, permitiendo o no la localización de este factor en el núcleo. Esta regulación se realiza por la intermediación con una Trx. Es, por otra parte, interesante decir que la regulación de la localización de YAP1 no ha sido observada en mutantes

de glutarredoxinas, demostrando así una especificidad funcional de las Trxs en relación al sistema glutarredoxina. Además el sistema de activación de YAP1 por el peróxido de hidrógeno parece ser diferente de la activación por la diamida, donde son otras cisteínas diferentes del CRD las que intervienen (Izawa *et al.*, 1999, Delaunay *et al.*, 2000). Una glutathion peróxidasa, Gpx3, participa también en la regulación redox de AP1, en este mecanismo sensor (Delaunay *et al.*, 2002).

El factor de transcripción **OxyR** de *E. coli*, activo por la presencia de un puente disulfuro, es inactivado bien por Trx, bien por Grx cuando alguna de las dos rompe este puente disulfuro (Zheng *et al.*, 1998).

c. Mensajeros intercelulares

En organismos pluricelulares, las Trxs han sido descritas en multitud de ocasiones como mensajeros intercelulares. En humanos, Trx80, la TRX1 humana truncada ha sido caracterizada en multitud de ocasiones como proteína plásmática, siendo descrita como un potente mensajero intercelular, involucrado en diferentes funciones (Pekkari y Holmgren, 2004). Actúa, junto a las glutarredoxinas, como antioxidante reductor indirecto en la detoxificación de hidroperóxidos (Bjornstedt *et al.*, 1994). Varios estudios han puesto de manifiesto la elevada concentración de ésta en plasma sanguíneo de individuos infectados con diferentes enfermedades. Además, forman parte del sistema de inflamación en respuesta a un ataque patógeno (Nordberg y Arner, 2001, Powis y Montfort, 2001).

En plantas superiores, se ha demostrado la presencia de cantidades importantes de Trxs y glutarredoxinas en tubos conductores floemáticos de mono y dicotiledoneas (Ishiwatari *et al.*, 1995, Szederkenyi *et al.*, 1997, Schobert *et al.*, 1998), sin embargo la presencia de estas proteínas en tejidos conductores no ha sido tan estudiada como en el caso de Trx80.

d. El estrés abiótico

Si existe un papel clásico en el estudio general de las Trxs, este es el que las relaciona con la defensa frente al estrés oxidativo, gracias a la fuerte capacidad oxido-reductora de su centro activo. Como ya hemos visto, el sistema Trx regula un cierto número de factores de transcripción implicados en la respuesta frente a desequilibrios redox. A menudo, la expresión de genes de *Trxs* es regulado por estos mismos factores de transcripción, pudiéndose llegar a hablar de autoregulación. La implicación de las Trxs en la resistencia frente a agentes oxidantes ha sido manifestada en varias experiencias de muntantes deletereos para sus genes de *trxs*. En efecto, el doble mutante de levadura, al igual que el mutante Δtrx de *E. coli*, mostraron sensibilidades frente a diferentes agentes oxidantes (Kuge y Jones, 1994, Muller, 1996, Ritz *et al.*, 2000). Además, la expresión heteróloga de ciertas *Trxs* de planta, citosólicas (Mouaheb *et al.*, 1998) o cloroplastídicas (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001), permitió al mutante de levadura resistir a concentraciones de diferentes agentes oxidantes superiores a las soportadas por la cepa mutante. Este hecho sugiere un papel de las Trxs en el mecanismo de resistencia frente al estrés oxidativo en las plantas.

Las Trxs son descritas como eliminadoras de ROS de forma directa (Das y Das, 2000), sin embargo su función antioxidante principal es la capacidad de reducción de las peroxidasa dependientes de Trxs, las peroxirredoxinas, tanto en los organismos unicelulares como en eucariotas superiores. Como acabamos de ver, Trx80 actúa, junto a las glutarredoxinas, como antioxidante reductor en la detoxificación de hidroperóxidos en el plasma sanguíneo de mamíferos (Bjornstedt *et al.*, 1994). Además, las Trxs funcionan también como antioxidantes por su capacidad de reducción de la enzima metionín sulfóxido reductasa. En presencia de agentes oxidantes ciertas metioninas de proteínas endógenas pueden ser oxidadas a diferentes sulfóxidos de metionina, sin modificar

aparentemente la capacidad de las proteínas concernientes. El conjunto de estas metioninas representan un importante sistema antioxidante que conduce a la eliminación de los ROS (Levine *et al.*, 1996, Levine *et al.*, 1999, Levine *et al.*, 2000). Estos sulfóxidos de metionina pueden ser revertidos a metionina gracias a la actuación reductora de la enzima metionin sulfóxido reductasa, que son reducidas por el sistema Trx (Gonzalez y Baldesten, 1970, Gleason y Holmgren, 1988, Moskovitz *et al.*, 2001).

Sin embargo, otros tipos de estreses abióticos hacen a las Trxs partícipes en el mecanismo de recuperación de estados fisiológicos estables. En *Chlamydomonas reinhardtii*, la expresión de Trxs *h* y *m* es inducida en presencia de metales pesados (Lemaire *et al.*, 1999). En *Solanum tuberosum* el estrés hídrico induce la expresión de la proteína CDSF32, que ejerce su función antioxidante, probablemente por su capacidad de reducir una peroxirredoxina (Rey *et al.*, 1998, Broin *et al.*, 2002). Además, Trxs cloroplastídicas de guisante mostraron un aumento en sus niveles de expresión y cantidad de proteína, cuando las plantas eran sometidas a temperaturas bajas (Pagano *et al.*, 2000).

Un aspecto interesante a comentar es que en el periplasma de *E. coli*, las Trxs pueden actuar como oxidantes y participar en la formación de puentes disulfuro (Debarbieux y Beckwith, 1998).

e. Infecciones y enfermedades

A parte de su papel en la resistencia frente al estrés abiótico, las Trxs participan en la defensa frente a un cierto número de enfermedades. En un trabajo presentado por Powis y Montfort se pueden revisar todas las patologías humanas donde está demostrada la intervención de las Trxs. Las Trxs protegen el ADN de los fibroblastos de la piel frente al daño producido por las radiaciones UV-A (Didier *et al.*, 2001). Se expresan como factores derivados de células T

adultas leucémicas (Nakamura *et al.*, 1997), y están implicadas en la resistencia frente a diferentes enfermedades humanas tales como la arterioesclerosis, el Alzheimer o el SIDA (Powis y Montfort, 2001). En apartados anteriores vimos como la concentración elevada de Trx80 en plasma sanguíneo es un sintoma de diferentes enfermedades, ya que forman parte del sistema de inflamación en respuesta a ataques patógenos (Nordberg y Arner, 2001, Nakamura *et al.*, 2002).

En *A. thaliana* se ha descrito la inducción génica de *Trxs* tipo *h* en presencia de patógenos bacterianos (Reichheld *et al.*, 2002, Laloi *et al.*, 2004).

f. División celular y apoptosis

Como ya se ha comentado anteriormente, la fase S perturbada del doble mutante de levadura sugiere para las *Trxs* un papel en el desarrollo del ciclo celular (Muller, 1991). Las *Trxs*, así como las *Grxs*, fueron inicialmente aisladas como donadores de hidrógeno de la ribonucleótido reductasa de *E. coli*, enzima indispensable en la replicación del ADN, y por consiguiente para la división celular. Sin embargo, como ya explicamos, la perturbación del ciclo celular del mutante no puede explicarse por una actividad reducida de la ribonucleótido reductasa. Según el trabajo presentado por Machado y colaboradores la delección del gen de la tiorredoxin reductasa de levadura da lugar a la inducción de la expresión de genes poseedores de elementos MCB (MluI Cell cycle Box) activos durante la transición de la fase G1 a S del ciclo. Además, parece ser que las *Trxs* oxidadas activan estos elementos MCB. El modelo propuesto explica que durante la replicación del ADN en fase S, las *Trxs* reducen la ribonucleótido reductasa, permitiendo así la formación de nuevos desoxirribonucleótidos, quedando la *Trx* en estado oxidado mayoritariamente. Este estado oxidado provoca entonces la expresión de genes con elementos MCB que permiten la consecución normal del ciclo celular (Machado *et al.*, 1997).

Las Trxs participan en la síntesis del ADN, en otro nivel diferente a la reducción de la ribonucleótido reductasa. La presencia de una Trx *m* de espinaca en un ovocito de *Xenopus* actúa como competidor con la Trx endógena y bloquea el desarrollo del ovocito (Hartman *et al.*, 1993). La microinyección de dNTPs no permitía realizar un ciclo suplementario, hecho que demostró que las divisiones del ovocito no son bloqueadas por falta de dNTPs. Hartman propuso la participación de la Trx en el complejo de iniciación de la replicación. Por otro lado, el estudio de la línea mutante *rml1* permitió relacionar la distorsión del ciclo celular y la concentración intracelular de glutatión. Las células del mutante *rml1*, desprovistas de actividad γ -glutamil-cisteína sintetasa sufren una división celular fuertemente ralentizada (Vernoux *et al.*, 2000). Este hecho podría explicar los niveles anormales de glutatión en el ciclo celular anormal del doble mutante *trx1 trx2* de levadura.

En lo que concierne a la replicación del ADN, una función insólita de las Trxs es su participación en la replicación del ADN de fagos filamentosos, especialmente del fago T7 (Russel y Model, 1985). La Trx de la célula hospedadora aumenta la eficacia de la ADN polimerasa vírica uniéndose a ella (Bedford *et al.*, 1997). La mutación del sitio activo de la Trx no afecta a la eficacia de la polimerasa de T7, así, la propiedad oxido-reductora de la Trx no parece estar implicada en tal interacción. La Trx juega aquí un papel exclusivamente estructural (Huber *et al.*, 1986, Russel y Model, 1986, Himawan y Richardson, 1992).

Se ha descrito la implicación de las Trxs de levadura, durante la formación de una nueva vacuola, por fusión de vesículas, en el curso de la fase S del ciclo celular (Xu y Wickner, 1996). La fusión de vesículas necesita de la intervención de diferentes factores como el complejo LMA1, constituido por una Trx y un inhibidor de proteasas P_2 . La sustitución por serinas de las cisteínas catalíticas de la Trx no perturba la formación de nuevas vacuolas (Xu *et al.*, 1997).

Diversos trabajos describen las Trxs como un factor de crecimiento en diferentes líneas celulares de animales. Son secretadas, por ejemplo por las células T leucémicas adultas (Dean *et al.*, 1994), por hepatocitos, fibroblastos o células cancerosas (Powis *et al.*, 2000). La forma truncada de la Trx 1 humana, Trx80, estimula el crecimiento de células normales periféricas y células mononucleares de la sangre (Pekkari *et al.*, 2000, Pekkari y Holmgren, 2004). Este es otro caso donde la actuación de la Trx, Trx80, no depende de su actividad catalítica.

Por otro lado, la Trx *h1* de tabaco es expresada preferencialmente en los tejidos en crecimiento y su funcionamiento parece estar ligado a la división celular, tras descubrir que los mensajeros de esta proteína fueron puestos en evidencia durante una criba que permitía el aislamiento de genes expresables de forma precoz durante el inicio del crecimiento de protoplastos, obtenidos a partir de tejidos diferenciados de tabaco (Marty *et al.*, 1993).

Como ya hemos visto anteriormente, es importante recordar aquí la acción reguladora de las Trxs sobre los factores de transcripción, que pueden regular la expresión de genes relacionados con la división celular.

La actividad de la kinasa ASK1 que modula la señal de apoptosis de células humanas está regulada por una Trx. En efecto, ASK1 inactiva está unida en su dominio N-terminal, a una Trx reducida. En presencia de una concentración anormalmente elevada de ROS, la Trx es oxidada y libera a ASK1 que actuará entonces induciendo la apoptosis (Saitoh *et al.*, 1998). Las células cancerosas que sobreexpresan una Trx activa tienen un crecimiento más importante y son menos sensibles a las señales apoptóticas (Freemerman y Powis, 2000), mientras que la expresión de una Trx con el sitio catalítico mutado sufre un efecto contrario. Además, se ha demostrado la importancia de la Trx mitocondrial animal, TRX2, en el fenómeno de apoptosis (Tanaka *et al.*, 2002). En células de pollo donde la expresión de TRX2 es inhibida, el citocromo c de la

mitocondria es exportado al citoplasma, y varias caspasas son, por otro lado, activadas, dos fenómenos que inducen la apoptosis celular. Por último recordar el papel de la Trx en la regulación del factor de transcripción p53 que interviene en la señal de apoptosis.

g. Reproducción y desarrollo

Varias isoformas de Trx han sido descritas en humanos como específicas de tejido reproductor masculino (Miranda-Vizueté *et al.*, 2004). SpTrx, la más estudiada, se localiza específicamente en espermátidas, donde ha sido caracterizada como un factor de la regulación de la espermatogénesis e intervendría, en particular, a nivel de la formación del flagelo del espermatozoide (Miranda-Vizueté *et al.*, 2001).

En plantas mono y dicotiledoneas las Trxs han sido involucradas en el fenómeno de autoincompatibilidad floral, que tiene como fin evitar la autopolinización floral para mejorar la carga genética de la descendencia. Este fenómeno produce el rechazo del grano de polen por parte del pistilo autopolinizado. El género *Brassica*, ha sido ampliamente estudiado existiendo un modelo de actuación de las Trxs en este proceso (Cabrillac *et al.*, 2001). También en mono y dicotiledoneas, se ha descrito la expresión de Trxs en grano de polen, aunque su función no está completamente clarificada (Li *et al.*, 1994, Juttner *et al.*, 2000). Además se ha descrito la expresión génica de algunas Trxs *h* de *A. thaliana* en granos de polen y estigma floral (Reichheld *et al.*, 2002). El papel de las Trxs en los tejidos florales está actualmente restringido al grupo de las Trxs *h* por lo que se verá con mayor detalle en apartados posteriores.

Las Trxs están también implicadas en el desarrollo y la gestación del embrión de algunos animales. El desarrollo de éste es, a menudo, bloqueado *in vitro* en diversos estados según la especie. En el ratón, el embrión es bloqueado en

el estado de dos células, mientras que la adición exógena de Trx o de superóxido dismutasa (SOD) permite retomar el desarrollo (Goto *et al.*, 1992). El bloqueo en el desarrollo es debido a la defosforilación e inactivación de un factor p34^{cdc2}. La proteína cdc25 es la responsable directa de la defosforilación del factor durante la transición de la fase G2 a mitosis, y la Trx es el activador del factor de transcripción, responsable de la expresión del gen que codifica cdc25. (Natsuyama *et al.*, 1993). Por otra parte, las Trxs inhiben la formación de la roseta que tiene lugar, normalmente, cuando un linfocito entra en contacto con un glóbulo rojo extraño. Esta inhibición es importante porque permite el desarrollo del embrión y actúa como marcador de la presencia de un factor precoz del embarazo. La presencia de Trx con una de las dos cisteínas del centro activo mutadas, mantiene la actividad inhibidora de la roseta, concluyendo que esta actividad es independiente de su centro activo. Sin embargo, la sustitución de la cisteína 74, conservada en las Trxs animales por una serina, inhibe la actuación de la Trx como factor del embarazo (Tonissen *et al.*, 1993). La actuación de la Trx podría deberse gracias a la formación de un dímero que implicara la cisteína 74 de las dos Trxs (Powis y Montfort, 2001).

Para finalizar este apartado, hemos de mencionar el papel preponderante de las Trxs durante la germinación de la semilla ha sido claramente establecido por diferentes estudios, siendo la Trx *h* la principal responsable de esta función. Este papel fisiológico será visto más detalladamente en apartados que se centran en el estudio de las Trxs *h*.

h. Fotosíntesis y metabolismo asociado

En los organismos fotosintéticos, las Trxs están implicadas en determinadas vías metabólicas. El papel más clásicamente reconocido de las Trxs en plantas está probablemente en la regulación de determinados enzimas

fotosintéticos. Las Trxs cloroplastídicas forman parte de un sistema clave en la regulación de enzimas del ciclo de Calvin durante la transición luz-oscuridad. Estas Trxs son reducidas por una tiorredoxina reductasa dependiente de ferredoxina (FTR). La ferredoxina reducida procede de la cadena de transporte electrónico del cloroplasto, activada por la luz, siendo su interacción con la tiorredoxin reductasa cloroplastídica donde se considera que se convierte la señal luminosa en señal química "tiol" (Ruelland y Miginiac-Maslow, 1999). La Trx reducida viene a regular la actividad de numerosas enzimas implicadas en el proceso fotosintético. Numerosos estudios han puesto de manifiesto el papel de las Trxs *f*, o *m*, en la activación de 4 enzimas del ciclo de Calvin: la fructosa-1,6-bisfosfatasa (MoraGarcia *et al.*, 1996, Jaramillo *et al.*, 1997, Wangenstein *et al.*, 2001), la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (Baalmann *et al.*, 1995), la sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa (Raines *et al.*, 1992), y la fosforibuloquinasa (Brandes *et al.*, 1996). La rubisco activasa, que activa la rubisco en respuesta a estímulos luminosos sufre una regulación redox por Trx *f* (Zhang y Portis, 1999). Las Trxs *f*, o *m*, están también implicadas en la activación de la subunidad CF1 de la ATPasa de los tilacoides (Schwarz *et al.*, 1997). Mutantes deletéreos para un gen de Trx en la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* presentan falta de pigmentación. En este organismo las Trxs están implicadas en la formación de un aparato fotosintético funcional. Exactamente, las Trxs regulan el operon *puf* que codifican unas proteínas de unión a los pigmentos. Esta regulación estará intermediada por la existencia de algún factor de transcripción sensible a la reducción (Pasternak *et al.*, 1999). Los mecanismos de regulación redox de la NADP-malato deshidrogenasa (MDH) por Trxs cloroplastídicas han sido aclarado por el equipo de Miginiac-maslow. La MDH se encuentra bajo una forma homodimérica. Cada una de sus subunidades posee dos parejas de cisteínas y según el estado redox de estas se explica la actividad presente en la enzima: las dos cisteínas en posición N-terminal, modulan la conformación del

sitio activo, mientras que las dos cisternas de la zona C-terminal regulan la accesibilidad al sitio activo (Lamotte-Guery *et al.*, 1997).

Las Trxs participan en la regulación de la glucólisis inhibiendo la actuación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa durante la fase luminosa (Wenderoth *et al.*, 1997), y toman parte en la regulación de las biosíntesis de los ácidos grasos, por su acción sobre la acetilcoenzima-A carboxilasa (Sasaki y Hatano, 1997), o del almidón, reduciendo la ADP-glucosa pirofosforilasa (Ballicora *et al.*, 2000).

VII. Origen evolutivo de las tiorredoxinas

El descubrimiento de la gran variedad de tipos de Trxs coexistentes en la mayoría de seres vivos, embarcó a los científicos en la búsqueda de relaciones evolutivas existentes entre todas estas proteínas. Las tiorredoxinas son proteínas especialmente adecuadas para estudios de genética evolutiva, mediante el desarrollo de árboles filogenéticos, dada su ubicuidad en la mayor parte de las células vivas, su variedad de funciones y su pequeño tamaño. La gran cantidad de secuencias nucleotídicas de *Trxs* disponibles en las bases de datos de ADN, y su posterior estudio, permitió proponer teorías sobre el origen y las relaciones entre estas proteínas. Estas proposiciones están en concordancia, y corroboran la teoría endosimbiótica que explica el origen de las células eucarióticas (Margullis, 1970). En los siguientes párrafos intentaremos resumir todas aquellos estudios evolutivos que sobre estas pequeñas proteínas se han realizado.

a. Las tiorredoxinas tienen diferentes orígenes evolutivos

El primer estudio evolutivo con secuencias de Trxs fue realizado por Hartman, Syvanen y Buchanan, se usaron 14 secuencias conocidas de Trxs para realizar un árbol filogenético (Hartman *et al.*, 1990). Los resultados fueron coherentes con los estudios pioneros realizados a partir de las secuencias del ARN ribosómico 16s (Fox *et al.*, 1980, Woese, 1987). Como resultado de tales estudios se dividieron las tiorredoxinas en cuatro grandes grupos, tres de ellos procariotas (I-III) y uno eucariota (IV) (Fig.6):

- Grupo I: bacterias fotosintéticas púrpuras, *Escherichia* y *Corynebacterium*
- Grupo II: bacterias fotosintéticas verdes (*Chlorobium*)
- Grupo III: cianobacterias y Trxs *m.*

-Grupo IV: animales

La Trx *f* de espinaca se integraba en el grupo de las Trxs animales (que quizás debería haber sido llamado eucariotas), mientras que la Trx *m* aparecía en el grupo III, junto con las cianobacterias, probando así su origen bacteriano. Este estudio apoyaba la idea establecida en primer lugar por Lynn Margulis (Margulis, 1970), ampliamente aceptada en la actualidad, de que el cloroplasto de las células vegetales y la mitocondria de todas las células eucariotas proceden de bacterias endosimbiontes (cianobacterias y bacterias púrpuras, respectivamente), que han delegado la mayor parte de su carga génica al núcleo eucariótico, aunque aún conservan parte de su genoma. De este modo, el gen para la Trx *m* pertenecía originalmente al genoma bacteriano, de donde fue traslocado al núcleo, en donde le fue añadido un péptido de tránsito para conducir la proteína de nuevo al cloroplasto.

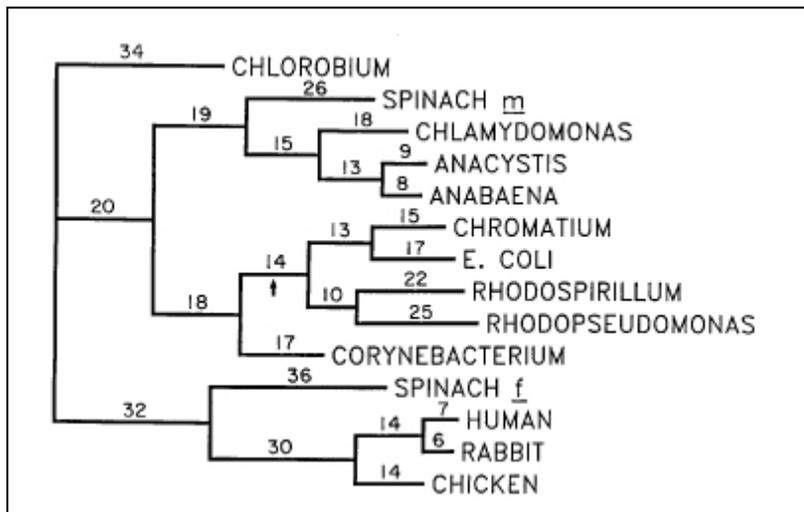


Figura 6. Árbol filogenético. Construido a partir de secuencias aminoacídicas de 14 Trxs de animales, plantas superiores (*f* y *m*), algas (*m*), cianobacterias (*m*) y bacterias. Extraído del trabajo original de Hartman y colaboradores (Hartman *et al.*, 1990)

Años más tarde se realizó un nuevo análisis filogenético. En esta ocasión se emplearon 35 secuencias, 20 de las cuáles pertenecían a plantas o algas fotosintéticas. La aportación más novedosa fue el estudio de las posiciones de los intrones en el interior de las secuencias de los genes de las *Trxs* (Fig. 7). El árbol evolutivo resultó ser más heterogéneo, aunque todas las tiorredoxinas *m* seguían englobándose con las procariotas (Sahrawy *et al.*, 1996).

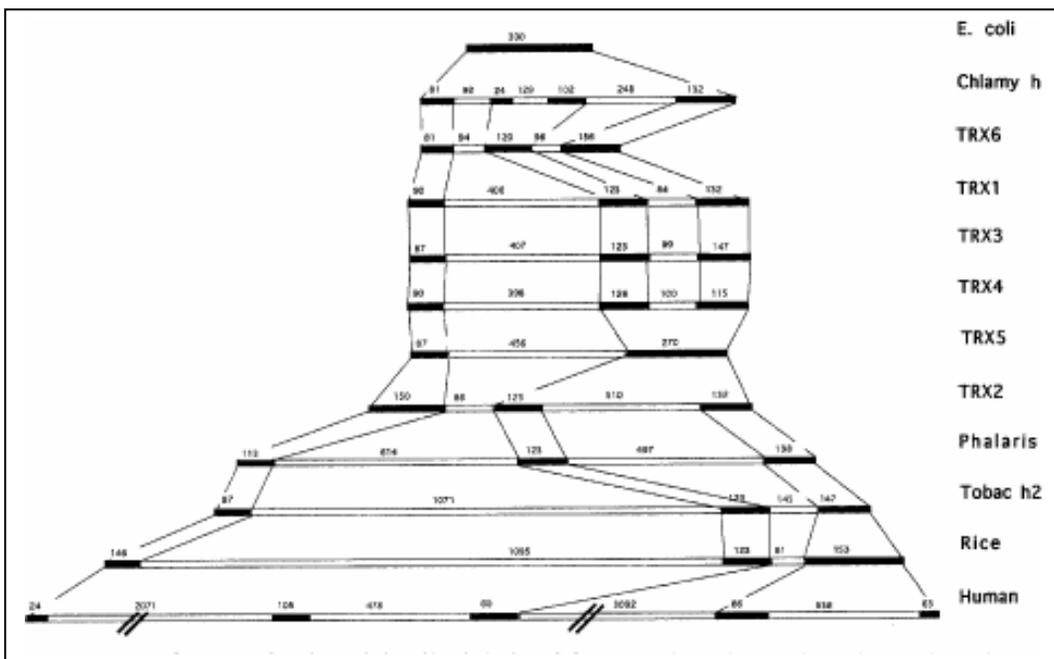


Figura 7. Estructura intrónica de algunos genes de *Trxs*. Se representan *Trxs h* de plantas superiores, humana, *Chlamydomonas* y *E. coli*. Se puede apreciar la posición conservada de algunos intrones en las diferentes isoformas de *Trxs*. Extraído del trabajo original de Sahrawy y colaboradores (Sahrawy *et al.*, 1996).

Según este trabajo las *Trxs h* y *f* forman sendos grupos compactos, separados de otras *Trxs* eucariotas, ambos tipos presentan entre uno y tres intrones. La tiorredoxina humana presenta cuatro intrones (Fig. 7). La presencia de intrones en estas secuencias describe sus orígenes claramente eucarióticos,

pero además, la posición conservada de algunos de estos intrones, denota el origen evolutivo de estas secuencias a partir de una proteína antecesora común y eucariótica. Por el contrario, las *Trxs m* únicamente poseen un intrón entre el péptido de tránsito y la proteína madura mostrando así su origen bacteriano y su historia evolutiva de migración al núcleo, donde se le añadió posteriormente el péptido de tránsito.

Un aspecto interesante de estos estudios fue el origen eucariótico de las *Trxs f*, ya que la mayoría de los productos génicos presentes en el cloroplasto parecen provenir de la bacteria simbiótica primordial. La *Trx f* ha adquirido un péptido de tránsito para incorporarse al cloroplasto y, además, ser funcional en éste. Esta facilidad para los cambios funcionales puede deberse a la alta versatilidad y falta de especificidad, que en ocasiones presentan las *Trxs*.

Si la *Trx m* corrobora el origen bacteriano del cloroplasto, lo mismo ocurre con otras *Trxs* que se localizan también en este orgánulo, las *Trxs ch2* y *x*. Ambas comparten claramente semejanzas aminoácidas con las *Trxs m*, que las revelan de origen procarióticos. La *Trx x* de *A. thaliana* presenta una hélice $\alpha 1$ más corta, al igual que las *Trxs* de origen procariótica, mientras que las *Trxs ch2*, de esta misma especie, poseen, al igual que las *Trxs m*, un intrón entre el péptido de tránsito y la secuencia codificante. Aunque, además, ambos tipos de *Trxs* presentan un intron en sus secuencias codificadoras (Meyer *et al.*, 2002).

Como ya hemos visto en capítulos anteriores se conoce la existencias de *Trxs* mitocondriales en diferentes especies, de animales, levaduras, y recientemente de plantas. En plantas superiores, las *Trxs* mitocondriales no están tan claramente relacionados con las *Trxs* procarióticas como en el caso de las *Trxs* cloroplastídicas. La *Trx* mitocondrial de *A. thaliana* (*o1*), ha sido recientemente clasificada en un nuevo subgrupo, entre las *Trxs* de origen eucariótico y las de origen procariótico. Poseen 4 y 5 intrones en localizaciones diferentes a todas las

demás Trxs estudiadas y sus secuencias aminoacídicas no concuerdan preferencialmente con ningún grupo ya descrito. En cualquier caso, todas ellas poseen un peptido de transito que las dirige a la mitocondria (Laloi *et al.*, 2001, Meyer *et al.*, 2002).

b. En plantas superiores coexisten multitud de formas de Trxs con orígenes evolutivos dispares

Recientemente se ha realizado un último análisis evolutivo entre todas las isoformas de Trxs descritas en plantas de diferentes especies (Meyer *et al.*, 2002). Se tuvieron en cuenta los dos aspectos empleados en trabajos anteriores, por un lado un árbol filogenético agrupaba las secuencias en función de su estructura secundaria, y por otro, la presencia de intrones en posiciones conservadas, permitía corroborar la validez de las clasificaciones, y además permitía la formación de variantes dentro de cada grupo (por ejemplo, *h2*, *h7*, *h8*, *CxxS1* y *CxxS2* son consideradas tipo *h* en base a la posición de sus secuencias intrónicas), o la discriminación entre dos tipos de Trxs (por ejemplo, *x* y *Ch2* no pueden ser asociadas debido a las diferencias entre sus estructuras génicas). En este estudio se emplearon todos los subtipos de Trx descritos en plantas superiores.

Se puede apreciar como las secuencias de origen procariótico se agrupan en la parte derecha de la figura 8, en cuatro grupos claramente diferenciados. Las secuencias de Trx *m* se encuentran agrupadas en el grupo principal junto con las dos Trxs de *E. coli*.

El resto de secuencias conforman el grupo de Trxs de plantas superiores con origen eucariótico. El grupo de las Trxs *h* es el más importante y numeroso. Algunas secuencias como las *CxxS* y algunas Trxs *h* de monocotiledóneas se agrupan aparte, debido a su estructura génica. La Trx *CxxS1* se denomina así, al

igual que su homóloga CxxS2, debido a que carecen de la segunda cisteína en el centro activo, pudiendo actuar como disulfuro isomerasa y, en ocasiones, como reductasa. Inicialmente se la denominó como Trx *h6* debido a su homología con las clásicas *h*. Ambas secuencias son expresadas, y poseen dos intrones en la posición de las *Trxs h*, y una helice $\alpha 1$ más larga que la de las *Trxs* procarióticas, al igual que las clásicas *h*.

La TDX es una proteína con un dominio Trx ya descrita anteriormente, su secuencia es claramente eucariótica, a pesar de no poseer intrones en su estructura. Este gen es expresado y un homólogo ha sido encontrado en *N. tabacum*.

El grupo eucariótico conformado por las *Trxs* denominadas *lilium*, deben su nombre a que inicialmente fueron descritas en *L. grandiflorum*, poseen homología con *Trxs* eucarióticas, sin embargo, su actividad oxidoreductasa no ha sido puesta en evidencia, forman un grupo separado cercano al formado por las *Trxs f*, de localización cloroplastídica.

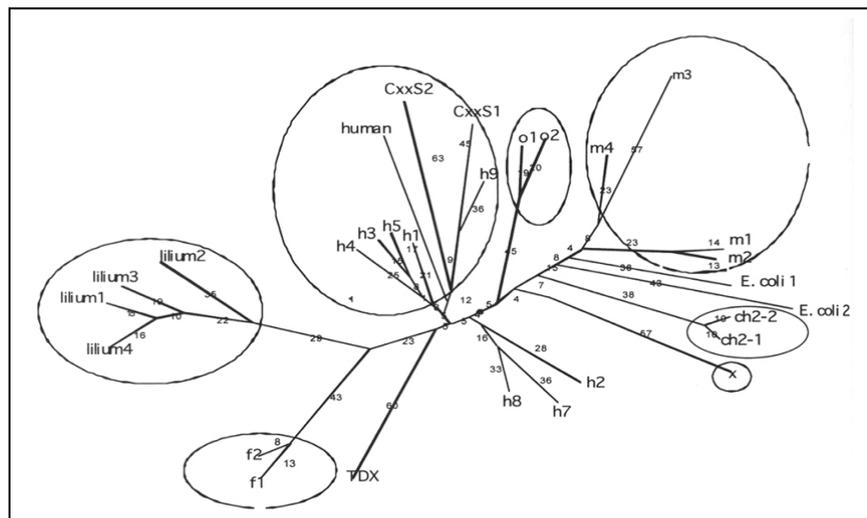


Figura 8. Árbol filogenético. Construido a partir de las secuencias aminoacídicas de las *Trxs* de *A. thaliana*. Extraído del trabajo original de Meyer y colaboradores (Meyer *et al.*, 2002).

VIII. Tiorredoxinas *h*, el grupo más numeroso y controvertido

Como ya mencionamos al inicio de este capítulo, las Trxs de plantas conforman una familia multigénica muy compleja, de hecho, no se conoce actualmente otro organismo que posea número mayor de estas proteínas. Recordemos que tras la secuenciación de *A. thaliana* se han descrito más de una veintena de proteínas que son Trxs o bien poseen algún dominio en su estructura con características de Trxs. Si nos adentramos más en el estudio de este tipo de proteínas en plantas superiores, descubriremos que son las Trxs cloroplastídicas, *m* y *f*, las que han generado un mayor número de trabajos publicados, y la mayor parte de ellos relacionados con el metabolismo fotosintético. Los trabajos realizados en nuestro grupo, a lo largo de los últimos años, en guisante, han ayudado a aumentar el conocimiento sobre estos tipos de Trxs (*m* y *f*). Sin embargo, cuando observamos la clasificación de Trxs en *A. thaliana*, encontramos que la tercera parte de estas son Trxs *h*. Sin embargo, el número de trabajos en los que se han estudiado éstas son muy limitados, quedando sus papeles fisiológicos relegados a unas pocas funciones que en ocasiones están carentes de una base bien asentada. Por otro lado, el elevado número de isoformas presentes impone la cuestión obligatoria de la especificidad o redundancia funcional de estas Trxs.

Tras analizar la bibliografía, en revistas de impacto, sobre Trxs *h* podemos encontrar, tras finalizar el año 2004, algo menos de una centena de trabajos publicados al respecto, siendo el primero de ellos del año 1987.

Analizando estos trabajos, vemos como más de la mitad están centrados en la caracterización génica, proteínica o bioquímica de alguna Trx *h*. Estos trabajos, generalmente son los primeros realizados y asentaron los conocimientos básicos sobre estas proteínas. El resto de trabajos se han enfocado en su relación

con diferentes procesos fisiológicos, localización celular o subcelular, o bien, estudios estructurales.

Si existe una función clásica dentro del grupo de las Trxs *h* esta es la que las relacionan con un papel preponderante en la germinación de la semilla, estando una proporción importante de estos trabajos centrados en monocotiledóneas. Otro grupo importante de estos trabajos se han centrado en el estudio de la estructura tridimensional de las Trxs *h*, estando disponibles varias estructuras resueltas por difracción de rayos X y por RMN, aunque la mayoría de estas corresponden a una Trx *h* del alga fotosintética *Chlamydomonas*. Recientemente, se ha publicado la primera estructura tridimensional de una Trx *h* de plantas superiores (Coudevylle *et al.*, 2005). El resto de investigaciones se han repartido en aspectos muy dispares, como por ejemplo su papel en procesos de autoincompatibilidad polen-pistilo, o bien han sido recientemente presentadas como proteínas que defienden frente a diferentes tipos de estrés. Su localización espacial ha sido un tema de estudio por diferentes grupos, siendo inicialmente descritas como proteínas citosólicas, y posteriormente encontradas ejerciendo funciones en núcleo, asociadas a membranas, e incluso parecen localizarse en mitocondrias o peroxisomas. Además han sido descritas como una de las proteínas mayoritarias en los vasos floemáticos.

Tras esta breve revisión funcional de las Trxs *h*, que serán vistas con más detalle a continuación, se puede apreciar que existen muchas lagunas sobre la funcionalidad de las mismas. Por otro lado el elevado número de isoformas presentes (recordemos que en *A. thaliana*, hay descritas 8 Trxs *h* y varias proteínas relacionadas) nos obliga a cuestionarnos la especificidad funcional entre todas estas isoformas, ya que en los diferentes ensayos *in vitro*, en los cuales se pone de manifiesto la actividad Trx, estas no muestran diferente comportamiento.

a. Tiorredoxinas *h*, un poco de historia

Las Trxs *h* fueron descritas y caracterizadas por primera vez en 1987, en un trabajo en el que se aisló y caracterizó una Trx y una tiorredoxin reductasa de cultivos de células no fotosintéticas de zanahoria (Johnson *et al.*, 1987a). Este trabajo vino a confirmar lo que ya se sospechaba desde hacia varios años, la existencia de un sistema Trx en tejidos heterótrofos de plantas superiores, de ahí su apelativo de Trx *h*. En ese mismo año, el mismo autor, publicó otro trabajo en el cual se caracterizó una Trx *h*, pero esta vez de endospermo de semillas de trigo (Johnson *et al.*, 1987b) de esta forma se abrió una línea de investigación que dio, y está dando lugar a una gran cantidad de trabajos en los cuales se relaciona la Trx *h* con la germinación de la semilla, siendo esta su función más clásica. Una proporción importante de estos trabajos (al igual que los trabajos iniciales de Johnson) fueron y son actualmente encabezados por el Pofr. Bob B. Buchanan de la Universidad de Berkeley en EEUU. Con el paso de los años se ha incrementado el conocimiento sobre estas proteínas debido al gran número de publicaciones, que está aumentando año tras año, y que cada vez involucra a un mayor número de investigadores.

A continuación vamos a realizar una revisión detallada sobre algunos aspectos claves sobre este tipo de Trxs.

b. Las tiorredoxinas *h* y sus funciones en la semilla

Durante la germinación de la semillas las Trxs *h* juegan un papel importante demostrado, especialmente en cereales, desde hace ya varios años. De hecho, como ya comentamos en apartados anteriores, si existe una función clásica para las Trxs de este grupo, esta es la que las relaciona con la germinación de la semilla, facilitando la hidrólisis de las reservas macromoleculares.

En el mismo año en el que se describió la primera Trx *h* de plantas superiores (Johnson *et al.*, 1987a), se presentó también una Trx *h* aislada de endospermo de semillas de trigo, con capacidad de reducir la purotionina, una proteína de almacenamiento de semilla que presenta 4 puentes disulfuro (Johnson *et al.*, 1987b). Actualmente es una evidencia el hecho de la reducción de proteínas de almacenamiento en semilla por Trxs *h*. Esto facilita la posterior proteólisis, durante las primeras etapas de la germinación de los cereales. La relación de las Trxs *h* en esta tarea se basó principalmente en la observación de que las Trxs de plantas y de bacterias poseían la capacidad *in vitro* de reducir proteínas de almacenamiento de semilla, y de inactivar inhibidores de enzimas amilolíticos (Kobrehel *et al.*, 1992). Por ejemplo, las Trxs de trigo y de *E. coli* fueron capaces de reducir e inactivar los inhibidores de α -amilasa y de tripsina (Kobrehel *et al.*, 1991, Jiao *et al.*, 1992). Las Trxs *h*, además, reducen una serin-proteasa específica de semilla, denominada tiocalsina, que tras su reducción es activada por calcio (Besse *et al.*, 1996). La tiocalsina reducida es capaz de hidrolizar las gliadinas y gluteninas previamente reducidas por Trxs *h*.

Pero las evidencias más concluyentes del papel de las Trxs *h* en la movilización de proteínas de reserva en semilla se obtuvieron por medio de la construcción de líneas transgénicas de cebada (*Hordeum vulgare*), que sobreexpresaban Trx *h*. Esta sobreexpresión en semilla cuadruplicaba la actividad de la enzima dextrinasa límite que rompe los enlaces α -1,6 del almidón (Cho *et al.*, 1999).

Estudiando los niveles de Trx en endospermo de trigo se determinó que existe una progresiva reducción de estas, durante la germinación siendo este fenómeno producido por acción del ácido giberelínico (GA₃) (Lozano *et al.*, 1996). Sin embargo, Serrato y colaboradores encontraron que los niveles proteínicos de Trx en aleurona y escutelo se mantienen invariables durante la germinación, y el GA₃ no produce efectos a nivel de las Trx en esos tejidos. Además, estas mismas

Trxs fueron inmunolocalizadas predominantemente en el núcleo de células del escutelo y de aleurona, y en menor proporción en endospermo (Serrato *et al.*, 2001).

En conclusión (Fig. 9), las Trxs *h* han sido descritas como proteínas que ejercen una importante función en las fases iniciales de la germinación, llevando a cabo la movilización de compuestos de reserva a través de diferentes actividades. (i) En primer lugar las Trxs actúan a nivel de las proteínas de reserva, rompiendo puentes disulfuro existentes en estas proteínas, dejando más accesibles los enlaces peptídicos para que sean hidrolizados por proteasas específicas. (ii) Por otro lado las Trxs se reconocen como activadores de varias enzimas proteolíticas y amilolíticas que darán lugar a la liberación de monómeros aminoacídicos y glucídicos necesarios para la germinación de la semilla. (iii) Las Trxs *h* también actúan inhibiendo a determinados inhibidores de enzimas hidrolíticas (inhibidores de α -amilasa o inhibidores de tripsina).

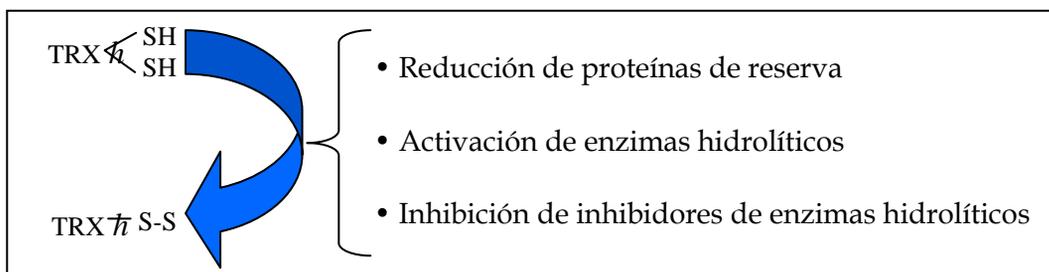


Figura 9. Roles conocidos de las Trxs *h* en semilla, en relación a la movilización de reservas durante la germinación.

En conjunto las Trxs *h* favorecen la movilización de proteínas de reserva en semilla. Este conocimiento ha posibilitado el empleo de harinas transgénicas comerciales con elevados niveles de Trx *h*. Una de las características de estas harinas es una mayor proporción de compuestos reducidos lo cual conduce a una

menor alergenicidad de los alimentos que las contengan especialmente indicada para individuos celíacos.

Algunos trabajos han mostrado que son varias las *Trxs h* que se expresan en semillas, mostrando diferentes patrones bioquímicos, y de expresión espacio-temporal. Este hecho implica la existencia de funciones diferenciadas entre las distintas isoformas de *Trx h* coexistente en este órgano. Estos resultados se han descritos en cebada (Maeda *et al.*, 2003) y guisante (Montrichard *et al.*, 2003). Por ejemplo, la caracterización de dos *Trxs h* (*h3* y *h4*) en semillas de guisante, se realizó por Montrichard y colaboradores. Se demostró que las dos *Trxs h* de guisante tienen una distribución espacio-temporal diferente en la semilla. La expresión génica de *Trx h3* (*PsTRXh3*) se acumula en ejes embrionarios y cotiledones, y se mantienen constante hasta dos días tras la protusión de la radícula, sin embargo, la *Trx h4* (*PsTRXh4*) solo se expresa en ejes de semilla seca y durante la imbibición, pero sus niveles disminuyen en los siguientes estadios de la germinación (Montrichard *et al.*, 2003).

El conocimiento de la función fisiológica de las *Trxs h* en la semilla se ha visto recientemente actualizada por una serie de trabajos que involucran a estas proteínas en otras funciones diferentes a aquellas relacionadas con la movilización de reservas nutricionales, por ejemplo en la defensa frente a diferentes tipos de estrés. Serrato y Cejudo encontraron que la acumulación de *Trx h* en núcleo de células de semilla se asociaba con el estrés oxidativo sufrido por esos tejidos en desarrollo (Serrato y Cejudo, 2003). Por otro lado se demostró que las líneas transgénicas de cebada que sobreexpresaban *Trx h* eran más resistentes al efecto inhibitor del selenito, proponiéndose la posibilidad de emplear plantas que sobreexpresen *Trxs* en bioremediación de ambientes contaminados (Kim *et al.*, 2003).

Los trabajos basados en la captura de proteínas diana de *Trxs* han ayudado a corroborar los papeles fisiológicos de las *Trxs* en semillas, y han

aportado nuevas informaciones que podrán abrir nuevos campos de trabajo al respecto. En 2001, se aislaron 3 proteínas (Arah2, Arah3 y Arah4), ya descritas como alérgenos, y dos, no descritas anteriormente en semillas, y relacionadas con la desecación y la maduración de proteínas en semilla (Yano *et al.*, 2001). Posteriormente, en otro trabajo, se capturaron varias proteínas diana en líneas transgénicas de cebada que sobreexpresan *Trx h*, tras someter al embrión a peróxido de hidrógeno. Se describió, entre otras, una peroxiredoxina (peroxidasa dependiente de Trx) de semilla lo cual corrobora el papel antioxidante de estas proteínas en el estrés de la semilla (Marx *et al.*, 2003). En este trabajo se obtuvieron proteínas diana que relacionaban a las Trxs con procesos tales como, la dormancia, y la traducción y movilización de proteínas de reserva. Maeda y colaboradores, realizaron una nueva búsqueda de proteínas diana de Trxs *h* en cebada. Se emplearon dos Trxs *h*, comprobando que no presentaban diferencia en la especificidad frente a las proteínas diana. Se encontraron proteínas ya descritas por su interacción con Trxs: inhibidores de α -amilasa/subtilisina, inhibidores de α -amilasa/tripsina, ciclofilinas (descritas como proteínas diana de Trxs *m*). Por otro lado se identificaron varias proteínas no descritas como dianas de Trxs: proteína embrioespecífica, isoenzimas de quitinasa y superóxido dismutasa entre otras (Maeda *et al.*, 2004). El último estudio de captura de proteínas diana de Trxs *h* en semilla lo realizaron Wong y colaboradores en cebada (Wong *et al.*, 2004). Se aislaron 68 posibles diana de diferentes estadios de desarrollo, entre las cuales hay 40 desconocidas, que no vamos a citar aquí, pero lo que si mencionaremos es que se describieron varias proteínas en la defensa frente al estrés oxidativo (peroxiredoxina tipo II, catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glioxalasa, GSH dehidroascorbato reductasa, peroxidasa 1, serpina, taumatina), muchas proteínas relacionadas con el metabolismo del carbono (inhibidores ya descritos, aconitasa, aldolasa, NAD malato deshidrogenasa), y muchas proteínas relacionadas con una gran diversidad de

funciones. El empleo de técnicas centradas en la captura de proteínas diana aporta una gran cantidad de datos que permiten abrir nuevas líneas de trabajo en el estudio de estas proteínas.

c. Las tiorredoxinas *h* en los tejidos florales reproductores

Las Trxs *h* juegan un papel crucial en la función floral, diferentes estudios han descrito la presencia de estas pequeñas proteínas, tanto en el grano de polen, como en el pistilo. Varias líneas de investigación claramente diferenciadas, han demostrado el papel de las Trxs *h* en este órgano, implicándolas en el mecanismo de la autoincompatibilidad floral. Sin embargo, son muchos los datos que quedan por explicar para poder aclarar su función de forma evidente.

i) La autoincompatibilidad floral

La reproducción sexual es un proceso altamente controlado en el cual es necesaria una serie de pasos para el reconocimiento de los dos componentes, masculino y femenino. En plantas superiores, el éxito de la fertilización que conduce a la formación de la semilla, es dependiente de la interacción entre los dos componentes compatibles que interaccionan: el grano de polen, que porta los gametos masculinos, y el pistilo, donde se encuentran los gametos femeninos. Durante la polinización el polen es transportado por diferentes vectores (Por ejemplo, aire, agua y animales) hacia el estigma, la superficie receptiva del pistilo. El pistilo posee la capacidad de discriminar los diferentes tipos de polen con los que interacciona. Así el grano de polen perteneciente a otra especie diferente a aquella que porta la flor, es generalmente rechazado, manteniendo así la estabilidad genética de la especie. Además de este reconocimiento que previene cruces interespecíficos, se estipula que algo más del 50% de las especies

de angiospermas poseen la habilidad de identificar y rechazar su propio polen. La autopolinización es un fenómeno particularmente propenso en especies donde se dan estructuras hermafroditas, como ocurre en la mayoría de las angiospermas (El 96% de angiospermas portan órganos masculinos y femeninos en la misma planta, y entre estas especies, el 75% portan flores hermafroditas). La significación evolutiva del rechazo del polen propio, denominado autoincompatibilidad (SI), es considerable, y la adquisición de diferentes sistemas de SI en plantas con flores durante el curso de la evolución, se cree responsable de la gran variabilidad y adaptación de estos vegetales al medio. Esto, condujo al rápido avance y una posición dominante de las plantas con flor en la biosfera (Gaude y Cabrillac, 2001).

El sistema genético que controla el fenómeno de la autoincompatibilidad está constituido por genes que presentan una elevada variabilidad alélica, recordando al sistema genético que constituye el complejo mayor de histocompatibilidad en mamíferos. Por esta razón las plantas en este tipo de experimentos son denominadas como “haplotipos”, y el rechazo se producirá cuando se de la expresión de los mismos productos alélicos en las cubiertas del grano de polen y en la superficie estigmática.

Actualmente se conoce que este rechazo no se limita al polen procedente de la misma planta, también se rechazarán el grano de polen que expresen los mismos alelos presentados por el estigma. Este hecho sugiere que estos genes deben contener, al menos, dos unidades transcripcionales multialélicas, una que codifique el determinante masculino y otra el femenino, responsables ambas de la autoincompatibilidad (Fig. 10). Por consiguiente, el reconocimiento polen-pistilo que conduce a la respuesta de SI, se basa en la interacción directa entre los componentes, masculino y femenino, que presentan el mismo alelo, y que conducen a la respuesta de SI que detiene el proceso de fertilización del ovario. Los componentes masculinos y femeninos responsables de esta interacción

molecular varían entre las diferentes especies, pero el papel de las Trxs *h* en este sistema ha sido puesto de manifiesto en dos modelos de estudio de SI, el modelo de herbáceas (*Phalaris coerulescens*), y el modelo *Brasica*. En el primero, la Trx parece jugar un papel en los dos componentes, granos de polen y estigma, aunque el mecanismo molecular aún no está claro. En el segundo modelo la función de la Trx ha sido evidenciada de forma elegante, a nivel molecular, actuando en este caso desde el estigma femenino.

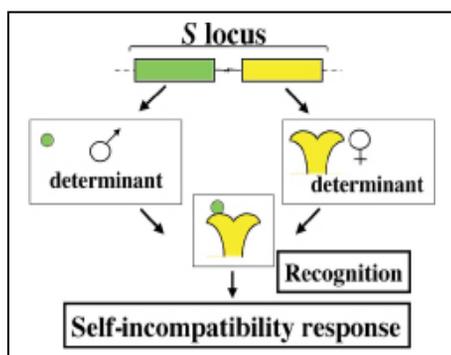


Figura 10. Genética de la SI floral. El *Locus* S contiene, al menos dos componentes, que codifican los determinantes masculino, que se expresa en el grano de polen (verde), y femenino, que se expresa en estigma floral (amarillo). La respuesta de SI ocurre cuando ambos determinantes, portan el mismo alelo. Figura extraída del trabajo original (Gauze y Cabrillac, 2001).

ii) Las tiorredoxinas y la SI en herbáceas, un modelo aún por descifrar

En las plantas herbáceas la SI está controlada por, al menos, dos genes multialélicos no ligados, denominado S y Z (Hayman y Richter, 1992). El crecimiento del tubo polínico se detiene cuando los alelos de ambos genes expresados en el polen se encuentran también en el estigma. Este sistema de SI gametofítica controlado por dos genes es característico de las plantas herbáceas.

En 1994, Li y colaboradores clonaron y secuenciaron el gen S, multialélico, de *P. coerulescens*, cuya mutación conducía a la pérdida de la SI en la planta. La secuencia aminoacídica deducida constituía una proteína con un dominio N-terminal variable y un dominio C-terminal conservado de Trx tipo *h*. Propusieron que el extremo N-terminal determinaba la especificidad alélica, y el dominio Trx

poseía la actividad catalítica, que fue corroborada *in vitro* por la expresión y purificación de la Trx (Li *et al.*, 1994, Li *et al.*, 1995). Posteriormente, los mismos autores corroboraron que la actividad Trx era necesaria para el proceso de SI. La proteína S mutante que conducía a la pérdida de SI había sufrido una mutación puntual en un serina del dominio Trx que le hacía perder su actividad Trx, transformando la planta en autocompatible (Li *et al.*, 1996). Además para corroborar el modelo de *P. coerulescens* en el estudio de SI en monocotiledoneas, se aisló y estudió el gen S de otras 15 especies de herbáceas, comprobando así la presencia de esta proteínas incluso en especies autocompatibles (Li *et al.*, 1997).

Se han propuesto dos modelos que permiten explicar molecularmente la SI en herbáceas (Lewis, 1976, Wehling *et al.*, 1994). Ambos modelos postulan la expresión de los genes S y Z en los dos componentes interactuantes, granos de polen, y estigma floral, y también suponen la interacción del producto del gen S (dominio N-terminal) con otras proteínas. Li y colaboradores propusieron un posible papel catalítico del dominio Trx (dominio C-terminal) regulando esta interacción (Li *et al.*, 1996).

En conclusión, se demostró la implicación de proteínas, con un dominio Trx tipo *h*, en el proceso de SI en *P. coerulescens*. Además se comprobó que la actividad catalítica del dominio Trx está relacionada con la capacidad de la planta para aceptar o rechazar el grano de polen. Este modelo es aplicable a otras monocotiledoneas, sin embargo no hay datos suficientes para proponer un mecanismo molecular de actuación sólido.

iii) Papel molecular de las tiorredoxinas *h* en el mecanismo de SI en *Brassica*

La SI en la familia *Brassicaceae* está controlada por un conjunto de genes ligados, que se encuentran en la misma localización cromosómica, en el denominado locus S. Algunos de estos genes presentan una elevada variabilidad

genética que conducen a diferentes tipos de alelos. En la respuesta de SI en este grupo de plantas, el tubo polínico no se desarrolla adecuadamente en el estigma que expresa los mismos alelos S que el grano de polen. El rechazo del polen es el resultado de la detención del crecimiento del tubo polínico.

Son varios los componentes proteínicos o glicoproteínicos que determinan la respuesta de SI en brassicáceas, aunque los responsables directos de la interacción que determina la complementariedad alélica son dos proteínas, codificadas ambas por el locus-S. El componente femenino se ha denominado *S-locus receptor Kinase* (SRK) y se expresa en el tejido estigmático (Takasaki *et al.*, 2000), y el componente masculino, denominado *S-locus cysteine-rich protein* (SCR) forma parte de un grupo de proteínas PCP (pollen coats protein) que se expresa en las cubiertas del polen (Schopfer *et al.*, 1999). Actualmente se conoce que la respuesta de SI se traduce molecularmente por la interacción de SCR con SRK (Stephenson *et al.*, 1997, Schopfer *et al.*, 1999).

SRK es una proteína transmembrana, consistente en una región extracelular, otra intermembranosa, y una última región citoplasmática que muestra actividad serin-treonin quinasa (Giranton *et al.*, 2000). Tras la interacción de granos del polen con el tejido estigmático, ambos del mismo haplotipo, se produce la autofosforilación del dominio quinasa de SRK, y en estas condiciones esta proteína, es capaz de fosforilar a una proteína citoplasmática denominada ARC1, que actúa produciendo una serie de reacciones en cascada que conducen a la parada del crecimiento del tubo polínico.

El papel molecular de las Trxs *h* en el proceso de la SI fue puesto gradualmente de manifiesto a lo largo de una serie de trabajos. Inicialmente, se descubrió la capacidad de interacción de dos Trxs *h* de *Brassica*, denominadas THL-1 y THL-2, con el dominio quinasa de SRK. Esta información se obtuvo al enfrentar una librería de ARNm con el dominio quinasa por medio de la técnica del doble híbridos. Luego fue corroborada por coimmunoprecipitación (Bower *et*

al., 1996). Posteriormente Cabrillac y colaboradores propusieron un modelo para el mecanismo molecular de las Trxs *h* en la SI. Ambas Trxs interactúan de manera reversible con el dominio quinasa de SRK en el estigma, inhibiendo su capacidad de autofosforilación, evitando así la activación espontánea de la cascada de señales que conducen a la SI. En este modelo, la proteína SCR del polen interactúa con la SRK estigmática, produciéndose la liberación de la Trx. El dominio quinasa de SRK queda libre de la Trx permitiendo así su actividad de autofosforilación, produciéndose de esta forma la respuesta de SI (Cabrillac *et al.*, 2001).

Por último se caracterizó la interacción entre estas Trxs y el dominio quinasa de SRK. Se usaron construcciones híbridas entre diferentes tipos de Trxs y se realizaron mutaciones puntuales en los dos componentes de la interacción, realizándose experiencias con el sistema de doble híbrido. La interacción era de naturaleza oxido-reductiva ya que la sustitución o delección de residuos de cisteína en el centro activo de las Trxs y/o en el dominio quinasa, abolían la posibilidad de interacción entre ambas proteínas. Además se postuló que esta interacción se daba entre Trxs *h* que mostraban el centro activo -WCPPC- (Mazzurco *et al.*, 2001).

Por último, recientemente se ha realizado la construcción de plantas transgénicas de *Brassica napus*, que expresan una Trx *h* en antisentido dando lugar a un fenotipo con bajo nivel de rechazo de polen propio (Haffani *et al.*, 2004)

iv) Otros datos sobre la presencia de tioredoxinas *h* en tejidos florales

El conjunto de trabajos que han sido previamente explicados se agrupan en dos modelos que relacionan las Trxs con el proceso de autoincompatibilidad.

Sin embargo, existen otros datos que han puesto de manifiesto la presencia de Trxs en polen y tejido estigmático, aunque no se ha explicado aún esta presencia.

En *Brassica rapa* se detectó la presencia de Trxs en la superficie del grano de polen. Para ello, se inmunodetectaron un grupo de proteínas utilizando anticuerpos obtenidos de conejos a los que se les inyectó proteínas de la cubierta del grano de polen. Las proteínas que se muestrearon procedían de la expresión de una librería de ADNc de anteras inmaduras. Esta presencia no se han relacionado con el fenómeno de la SI en *Brassica*, aunque fueron identificadas como posibles alérgenos (Toriyama *et al.*, 1998).

Juttner y colaboradores clonaron, expresaron y caracterizaron diferentes Trxs *h* a partir de ARNm de granos de polen de diferentes herbáceas (*Lolium perenne*, *Hordeum bulbosum*, *Phalaris coerulea* y *Secale cereale*). Estas secuencias mostraron homología mayor del 95% por lo cual se agruparon en un subtipo de Trx *h*. En la base de datos, a partir de estas secuencias, se detectaron otras Trxs de especies no herbáceas (tomate, soja, arroz y pino) mostrando así su importancia funcional no limitada a monocotiledoneas (Juttner *et al.*, 2000). Este subgrupo de Trxs *h*, junto con otras de diferentes especies se denominan como subgrupo 3 en la última clasificación de Trxs *h* (Gelhaye *et al.*, 2004b). Su posible papel fisiológico está aún por determinar.

Las Trxs *h* de *A. thaliana* fueron estudiadas a nivel transcripcional (northern blots, RT-PCR semicuantitativa y experiencias de fusión promotor-GUS), mostrando patrones de expresión claramente diferenciados (Reichheld *et al.*, 2002). Algunas de ellas con un patrón de expresión muy ubicuo, otras mostraron preferencias en granos de polen y estigma floral.

d. Las tiorredoxinas *h* se expresan en haces vasculares

La presencia de Trxs tipo *h* como una de las proteínas mayoritarias en los haces vasculares del floema, está actualmente fuera de dudas desde que en 1995 Ishiwatari y colaboradores realizaron su extracción e identificación de haces vasculares de arroz. La proteína denominada como RPP13-1, una de las más abundante, fue parcialmente secuenciada, y a partir de la información obtenida se obtuvo un ADNc que correspondía con una Trx tipo *h*. Esta fue sobreexpresada y presentaba actividad reductora de puentes disulfuros (Ishiwatari *et al.*, 1995). En los años posteriores se corroboró esta presencia en otras especies de monocotiledoneas, e incluso de dicotiledoneas, planteándose la posibilidad de que estas proteínas procedieran de la translocación de las células de acompañamiento del floema (Sasaki *et al.*, 1998, Schobert *et al.*, 1998, Santandrea *et al.*, 2002). Este último dato fue confirmado por medio de experiencias de hibridación *in situ*, demostrándose además en células mesofílicas de tabaco, con experiencias de microinyección de Trx marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que estas proteínas eran capaces de atravesar las células del floema vía plasmadesmos (Ishiwatari *et al.*, 1998).

Varias funciones fueron propuestas para estas proteínas en tejido conductor, aunque el más evidente se propuso tras realizar el seguimiento de la expresión génica de *Trx h* durante la formación del tejido conductor por hibridación *in situ*. Permitió determinar que estas proteínas se encuentran en todos los tipos celulares en los primeros estadios del desarrollo vascular, quedándose su expresión relegada a las células de acompañamiento conforme se organiza el tejido vascular. Estas experiencias permitieron argumentar y defender el papel de estas proteínas en la diferenciación celular del tejido vascular (Ishiwatari *et al.*, 2000).

Estudios de expresión génica en *A. thaliana* transformadas con una construcción promotor-GUS, y de northern blot, permitieron demostrar que cuatro *Trxs h* de esta planta eran principalmente expresadas en haces vasculares de plantulas (Reichheld *et al.*, 2002).

e. Las tiorredoxinas *h* y el estrés

El papel de las Trxs en la defensa frente al estrés oxidativo ha sido descrito en diferentes organismos. Diferentes trabajos en humanos, levadura, plantas superiores, algas (*C. Reinhardtii*) y bacterias (*E. coli*) han demostrado la implicación de diferentes tipos de Trxs en el control del equilibrio redox y la defensa frente al estrés oxidativo (puede verse en el capítulo referente a las funciones generales de las Trxs). Las Trxs *h* parecen estar involucradas en esta función, según ciertos trabajos recientes. Mouaheb y colaboradores realizaron en 1998 experiencias de complementación heteróloga en EMY63 con cinco *Trxs h* de *A. thaliana*. Estas experiencias sirvieron para corroborar la especificidad funcional dentro de este subgrupo de Trxs. AtTRXh3 pareció ser la Trx *h*, de esta planta, que mejor complementaba la sensibilidad frente al peróxido de hidrógeno (Mouaheb *et al.*, 1998). Posteriormente se demostró que esto, se debía a la interacción de esta Trx con una Peroxiredoxina de levadura descrita como tipo II, comprobándose además, la existencia de una prx homóloga en la planta, que además es citosólica (Verdoucq *et al.*, 1999). Trabajos posteriores han demostrado esta capacidad enzimática (Brehelin *et al.*, 2003), e incluso la captura de una prx tipo II citosólica, como proteína diana de Trxs *h* (Yamazaki *et al.*, 2004). Por otro lado, Serrato y col. encontraron que en trigo sometido a estrés oxidativo, las Trxs se acumulan en núcleo de células de semilla en desarrollo, (Serrato *et al.*, 2001, Serrato y Cejudo, 2003). Además varias proteínas diana han sido capturadas en diferentes trabajos, identificándose éstas, como proteínas involucradas en la

defensa frente al estrés oxidativo, como peróxirredoxinas, superóxido dismutasa, ascorbato peróxidasa, etc (Marx *et al.*, 2003, Maeda *et al.*, 2004, Yamazaki *et al.*, 2004, Marchand *et al.*, 2004).

El papel de las Trxs *h* en la defensa frente a estrés biótico ha sido también recientemente descrito. Se han capturado posibles proteínas diana de Trxs *h* involucradas en la defensa frente a este tipo de estrés (Marchand *et al.*, 2004).

Una Trx *h* de *A. thaliana*, AtTrxh5, parece aumentar su nivel de transcritos en plantas sometidas a estrés oxidativo o estresadas por agentes patógenos (Reichheld *et al.*, 2002, Laloï *et al.*, 2004).

f. Las Trxs *h*, clásicamente descritas como citosólicas pueden localizarse en otros compartimentos celulares.

La localización subcelular de las Trxs *h* es un tema ciertamente controvertido desde el descubrimiento de éstas. Mientras que las formas *m* y *f* han sido siempre consideradas como cloroplastídicas, las *h* fueron propuestas como citosólicas desde prácticamente su descubrimiento, debido a la carencia de peptido de transito (Brugidou *et al.*, 1993). Sin embargo en los últimos años algunos trabajos han descrito estas isoformas en diferentes compartimentos celulares, complicando aún más el conocimiento funcional de estas proteínas. Shi y Bhattacharyya describieron dos Trxs tipo *h*, en soja, asociadas a membranas a través de su extremo N-terminal transmembrana, aunque su papel no fue, ni ha sido aún descifrado (Shi y Bhattacharyya, 1996). Por otro lado, la presencia de las Trxs *h* en núcleo de células de semilla de trigo fue puesta de manifiesto relacionándose, en este caso, con la defensa frente al estrés oxidativo durante la germinación de semilla (Serrato *et al.*, 2001, Serrato y Cejudo, 2003). En un reciente trabajo, Gelhaye y colaboradores han descrito la presencia de una Trx *h* de alamo (PtTRXh2) en mitocondrias, donde parece ser reducida por la NADPH-

Trx-reductasa mitocondrial (AtNTRA). PtTRXh2 actuaría regulando una oxidasa alternativa de mitocondria por oxidoreducción, permitiendo así, la activación de ésta por piruvato (Gelhaye *et al.*, 2004a).

g. Estructura tridimensional de las tiorredoxinas *h*

El conocimiento de la estructura tridimensional de las Trxs *h* está prácticamente relegado a los estudios en el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Varios trabajos describen la estructura tridimensional de diferentes Trxs de este alga verde, resueltos por RMN o por difracción de rayos-X (Mittard *et al.*, 1995, Mittard *et al.*, 1997a). También se han descrito estructuras con mutaciones puntuales, y se han realizado estudios espectroscópicos y calorimétricos (Richardson *et al.*, 2000, Menchise *et al.*, 2001a, Menchise *et al.*, 2001b). Sin embargo, recientemente ha sido publicada la primera estructura de Trx *h* de planta superior (*Populus tremula*). En este caso la Trx resuelta exhibe el centro activo atípico -WCPPC- (Coudevylle *et al.*, 2004, Coudevylle *et al.*, 2005).

La arquitectura molecular de las Trxs está altamente conservada y todas las Trxs *h* resueltas por el momento respetan este *fold*ing. Las diferencias funcionales entre todas estas isoformas se basan en las características aminoacídicas de la superficie molecular, este hecho condiciona el tipo de proteína diana con la que interaccionan (Eklund *et al.*, 1984)

h. Proteínas diana de tiorredoxinas *h*

En los últimos años han sido publicados varios trabajos, de diferentes autores, en los que se han realizado la búsqueda y captura de proteínas diana de Trxs. Las Trxs tipo *h* han sido, quizás, las más afortunadas en estos estudios (Verdoucq *et al.*, 1999, Yano *et al.*, 2001, Marx *et al.*, 2003, Wong *et al.*, 2004, Maeda

et al., 2004, Yamazaki *et al.*, 2004, Marchand *et al.*, 2004). Estos trabajos están principalmente basados en la combinación de diferentes técnicas que conducen a la identificación de las secuencias aminoacídicas de posibles proteínas dianas de Trxs. En primer lugar los extractos crudos son incubados con la Trx a ensayar y posteriormente se tratan con sondas fluorescentes (monobromobimano o Cy5 maleimida), de esta forma se etiquetan los grupos cisteínas que han sido previamente reducidos por Trx. Otra opción es la captura de las proteínas diana por medio de su unión covalente con la Trx ensayada, pero previamente mutada (segunda cisteína del centro activo por serina) permitiéndose así, la unión covalente y estable entre ambas proteínas. Posteriormente, estas proteínas son identificadas gracias a la separación electroforética bidimensional, lo cual permite mayor resolución. Por último, se realiza la identificación aminoacídica por secuenciación o bien, basada en espectrometría de masas y comparación en base de datos.

Estos trabajos han originado una enorme variedad de secuencias aminoacídicas, algunas de las cuales no son conocidas. En otros casos las secuencias se han identificado con proteínas de las cuales ya se intuía la posibilidad de interacción con Trxs.

i. Origen y agrupación de las Trxs *h*

Las Trxs del grupo *h* representan el más grande y divergente grupo de Trxs en plantas, su origen eucariótico, junto con las Trxs de mamífero y las Trxs *f*, está más que asentado. La multitud de isoformas de Trx *h* y la alta homología interespecífica existente entre ellas corrobora los fenómenos evolutivos de duplicación y divergencias dentro de este grupo (Rivera-Madrid *et al.*, 1995). Por otro lado, la presencia en las diferentes especies de dos intrones en posiciones

conservadas (Sahrawy *et al.*, 1996) confirman el hecho de que las Trxs *h* de plantas superiores y *Chlamydomonas* provienen de una Trx ancestral común.

Con la excepción de *A. thaliana*, cuyo genoma ha sido recientemente secuenciado, no se conoce el juego completo de Trxs *h* de ninguna especie. Meyer y colaboradores realizaron un estudio evolutivo con todas las Trxs de esta planta y otras de diferentes especies. Demostraron que en ocasiones, existe mayor homología entre dos Trxs de dos especies filogenéticamente alejadas, que entre dos secuencias de diferentes Trxs *h* de una misma especie (Fig. 11), por ejemplo las Trxs *h1*, *h3*, *h4* y *h5* de *A. thaliana* mantienen un mayor grado de homología con las Trxs *h* de monocotiledoneas, como el trigo o arroz, que con el resto de Trxs de *Arabidopsis* (*h2*, *h7* y *h8*) (Meyer *et al.*, 2002).

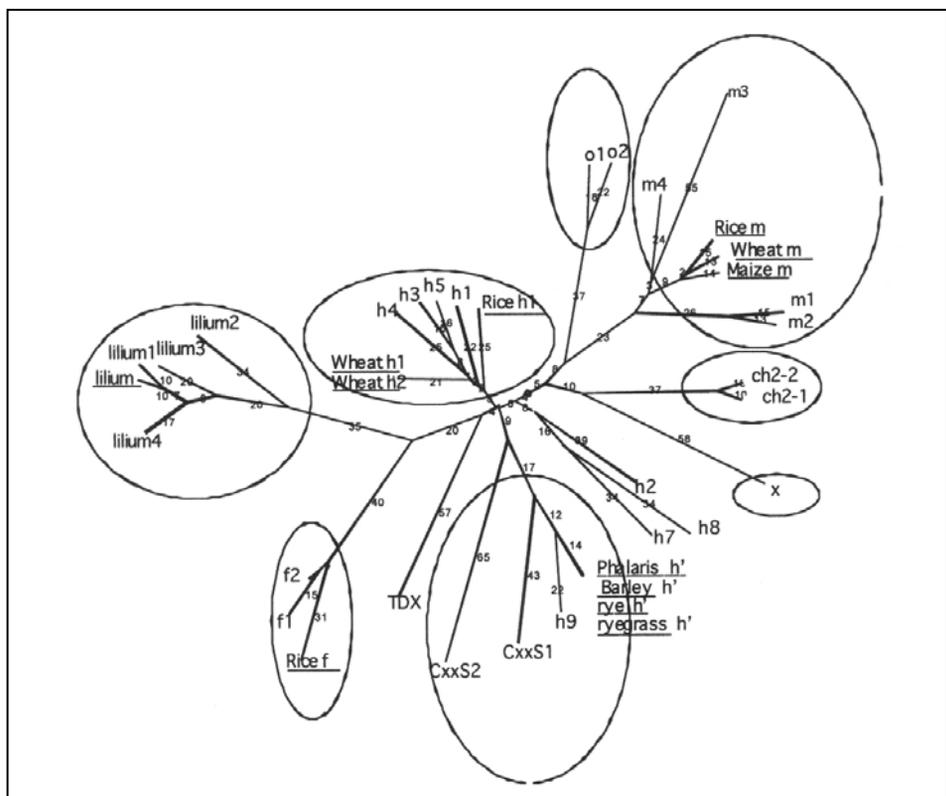


Figura 11. Arbol filogenético construido a partir de las Trxs de *A. thaliana* y de otras especies de monocotiledoneas.

Gelhaye y colaboradores (Gelhaye *et al.*, 2004b), han presentado recientemente un trabajo basado principalmente en el estudio de cinco Trxs *h* del álamo (*Populus trichocarpa*) y en las Trxs *h* de *A. thaliana*. Las Trxs *h* de plantas superiores pueden ser agrupadas en tres subgrupos según su secuencia aminoacídica (Fig. 12), y si se analizan los diferentes subgrupos se puede apreciar que tienen características bioquímica y funcionales parecidas. En el subgrupo 1 se encuentran las Trxs *h* más ampliamente estudiadas (AtTRX*h*1, AtTRX*h*3, AtTRX*h*4, AtTRX*h*5, PtTRX*h*1 y PtTRX*h*3), y la alta homología secuencial entre algunos de sus componentes (AtTRX*h*3 y AtTRX*h*5) puede ser explicada por un evento de duplicación (Reichheld *et al.*, 2002). Poseen los dos tipos de centros activos descritos para las Trxs *h* (-WCG/PPC-), y parecen ser de localización principalmente citosólica. Las Trxs *h* de este subgrupo son abundantes en haces vasculares floemáticos, comprobándose este hecho en *A. thaliana* (Reichheld *et al.*, 2002), arroz (Ishiwatari *et al.*, 1995) y maíz (Santandrea *et al.*, 2002).

El grupo 2 es más heterogeneo y menos conocido, la característica principal de este subgrupo es la presencia de una extensión N-terminal, mientras que el centro activo está totalmente conservado en este grupo (-WCGPC-). Tres Trxs de *A. thaliana* y dos de álamo parecen conformarlo actualmente (AtTRX*h*2, AtTRX*h*7, AtTRX*h*8, PtTRX*h*2 y PtTRX*h*5). AtTRX*h*7 y AtTRX*h*8 comparten una elevada homología que indica un origen evolutivo por duplicación génica, además la Trx de álamo, PtTRX*h*2, comparte también una alta homología con ambas. PsTRX*h*2 ha sido descrita recientemente como una Trx *h* inmunolocalizada en la mitocondria. Estudios de expresión han detectado que esta proteína es altamente expresada en todos los tejidos, especialmente en hoja (Gelhaye *et al.*, 2004a), sin embargo las secuencias ortólogas en *Arabidopsis*, AtTRX*h*7 y AtTRX*h*8, parecen ser muy débilmente expresadas, y siempre en localizaciones tisulares específicas (Reichheld *et al.*, 2002). De todas las Trxs de este subgrupo, AtTRX*h*2 ha sido la más estudiada (Rivera-Madrid *et al.*, 1995,

Mouaheb *et al.*, 1998, Brehelin *et al.*, 2000, Reichheld *et al.*, 2002), su papel en el metabolismo de S se puso de manifiesto en experiencias de complementación heteróloga en levadura, y por RT-PCR se demostró que su expresión se daba en prácticamente todos los tejidos, pero sobre todo en los florales. Por análisis de secuencias, se han descrito, en otras plantas superiores, Trxs *h* pertenecientes a este grupo, como por ejemplo la Trx *h1* y *h2* de soja. La localización celular de este subgrupo queda aún por descifrar, aunque inicialmente parecían ser citosólicas, algunos estudios predictivos las dirigen hacia orgánulos e incluso podrían estar asociadas a membranas celulares (Shi y Bhattacharyya, 1996).

El grupo 3 fue inicialmente descrito por Juttner y colaboradores como un conjunto de Trxs *h* que presentaban una alta homología secuencial (Juttner *et al.*, 2000). En este grupo se encontraban algunas Trxs de *lolium perenne*, *Hordeum bulbosum*, *Phalaris coerulescens* y *secale cereale*, y junto a estas se han agrupado las Trxs AtTRX*h9* y PtTRX*h4*. Todas poseen un centro activo clásico -WCGPC- y se diferencian del subgrupo 1 por poseer un extremo N-terminal, con una cisteína conservada en cuarta posición. PtTRX*h4* ha sido recientemente caracterizada (Gelhay *et al.*, 2003) y muestra unas propiedades bioquímicas especiales junto con las descritas por Juttner (Juttner *et al.*, 2000). Las enzimas NTR de *E. coli* y de *A. thaliana* no parecen reducirlas de forma efectiva, aunque por otro lado todas ellas son activas en el test de reducción de insulina. PtTRX*h4* parece ser reducida por glutarredoxinas y se expresa en prácticamente todos los tejidos. AtTRX*h9* no parece ser expresada, y las Trxs de este subgrupo, de *Lolium penne* y *Phalaris coerulescens*, lo hacen principalmente en granos de pollen y estigma floral. En este grupo también se encuentran unas Trxs que muestran un centro activo peculiar -WCXS-. Cuatro Trxs de este tipo han sido incluidas en este grupo, dos de *Arabidopsis* (AtCXXS1 y AtCXXS1) y dos de álamo (PtCXXS1 y PtCXXS3). PtCXXS3 ha sido recientemente caracterizada y muestra un patrón de comportamiento bioquímico especial (Gelhay *et al.*, 2003).

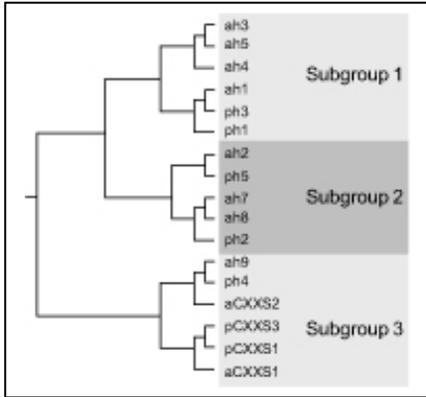


Figura 12. Arbol filogenético de las Trxs h de *P. trichocarpa* y de *A. thaliana*. Las diferentes secuencias pueden ser agrupadas en tres grupos con secuencias aminoacídicas y características bioquímicas similares. Extraído del trabajo original de Gelhaye y colaboradores (Gelhaye *et al.*, 2004b)

OBJETIVOS

1. Obtención y caracterización de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas traducidas, de Trxs *h* de guisante (*Pisum sativum* cv. Lincoln).
2. Expresión, purificación y caracterización bioquímica-estructural de Trxs *h* de *Pisum sativum* como proteínas recombinantes en *E. coli*.
3. Estudios de expresión génica y proteínica de Trxs *h* de *Pisum sativum*. Localización proteínica a nivel tisular.
4. Estudios funcionales de Trxs *h* de *Pisum sativum*

MATERIALES Y
MÉTODOS

I. Material Vegetal

Todas las experiencias se han realizado utilizando como material vegetal guisante (*Pisum sativum* cv. Lincoln) y *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia.

II. Cepas microbiológicas

a. *Escherichia coli*

Dos cepas de *E. coli* han sido utilizados para el desarrollo de este trabajo, dependiendo de la finalidad de la construcción que van a portar.

La cepa **DH5 α** (genotipo supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi1 relA1) ha sido utilizada rutinariamente para la clonación y amplificación de plásmidos. También se utilizó para el almacenamiento de la construcción en la bacteria, conservada en glicerol.

BL21 DE3 (genotipo B F⁻ dom ompT hsdS(τ_B m B ⁻ Λ (DE3)) fue utilizada para la producción de proteínas recombinantes tras la inducción con IPTG

b. *Agrobacterium tumefaciens*

La estirpe de *A. tumefaciens* empleada en el desarrollo de esta tesis ha sido la GV3101pMP90 (C58pM90), es utilizada para la transformación en planta conteniendo los factores de virulencia en el plásmido pMP90 (Koncz y Schell, 1986).

c. *Saccharomyces cerevisiae*

La cepa de levadura utilizada para las experiencias de complementación heteróloga es la EMY63 (Muller, 1991). Su genotipo es: Mata, *ade2-1*, *ade3-100*, *his3-11*, *leu2-3*, *lys2-801*, *trp1-Δ1*, *ura3-1*, *trx1::TRP1*, *trx2::LEU2*, y deriva de la cepa estándar EMY60 (Mata, *ade2-1*, *ade3-100*, *his3-11*, *leu2-3*, *lys2-801*, *trp1-1*, *ura3-1*). EMY63 posee los dos genes que codifican para sus dos Trxs citosólicas deletéreos, siendo esta característica la que la diferencia de la cepa de la que se ha originado EMY60.

III. Material nucleico

a. Vectores plasmídicos

Los plásmidos utilizados para clonar rutinariamente los fragmentos de ADN resultantes de la amplificación por PCR, se basan en el principio del “TA-cloning”, y son **pGEM-T** y **pGEM-T easy** (Promega). Contienen como marcador selectivo el gen que confiere resistencia a ampicilina, y permiten seleccionar bacterias transformadas por selección de color, debido a la desactivación insercional que sufre *LacZ* por parte del fragmento subclonado.

Para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se ha empleado el sistema de expresión T7, clonando los ORFs deseados en el vector **pET3d** (Novagen). Para la utilización de este sistema es necesario una cepa como la BL21(DE3), portadora en su genoma del ADN del bacteriófago lisogénico λDE3; contiene el gen de la T7-ARN-polimerasa bajo el control del promotor lacUV5, que es un derivado del promotor lac, inducible por IPTG. Este sistema de expresión basado en T7 presenta un rendimiento sorprendente, que puede llegar

en algunos casos a que el 50% de la proteína expresada por la bacteria sea la deseada.

Para la expresión de proteínas recombinantes en levadura se han empleado dos vectores diferentes. El vector **ycp2** (Cole *et al.*, 1990) es un vector centromérico con secuencias “ars” (autonomously replicating sequence). La expresión de genes subclonados se produce bajo el control del promotor *GAL4*, inducible por galactosa y reprimible por glucosa. También se utilizó el vector **pFL61** (Minet *et al.*, 1992), de alto número de copias por célula, con expresión constitutiva de la secuencia portada, bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa de levadura. Todo ello da lugar a una sobreexpresión de proteína heteróloga. Estos dos vectores se replican tanto en bacterias como en levadura, y contienen como marcador de selección en bacterias el gen que confiere resistencia a ampicilina, así como el gen *URA3* que permite seleccionar las levaduras transformadas en un medio carente de uracilo.

Para transformar *A. thalina* vía *A. tumefaciens* es necesario transformar previamente el microorganismo con un vector que cumpla ciertos requisitos. **pBI101** (Clontech) es un plásmido comercial de 12.2 kb, elegido para tal función. Contiene un origen de replicación (RK2) de bajo número de copias y porta el gen de resistencia a la kanamicina. Alberga la secuencia que codifica para el gen GUS (1.87kb), pero carece de secuencias reguladoras; está diseñado para clonar y ensayar con promotores de plantas, utilizando como rastreador la actividad β -glucuronidasa. Un fragmento de 260 pb contiene la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (NOS-ter) del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, de tal manera, que la expresión en plantas transformadas pueda ser detectada.

b. Oligonucleótidos

Las secuencias de oligonucleótidos empleados en este trabajo se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Cuadro de oligos empleados en este trabajo. D: directo, R: reverse

Nombre del oligo	Restricción D/R	Amplificación/utilidad	Secuencia
Oligos relacionados con las Trxs citosólicas			
PeahN	NcoI, D	<i>Trx h1</i> para pET3d	5'-agaccatggcaggttcatcagaagagg-3'
PeahC	BamHI,	<i>Trx h1</i> para pET3d e YCP2	5'-ttggatccctaagcattagatgaagccac-3'
Peah2N	NcoI, D	<i>Trx h2</i> para pET3d	5'-agaccatggcagcagaaaatgaggtg-3'
Peah2C	BamHI,	<i>Trx h2</i> para pET3d e YCP2	5'-ttggatccctcaagcagtagcaacagtt-3'
ThN	D	Heterólogo de <i>Trxs h</i>	5'- atggtcgcagaaggtgaagtgatc -3'
ThC	R	Heterólogo de <i>Trxs h</i>	5'-aattttctcttagcagctcc -3'
Th2N	D	Heterólogo de <i>Trxs h</i>	5'-gaggagggacaagtgatcgcttgccac-3'
Th2C	R	Heterólogo de <i>Trxs h</i>	5'-ctcctttctttgaccaacaactttatc-3'
Th3F	D	RACE 3' de <i>Trx h1</i>	5'-tgtgtttgtgaaagaaggaacg-3'
Th3R	R	PCR-Walking promotor <i>h1</i>	5'-gtgaaggatattcgttccatgc-3'
Th4RN	R	PCR-Walking promotor <i>h1</i>	5'-tttcttgattcattgcctct-3'
Th4F	D	RACE 3' de <i>Trx h2</i>	5'-ttctgtctctgaaagaaggcatg-3'
Psw1	R	PCR-Walking promotor <i>h2</i>	5'- ctccatgattcatcggaatgaac -3'
Psw2	R	PCR-Walking promotor <i>h2</i>	5'-gttcctttctggatctgtgttcttcc-3'
PolyT ₂₃ (A)	R	RACE 3' de <i>h1</i> y <i>h2</i>	5'-tttttttttttttttttttt (t/c/a/g)-3'
MluIhN	MluI, D	<i>Trx h1</i> para YCP2	5'-agacgcgatggcaggttcatcagaa-3'
MluIh2N	MluI, D	<i>Trx h2</i> para YCP2	5'-agacgcgatggcagcagaaaatgag-3'
NotIhN	NotI, D	<i>Trx h1</i> para pFL61	5'-ttgcgccgatggcaggttcatca-3'
NotIhC	NotI, R	<i>Trx h1</i> para pFL61	5'-ttgcgccgctaagcattagatgaa- 3'
NotIh2N	NotI, D	<i>Trx h2</i> para pFL61	5'-ttgcgccgatggcagcagaaaaat-3'
NotIh2C	NotI, R	<i>Trx h2</i> para pFL61	5'-ttgcgccgctcaagcagtagcaac-3'
PrTrxh1a	SaII	Promotor de <i>Trx h1</i> para	5'-gtgtcgacactcttaattctaatcaa-3'
PrTrxh1b	BamHI	Promotor de <i>Trx h1</i> para pBI11	5'-gtggatcccatctctctgaattttt-3'
PrTrxh2a	SaII	Promotor de <i>Trx h2</i> para	5'-gtgtcgacaacctattttacatttc-3'
PrTrxh2b	BamHI	Promotor de <i>Trx h2</i> para	5'-gtggatcccatttttgttcttctct-3'
H1up	D	3'-UTR de <i>h1</i>	5'-tcttcattgtgtggatattctt-3'
H1down	R	3'-UTR de <i>h1</i>	5'-tcatctccaccattatttaagacg-3'
H2up	D	3'-UTR de <i>h2</i>	5'-tcatatcaagatcatcaataacatagtgaaact-3'
H2down	R	3'-UTR de <i>h2</i>	5'-ttgaagtaggccaataatgtgcc-3'

Oligos relacionados con las Trxs cloroplásticas			
TfC	BamHI, R	<i>Trx f</i> para pET3d e YCP2	5'-aaggatccctaactagaccgaacagtg-3'
PeamC	BamHI, R	<i>Trx m</i> para pET3d e YCP2	5'-ttgatcctcaaatatactttccac-3'
MluIfN	MluI, D	<i>Trx f</i> para YCP2	5'-taacgcgtatggtaggaaagtaac-3'
MluImN	MluI, D	<i>Trx m</i> para YCP2	5'-ggacgcgtatggctgaaatgaagt-3'
NotIfN	NotI, D	<i>Trx f</i> para pFL61	5'-ttgcgccgatggtaggaaagtaac-3'
NotIfC	NotI, R	<i>Trx f</i> para pFL61	5'-ttgcgccgctaactagaccgaaca-3'
NotImN	NotI, D	<i>Trx m</i> para pFL61	5'-ttgcgccgatggctgaaatgaagt-3'
NotImC	NotI, R	<i>Trx m</i> para pFL61	5'-ttgcgccgctcaaatatacttttc-3'
Oligos relativos a vectores de clonaje, PCR-Walking y ribosómico 18S			
18Sup	D	3'-UTR de 18S	5'-agtaagcgcgagtcacagct-3'
18Sdow	R	3'-UTR de 18S	5'-cattcaatcggtaggagcgac-3'
AP1	D/R	PCR-Walking	5'-ggatcctaatacgcactactatagggc-3'
AP2	D/R	PCR-Walking	5'-ctataggctcgagcggc-3'
ycp2-5'	D	Secuenciación de ycp2	5'-cctctatactttaacgtcaagg-3'
ycp2-3'	R	Secuenciación de ycp2	5'-acgtgtacaccgggtcacgt-3'
pFL61D	R	Secuenciación de pFL61	5'-ctatttttagcgtaaaggatgg-3'
pFL61G	D	Secuenciación de pFL61	5'-ctctttttacagatcatcaagg-3'
Gus3	R	Secuenciación de pBI101	5'-acgcgcttcccaccaacgctg-3'
T7	D	Secuenciación de pGEM-T	5'-taatacgcactactataggg-3'
T7term	R	Secuenciación de pET-3d	5'-gctagtattgctcagcgg-3'
SP6	R	Secuenciación de pGEM-T	5'-gatttaggtgacactatag-3'

IV. Medios de cultivo

a. Cultivo vegetal

Medio de germinación MS: Murashige and Skoog médium (micro and macroelements including vitamins) (Duchefa) 2.6 g/L; MES (Sigma) 0.5 g/L; sacarosa (Sigma) 5 g/L; agar 6 (BD) g/L; ajustado a pH 5.7 con KOH. Opcionalmente puede contener kanamicina 50 mg/L (Duchefa).

Medio de nutritivo de Hewitt: Para preparar 5 l de medio nutritivo se mezcla 5 mL de solución A de micronutrientes y 250 mL de cada una de las

soluciones de macronutrientes, B, C y D. Por último se añadió H₂O hasta 5000 mL. Se ajustó el pH hasta un valor de 5.5 con KOH 1N. **Solución A** de micronutrientes: 1.4375 g de BO₃H₃, 0.1099 g de SO₄Zn·7H₂O, 0.9002 g de Cl₂Mn·4H₂O, 0.1 g de SO₄Cu·5H₂O, H₂O: csp 500 mL. **Solución B** de macronutrientes: 22.5220 g de (NO₃)₂Ca·4H₂O, 1.7620 g de NO₃K, 3.1932 g de (NO₃)₂Mg·6H₂O, 1.4112 g de EDTA Fe, H₂O csp 1000 mL. **Solución C** de macronutrientes: 5.7460 g de SO₄Mg·7H₂O, H₂O csp 1000 mL. **Solución D** de macronutrientes: 12.6880 g de PO₄H₂K, H₂O csp 1000 mL.

b. Cultivos bacterianos

Medio LB (Luria-Bertani) o LBA: extracto de levadura (Difco) 5 g/L; triptona (BD) 10 g/L; NaCl 10 g/L. Si el medio es de consistencia sólida se añade agar (BD) 15 g/L. Puede contener X-Gal (Apollo) 20 µg/mL, disuelto previamente en N,N-dimetil formamida) e IPTG (Roche) 100 µM.

Medio MYA: extracto de levadura (Difco) 5 g/L; caseína 0.5 g/L (Duchefa); manitol (Sigma) 8 g/L; (NH₄)₂SO₄ 2 g/L; NaCl 5 g/L; ajustar a pH 6.6 con NaOH. Si el medio es de consistencia sólida se añade agar (BD) 16 g/L.

Antibióticos: ampicilina 100 (Roche) mg/L; Kanamicina (Duchefa) 50 mg/L; gentamicina (Duchefa) 10 mg/mL; rifampicina (Duchefa) 50 mg/L (solución stock en metanol).

c. Cultivo de levadura

Medio completo YPGA: Extracto de levadura (Difco) 5 g/L; bactopectona (Difco) 5 g/L; glucosa 20 g/L; adenina (Sigma) 0.1 mM.

Medio YNB: extracto de levadura nitrogenado sin aminoácidos (Difco) 7 g/L; glucosa o galactosa 20 g/L.

Medio mínimo B: Este medio está desprovisto de toda fuente de azufre orgánica (Cherest y Surdinkerjan, 1992).

Los medios sólidos de levadura son obtenidos añadiendo 20 g/L de bactoagar (Difco). Según la cepa utilizada y la experiencia a realizar, los medios se complementaban con: adenina (Sigma) 0.3 mM; lisina (Merk) 7 mM; histidina (Sigma) 1.3 mM; sulfóxido de metionina (Sigma) 0.1 mM; metionina (Sigma) 1 mM y uracilo (Merck) 0.18 Mm.

V. Manipulación de *P. sativum*

a. Condiciones de cultivo

La germinación se llevó a cabo disponiendo semillas de *P. sativum* sobre vermiculita adecuadamente húmedecida, en bandejas de plástico. La germinación y crecimiento de la plántula se realizó en cámara climática Fison (modelo 600G3/TL) a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) de irradiación, en fotoperiodo de 16 h y 25/20°C de temperatura día/noche. Se aplicó un riego periódico, y las plántulas se recogen según el tratamiento a realizar. Las plantas se crecieron en estas condiciones un máximo de 3 semanas.

Cuando se pretendían crecer plantas hasta estado de madurez, se llevaba a cabo el crecimiento en tierra. Para ello, plántulas de 10 d de germinación en vermiculita, fueron trasplantadas a macetas y crecidas en las mismas condiciones descritas anteriormente. Cada dos-tres días se regaban, y cada semana se añadía medio líquido nutritivo de Hewitt.

b. Tratamiento de estrés

Para inducir estrés oxidativo en guisantes se introdujo la raíz de plántulas de 15 días en soluciones acuosas conteniendo diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y terc butil hidroperóxido (0, 5, 10, 15, 20 y 25 mM). Se mantuvieron en oscuridad durante 15 h, y a continuación se diseccionaron en órganos, que se pesaron y guardaron a -80°C hasta el momento de su procesamiento. Se realizaron 5 repeticiones de cada experimento, utilizándose todos para las experiencias de cuantificación proteínica por western blot. Para medir los niveles de expresión génica por PCR a tiempo real se utilizaron muestras de tres repeticiones.

VI. Manipulación de *Arabidopsis thaliana*

a. Condiciones de cultivo

Tierra: Las plántulas, dispuestas en macetas, se hicieron crecer en una cámara climatizada A 20-22°C, con intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR), en fotoperiodo de 16 h. El riego es regular cada 2 días.

Cultivos *in vitro*: Las semillas Se dispusieron en placa Petri, con unas condiciones en irradiación de 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (PAR) y un fotoperiodo de 16 horas, a 20-22°C.

b. Manipulación de semillas

Recolección: Las semillas son recolectadas de plantas crecidas en cultivo de tierra durante aproximadamente 6 semanas. La recolección se lleva a cabo

cuando las silicuas están secas. Para ello el tallo de la planta se tumba sobre un pliego de papel de filtro, y con las manos se presionan levemente las ramas para que las semillas se vayan desprendiendo. Al final todo el material recogido se pasa por un papel tamiz que permite el paso de semillas, quedando libres de las envueltas de silicuas y otros materiales no deseados. Posteriormente estas semillas son esparcidas sobre otro papel de filtro, y con ayuda de un pincel se eliminan el resto de contaminantes que puedan quedar.

Esterilización: Para el cultivo *in vitro* las semillas deben ser esterilizadas bajo campana de flujo laminar. Aproximadamente 1000 semillas (20 mg) son lavadas en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 1 mL de una solución de etanol 70% durante 1 min; tras decantar las semillas, el etanol es eliminado y se añade 1 mL de una solución de desinfección (lejía comercial 70% y Tween-20 2.5%) que, tras 5 min con agitación frecuente, es eliminada por aspiración con pipeta. A continuación se lavaron 3-5 veces con 1 mL de ddH₂O estéril.

Sembrado: Para la germinación en tierra las semillas son esparcidas en la superficie de macetas (11 cm diámetro) con una mezcla de tierra hortícola/vermiculita (3:1) debidamente esterilizada y humedecida. Son vernalizadas en oscuridad a 4°C durante 48 horas. En el caso de cultivos in vitro las semillas eran resuspendidas en agua estéril y se depositaban, una a una, con ayuda de una pipeta pasteur en placas petri que contenían medio de germinación MS, con o sin antibiótico.

c. Transformación de plantas por *A.tumefaciens*

Se sembraron aproximadamente 100 semillas WT en macetas de tierra de, aproximadamente, 11 cm de diámetro, como se describe anteriormente. Conforme se van desarrollando se deben quitar algunas plantas para que no crezcan tan densamente. Aproximadamente al mes de la siembra, cuando el tallo

floral alcanza, aproximadamente, 10 cm las plantas están listas para la transformación por infiltración, eliminándose todas las flores abiertas, semiabiertas y las silicuas.

Tres días antes de la infiltración se inocula *A. tumefaciens* en un tubo estéril con 10 mL de medio LB, o MYA, adicionado con kanamicina, gentamicina y rifampicina, y se deja crecer a 28°C en agitación (200 rpm) durante 24 h. Tras este periodo se pasa ese preinóculo a un volumen de 600 mL del mismo medio, dejando crecer, en este caso, 48 h en igualdad de condiciones.

Antes de la infiltración, se sedimentan las células a 3000 xg durante 15 min, resuspendiéndolas en 200 mL de solución de infiltración [Murashige and Skoog médium (Duchefa) 2.2 g/L; MES (Sigma) 0.1 g/L; sacarosa (Sigma) 5 %, se ajusta el pH a 5.9 con NaOH], a la que previamente se añaden 10 µl de BAP (preparado 1 mg/mL en NaOH 1N). Una vez que las células son resuspendidas se añaden 200 µl de Silwet L-77 (Lehle Seeds), detergente que favorecerá la apertura de los estomas en el proceso de infiltración.

El medio de infiltración se vierte en un recipiente de diámetro de boca ligeramente mayor al diámetro superior de la maceta, con el fin de que la parte aérea de la planta entre en contacto con la solución por un simple volcado de aquélla. Para evitar que la tierra caiga en la solución, antes del volcado cubrimos la tierra con cinta adhesiva. La inmersión de la parte aérea se realiza durante 5 min girando la maceta cada cierto tiempo para que toda la parte aérea entre en contacto con la solución de infiltración.

Se retira la maceta y se elimina el exceso de solución de infiltración apoyando la planta sobre un poco de papel de filtro. Se retiran las cintas que impedían la pérdida de tierra y se cubre la maceta con una bolsa de plástico. Posteriormente se coloca la maceta en la cámara de crecimiento, y al día siguiente, se realizan agujeros en las esquinas de la bolsa para evitar que no se

condense agua. Pasadas 24 h se retira la bolsa y se espera hasta la recolección de semillas.

d. Selección de transformantes

Las semillas procedentes de plantas transformadas son esterilizadas según el método descrito anteriormente, y alrededor de 1000 semillas son esparcidas en placas Petri de 14 cm sobre medio de germinación MS conteniendo el antibiótico de selección (kanamicina). Las plántulas resistentes son trasplantadas a tierra tras 2-3 semanas de crecimiento originando, cada una de ellas una línea transformante, y en conjunto la primera generación de transformantes.

e. Test de segregación y búsqueda de líneas homocigotas

Las diferentes líneas pasadas a tierras se sometieron a autofecundación para producir la segunda generación de transformantes. Para confirmar la existencia de un único lugar de inserción, la segunda generación de semillas de cada línea se sometió a crecimiento en medio MS + kanamicina, para descubrir la proporción de transformantes. Esta no debía superar el 75%, ya que si así ocurría significaba que había más de un *locus* de inserción. De las plantas transformantes de la 2ª generación se pasaron 20 plántulas resistentes a tierra y fueron sometidas a autofecundación para dar lugar a la 3ª generación. La proporción de semillas resistentes en la 3ª generación nos permitirá conocer la condición homocigota/heterocigota de la planta originaria (2ª generación). Una vez conocida esta proporción, se seleccionaron tres plantas homocigotas de cada línea, experimentándose con ellas.

Para realizar los cálculos de proporción, 100 semillas procedentes de cada planta seleccionada eran sembradas sobre medio de germinación MS con kanamicina, y separadas unas de otras con la ayuda de una pipeta Pasteur estéril.

f. Autocruzamiento

Los autocruzamientos se fuerzan utilizando el sistema de los aracones. Éstos se colocan antes de la floración, aislando a la planta del exterior.

VII. Manipulación *Saccharomyces cerevisiae*

a. Condiciones de cultivo de levaduras

La cepa EMY63 se obtiene de glicerol almacenado a -80°C , y son crecidas en cultivos de medio completo (YPGA). Las cepas transformadas son crecidas en cultivo con medio mínimo YNB glucosa, sin uracilo, y suplementados con los factores de auxotrofia necesarios (adenina, lisina, histidina y metionina). El crecimiento se realiza a 28°C y, para los cultivos líquidos, en agitación de 200 rpm.

b. Preparación de levadura competente

A partir de 100 μl de un cultivo saturado de EMY63 se inoculan 10 mL de medio YPGA, dejándose crecer hasta obtener una DO_{600} de 1. Las células son entonces centrifugadas 5 min a 3000 xg y resuspendidas en 1 mL de agua destilada estéril para lavar el medio YPGA. Tras una nueva centrifugación las células son resuspendidas en 1 mL de solución A (acetato de litio 0.1 M, TE 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). Finalmente, tras una nueva centrifugación, las células son resuspendidas en 100 μl de esta misma solución.

c. Transformación de levaduras

Para la transformación, a 50 μ l de levaduras competentes se le añaden 50 μ g de ADN carrier (esperma de salmón, desnaturalizado durante 20 min a 100°C), 1-2 μ g de la construcción de interés y 300 μ l de solución B (solución A con 50% PEG 4000). La mezcla es incubada en agitación durante 30 min a 28°C y, posteriormente, se somete a choque térmico de 15 min a 42°C. Las células son centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de YNB con el fin de lavar. Por último, tras una nueva centrifugación la levadura es resuspendida en 250 μ l de YNB y sembradas sobre medio mínimo sólido selectivo (sin uracilo). Las colonias transformadas aparecen a partir de las 48 h de crecimiento a 28°C.

d. Metodología de trabajo en la complementación heteróloga

Las experiencias de complementación heteróloga se llevaron a cabo con cuatro Trxs de guisante (*h1*, *h2*, *f* y *m1*), realizando construcciones con los dos vectores descritos: *yep2* y *pFL61*. Se emplearon 4 construcciones control para cada vector. El vector vacío, como control negativo, el vector conteniendo la secuencia de la *TRX1* de levadura (*ScTRX1*) que restituye el fenotipo de *EMY60*, como control positivo, y vectores conteniendo las *Trxs* de *A.thaliana*, *AtTRXh2* y *AtTRXh3*, cuyo patrón de complementación están bien descritos (Mouaheb *et al.*, 1998). Los clones correspondientes a las *Trxs* de *A. thaliana*, fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Meyer.

Se realizó la transformación de EMY63 con las siguientes construcciones (un total de 16):

- a) Construcciones con *Trxs* de guisante: *ycp2PsTRXh1*, *ycp2PsTRXh2*, *ycp2PsTRXf*, *ycp2PsTRXm1*, *pFL61PsTRXh1*, *pFL61PsTRXh2*, *pFL61PsTRXf*, *pFL61PsTRXm1*.
- b) Construcciones controles: *ycp2*, *ycp2AtTRXh2*, *ycpAtTRXh3*, *ycp2ScTRX1*, *pFL61*, *pFL61AtTRXh2*, *pFL61AtTRXh3*, *pFL61ScTRX1*.

De las transformaciones con cada una de las construcciones, se crecieron dos colonias en 10 mL de medio cada una, de YNBglu adicionado con adenina, lisina, metionina e histidina (necesarios por el genotipo de EMY63) y se dejaban toda la noche creciendo. Al día siguiente teníamos 32 clones diferentes (16 + 16). Con todos ellos se realizaron diluciones con medio YNB, hasta obtener valores de DO₆₀₀ de 0.05. A partir de esta se realizaban diluciones seriadas para obtener, al final tres concentraciones diferentes (0.05, 0.005 y 0.0005) de cada uno de los clones.

Para realizar estas experiencias se utilizaban placas cuadradas estériles (12 x 12 cm) conteniendo el medio sólido de experimentación correspondiente. Sobre éste se depositaban gotas de 7 µl, de cada una de las tres diluciones, de forma ordenada según un patrón indicado en la figura 1. Cada placa se subdividía en dos columnas donde se experimentaba en paralelo con los dos clones de la misma transformación. El orden que se indica en el cuadro es el que se utilizó en todas las experiencias. Todas las placas se repitieron por duplicado. El crecimiento de los diferentes clones se siguió desde el 2º día, hasta el 5º.

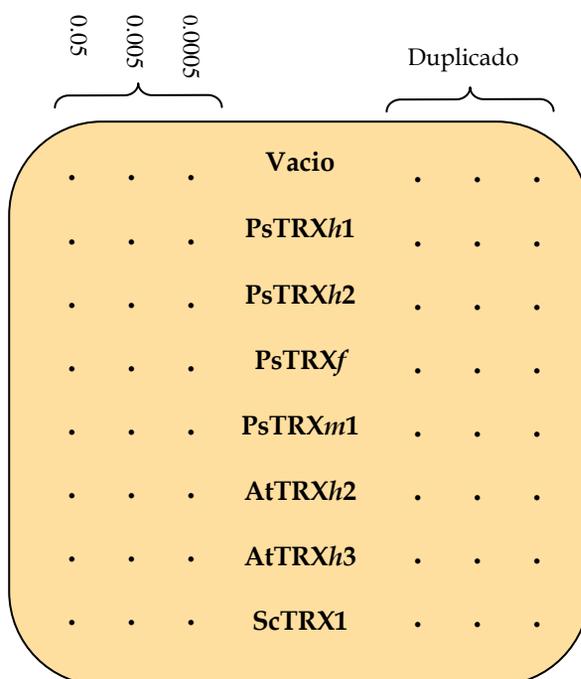


Figura 1. Placa de ensayo de las experiencias de complementación heteróloga. Un papel se pegaba a la parte de atrás de la placa para actuar como guía. Las gotas de los diferentes clones se depositaban en los puntos indicados por el patrón, éstas se dejaban secar y las placas se depositaban en estufas a 28°C durante 2-5 días.

En estas experiencias de complementación heteróloga también se emplearon otras metodologías diferentes. Se realizaron experiencias de halo de inhibición con H_2O_2 . En una placa petri redonda (8.5 cm de diámetro) se sembraron 150 μ l de medio YNB con levadura (0.1 a 600nm), y cuando el cultivo se absorbía, se depositaba sobre el centro de la placa un disco de papel grueso estéril, impregnado con 80 μ l de una disolución de 100 mM del agente oxidante.

En ocasiones, para presentar el resultado final en una placa petri (8.5 cm) se depositaron gotas de 50 μ l de cultivo (0.05 de DO) de cada uno de los clones. De esta forma se puede apreciar de forma simple y resumida los resultados finales.

VIII. Manipulación de *E. coli*

a. Condiciones cultivo de *E. coli*

Las distintas cepas de *E. coli* sin transformar son crecidas en medio LBA. Las células transformadas son crecidas en este mismo medio, pero suplementado con los antibióticos necesarios para la selección, en función del vector que porten. En todos los casos el crecimiento es a 37°C, y los medios líquidos en agitación a 200 rpm. En la expresión de algunas proteínas recombinantes se dejan crecer a 28°C para evitar las formación de cuerpos de inclusión.

b. Preparación de células competentes

La exposición de *E. coli* a CaCl₂ u otros iones divalentes a temperaturas próximas a 0°C favorece la penetración del ADN extraño en la célula. El tratamiento con CaCl₂ en frío origina un estado especial de la célula denominado "competencia". Para preparar células competentes se tomaron 3 mL de un cultivo en fase estacionaria de la cepa correspondiente de *E. coli* y se diluyen en 500 mL de medio LB, llevándose a incubar a 37°C y agitación hasta alcanzar la fase exponencial temprana de crecimiento (DO_{600nm} = 0.4 - 0.6). A partir de este momento se trabaja en frío, ya que la supervivencia de las células competentes está limitada por la temperatura. Se recogieron las células por centrifugación a 3000 xg durante 10 min, y se resuspenden en 30 mL de una solución de CaCl₂ 100 mM. Se incuba durante 40 min en hielo, y se vuelven a recoger por centrifugación 10 min a 2100 xg. De nuevo se resuspenden en 6 mL del tampón anterior.

Si las células se van a almacenar a -80°C, éstas son resuspendidas en CaCl₂ 100 mM, 15% glicerol, y se fraccionan en alícuotas de 200 µl. Pueden mantenerse durante meses e, incluso, años.

c. Transformación de células competentes

Se añadieron de 0.1 a 1 µg de ADN plasmídico a una alícuota de 200 µl de células competentes y se dejan incubar en hielo durante 1 h. Posteriormente se las somete a choque térmico (1.5 min a 42°C) para facilitar la penetración del ADN, dejándose nuevamente en hielo durante 2-3 min. A continuación se añadieron 800 µl de LB y se incuba 45 min a 37°C. Finalmente se siembra un volumen adecuado de la transformación, o bien, se centrifuga el cultivo y se resuspenden las células en 100 µl de LB, en placas selectivas de LBA-ampicilina (o el antibiótico necesario). Las placas se dejaron crecer a 37°C.

IX. Manipulación de *A. tumefaciens*

a. Condiciones de cultivo de *A. tumefaciens*

Las células de *A. tumefaciens* sin transformar fueron crecidas en medio MYA, o bien medio LB con rifampicina y gentamicina. Las células transformadas son desarrolladas en esos mismos medios pero suplementados con kanamicina. El crecimiento es a 28°C, y los medios líquidos en agitación a 200 rpm.

b. Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*

Se inocularon 200 mL de medio LB con gentamicina y rifampicina con 4 mL de un cultivo crecido durante 24 h, dejándose crecer a 28°C. Se recogen las células por centrifugación a 3000 xg y se resuspenden en 100 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8. Posteriormente se centrifuga de nuevo y se elimina completamente el Tris, resuspendiéndose en 2 mL de medio LB o MYA. Estas células están listas

para transformar o bien se pueden guardar a -80°C en alícuotas de 0.2 mL tras resuspender en 15% de glicerol.

c. Transformación de *A. tumefaciens*

Para la transformación se utilizaron alícuotas de 0.2 mL de células, a las que se añaden 1-10 μg de ADN plasmídico diluido en un volumen de 50 μl . Esta mezcla se congela durante 5 min en nieve carbónica/etanol 96^o y seguidamente se descongelan en un baño a 37°C durante 25 min, tras lo cual se añaden 1-2 mL de medio LB o MYA, dejando crecer 1 hora a 28°C con agitación. Por último, se siembra en placa sólida adicionada de kanamicina, rifampicina y gentamicina, y se deja crecer a 28°C entre 24-48 h.

X. Manipulación de ADN

a. Metodos de extracción de ADN genómico (ADNg)

El aislamiento de ADNg para el desarrollo de este trabajo se realizó con el Kit comercial “Plant DNAzol Reagent” (Invitrogen). Es un reactivo específicamente formulado para el aislamiento del ADNg de plantas, y está basado en el uso de una nueva solución detergente de lisis conteniendo guanidina, que hidroliza el ARN y permite la precipitación selectiva del ADNg con etanol. El ADNg precipitado es lavado con etanol y solubilizado. El procedimiento puede ser completado en 60 min y la calidad del ADNg aislado permite ser empleado en todas las aplicaciones biotecnológicas empleadas en nuestro laboratorio (para más detalles consultar protocolo de fabricante).

b. Métodos de extracción de ADN plasmídico

i) Extracción de ADN plasmídico bacteriano de *E. coli* y *A. tumefaciens*

En nuestro trabajo se han empleado dos tipos de minipreparaciones diferentes, una clásica y otra basada en el empleo de kits comerciales. En ambos casos la obtención de ADN plasmídico se realiza a partir de cultivos bacterianos en fase estacionaria de 3-5 mL (normalmente crecidos durante toda la noche en medio con ampicilina). El resultado de la extracción fue utilizado para PCR, digestión, secuenciaciones y otras técnicas moleculares.

El protocolo clásico es la lisis alcalina, aunque gradualmente este método ha sido sustituido por la utilización de kits comerciales debido a que dan lugar a ADNs de gran calidad con protocolos más rápidos y sencillos. Por otro lado, el abaratamiento progresivo de los precios de estos kits está permitiendo que se implanten cada vez más en los laboratorios de biología molecular.

Para la realización de este trabajo se han utilizado en nuestro laboratorio los siguientes kits comerciales: “Wizard Miniprep” (Promega), “GFX Micro Plasmid prep kit” (Amersham Biosciences) y “Perfectprep plasmid mini” (Eppendorf). Todos ellos fueron utilizados siguiendo los protocolos del fabricante y daban lugar a ADNs de alta calidad.

En las minipreparaciones rutinarias se empleó el método clásico de la lisis alcalina:

- ✓ Para un cultivo de 3 mL se centrifugan las células durante 30 seg en una centrífuga de mesa a máxima velocidad.
- ✓ Se resuspende el pellet celular en 100 µl de GTE (Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM), suplementado con 10 µl de lisozima (Roche. Preparada 50 mg/mL) y se deja 5 min a temperatura ambiente para que actúe la lisozima

- ✓ Se añaden 200 µl de solución de NaOH 0.2 N y SDS (5%), dejando 5 min en hielo.
- ✓ Neutralizamos con 150 µl de disolución de acetato potásico 5 M, y se añade 1 µl de RNAsa (Roche, 10 mg/mL). Agitar al vórtex y dejar 5 min en hielo para eliminar el ARN.
- ✓ Se centrifuga 3 min transfiriéndose la solución clarificada a un nuevo tubo.
- ✓ Tratamos con un volumen de fenol para eliminar proteínas, se agita al vórtex y separamos mediante 5 min de centrifugación.
- ✓ Se transfiere a un nuevo tubo la fase acuosa (superior) conteniendo el ADN, y añadimos un volumen de cloroformo-isoamílico (24:1), centrifugando de nuevo.
- ✓ Tomamos la fase acuosa y le añadimos un volumen de isopropanol y 1/10 (v:v) de acetato sódico 3 M, dejando 30 min a -80°C para que el ADN precipite.
- ✓ Se centrifuga a máxima velocidad durante 15 min a 4°C, decantando después.
- ✓ Lavamos el pellet con 1 mL de etanol al 70% para eliminar las sales, se agita al vórtex y centrifugamos de nuevo 5 min.
- ✓ Desechar el sobrenadante y secar al aire. Por último, resuspendemos en 20-40 µl de agua.

ii) Extracción de ADN plásmidico de levadura

Este protocolo se utilizó para la detección por PCR, en levadura transformada, de las construcciones con sus insertos correspondientes. Métodos de PCR sobre la colonia de levadura han sido ensayados, pero los resultados no fueron completamente satisfactorios.

- ✓ Un cultivo en medio mínimo de 2 mL de levadura en fase estacionaria se centrifugó a temperatura ambiente durante 2 min.
- ✓ Las células son resuspendidas en 500 µl de tampón S (fosfato potásico 10 mM pH 7.5, EDTA 10 mM, zymoliasa 50 µg/mL y 2-ME 50 mM), se agita por vortex. La suspensión es incubada 30 min a 37°C, con inversiones del tubo cada 10 min
- ✓ Se añaden 100 µl de tampón L (Tris-HCl 250 mM pH 7.5, EDTA 25 mM y SDS 2.5%), se agita por vortex, incubando 30 min a 65°C (la solución debe aparecer translúcida).
- ✓ Añadimos 150 µl de solución 3 (ácido acético 2 M y acetato potásico 3M, pH 4.4-4.5), agitar por vortex, y se incuba 10 min en mezcla de hielo/agua
- ✓ Centrifugar 10 min a 10.000 xg a 4°C.
- ✓ Agregar al sobrenadante 800 µl de etanol 100% mantenido a -20°C; mezclar bien y centrifugar igual que antes.
- ✓ Se decanta el sobrenadante y se lava el ADN con 500 µl de etanol 70% conservado a -20°C.
- ✓ Centrifugamos 7 min a 10.000 xg a 4°C
- ✓ Decantar sobrenadante y resuspender el ADN en 25 µl de agua destilada estéril

c. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa (Mcdonell *et al.*, 1977) se utiliza para analizar, identificar y purificar fragmentos de ADN. El fundamento de la técnica es el hecho de que a pH básico o próximo a la neutralidad, la relación carga/masa de una molécula de ADN es constante e independiente de su longitud, por lo que al ser sometidos a un campo eléctrico, los distintos fragmentos de ADN migrarán de forma inversamente proporcional a su tamaño,

pudiendo separarse así los componentes de una mezcla de distintos fragmentos y calcularse el tamaño de éstos por referencia a unos fragmentos de pesos moleculares conocidos (marcadores de peso molecular). Además, en el caso de fragmentos circulares, como los plásmidos, la migración depende también del grado de enrollamiento, migrando más los fragmentos que tengan un menor enrollamiento.

Para preparar un gel de agarosa se disuelve en un horno microondas la cantidad deseada de agarosa en buffer TBE o TAE, tras lo cuál se vierte la cantidad deseada en un molde y se introduce un peine que permita la formación de los pocillos donde se va a cargar el ADN, dejando que solidifique. Si el gel es analítico se prefiere el uso de TBE, por ser los resultados más reproducibles. Si el gel es preparativo y se pretende usar el ADN posteriormente para llevar a cabo reacciones enzimáticas sobre el mismo, se recomienda el uso de TAE o, mejor aún, TAE (bajo en EDTA), ya que el ácido bórico y el EDTA pueden inhibir a algunas enzimas de restricción y a la ADN-polimerasa.

La concentración de agarosa utilizada en el gel depende del tamaño de los fragmentos que se deseen separar. En este trabajo se han utilizado fundamentalmente tres concentraciones: 0.8% para separar o visualizar plásmidos completos (de 1 a 15 kb) y ADNg, 1.5% para fragmentos intermedios (de 100 pb a 2 kb), y 3% para los fragmentos más pequeños (menores de 300 pb). En este último caso la agarosa utilizada era un 2% de agarosa normal y un 1% de agarosa de bajo punto de fusión (LMP "Nusieve", FCF Corp), para facilitar la fusión del gel. Si el gel es preparativo y se va a realizar la extracción de las bandas de ADN mediante fenol, se puede utilizar agarosa de bajo punto de fusión exclusivamente, lo que facilita la purificación posterior del ADN.

Para llevar a cabo la electroforesis, se dispone el gel ya solidificado en una cubeta de electroforesis horizontal (3 modelos: "i-Mupid" y "Mupid-21" de Eurogentec, y "Mini-Sub Cell GT" de Bio-Rad), tras lo cual se carga en cada

pocillo una mezcla de la muestra a analizar con tampón de carga (se prepara 10 x: glicerol 30%, azul de bromofenol 0.3%), y se corre la electroforesis a un voltaje de 50-100 V hasta que el frente haya avanzado lo que se considere oportuno (generalmente no más de media hora). Para visualizar el ADN, el gel se tiñe por inmersión en una solución de bromuro de etidio (1 mg/L) durante 10-15 min y, tras lavar con agua, se expone a luz ultravioleta de 254 nm en un transiluminador ("Gel Doc 2000" de Bio-Rad). Las imágenes son tratadas bajo el software "quantity one" de la misma casa comercial.

Como marcadores de peso molecular se emplearon los denominados "Molécula Weight Markers X" (Boehringer-Roche), que incluyen fragmentos de 0.13 hasta 12.2 kb, espaciadas aproximadamente 1 kb.

d. Extracción de ADN de geles de agarosa

Para purificar fragmentos de ADN a partir de un gel de agarosa, se han empleado dos métodos diferentes. Ocasionalmente se ha utilizado el método de extracción con fenol, pero en la mayoría de los casos se utilizaron los kits comerciales "QIAEx II" (Qiagen) y "GFX PCR" (Amersham Biosciences), utilizando el protocolo descrito por el fabricante. El kit de Amershan nos permite la purificación de la banda directamente del tubo de PCR.

La extracción de un gel de agarosa con fenol se basa en el hecho de que éste impide la formación del gel, ya que los monómeros que forman la agarosa son solubles en fenol. Si se enfría mediante inmersión súbita en nitrógeno líquido, el gel de agarosa se descompone y los fragmentos de agarosa se disuelven en la fase orgánica, quedando una fase acuosa que contiene el ADN. Antes del choque térmico con nitrógeno líquido, es necesario trocear el gel de agarosa en fragmentos del menor tamaño posible para que la extracción sea eficaz. En el caso de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) no es necesario

trocear, ya que basta con calentar la mezcla, de fenol y gel a 60°C, durante 5 min, para que se produzca la fusión de éste.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- ✓ Se corta la banda deseada del gel de ADN con una cuchilla y se la dispone en un tubo de 1.5 mL (se realiza esta operación en el transiluminador tras la inmersión en bromuro de etidio, lo que permite visualizar la banda).
- ✓ Disponer el trozo de agarosa sobre un cristal limpio, cortándose con una cuchilla en fragmentos pequeños. Si se trata de agarosa LMP este paso no es necesario.
- ✓ Trasvasar los trocitos de agarosa a un tubo de 1.5 mL y añadir 500 µl de fenol neutro. Si se trata de "LMP-Nusieve" se calienta a 60 °C hasta que se produzca la fusión del gel (5 min). Se mezcla enérgicamente al vórtex, obteniéndose una emulsión lechosa.
- ✓ Se sumerge el tubo en nitrógeno líquido durante 2 min hasta que se congele. Se saca y se centrifuga 10 min en centrífuga de mesa, a 12.000 rpm. Aparecen dos fases, estando el ADN en la fase acuosa, superior.
- ✓ Transferir la fase acuosa a un tubo limpio, y se añade 1 volumen de fenol:cloroformo (1:1).
- ✓ Mezclar enérgicamente al vórtex, se centrifuga 5 min y se toma de nuevo la fase acuosa, a la que se añade un volumen de isopropanol (mantenido a -20 °C) y 1/10 volumen de acetato sódico 3 M. Se agita al vórtex y se lleva a -80 °C una media hora para que precipite el ADN.
- ✓ Centrifugamos a 4°C, 15 min a 10.000 rpm, y se retira el sobrenadante lavándose el ADN con etanol 70%.
- ✓ Se centrifuga a 4°C, 5 min a 10.000 rpm, y se decanta dejando secar al aire (unos 15 min.).
- ✓ Resuspender el ADN en 8-20 µl de agua estéril.

e. Cuantificación de ADN

La estimación de la concentración del ADN, de forma aproximada, a partir de un gel de agarosa, se puede realizar por comparación directa con las bandas de los marcadores de peso molecular, sabiendo que el mínimo que se puede visualizar mediante tinción con bromuro de etidio es de 5 ng de ADN.

Cuando se precisa una medida más exacta, se puede emplear el método espectrofotométrico que, además, permite evaluar la pureza de la muestra. Consiste en determinar la absorbancia de la solución de ADN a 340 nm, 260 nm, 270 nm y 280 nm, frente a un blanco de TE o agua ultrapura. La concentración de la muestra se calcula respecto al valor estándar de $DO_{260} = 1$ para soluciones de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN de cadena doble. La relación DO_{260}/DO_{280} indica si existe contaminación con ARN, proteínas o fenol. Cuando esta relación es mayor de 1.85 existe contaminación con ARN, y si es menor de 1.65 la contaminación es con proteínas o fenol. La presencia de fenol en la muestra se confirma cuando la relación DO_{270}/DO_{260} es mayor de 1. Cuando la relación DO_{340}/DO_{280} es mayor de 0.5 el ADN está contaminado con proteínas.

f. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR (Saiki *et al.*, 1988) es uno de los métodos más versátiles y útiles que puede utilizar el biólogo molecular, consistiendo en la replicación *in vitro* de fragmentos específicos de ADN. A partir de una sola copia de un fragmento de ADN se pueden obtener del orden de 100.000 millones de fragmentos idénticos en 1-2 h. La técnica está basada en el proceso celular *in vivo* de replicación del ADN, sólo que todos los reactivos y componentes celulares necesarios han sido “transportados” a un tubo.

La temperatura de alineamiento que se ha utilizado fue específica de los oligos empleados, y se calculó empíricamente en función de la temperatura de desnaturalización o T_m ($T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$), que viene determinada por la longitud y composición de los oligos. T_m puede calcularse de modo orientativo mediante la fórmula: $T_m(^{\circ}\text{C}) = 2(A+T) + 4(C+G)$, aunque en ocasiones fue necesaria una confirmación experimental.

Los termocicladores disponibles en nuestro laboratorio son los siguientes: "Perkin-Elmer Geneamp 2400" y "UniCycler" (Linux).

i) Polimerasas termoestables utilizadas para PCR

La enzima más popular de todas las empleadas en la PCR es una polimerasa procedente de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*, conocida como Taq polimerasa, que es capaz de soportar, sin desnaturalizarse ni disminuir significativamente su actividad, sucesivas incubaciones a 94°C . Si embargo, esta enzima está viéndose sustituida por otras polimerasas termoestables, procedentes de otros organismos, cuya fiabilidad de copia es mayor, ya que poseen actividad correctora (exonucleasa 3'-5' o "proofreading"), a pesar de que en estos casos el rendimiento de la replicación es menor comparada con la Taq polimerasa, que carece de esta actividad. Por otro lado, generalmente la presencia de actividad correctora va asociada a la carencia de actividad "3' desoxiadenosin transferasa terminal", que poseen las polimerasas tipo Taq, añadiendo una molécula de dATP a la hebra recién sintetizada en su extremo 3', dando lugar a una molécula de ADN con extremos cohesivos. Esta facultad es aprovechada para la ligación rutinaria de productos de PCR por "TA-cloning", en el vector pGEM-T (Promega). Por ello, actualmente se comercializan mezclas de ambos tipos de enzima con muy buen resultado.

En la realización de este trabajo hemos utilizado diferentes enzimas en función del propósito de la amplificación:

- ✓ La “Taq DNA polymerase” (Promega), fue utilizada en amplificaciones rutinarias con fines analíticos, en los cuales el producto reamplificado no iba a ser utilizado.
- ✓ “Expand Long Template PCR system “ (Roche) es una mezcla de Taq y Pwo DNA polimerasas, que permiten amplificar fragmentos muy largos de hasta 20 Kb. La fiabilidad de la amplificación es mayor que la aportada por la Taq y, por otro lado, la adición de dATP a los extremos 3’ hace que esta mezcla sea ideal para ligar en vectores por “TA-cloning”. Fue empleada para reamplificar productos que iban ser ligados en pGEM-T y, posteriormente, secuenciados. Se emplea en “PCR Walking” por su capacidad de amplificar grandes fragmentos
- ✓ “Tth DNA polymerase” (Promega) es una enzima de características muy parecida a la Taq, siendo utilizada en la amplificación de fragmentos utilizando colonias de *E. coli* como molde, ya que la Taq polimerasa obliga a un paso previo de calentamiento de células y centrifugación posterior de las mismas.
- ✓ “HotStarTaq DNA polymerase” (Quiagen), se describe en el capítulo PCR Real Time

ii) PCR Walking

El método de “PCR walking” (Devic *et al.*, 1997) permite amplificar un fragmento de ADN genómico, específico de una secuencia de la cual no se conoce uno de los extremos. En este trabajo, se ha utilizado estudiar los extremos 5’ de los ADNc, así como las secuencias reguladoras.

Para el empleo de esta variante de PCR se utilizan bancos de ADN molde, obtenidos tras la digestión de ADN_g con una enzima de restricción. Posteriormente, a cada uno de los fragmentos de restricción se les liga, en ambos extremos, adaptadores oligonucleótidos de secuencia conocida (fig. 2). En nuestro trabajo hemos utilizado 7 bancos diferentes, cada uno procedente del empleo de una enzima de restricción distinta (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *ScaII*, *SspI*, *StuI* y *HpaI*).

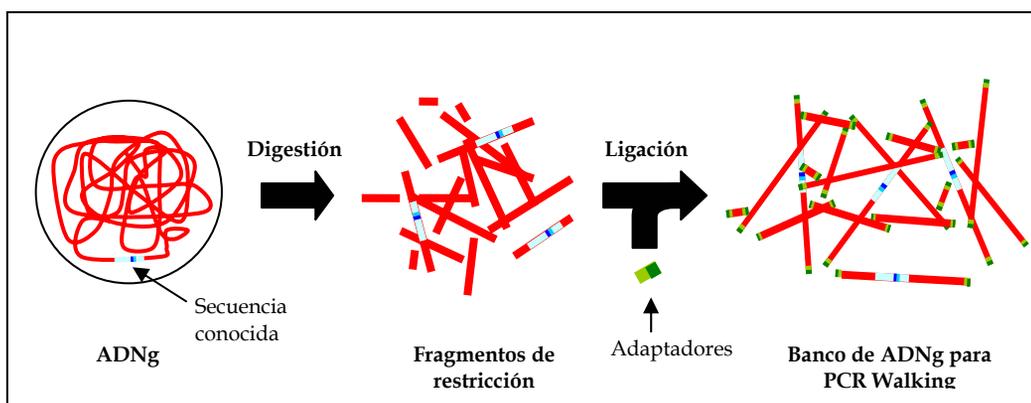


Figura 2. Síntesis de banco de ADN para PCR Walking

La técnica se basa en la realización de 2 reacciones consecutivas de PCR (fig. 3). En la primera se utiliza un oligo (AP1) que es homólogo al extremo del adaptador, y otro que hibrida con la secuencia genómica que conocemos (oligo A). Después, en la segunda PCR, utilizando el producto amplificado de la primera, se emplean otras parejas de oligos yuxtapuestas a los dos anteriores (AP2 y el oligo B). Esta segunda reacción permite aumentar la especificidad de la reacción y la cantidad de ADN amplificado.

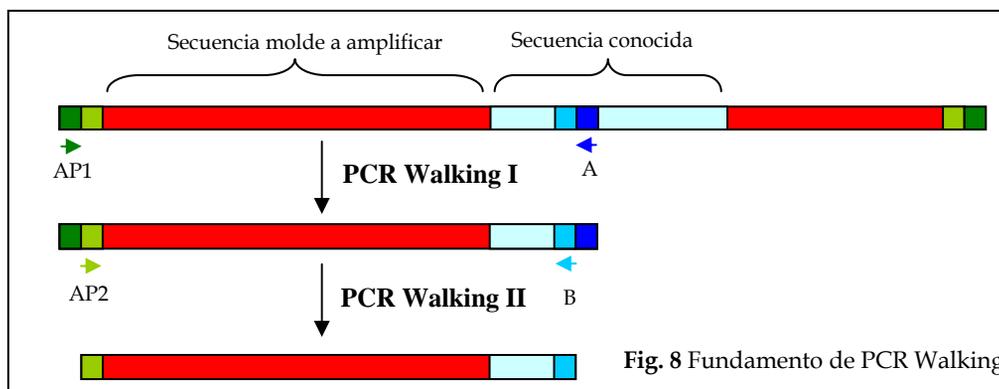


Figura 3. Fundamento de PCR Walking

iii) Subclonage de producto de PCR

Diversas experiencias de subclonage se han realizado durante este trabajo. La más común de todas es la referente a la ligación rutinaria en pGEM-T de productos de PCR. Para ello, siempre y cuando la visualización en gel de agarosa es positiva, la reacción de ligación se realiza directamente con el producto de la amplificación, ahorrando pasos de purificación. Se prepara la mezcla de reacción con los siguientes componentes, en un tubo de 1.5 mL:

- 5 µl de Buffer lig 2x
- 3 µl de productos de PCR
- 1 µl de « pGEM-T easy »
- 1 µl de ligasa T4

La mezcla se deja a temperatura ambiente durante 2 h, aproximadamente, y a continuación se lleva a cabo la transformación de *E. coli*, como se describe en el apartado de manipulación de *E. coli*. Como la eficiencia de este tipo de ligación es baja, se siembra todo el volumen de la mezcla de transformación en medio LBA con ampicilina, IPTG y X-gal, dejando toda la noche a 37°C.

iv) PCR sobre colonia

Tras la transformación con una mezcla de ligación, obtenemos una placa con una determinada cantidad de colonias, unas positivas (Vector +inserto) y otras no (Vector recircularizado). El empleo de IPTG y X-gal nos permite discernir, predictivamente, entre dos tipos de colonias por la coloración que presentan. Esto se debe a la inactivación de un gen plasmídico por la inserción del fragmento subclonado (desactivación insercional del gen lacZ de pGEM-T), inutilizando una ruta metabólica que es la responsable de la degradación del X-gal, y la coloración azul. Por otro lado, no todos los vectores utilizados en este trabajo poseen capacidad de seleccionar la colonia por coloración (por ejemplo, pBI101, ycp2 y pFL61). Por estas razones optamos por realizar amplificación por PCR sobre colonias potencialmente positivas. Este paso nos permite ahorrar tiempo (casi 1 día) al no tener que recurrir a una minipreparación de cada una de las colonias a estudiar. El protocolo de reamplificación a seguir ha sido siempre el mismo, en un volumen final de 25 μ l (Fig. 4).

La amplificación sobre colonias de *E. coli* o *A. tumefaciens* se realizó de dos maneras. La primera consiste en añadir la colonia directamente sobre el tubo de PCR con todos los componentes, tras haber realizado una réplica en placa nueva para poder conservar e identificar la colonia. En este caso utilizamos la enzima Tth polimerasa, ya que la Taq polimerasa no funciona correctamente en todos los casos.

La segunda opción consiste en la utilización de Taq polimerasa, para lo cual es necesario un paso previo en el cual la colonia es depositada en un tubo de 0.5 mL con 5 μ l de agua ddH₂O. La suspensión se hierve a 100°C durante 5 min, tras lo cual se centrifuga a 13.000 rpm en centrifuga de mesa refrigerada, durante 3 min, utilizandose 1 μ l del sobrenadante resultante como molde de la reacción de

PCR. De esta forma se consiguen eliminar los restos celulares y la agarosa, que puede interferir en la función de la Taq polimerasa.

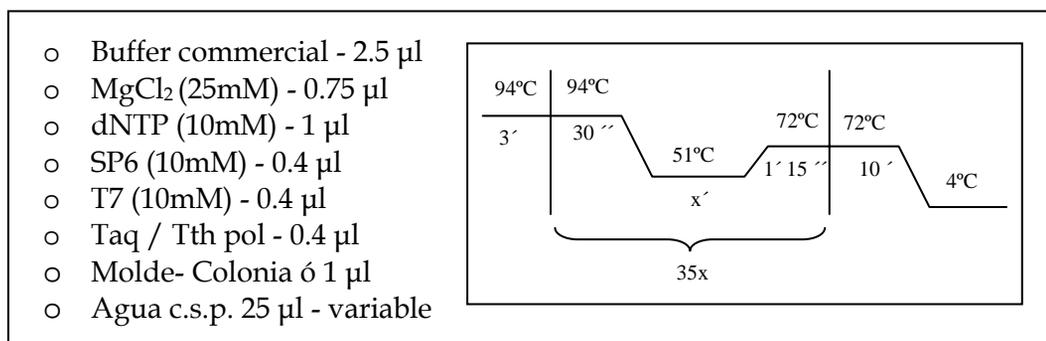


Figura 4. Condiciones de PCR para comprobar la presencia de un inserto en pGEM-T de 1 kb

Se realizó PCR directamente sobre las colonias de **levaduras** pero los resultados distaron bastante de los obtenidos empleando ADN purificado.

v) Cuantificación por PCR en tiempo real

El trabajo en el área de la PCR cuantitativa permite el estudio de la expresión génica en un órgano o una situación fisiológica determinada. Es decir, no sólo podemos determinar si un gen está siendo expresado, por ejemplo, en la raíz de una plántula de 10 días crecida en condiciones estándar, sino que podemos comparar la magnitud de esa expresión con la de otro gen en esa misma situación o, incluso, con él mismo en otro órgano u otra situación fisiológica. Esta técnica es una herramienta más que útil para los laboratorios de biología molecular y su empleo ha ido aumentando a lo largo de los últimos años. Por otro lado, las diversas técnicas y protocolos han ido evolucionando a la búsqueda de formas más simples, con resultados más reales. La PCR cuantitativa

está basada en el tratamiento de ADNc, retrotranscrito a partir de ARN, mensajero o total, con el objeto de amplificar una secuencia específica del gen a estudiar, de tal forma que la cantidad ADN final irá en función del ADNc (o ARN) inicial. Los primeros intentos de cuantificación por PCR dieron lugar a una variedad de técnicas, con unos problemas asociados. En el desarrollo de la PCR ésta debía estar, al finalizar, en la fase exponencial de la amplificación para que la cantidad de producto final fuera proporcional a la cantidad inicial del molde y al número de ciclos. Por otro lado, una vez que ésto se conseguía, había que encontrar un método fiable post-PCR para cuantificar esta amplificación.

Con la aparición de la PCR cuantitativa a tiempo real se evitan algunos de estos problemas. El método está basado en la cuantificación durante la fase exponencial de la amplificación, independientemente de la fijación de un número predeterminado de ciclos. Esto se consigue visualizando en tiempo real la síntesis de nuevas moléculas de ADN en cada ciclo, por lo que la interpretación de datos se simplifica enormemente.

En la cuantificación en tiempo real existen dos métodos generales de análisis de datos: cuantificación absoluta o relativa. La cuantificación absoluta determina el número exacto de copias inicial de molde, relacionando la señal de PCR con una curva estándar de un ADN o ARN patrón de concentración conocida. En la cuantificación relativa, la señal de PCR del molde problema se compara con otra muestra, tal como un control no tratado. Esta forma de cuantificar es más rápida y menos tediosa, y es el tipo de cuantificación empleado en nuestro trabajo.

En las experiencias de cuantificación los datos de salida de cada una de las muestras se normalizan con la salida aportada por un control normalizador que, generalmente, está representado por un gen constitutivo (casero o housekeeping) de expresión elevada y fisiológicamente constante. En nuestros experimentos utilizamos el ARN ribosómico 18S con este propósito. Los

resultados, ya normalizados, se relacionan a una de las muestras problema, lo que dependerá del tipo de experimento a realizar.

Para realizar estas experiencias 0.5 µg de ARN total se transcribieron a ADNc con la enzima “Multiscribe Reverse Transcriptasa” y los oligos “Random Hexamers Primers”, ambos suministrados por “Applied Biosystems”. Las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo en un “ABI Prism 7700 Sequence Detector” (Applied Biosystems) utilizando el kit de Qiagen “QuantiTect SYBR Green PCR kit” siguiendo el protocolo del fabricante. Los oligos empleados fueron diseñados con la ayuda del programa “Primer express” (Applied biosystems), y se describen en el apartado de oligos. La longitud de los fragmentos amplificados (amplicones) está comprendida entre 100 y 150 pb.

El “QuantiTect SYBR Green PCR kit” basa su funcionamiento en el colorante “SYBR Green I” y en el empleo de la “HotStarTaq DNA polymerase”. El colorante es empleado para la cuantificación de moléculas diana específicas ya que se une al ADN de doble cadena emitiendo una señal fluorescente, lo que evita tener que utilizar sondas específicas marcadas. El complejo SYBR Green I-ADN emite una señal fluorescente (máximos de excitación y emisión de 494 y 521 nm, respectivamente), que es recogida y monitorizada por el “ABI Prism 7700 Sequence Detector”, lo cual nos permite seguir desde el inicio de la reacción la formación de nuevas moléculas. La enzima “HotStarTaq DNA polymerase” del kit proporciona una alta especificidad y sensibilidad en la reacción de PCR, ya que es suministrada de forma inactiva por el fabricante siendo necesaria una incubación previa de 15 min a 95°C para realizar su función, de esta forma se previene la formación de productos inespecíficos en fases iniciales de la amplificación.

En la figura 5 se presentan los datos de salida proporcionados por el software del “ABI Prism 7700”. Cada color de la gráfica representa la amplificación de un tubo, pudiéndose apreciar cuatro fases claras en la síntesis

de nuevas cadenas de ADN. En los primeros ciclos de la amplificación el aumento de ADN es prácticamente inapreciable, siendo el fondo (background) de la reacción lo más aparente. Conforme aumenta el número de ciclos comienza la amplificación específica de moléculas de ADN, dando lugar a la fase de crecimiento geométrico, hasta que algún reactivo o componente de la amplificación limita el proceso, originando una fase lineal seguida de la fase meseta o "plateau".

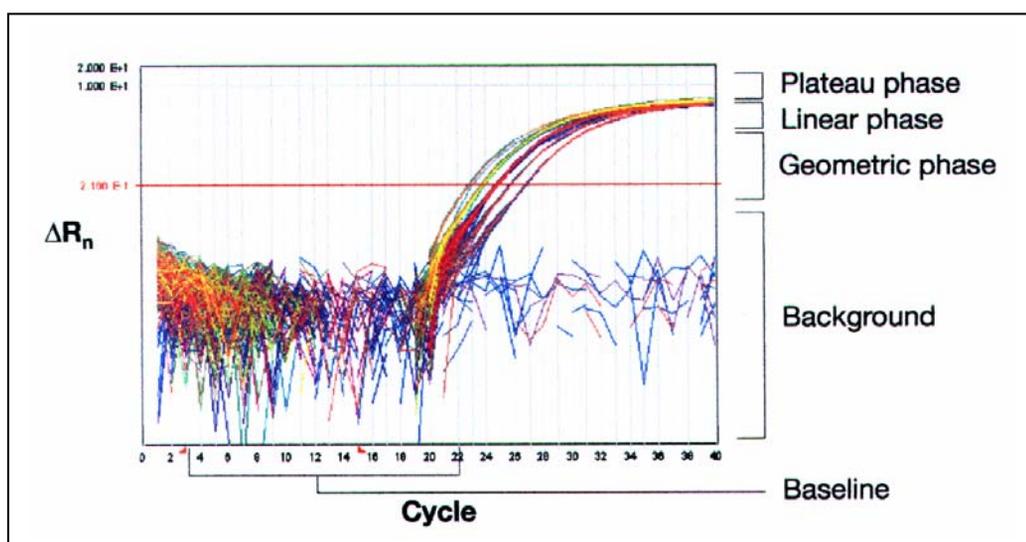


Figura 5. Datos de salida proporcionados por el software del "ABI Prism 7700"

El dato de salida más importante de cada muestra a cuantificar es el denominado C_T (Theshold cycle), que representa el número de ciclos en el que la línea de la gráfica intercepta la línea base. En la figura 6 se puede apreciar una representación más sencilla de la figura anterior. Cuanto mas pequeño es el valor de C_t mas cantidad de muestra inicial existe en la mezcla de PCR, es decir, existe una mayor expresión del gen estudiado. El ARN 18S es un gen altamente expresado en los tejidos, así que su valor de C_T es muy bajo. El nivel de expresión

del ARN 18S nos da una idea comparativa del nivel de metabolismo entre diferentes tejidos.

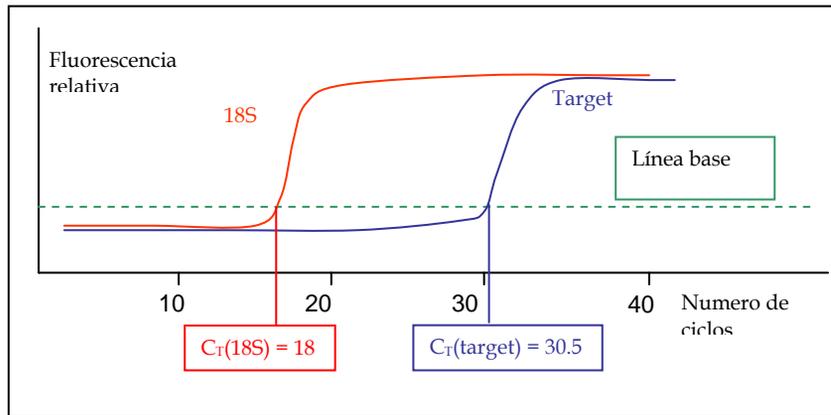


Figura 6. Obtención del valor de C_T

El método delta-delta ($\Delta\Delta$) es la manera más apropiada para analizar la cuantificación relativa de la expresión génica, utilizando PCR a tiempo real. Para ello se requiere el empleo de algunas ecuaciones y suposiciones que están bien descritos en Applied Biosystems Users Bulletin No. 2 (P/N 4303859). En la publicación presentada por Livak y Schmittgen se obtiene más información sobre el método (Livak y Schmittgen, 2001).

En la cuantificación de una muestra, la magnitud final expresa como “ $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ”, donde el valor de “ $\Delta\Delta C_T$ ” se calcula a partir de la siguiente ecuación (fig. 7),

$$\Delta\Delta C_{T\text{muestra A}} = (C_{T\text{muestra A}} - C_{T\text{constitutivo (18S)}}) - (C_{T\text{muestras referencia}} - C_{T\text{constitutivo (18S)}})$$

Fig. 12 Obtención del valor $\Delta\Delta C_{T\text{muestra A}}$

Figura 7. Obtención del valor $\Delta\Delta C_{T\text{muestra A}}$

Para aplicar este método necesitamos que la eficiencia de la reacción de PCR de los genes problema y del gen constitutivo sea muy similar. Esta se puede medir a partir del coeficiente de regresión lineal del valor C_T frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADN. Para ello se realizan amplificaciones de las muestras con diluciones seriadas (1/10, 1/100, 1/1000 y 1/10000).

g. Restricción de ADN

Las digestiones con enzimas de restricción se han realizado en las condiciones óptimas que fija el fabricante para cada enzima, ya que éstas difieren bastante unas de otras. Con fines analíticos se llevaron a cabo en 25 μ l de volumen total, con 0.5-1 μ g de ADN y 1 unidad enzimática de la enzima, en el tampón fijado por el fabricante. Con fines preparativos se utilizaron hasta 5 μ g de ADN, con 10 unidades enzimáticas en un volumen total de 100-150 μ l de tampón. Normalmente se incubaba a 37 °C durante 1 ó 2 horas, en función de la cantidad de ADN y de la enzima empleadas, teniendo presente que una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que digiere completamente 1 μ g de ADN (habitualmente del fago λ) en 1 h en las condiciones de digestión óptimas.

En la mayoría de los casos utilizamos digestiones dobles con enzimas de restricción diferentes, lo que nos permitía una inserción dirigida o polarizada, es decir, en un solo sentido. Estas digestiones dobles suelen presentar ciertos problemas cuando las condiciones óptimas de las dos enzimas no son compatibles, teniendo que emplear distintos tampones de reacción, por lo que a veces es necesario llevar a cabo determinadas estrategias que permitan llevar a cabo la doble digestión de un modo eficaz. En este trabajo se han utilizado digestiones dobles que no requieren un tratamiento especial, por ser ambas enzimas eficaces en el mismo tampón. Sin embargo, el empleo de determinadas enzimas incompatibles requiere un protocolo especial, consistente en digerir, en

primer lugar, con una enzima (la que emplee el tampón con menor fuerza iónica) en un volumen pequeño (10 µl). Tras 1-2 horas de digestión se diluye la mezcla 10 veces, y se lleva a cabo la digestión con la segunda restrictasa en su propio tampón. Otra opción es digerir con ambas por separado y extraer el ADN digerido con una purificación fenólica, pero este paso conlleva pérdida de muestra, por lo que en la mayoría de los casos hemos preferido utilizar la primera opción.

Otro aspecto importante es que en este trabajo todas las digestiones se han llevado a cabo sobre plásmidos. Es decir, cuando el inserto iba a ser digerido previamente se subclonaba en pGEM-T. Este hecho facilita enormemente la digestión del inserto porque, por un lado, permite visualizar directamente la calidad y cantidad del inserto digerido y por otro, la eficiencia de la digestión es mayor.

h. Ligación de ADN

Las ligaciones de fragmentos de ADN se realizaron añadiendo proporciones variables de ambos fragmentos, no sobrepasando la cantidad final de 300 ng de ADN total. La ligación se llevó a cabo en 20 µl del tampón de ligasa adecuado, suministrado por el fabricante, utilizando 1 unidad de ligasa del fago T4, incubando toda la noche a 12-15°C. Ocasionalmente se recurrió a tiempos de ligación más largos, de hasta 48 horas.

La mayoría de las ligaciones realizadas fueron dobles, permitiendo la inserción polarizada del inserto. Un caso especial en el presente trabajo ha sido la ligación en pFL61. En este caso el vector sufre doble digestión con el mismo enzima de restricción, NotI, lo que puede dar lugar a la recircularización del vector de forma frecuente en presencia de la ligasa. Para evitar tal hecho, se purificaba tras la digestión el ADN, y se incubaba con fosfatasa alcalina (Promega)

según las condiciones del fabricante. De esta forma se defosforilan los extremos cohesivos, evitando así la recircularización plasmídica.

i. Secuenciación de ADN

Para realizar la secuenciación de los plásmidos obtenidos en este trabajo se ha recurrido al Servicio de Secuenciación de ADN del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López Neyra”, de Granada, que dispone de un secuenciador automático ABI-Prism que secuencia eficazmente hasta 1 Kb.

Los fragmentos a secuenciar eran previamente subclonados en pGEM-T easy, y se secuenciaban por ambas hebras utilizando los oligos SP6 y T7. El resto de construcciones han sido secuenciadas utilizando oligos que flanquean la zonas de inserción (T7terminal, ycp2-5', ycp2-3', pFL61Dr, pFL61Ga y gus-3'), aunque en ocasiones se han empleado oligos del propio inserto subclonado.

XI. Manipulación de ARN

a. Tratamiento del material

Todo el material utilizado para la extracción de ARN fue tratado de forma especial para evitar la contaminación de RNasas, excepto aquél que ya es tratado, con tal propósito, en su fabricación. El material plástico descartable (puntas de pipeta y tubos estériles), el vidrio y la porcelana de los morteros fueron enjuagados con cloroformo, secados al aire y, posteriormente, autoclavados. El ddH₂O utilizada para este propósito fue tratada con DEPC (1 mL/L)

b. Métodos de extracción de ARN

Dos tipos de extracción de ARN han sido utilizados para la realización de este trabajo: extracción de ARN total y de ARNm. El primero fue empleado para experiencias de cuantificación génica de los diferentes genes estudiados, ya que es necesaria la cuantificación de ARN ribosómico (18S) como normalizador celular. Por otro lado, el ARNm fue empleado para el aislamiento de secuencias codificantes y su posterior estudio.

i) Aislamiento de ARN total

Para la extracción de este tipo de ARN se ha utilizado el reactivo “TRIzol Reagent” de la casa Invitrogen. Consiste en una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, que permite mantener la integridad de los ARN durante la lisis de tejidos y células. Tratamientos posteriores con cloroformo, etanol e isopropanol dan lugar a concentraciones finales de ARN de hasta 7 mg/mL en hoja, y 3 mg/mL en raíz, en un tiempo de 1-2 h. Se han utilizado según las condiciones del fabricante.

ii) Aislamiento de ARNm

Para este propósito hemos utilizado el kit de Boehringer - Roche “mRNA Isolation Kit”. El aislamiento de ARNm poliadenilado se basa en la utilización de biotina-oligo-(dT)₂₀ y partículas magnéticas de estreptavidina. No es necesario el paso previo de aislar ARN total, ya que la separación se realiza utilizando un soporte magnético que atrae el complejo de estreptavidina-biotina-oligo-(dT)₂₀-ARNm, permitiendo la obtención de cantidades suficientes de ARNm de buena

calidad para su empleo en el aislamiento de secuencias por RT-PCR. Fue utilizado según condiciones del fabricante

c. Cuantificación del ARN

Para cuantificar la concentración de una disolución de ARN se determina la absorbancia de la solución de ARN a 260 nm y 280 nm, frente a un blanco de TE o agua ultrapura. La concentración de la muestra se calcula respecto al valor estándar de $DO_{260} = 1$ para una solución de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ARN. La relación DO_{260}/DO_{280} indica si existe contaminación con ADN. Cuando esta relación es menor de 1.85 existe contaminación con ADN.

d. RT-PCR

Se empleó para la retrotranscripción del ARNm y posterior amplificación de secuencias de ADNc de ARN total o mensajero. En este trabajo se ha utilizado para obtener secuencias nucleicas que se traducen a proteína, evitando así la interferencia de los intrones. Promega comercializa con este propósito el kit "Access RT-PCR System". Se utilizó bajo recomendación del fabricante.

XII. Manipulación de proteínas

a. Extracción de proteínas

i) Plantas

Para la obtención de muestras proteínicas de hojas y raíces se recolectaron los correspondientes órganos a los tiempos determinados y, tras registrar el peso fresco de las mismas, se procesaron o se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Los extractos foliares se preparan homogenizando con nitrógeno líquido y mortero el tejido vegetal, fresco o congelado, en una relación mínima 1/0.5 (p/v) con tampón Tris-HCl 25 mM pH 7.5, MgCl_2 5 mM, 2-ME 5 mM y EDTA 0.5 mM. Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 13.200 rpm en centrifuga de mesa, a 4°C , durante 15 min. En el sobrenadante se determinó la concentración de proteínas y se realizaron todos los ensayos (actividades enzimáticas y reconocimiento inmunológico).

Las extracciones de raíz se realizaron de igual manera, con el mismo tampón de extracción, pero a una relación mínima de 1/1 (p/v).

ii) levaduras.

Este método se utilizó para preparar extractos de proteínas de levadura transformada, para comprobar la presencia Trxs recombinantes por "western blot". Para ello, 2 mL de un cultivo de levadura de 10^7 células/mL (equivalente a $\text{DO}_{650} = 1$), se recogieron por centrifugación ($5000 \times g$, 10 min) resuspendiéndose en 200 μl de dH_2O estéril. Se centrifugó para eliminar el sobrenadante y las células fueron sometidas a -20°C durante 5-10 min. Se resuspenden las células congeladas en 100 μl de tampón de carga (Tris-HCl 60 mM, pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, DTT 100 mM (o ME 5%), y azul bromofenol 0.001%) dejándose 5 min en hielo. Se añadió un volumen de 100 μl de "acid-

washed glass beads" (Sigma) y se sometió a agitación fuerte (vortex), 4 veces durante 30 s, dejando 1 min en hielo entre cada agitación. Posteriormente se calentó a 95°C durante 5 min, recogiendo las células en centrífuga de mesa a máxima velocidad durante 15 min. Por último, el sobrenadante se recoge en un tubo limpio y se guarda a -20°C hasta su uso en western blot (5-20 µl/pocillo).

b. Producción y purificación de tiorredoxinas recombinantes en *E. coli*

Para expresar las proteínas recombinantes subclonadas en vectores de expresión de la familia pET se ha utilizado generalmente el siguiente protocolo:

Se inicia con un precultivo, para lo cual se toma una colonia de *E. coli* BL21(DE3) previamente transformada con la construcción portadora de la secuencia a expresar, y se inoculan 3 mL de medio LB con ampicilina, incubando a 37°C y agitación durante unas 8 h. Pasado ese tiempo se toman 150 µl del cultivo y se añaden a 150 mL de medio LB con ampicilina, dejando incubar toda la noche a 37 °C con agitación.

Para la obtención de un cultivo en fase exponencial e inducir la expresión se distribuyen los 150 mL de cultivo de la noche anterior en tres matraces conteniendo cada uno 1 L de medio LB con ampicilina, y se incuba con agitación hasta que alcanzar una $DO_{600} = 0.5 - 0.8$, momento en el que se añade IPTG hasta una concentración 400 µM para inducir la expresión del gen recombinante. Se incuba a 37°C durante 4 a 6 h para expresar el gen. Finalizada la expresión se recogen las células por centrifugación a 6000 xg durante 10 min, y se almacenan a -80°C hasta el momento de la purificación de la proteína expresada.

La purificación de las Trxs citosólicas está basado en trabajos previos con algunas modificaciones (Hodges *et al.*, 1994, Jaramillo *et al.*, 1997). Para la purificación de las proteínas correspondientes a 3 L de cultivo se resuspenden en 20-40 mL de Tris-HCl 30 mM, pH 7.9, 300 mM de NaCl y 14 mM de 2-ME

(tampón de tiorredoxinas), y se rompen las células por presión en una prensa French a 60 MPa. A continuación los restos celulares se separan por centrifugación durante 20 min a 20000 xg. Si se trata de la Trx *h1* se incluye un paso de calentamiento a 75°C durante 10 min. Las proteínas desnaturalizadas se separan mediante 20 min de centrifugación a 20000 xg, a continuación, fraccionamos el sobrenadante con sulfato amónico entre 40% y 85% de saturación. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en tampón de tiorredoxinas, pasándose por una columna de Sephadex G-50, equilibrada con el mismo tampón. Las fracciones obtenidas son analizadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS; las que contienen Trxs son recogidas, concentradas por diálisis frente a carboximetil-celulosa de alta viscosidad hasta un volumen de 5 mL, dializadas frente a tampón de Trxs, 100mM de NaCl, y pasadas por una columna de cambio iónico de DEAE-celulosa equilibrada en el mismo buffer. Las Trxs se eluyeron con un gradiente de 100 a 600 mM en NaCl, con el fin de eliminar las contaminaciones de ADN. La Trx *h1* eluye al principio del gradiente completamente pura. Se comprueba su pureza por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS y tinción de plata.

Para la purificación de la Trx *h2* el protocolo es muy parecido al ya descrito, pero el tampón utilizado no tiene NaCl y el extracto no se somete a calentamiento alguno. Las fracciones precipitadas con sulfato amónico (40% y 40-85%) se disolvieron en el mismo tampón y se pasaron por separado por sephadex G-50. Las fracciones de ambas cromatografías conteniendo Trx se reunieron y filtraron por segunda vez.

c. Producción de anticuerpos

Para la obtención de anticuerpos policlonales de conejo se necesitó 1 mg de proteína purificada para la inmunización del animal, que fue enviada al

Servicio de Producción Animal de la Universidad de Sevilla. Los sueros se utilizaron tras centrifugar a 13.200 rpm en centrifuga de mesa, a 4°C, durante 15 min.

d. Electroforesis de proteínas

Para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo electroforesis vertical de proteínas en geles de poliacrilamida (Laemmli, 1970) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y reductoras. Se ha empleado el equipo Miniprotean III de Bio-Rad, con el cuál se obtienen geles de pequeño tamaño (8 x 7 x 0.75 cm), que dan buenas separaciones con un ahorro de tiempo considerable. En una migración electroforética en condiciones desnaturizante las proteínas se desplazan de forma inversamente proporcional a su peso molecular debido a la carga aportada por las moléculas de SDS, fuertemente negativas, que interaccionan con los residuos aminoacídicos de la proteína.

Se han utilizado dos protocolos diferentes en función de la finalidad de la electroforesis. Para el control de pureza en los procesos de purificación, y para la determinación de pesos moleculares de las Trxs, los geles separadores se prepararon al 15% de acrilamida (acrilamida:bisacrilamida, 29:1), el gel concentrador del 4%. Como tampón de desarrollo electroforético se uso un tampón Tris-glicina (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glicina 192 mM, y SDS 0.1%). La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 200 V durante aproximadamente 1 h. Las muestras y los marcadores de peso molecular (Pharmacia) se solubilizaron en tampón de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, glicerol 0.1%, SDS 0.5%, azul de bromofenol 0.05% y DTT 100 mM) y posteriormente se calentaron a 100°C durante 4 min. La polimerización de los geles se llevó a cabo con persulfato amónico a una concentración final 0.05%. El

TEMED fue utilizado como agente catalizador, a una concentración de 0.05% en gel separador y 0.1% en gel concentrador.

Para la separación de extractos proteínicos y posterior transferencia a membranas para, por último, ser inmunoreconocidas (Western blot) y cuantificadas, se precisa una focalización mayor de las bandas. Las proteínas entre 10-15 KDa no son bien resueltas en los geles discontinuos tradicionales, ya que el SDS migra paralelo a estas pequeñas proteínas, obstaculizando su resolución. En el siguiente protocolo se describe un tipo de electroforesis que migra en un tampón de desarrollo de Tris-Tricina (Tris-HCl 20 mM, Tricina 20 mM y SDS al 0.02%), que consigue individualizar estas pequeñas moléculas frente a las moléculas de SDS (Schagger y Vonjagow, 1987). El gel de separación se preparó al 16.5% de acrilamida con SDS 0.1%, glicerol 10% y tampón Tris-HCl 1 M pH 8.45. El gel de concentración, al 4% de acrilamida, contiene los mismos componentes excepto el glicerol. La polimerización de los geles se llevó a cabo con persulfato amónico al 0.05% para el gel separador y 0.075% para el gel concentrador. El TEMED se utilizó a una concentración de 0.05% en gel separador y del 0.15% en el gel empaquetador. Para cargar las muestras en el gel se les añadió tampón de carga, a una concentración final de 1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% de glicerol, 1% 2-ME y 0.01% de azul de bromofenol. Las muestras se calentaron 4 min a 100°C antes de cargarlas en el gel. Las condiciones de la migración fueron de 50 V hasta que la muestra entra en el gel, y 130 V hasta que el frente llega al límite del gel (aproximadamente 3-4 h).

Para visualizar las proteínas en el gel, una vez llevada a cabo la separación electroforética, se utilizaron las tinciones con Azul Coomasie o con plata. La segunda es más sensible y permite la comprobación de la pureza de las proteínas empleadas con un alto grado de fiabilidad. La tinción con Azul Coomasie es menos sensible, pero requiere menos tiempo, utilizándose para visualizar las proteínas durante los pasos intermedios de la purificación.

i) Tinción con Azul Coomasie R-250

1. Se sumerge el gel en solución de tinción de Coomasie (metanol 40%, acético 10% y azul coomasie R-250 0.1%) durante 30 minutos en agitación.
2. Se decolora mediante inmersión en solución de decoloración (etanol 40%, acético 10%) con agitación, cambiada 2 o 3 veces, durante 10 minutos cada vez.

ii) Tinción con plata

1. Fijación. Se sumerge el gel en 100 mL de solución de fijación (ácido acético 12%, metanol 50%, formaldehído 0.50% y el resto de agua), durante un mínimo de 30 minutos.
2. Doble lavados con 150 mL de etanol al 50%, 15 minutos cada vez.
3. Preimpregnación. Sumergir los geles en 100 mL de tiosulfato sódico 0.8 mM, durante 1 minuto.
4. Triple lavado con 100 mL de agua destilada, 20 segundos cada vez.
5. Impregnación. Sumergir los geles en 100 mL de nitrato de plata (2 g/L) y formaldehído (0.75%) durante 10 minutos, en la oscuridad.
6. Doble lavado con 100 mL de agua destilada, 20 segundos cada vez.
7. Revelado. Se sumergen los geles en 100 mL de carbonato sódico (60 g/L), tiosulfato sódico 16 μ M, formaldehído 0.50%, durante el tiempo suficiente para que aparezcan las bandas (5 min).
8. Doble lavado con 100 mL de agua destilada, 20 segundos cada vez.
9. Fijación. Se sumergen los geles en 100 mL de ácido acético 12%, metanol 50%, y el resto de agua.

e. Medida de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteína en disolución se ha empleado el reactivo “Bio-Rad protein assays”, basado en el cambio de color que presenta el colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al interactuar con restos básicos y aromáticos de las proteínas (Bradford, 1976). Siempre se ha seguido el protocolo que se indica para disoluciones de proteína de concentración menor a 25 µg/mL (microensayo). Se empleó según las indicaciones del fabricante.

f. Transferencia a membrana para inmunodetección (Western-blot)

Tras la electroforesis (Tris-Tricina) en gel de poliacrilamida, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF según el método de Towbin (Towbin *et al.*, 1979).

Una vez concluida la electroforesis, el gel de SDS-poliacrilamida se sumergió en tampón TGM (Tris-HCl 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0.037% y metanol 15%) durante, al menos, 5 min. La transferencia de proteínas a la membrana se realizó durante 50 min, utilizando tampón TGM, en un aparato de transferencia semi-seca “Trans-blot SD” (Bio-Rad), a un amperaje constante de 0.8 mA / cm² de superficie de membrana, y un voltaje máximo de 25 V. El montaje de la transferencia se describe en la figura 8.

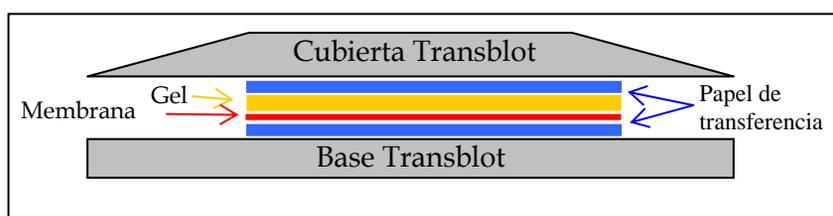


Figura 8. Montaje para la transferencia en el “Trans-blot SD”

La membrana y los papeles de transferencia (“extrathick blot paper”, Bio-Rad) se cortan al mismo tamaño que el gel. Los papeles se sumergen en tampón de transferencia antes del montaje mientras que la membrana es tratada previamente a la transferencia debido a su hidrofobicidad, sumergiendola en metanol durante 1 min. Posteriormente se introduce en ddH₂O para conseguir su estabilidad (aproximadamente 1 min), guardandose en tampón de transferencia hasta el momento del montaje. Este se lleva a cabo depositando las sucesivas capas, según indica el esquema adjunto, eliminando las posibles burbujas que queden atrapadas con ayuda de un rodillo limpio (tubo de ensayo o pipeta de cristal). Para toda esta manipulación es aconsejable la utilización de guantes por la posibilidad de contaminación proteínica de la membrana.

Una vez finalizada la transferencia la membrana se somete a los siguientes pasos:

1. Saturación o bloqueo de la membrana: La membrana se sumerge en 50 mL de tampón TBS (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, 0.9% NaCl) conteniendo leche desnatada en polvo al 5 % durante, al menos, 1 h, a temperatura ambiente. Con este tratamiento se saturan los sitios de unión de la membrana que permanecían libres tras la transferencia.
2. Lavado: Una vez saturada, la membrana se somete a dos lavados rápidos con TBST (tampón TBS con Tween 20 0.1%), de 1 min cada uno.
3. Incubación con anticuerpos: La membrana se incuba con agitación suave, en un volumen suficiente de TBST conteniendo el anticuerpo primario específico y 0.1 % de BSA. El tiempo de incubación es de 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.
4. Lavado: Los anticuerpos unidos de forma inespecífica a la membrana se eliminan mediante 3 lavados de 10 min, con 50 mL de TBST

5. Incubación con anticuerpo secundario marcado con peroxidasa: Esta incubación se realiza durante, al menos, 45 min, con agitación, en un volumen suficiente de TBST conteniendo 1 µg de antiinmunoglobulinas.
6. Lavado: La membrana se lava de nuevo, 2 veces, con TBST durante 15 min.
7. Lavado: Se eliminan los restos de detergente con dos lavados sucesivos de TBS, de 10 min. Por último, se sumerge la membrana en tampón de revelado (Tris-HCl 50 mM pH 8.6, NaCl 150 mM).
8. Revelado: La membrana se reveló por impresión de una película radiográfica (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences). Para este paso es necesario trabajar en oscuridad con utilización de luz roja de revelado de películas impresionables. Para ello se sumergió la membrana en la solución reveladora (20 mL de tampón de revelado conteniendo, de forma extemporánea, 8 mg de luminol y 0.2 mL de 4-iodofenol disuelto previamente en DMSO al 1%, durante 5 minutos. A continuación se introduce la membrana en un cassette de exposición en contacto con la película radiográfica, separadas ambas por un plástico transparente. Se cierra y se espera desde 1 seg hasta 1 h, según la intensidad de las bandas a revelar. Esta operación se puede repetir cambiando los tiempos de exposición. Por último, se desmonta el cassette y se introduce la película en una bandeja de líquido revelador (Tetenal), hasta la aparición de las manchas de impresión. Se lava con agua ligeramente, y se introduce en líquido fijador (Tetenal) hasta conseguir la transparencia final de la película. Finalmente se lava en agua de grifo y se deja secar.

g. Determinaciones enzimáticas

i) Análisis de activación de FBPasa por tiorredoxinas citosólicas

Para estudiar la capacidad de activación de las Trxs sobre la FBPasa se siguió el protocolo descrito por Prado y colaboradores (Prado *et al.*, 1992). El ensayo se basa en el hecho de que a pH 7.9 la FBPasa cloroplastídica no es activa, a no ser que, previamente, sea reducida por un donador de equivalentes de reducción. En este ensayo la Trx, reducida por DTT, actúa como agente reductor, cediendo electrones a la FBPasa y activándola. Como el DTT también puede actuar directamente sobre la FBPasa, hay que realizar un blanco sin Trx.

El ensayo se realiza en dos pasos:

1. Activación: En un volumen final de 100 μ l se incuban las cantidades deseadas de Trx y FBPasa en una mezcla de incubación (Tris-HCl pH 7.9 100 mM, DTT 2.5 mM, FBP 0.4 mM y CaCl₂ 0.05 mM), durante 10 minutos a 28°C.
2. Catálisis: Transcurrida la fase de activación, la mezcla se pasa a una cubeta con 900 μ l de Tris-HCl pH 7.9 50 mM, MgCl₂ 1 mM, FBP 0.36 mM, EGTA 0.02 mM, NADP 0.3 mM, 1.4 unidades de fosfoglucoasa-isomerasa (PGI) y 0.7 unidades de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH). Se mide la variación por minuto de la absorbancia a 340 nm producida por la aparición de NADPH debida a la actividad FBPasa, según la cadena siguiente de reacciones enzimáticas acopladas (fig 9).

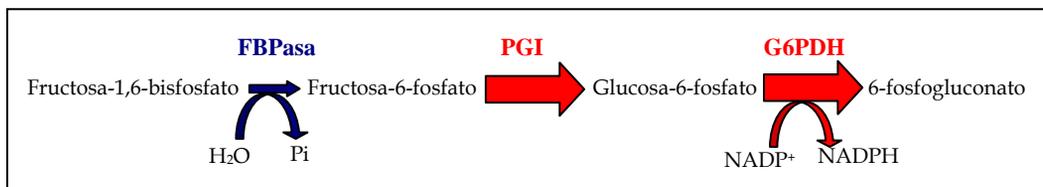


Figura 9. Esquema de la medición *in vitro* de la actividad FBPasa cloroplastídica

Las dos reacciones enzimáticas auxiliares (PGI y G6PDH) son mucho más rápidas que la desfosforilación de la FBP por la FBPasa, por lo que se puede considerar que la medida espectrofotométrica de la concentración de NADPH frente al tiempo será función únicamente de la actividad FBPasa.

ii) Análisis de reducción de Insulina por tiorredoxinas.

La Trx cataliza la reducción de los puentes disulfuro de la molécula de insulina por DTT. Mediante el ensayo enzimático, en el que están presente DTT, Trx e insulina, se mide espectrofotométricamente, a una longitud de onda de 650 nm, la turbidez generada por la precipitación de la cadena β de la insulina (Holmgren, 1979).

La reducción de la insulina se llevó a cabo en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.1, EDTA 2 mM, 0.5 mg de insulina, DTT 0.5 mM, y Trx a diferentes concentraciones.

Una disolución madre de insulina se preparó disolviendo 5 mg/mL (10x), en agua ultrapura (hay que añadir NaOH hasta pH 7 para una completa disolución). Se disponen 0.9 mL de la mezcla de reacción sin insulina en una cubeta, y se espera 15 min para que se produzca la reducción de la Trx por parte del DTT. A continuación se añade la insulina, y se comienza a medir a 650 nm hasta aproximadamente 30 min. Se realiza un blanco paralelo sin Trx.

h. Análisis histoquímico de la actividad GUS

La coloración histoquímica de plantas transgénicas que expresaban el gen *gus* se realizó según el protocolo de Jefferson y colaboradores (Jefferson *et al.*, 1987). Los tejidos son sumergidos en tampón *gus* (tampón fosfato sódico 100 mM pH 7, hexacianoferrato potásico (II) 0.5 mM, hexacianoferrato potásico (III) 0.5

mM y 1 mM de X-GlcA (Duchefa), disuelto previamente en dimetilformamida), a continuación son sometidos a vacío en campana, durante 15 min, 3 veces dejándose toda la noche a 37°C. El tampón gus se prepara extemporaneamente. Al día siguiente, se procede a la decoloración tisular, siempre a 37°C. Primero se retira el tampón gus, sumergiéndose los tejidos en etanol 70%, durante 1h, después se sustituye el etanol 70% por etanol absoluto. Este último paso se repite varias veces, dependiendo del tipo de tejido, hasta que toda la clorofila se ha eliminado (3-5 lavados).

Para la visualización de las muestras teñidas se utilizó una lupa estereoscópica "STEMI SR" (Zeiss). Para una mejor observación de las estructuras, en ocasiones fue necesario realizar un aplastado de los tejidos, siendo observados posteriormente mediante un microscopio óptico "Zeiss AXIOPLAN" (Zeiss) en campo claro. Las fotografías fueron tomadas mediante una cámara digital (Canon) acoplada a ambos aparatos.

i. Cristalización de proteínas

Para llevar a cabo la cristalización de cualquier proteína, y posterior resolución por difracción de rayos X, es necesaria una elevada concentración de proteína, y que éstas presenten un cierto grado de purificación. Para tal propósito, se expresaron y purificaron las cuatro Trxs de guisante (*h1*, *h2*, *f* y *m*) como proteínas recombinantes, por la metodología descrita anteriormente, y se llevaron hasta una concentración de 10 mg/mL. Las dos Trxs cloroplastídicas fueron purificadas según protocolos precedentes (Hodges *et al.*, 1994, Jaramillo *et al.*, 1997). Para evitar interferencias de la disolución en la que se encontraba almacenada la proteína, todas las muestras fueron dializadas previamente en Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, centrifugándose después durante 5 min a 12.000 xg, para eliminar partículas que pudieran interferir con el proceso de nucleación.

Existen varias técnicas para cristalizar las proteínas pero todas se basan en alcanzar, de una forma u otra, un grado de supersaturación de la disolución de proteína, de forma que se formen algunos núcleos a partir de los cuales crecerán cristales. En la gran mayoría de los casos, el factor limitante de la técnica es la obtención de cristales de calidad adecuada para ser utilizados en la obtención del patrón de difracción. Estos cristales deben ser cristales únicos y de un tamaño adecuado para que el patrón de difracción sea de una calidad suficiente para poder llevar a cabo la determinación estructural. En principio cualquier macromolécula es cristizable con más o menos dificultades, y solo es una cuestión de ensayar gran cantidad de condiciones de cristalización para encontrar la más óptima para la macromolécula.

En nuestro caso, partimos de unas condiciones más o menos racionales que nos permitieran, con el menor número de pruebas y con el menor gasto posible de proteína, llegar a las condiciones en las que nuestras proteínas cristalizaran en monocristales. Para ello, se utilizó el kit comercial de *Crystal Screen I* (Hampton Research), que contiene 50 combinaciones distintas de agente precipitantes, sales y pHs que pueden promover la formación de cristales.

Se utilizó el procedimiento de la gota sentada. En la figura 15 se muestra de forma esquemática el experimento. En el depósito se añadieron 0.5 mL de disolución precipitante para cada condición del *Crystal Screen I*. La gota se formó mezclando un volumen de 2 μ L de disolución de proteína concentrada, con 2 μ L de la misma disolución precipitante que se depositaba en el fondo del pocillo. Se realizó un seguimiento de la evolución de las gotas de proteína, observando y anotando la aparición de precipitados, cristales o separación de fase.

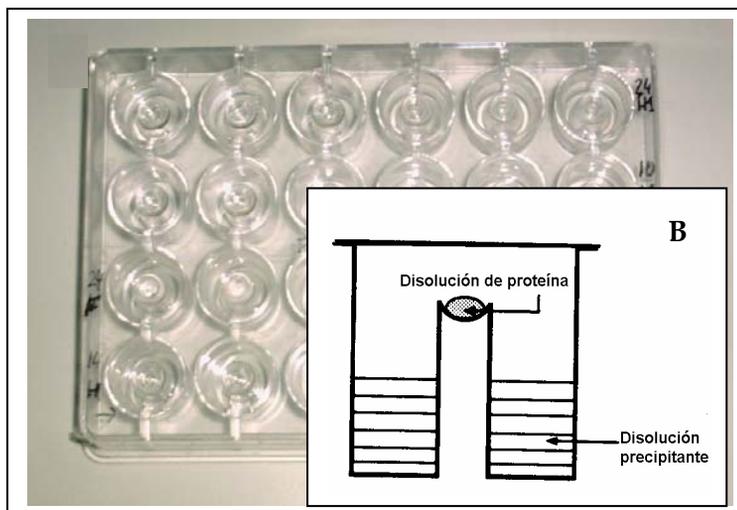


Figura 10. Metodología empleada para la cristalización. **A.** Placa de 6 x 4 pocillos. En cada pocillo se ensayan diferentes condiciones de cristalización. **B.** Representación gráfica de un pocillo de la placa. En el depósito del fondo se añaden 0.5 mL de solución precipitante a ensayar. En la concavidad superior del cilindro central se deposita la muestra de proteína concentrada y se diluye con un volumen igual de la disolución precipitante (disolución de proteína). Tras añadir las muestras, la placa se cierra y se mantiene a 37°C.

XIII. Herramientas de bioinformática

En este trabajo se hace uso de herramientas computacionales. Estas se han convertido hoy en día en imprescindibles para el trabajo del biólogo molecular, y han avanzado tanto en los últimos años que sus resultados, en muchos casos, pueden ser considerados casi con el mismo nivel de confianza que un resultado experimental. En cualquier caso, la utilidad principal de los modelos informáticos no es confirmar, sino sugerir. Los cálculos teóricos, las simulaciones por ordenador y las comparaciones de secuencias y estructuras tienen su máximo valor a la hora de proporcionar ideas que, después, puedan ser comprobadas mediante métodos experimentales.

Se pueden dividir las herramientas bioinformáticas, empleadas a lo largo de este trabajo en tres grupos:

- ✓ Bases de datos con información actualizada que nos han aportado información de interés (secuencias de aminoácidos o nucleótidos, estructuras resueltas, secuencias promotoras y bibliografía).
- ✓ Programas de análisis de secuencias y estudios filogenéticos. Nos permiten realizar alineamientos de secuencias, búsquedas comparativas o construcción de árboles filogenéticos.
- ✓ Programas de representación y modelización de estructuras moleculares. Estos programas nos permiten visualizar estructuras tridimensionales de proteínas o ácidos nucleicos e, incluso, modelizar tridimensionalmente secuencias aminoacídicas.

A continuación describimos los diferentes programas utilizados en el laboratorio, separando los utilizados a través de la red y los que se usan vía Internet.

a. Programas y bases de datos disponibles a través de la red

Son utilizados accediendo a la página web, donde se encuentran ubicados los diferentes programas. En ocasiones es necesario el empleo de estas herramientas porque las operaciones biocomputacionales a realizar son de tal envergadura que se precisa de grandes computadoras.

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). Programa de alineamientos utilizados para la búsqueda de similaridad de secuencias, con secuencias de bancos de datos no redundantes.

ClustalW y **Align** (<http://www.ebi.ac.uk/services/index.html>). Programas diseñados para el alineamiento de secuencias aminoacídicas o nucleotídicas. ClustalW permite alineamientos múltiples.

SWISS-MODEL (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>) (Guex y Peitsch, 1997). Es un programa de modelización molecular (*threading*) de uso público, que está localizado en el GLAXO Institute for Molecular Biology (GIMB) de Ginebra. Los programas de *threading* permiten modelar una secuencia de aminoácidos sobre estructuras tridimensionales próximas, conocidas experimentalmente y almacenadas en la base de datos del Protein Data Bank. El usuario únicamente debe introducir la secuencia de la proteína que desea modelar. El programa se encarga de alinearla con las secuencias cuyas estructuras existan en el Protein Data Bank que más identidad guarden con la secuencia problema. Una vez concluido el alineamiento, el programa sustituye los aminoácidos de la estructura por los de la secuencia problema, tras lo cuál realiza una etapa de optimización energética para dar lugar a un modelo teórico mejorado. El resultado es enviado al usuario por correo electrónico en forma de fichero de texto, con las coordenadas atómicas del modelo en formato PDB (el mismo formato que se emplea para almacenar en el Protein Data Bank las estructuras reales obtenidas por RMN o difracción de rayos X). Los resultados son tanto más confiables cuanto mayor sea la identidad de la proteína problema con las proteínas sobre cuyas secuencias se ha modelado, y cuanto más conservada esté la estructura tridimensional en la familia de proteínas a la que pertenece la molécula problema.

En este trabajo SWISS-MODEL ha sido empleado para obtener los modelos teóricos de las tiorredoxinas h1 y h2 de guisante, cuyas estructuras no se conocen experimentalmente, pero cuyas secuencias guardan una homología adecuada con las tiorredoxinas de *E. coli*, humana y de *Chlamydomonas*, contenidas en el banco de datos.

ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>). Se trata en realidad de un conjunto de bancos de datos (incluyendo el famoso GenBank, la mayor base de datos de secuencias de ADN del mundo), accesibles desde una única

herramienta de búsqueda, localizada en el National Center for Biotechnology Information, un anexo de la National Library of Medicine en Bethesda, Maryland, que también mantiene la conocida base de datos MEDLINE de bibliografía biomédica. Permite la búsqueda de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, así como de estructuras.

The ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server (<http://www.expasy.org/>). El Instituto suizo de bioinformática (SIB) presenta esta página que está dedicada al análisis de secuencias de proteína, estructuras tridimensionales y análisis 2D. Se empleó principalmente para el estudio predictivo de las secuencias aminoacídicas de las dos Trxs citosólicas.

CODON USAGE DATABASE (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Base de datos que nos ha permitido conocer preferencias codónicas de guisante con una alta fiabilidad.

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE>). Programa de búsqueda de elementos de regulación cis en secuencias de ADN de plantas (Higo *et al.*, 1999)

EBI (<http://www.ebi.ac.uk>). El instituto europeo de bioinformática (EBI) es una organización académica que forma parte del laboratorio europeo de biología molecular (EMBL). Es un centro para la búsqueda y el apoyo a la bioinformática que controla bases de datos biológicos, incluidos ácidos nucleicos, secuencias de proteínas y estructuras macromoleculares. En sus servicios de enlace dispone de una amplia variedad de programas bioinformáticas para el análisis de secuencias. También dispone de una amplia variedad de bases de datos biológicas y bibliográficas, que han resultado muy útiles para el desarrollo de este trabajo.

b. Programas disponibles en el laboratorio

Son utilizados desde las computadoras del laboratorio, bien por su libre distribución en Internet, bien por la compra del programa y los derechos de utilización.

Antheprot V5.0 y **Anthenuc V2.0** (disponibles en <ftp://ibcp.fr/pub>). Estos dos programas han sido utilizados para la realización de alineamientos rutinarios, simples o múltiples, para aminoácidos o nucleótidos, respectivamente. Ambos programas permiten una variedad de funciones, además de los alineamientos. Pueden ser descargados de forma gratuita desde la dirección indicada.

Chromas V1.45 (disponible en <http://www.technelysium.com.au/>). Este software ha sido utilizado para el análisis de cromatogramas resultantes de las secuenciaciones. Es una versión gratuita

Sequencher 3.0. Es utilizado para la lectura de cromatogramas, e interpretación de resultados de la secuenciación. Es una herramienta muy potente para esta función, permitiendo comparar más de dos cromatogramas al mismo tiempo. Es una versión de pago.

Sequin (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>). Herramienta diseñada por el NCBI para el envío y la actualización de secuencias a los bancos de secuencias GenBank, EMBL, y DDBJ.

Swiss-PdbViewer V3.7b2 (<http://www.expasy.org/swissmod/SWISS-MODEL.html>). Herramienta informática para visualizar y manipular estructura de macromoléculas resueltas y modelizadas. Es uno de los programas de visualización que más versatilidad y posibilidad ofrece de los distribuidos por la red de forma gratuita.

RESULTADOS

I. Caracterización génica de dos tiorredoxinas tipo *h* de *Pisum sativum*

El objetivo principal de este trabajo ha sido la caracterización de Trxs citosólicas de guisante. La experiencia y material disponible en nuestro laboratorio nos permitió enfocar el estudio desde el punto de vista molecular de la genética reversa, es decir, desde la estructura génica hasta un nivel proteínico-funcional. Por tal razón, lo primero que realizamos fue la búsqueda de las secuencias nucleicas que codifican para este tipo de proteínas en guisante.

a. Obtención del ADNc correspondiente a dos tiorredoxinas tipo *h* en guisante.

Para conocer las secuencias codificantes de Trxs citosólicas de guisante empleamos técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que nos permitió la obtención de secuencias correspondientes a dos *Trxs* tipo *h*.

Para esta etapa, el material de partida fue generalmente el ARNm, ya que su empleo permite el estudio de secuencias codificantes sin el problema presentado por los intrones, presentes en las secuencias genómicas.

La estrategia a seguir consistió en la amplificación parcial de diferentes fragmentos solapantes de moléculas de ácidos nucleicos.

i) Amplificación del fragmento central de dos *Trxs h* de guisante

El primer problema al que nos enfrentamos fue el diseño de oligos que sirvieran para amplificar fragmentos de *Trxs h* de guisante, no conocidas. Para tal proyecto decidimos recopilar secuencias codificantes de *Trxs h* de especies filogenéticamente afines al guisante, disponibles en la base de datos de PubMed. Por medio del alineamiento de estas secuencias (Fig. 1), conseguimos reconocer

zonas conservadas, y específicas de este subgrupo, que nos permitió diseñar oligos heterólogos, dos directos: ThN (correspondiente a la secuencia -MAAEEGVI-, sobre fondo amarillo) y Th2N (secuencia -EEGQVIACH-, letra azul); y dos reversos: oligo Th2C (secuencia -DKVVGAKKEE-, fondo rojo) y ThC (secuencia -GAAKEEI-, letra verde).

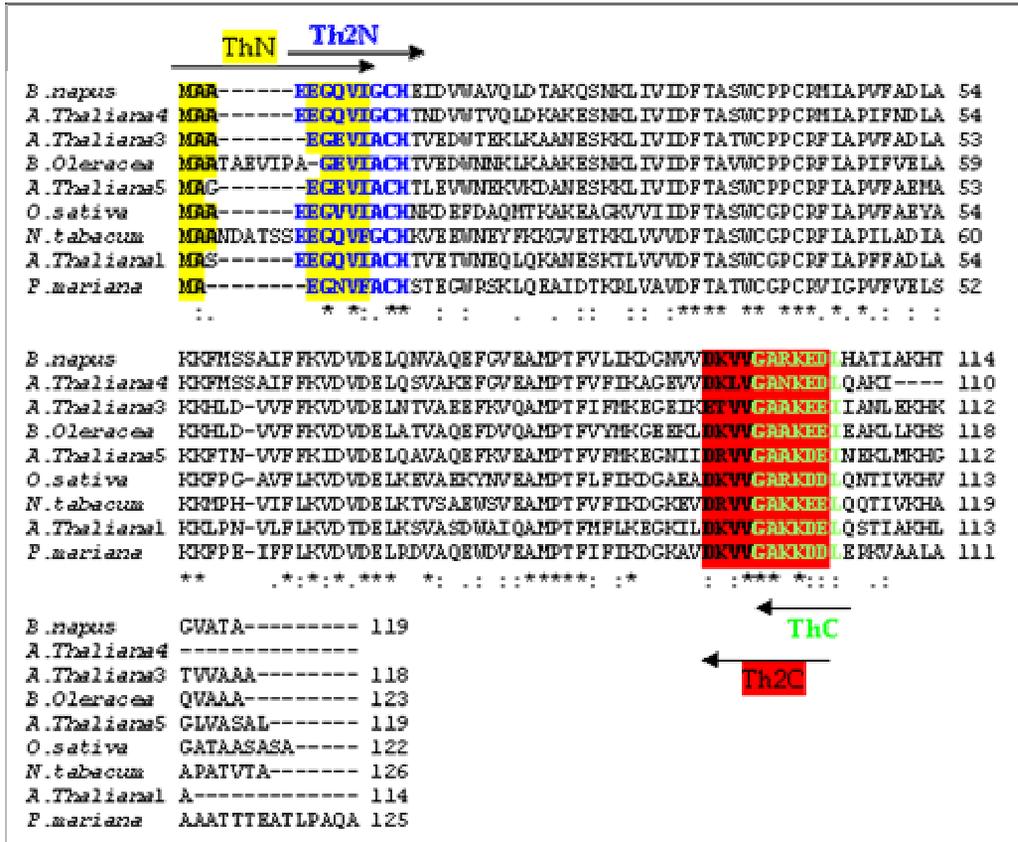


Figura 1. Alineamiento aminoacídico de algunas Trxs h disponibles en la red. *B. napus* (U59380), *A. thaliana* 4 (U35828), *A. thaliana* 3 (U35640), *B. oleracea* (X89759), *A. thaliana* 5 (U35829), *O. sativa* (U92541), *N. tabacum* (X58527) y *A. thaliana* 1 (U35827), *P. mariana* (AF051206). (*): residuos idénticos, (:) sustitución conservativa, (.) sustitución semi-conservativa. “CLUSTAL W (1.82) multiple sequence alignment”; (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>).

Como último paso para el diseño de los oligos era necesaria la traducción de las secuencias aminoacídicas a nucleótidos. La degeneración del código

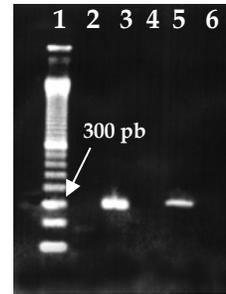
genético nos obligó a la síntesis de oligos heterólogos para los que se tuvieron en cuenta, entre otras cosas, la preferencia codónica de *P. sativum* (Fig. 2).

<i>Pisum sativum</i> [gbph]: 693 CDS's (272843 codons)			
fields: (triplet) (frequency: per thousand) (number)			
UUU 24.0 (6554)	UCU 21.9 (5987)	UAU 18.2 (4975)	UGU 9.3 (2544)
UUC 18.2 (4966)	UCC 10.4 (2847)	UAC 12.8 (3489)	UGC 6.2 (1678)
UUA 11.8 (3233)	UCA 17.8 (4866)	UAA 1.1 (299)	UGA 0.9 (238)
UUG 22.5 (6151)	UCG 5.1 (1403)	UAG 0.5 (149)	UGG 11.3 (3076)
CUU 25.0 (6818)	CCU 19.9 (5433)	CAU 14.2 (3886)	CGU 8.2 (2225)
CUC 13.1 (3568)	CCC 6.2 (1682)	CAC 8.4 (2300)	CCG 4.1 (1113)
CUA 8.9 (2427)	CCA 19.0 (5176)	CAA 20.9 (5697)	CGA 4.4 (1195)
CUG 7.9 (2163)	CCG 5.5 (1488)	CAG 13.5 (3688)	CCG 2.9 (784)
AUU 28.0 (7635)	ACU 20.9 (5702)	AAU 26.0 (7101)	AGU 14.0 (3812)
AUC 14.9 (4075)	ACC 12.3 (3359)	AAC 20.0 (5454)	AGC 8.6 (2357)
AUA 13.1 (3566)	ACA 17.5 (4769)	AAA 31.9 (8692)	AGA 16.4 (4487)
AUG 21.5 (5860)	ACG 4.1 (1115)	AAG 34.5 (9424)	AGG 10.9 (2984)
GUU 32.1 (8760)	GCU 32.3 (8823)	GAU 38.3 (10457)	GGU 26.8 (7323)
GUC 10.1 (2743)	GCC 11.2 (3053)	GAC 15.9 (4329)	GGC 9.7 (2647)
GUA 9.7 (2651)	GCA 22.4 (6103)	GAA 36.5 (9951)	GGA 25.9 (7080)
GUG 16.7 (4557)	GCG 5.8 (1574)	GAG 28.3 (7731)	GGG 9.4 (2571)
Coding GC 43.23% 1st letter GC 51.31% 2nd letter GC 40.13% 3rd letter GC 38.26%			

Figura 2. Preferencia codónica de *P. sativum*. El número que acompaña a cada triplete significa la frecuencia en tanto por mil (%) que posee éste en el conjunto de los 64 totales. Por ejemplo, el triplete “AAA” se presenta en guisante con una frecuencia del 31.9% (<http://www.kazusa.or.jp/codon>).

Los oligos diseñados fueron empleados en la amplificación por RT-PCR, sobre ARNm de hojas de guisante, de fragmentos de *Trxs h*. Según las condiciones descritas en la figura 3, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 300 pbs cada uno. Los resultados de las secuenciaciones revelaron que las secuencias resultantes poseían 303 (calle 3, fragmento Th2N/Th2C) y 309 pbs (calle 5, fragmento ThN/Th2c) cada una.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 2% resultado de la amplificación por RT-PCR. Calle 1: marcador molecular, 2: ThN/ThC, 3: Th2N/Th2C, 4: Th2N/ThC, 5: ThN/Th2C y 6: control sin ARNm. Las condiciones de la RT-PCR fueron: 48°C/45 min, 94°C/2 min, 45 ciclos de [94°C/30 s, X°C/1 min, 68°C/ 30s], 68°C/7 min y 4°C/ hasta recogida. X= 55°C para las calles 2, 4 y 6; X= 70°C para las calles 3 y 5.



El envío de ambas secuencias traducidas a la base de datos permitió la búsqueda de homologías entre éstas y la base de datos de proteínas. Los mayores parentescos, en ambos casos, coincidían en primer lugar con varias Trxs *h* de plantas superiores presentes en la red, pudiendo así identificar nuestras secuencias como fragmentos centrales de dos Trxs citosólicas de guisante. Ambas secuencias aminoacídicas presentaron gran similitud entre ellas y mostraron el centro activo típico de las Trxs -WCGPC- (Fig. 4).



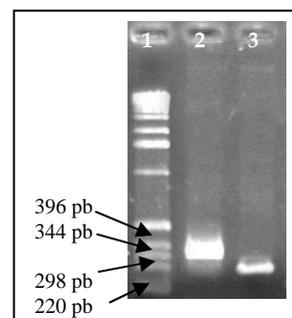
Figura 4. Alineamiento de los dos fragmentos obtenidos por RT-PCR. El fragmento Th2N/Th2C (1) y el ThN/Th2C (2) poseen una identidad del 68% y una similitud del 83.5%. Ambos fragmentos muestran altas homologías con las Trxs *h* de la base de datos. En rojo, se marcan los oligos empleados en la amplificación y en azul el centro activo de las Trxs -WCGPC-. (|): residuos idénticos, (:) sustitución conservativa, (.) sustitución semi-conservativa. Alineamiento simple (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>).

ii) Amplificación del extremo 3' de los ARNm.

Las secuencias 3' de cada uno de los ARNm fueron amplificadas por RT-PCR. Para ello se utilizó un oligo PolyT(A), y para cada uno de los fragmentos se diseñaron oligos específicos de las zonas conocidas. Para la secuencia de 303 pbs se diseñó el oligo Th3F, y para el fragmento de 309 pbs se diseñó el oligo Th4F.

Tras la RT-PCR se obtuvieron dos bandas, de aproximadamente 350 y 300 pbs (Fig. 5). Las secuenciaciones revelaron los extremos 3' de ambos ARNm, compuestos por las secuencias traducibles correspondientes a los extremos carboxilos de cada una de las proteínas, y los fragmentos 3'UTR de cada molécula. Los fragmentos constaron de 340 pbs para el fragmento Th3F/PolyT(A) y de 289 pbs para el Th4F/PolyT(A) (Fig. 6).

Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de la RT-PCR. Calle 1: marcador molecular, 2: Th3F/PolyT(A), y calle 3: Th4F/PolyT(A). Las condiciones de la RT-PCR fueron: 48°C/45 min, 94°C/2 min, 45 ciclos de [94°C/30 s, 58°C/1 min, 68°C/ 30s], 68°C/7 min y 4°C/ hasta recogida.



1) **Th3F/polyT(A)**

FVFVKEG**T**ILGK**V**VGAKKEEL**Q**QTIERHVASSNA**Tga**tttttggttggtggttggttagcagcttcatctt
 caaagactaaataaataaactgtgatggtatcctttgcttccattggttgggatatcttgattggat
 gttatgtctttttattgcaccttagagctttattctcgtcttaaataatggtggaggatgatggtattac
 tatggattccctaattgacaacatgaacttctcttcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

2) **Th4F/polyT(A)**

FLLLKEGMEVDK**V**VGAKKEEL**Q**LAI**T**KHAT**V**ATA**ga**agtatcatatcaagatcatcaataacatagtg
 aactttttcgtgctgggtttgtggttttctgtatgcttgaaaataaatttaggcacattattggcctact
 tcaaatgactattattgactaaaagatatttgtatgaaaatgcatgattggttgaaaaaaaaaaaaaaaa
 aaaaa

Figura 6. Extermos carboxilos de ambas proteínas traducidas (rojo) y fragmentos 3'UTR de los respectivos ARNm. En negrita se marcan los oligos homólogos empleados en las amplificaciones. Se pueden apreciar las señales de parada de la traducción en azul.

iii) Amplificación del extremo 5' del gen de ambas Trxs por PCR-Walking

Para obtener la secuencia completa del ORF, para cada uno de los mensajeros y, por consiguiente, conocer ambas secuencias proteínicas al completo, sólo nos restaba conocer los extremos 5' de cada secuencia ribonucleotídica. Para ello empleamos la técnica del PCR-Walking que nos permite "caminar" sobre el ADN genómico (ADNg) sin necesidad de utilizar un segundo oligonucleótido específico. Diseñamos dos parejas de oligos homólogos, y reversos, para cada una de las secuencias a estudiar. Los oligos Th4RN y Th3R sirvieron para reamplificar dos fragmentos de ADNg solapantes con la secuencia Th2N/Th2C, obteniéndose dos fragmentos, uno de aproximadamente 1 kbs y el otro de 400 pbs. Ambos resultaron ser las secuencias buscadas en 5'-Upstream correspondientes a ese fragmento (Fig. 7). Para amplificar el extremo 5' del fragmento Th2N/ThC se diseñaron los oligos específicos PsW1 y PsW2. Las dos reacciones consecutivas consiguieron reamplificar varios fragmentos que fueron secuenciados y sólo uno de ellos correspondía al extremo 5' del ARNm, de aproximadamente 300 pbs (Fig. 8).

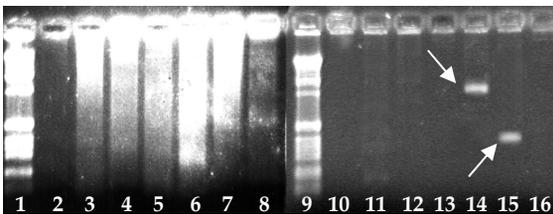
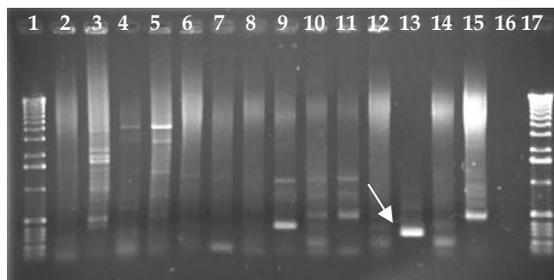


Figura 7. Electroforesis de agarosa al 1.5%. Resultado del PCR-Walking I (calles 2-8) y II (calles 10-16). Calle 1 y 9: Marcadores moleculares; 2 y 10: PCRWI y II respectivamente, utilizando como molde banco de ADN DraI; 3 y 11:

igual pero con banco EcoRV; 4 y 12: HpaI; 5 y 13: PvuI; 6 y 14: ScaI; 7 y 15: SspI; 8 y 16: StuI. Las condiciones del PCRWI (Ap1/Th4RN) fueron: 94°C/2 min, 32x [94°C/1 min, 56°C/1 min, 65°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. Las condiciones del PCRWII fueron: 94°C/1 min, 7x [94°C/1 min, 72°C/4 min], 32x [94°C/1 min, 62°C/45 s, 72°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. Condiciones de PCRWII (Th3R/ Ap2): 94°C/2 min, 30x [94°C/1 min, 55°C/1 min, 65°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. Las flechas indican los fragmentos que fueron secuenciados que resultaron ser las secuencias buscadas.

Figura 8. Electroforesis de agarosa al 1.5%. Resultado del PCR-Walking I y II. Calle 1 y 17: Marcadores moleculares; 2 y 3: PCRWI y II, respectivamente utilizando como molde banco de ADN *ScaI*; 4 y 5: igual pero con banco *PvuI*; 6 y 7: *SspI*; 8 y 9: *HpaI*; 10 y 11: *StuI*; 12 y 13: *DraI*; 14 y 15: *EcoRV*; 16: control negativo sin oligos.



Las condiciones del PCRWI (*Ap1/Psw2*) fueron: 94°C/1 min, 7x [94°C/1 min, 72°C/4 min], 32x [94°C/1 min, 62°C/45 s, 72°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. Las condiciones del PCRWII fueron: 94°C/1 min, 7x [94°C/1 min, 72°C/4 min], 32x [94°C/1 min, 62°C/45 s, 72°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. Condiciones de PCRWII (*Psw1/Ap2*): 94°C/1 min, 5x [94°C/1 min, 72°C/4 min], 27x [94°C/1 min, 62°C/45 s, 72°C/4 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida. La flecha indica el fragmento que fue secuenciado.

iv) Reconstrucción del ORF final para ambos genes

A partir de los resultados obtenidos se pudieron reconstruir las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas definitivas para ambas *Trxs* citosólicas, que fueron denominadas como *TRX h1* ó *PsTRXh1* (cuyo fragmento central coincide con el fragmento *Th2N/Th2C*) y *TRX h2* ó *PsTRXh2* (*Th2N/ThC*). En la figura 9 se muestran las secuencias completas de ambas *Trxs* citosólicas con sus correspondientes traducciones aminoacídicas.



Figura 9. Secuencias nucleotídicas codificantes de las Trxs h1 y h2 de guisante y sus traducciones correspondientes. Se indica el número de acceso con el cual se encuentran identificadas ambas secuencias en la base de datos.

b. Amplificación de las secuencias genómicas codificantes de las Trxs citosólicas *h1* y *h2* de guisante

La presencia y ubicación de secuencias intrónicas en los genes de *Trxs* está altamente conservada dentro de cada subtipo de *Trx*, por ello, el estudio de sus secuencias genómicas nos ayuda a clasificarla como perteneciente a un subgrupo determinado (Sahrawy, 1997).

Las parejas de oligos *PeahN/PeahC* y *Peah2N/Peah2C* coinciden con el inicio y final del ORF de ambas *Trxs* y fueron diseñados para reamplificar las secuencias genómicas, *PsTRXh1* y *PsTRXh2*, respectivamente (Fig. 10).

Las secuencias amplificadas (Fig. 10) fueron clonadas en pGem-T y secuenciadas por ambas hebras. Ambas secuencias poseen dos intrones en la misma posición aminoacídica (24 y 66, numeración según la *Trx* de *E.coli*) que están conservadas en las *Trxs* citosólicas de plantas superiores (Fig. 11 A). La *TRX h1* posee una secuencia codificante de 1689 pb, con un tamaño de intrones de 1236 y 90 pb cada uno (Exón 1: 1..96, Intrón 1: 97-1332, Exón 2: 1333..1455, Intrón 2: 1456-1545, Exón 3: 1546..1689). *PsTRXh2* posee una secuencia de 897 pb (Exón 1: 1..87, Intrón 1: 88-408, Exón 2: 409..531, Intrón 2: 532-750, Exón 3: 751..897) con dos intrones de 321 y 219 pb (Fig. 11 B). En la figura x, se muestran las secuencias intrónicas de ambas *Trxs* citosólicas.

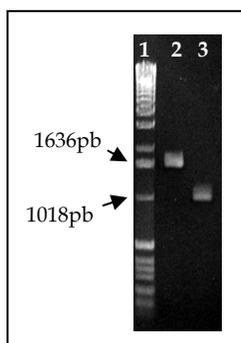


Figura 10. Electroforesis de agarosa al 1.5%, resultado de la PCR para reamplificar las secuencias genómicas de ambas *Trxs* citosólicas. Electroforesis de agarosa al 1.5%. Calle 1: marcador molecular, 2: oligos *PeahN/PeahC*, y 3: oligos *Peah2N/Peah2C*. En ambos casos se utilizaron ADN_g extraído por el método del CTAB. Las condiciones del PCR fueron: 94°C/2 min, 35x [94°C/30s, 65°C/1 min, 72°C/1.5 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida.

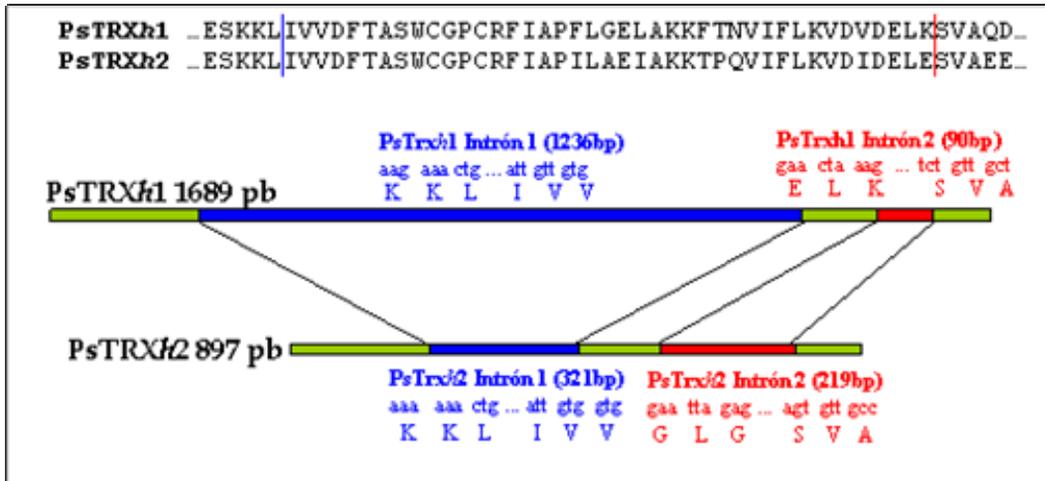


Figura 11. Posición de las secuencias intrónicas de *TRX h1* (*PsTRXh1*) y *TRX h2* (*PsTRXh2*) de guisante. **A:** Secuencias aminoacídicas centrales de ambas Trxs. Las líneas transversales representan las dos posiciones intrónicas. En azul el intrón 1 y en rojo el intrón 2. **B:** Esquema representativo de los intrones y exones de los genes de ambas Trxs citosólicas. En azul todo lo relativo al intrón 1 (tamaño, lugar de inserción nucleotídica y aminoácidos correspondientes), en rojo todo lo relativo al segundo intrón.

c. Descripción y estudio comparativo de las secuencias nucleotídicas

Una vez obtenidas las secuencias nucleotídicas de las 2 *Trxs* tipo *h* de guisante, pasamos a describirlas y compararlas. Además, se realizaron comparaciones con las secuencias de las *Trxs h3* y *h4* de guisante, descritas recientemente en la bibliografía.

i) Estudio de las secuencias nucleotídicas traducibles

En la figura 12, se muestran las secuencias nucleotídicas que codifican para las dos *Trxs* de guisante objeto de nuestro trabajo (*h1* y *h2*), junto a las *Trxs h3* y *h4*, ya descritas. Las secuencias de *h1* y *h2* comparten una homología del 66%. Cuando se las compara con las secuencias correspondientes de las *TRXs h3* y *h4* obtenemos, para *h1* una homología del 72% con *h3* y del 43% con *h4*. Los valores correspondientes para el ORF de *PsTRXh2* son del 74% y del 42%, con las *h3* y *h4* respectivamente.

ii) Estudio de las secuencias de ARNm no codificantes en 3'

El alineamiento de las secuencias 3'-UTR (no se muestra) de las cuatro *Trxs* citosólicas de guisante mostraron las siguientes homologías: 3'-UTR-*h1* comparte 40.4%, 44.6% y 35.6% frente a 3'-UTR *h2*, *h3* y *h4* respectivamente; 3'-UTR *h2* comparte un 39.6% con la secuencia correspondiente de *h3* y 46.5% con la de *h4*; *h3* y *h4* presentan entre ellas un 26.6% de homología.

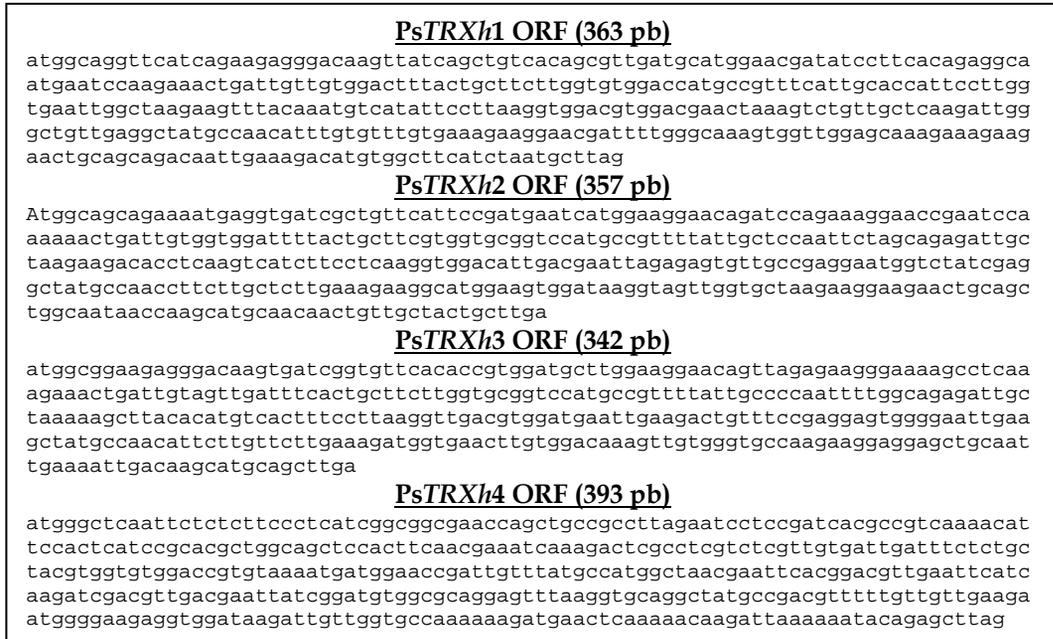


Figura 12. Secuencias nucleotídicas codificantes de las Trxs *h* de guisante

iii) Estudio de las secuencias génicas 5'-upstream: 5'-UTR y posibles secuencias reguladoras.

Las secuencias nucleotídicas 5'-UTR del ARNm y las secuencias reguladoras fueron amplificadas por PCR-Walking de forma conjunta. Éstas fueron enviadas y comparadas con los “elementos” existentes en la base de datos PLACE. En ésta se depositan los elementos reguladores en cis (secuencias nucleotídicas o “cajas” en 5'-upstream) de ADN de plantas que han sido previamente descritos, por medio de estudios moleculares.

El alineamiento de las secuencias en 5' de ambos genes no mostraron semejanzas significativas. Sin embargo, los resultados de la comparación con la base de datos de secuencias reguladoras mostraron una gran cantidad de posibles elementos presentes, de 4 a 8pb de longitud. Toda la información obtenida por medio de estos estudios comparativos aportan una información

predictiva, debiéndose tener en cuenta, además, la posibilidad de la existencia de estas cajas por un hecho puramente aleatorio. Por estas razones, solo nombraremos algunos elementos, bien porque otros datos experimentales corroboran su posible papel como secuencia reguladora, o bien, porque se repiten en un número significativamente mayor del que se esperaría de una forma puramente aleatoria.

En las secuencias 5' de *PsTRXh1* (1037 pb) se encontraron numerosos elementos descritos en genes que están involucrados en la formación y desarrollo de la semilla. Este dato es relatado aquí debido a que las Trxs *h* han sido descritas como proteínas involucradas en el desarrollo de la semilla en multitud de ocasiones (ver funciones de las Trxs *h*). Se encontraron varios elementos reguladores descritos en genes de alfa y beta amilasa de varias especies:

Tabla 1. Posibles elementos reguladores presentes en la secuencia 5'-upstream de *PsTRXh1* descritos en genes amilolíticos de varias especies vegetales. El número de referencia permite acceder, a través de la base de datos a toda la bibliografía relativa al motivo (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

Elemento	Secuencia	Nº repeticiones	Referencia
AMYBOX1	taacara	2	S000020
MYBGAHV	taacaaa	2	S000181
POLASIG1	aataaa	8	S000080
PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	cctttt	1	S000259
SP8BFIBSP8BIB	tactatt	1	S000184
TATCCAOSAMY	tatcca	1	S000403

También, en relación a la semilla, se encontraron posibles elementos reguladores descritos en varias proteínas de almacenamiento de semilla de muchas especies vegetales (genes de alfa y beta-gliadinas, gluteninas, leguminas, napinas y conglucinas):

Tabla 2. Posibles elementos reguladores presentes en la secuencia 5'-upstream de PsTRXh1 descritos en genes codificantes de proteínas de almacenamiento. El número de referencia permite acceder, a través de la base de datos a toda la bibliografía relativa al motivo (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

Elemento	Secuencia	Nº repeticiones	Referencia
-300ELEMENT	tghaaark	1	S000122
AACACOREOSGLUB1	aacaaac	2	S000353
CAATBOX1	caat	2	S000028
EBOXBNNAPA	canntg	4	S000144
SEF1MOTIF	atatttaww	1	S000006
SEF3MOTIFGM	aacca	1	S000115
SEF4MOTIFGM7S	rttttr	7	S000103
SURE1STPAT21	aatagaaaa	1	S000186
TATABOX2	tataaat	2	S000109

Por otro lado, el resultado de estas comparaciones revelaron la existencia de potenciales elementos reguladores encontrados en muchos genes relacionados con diferentes tipos de estrés (hídrico, oxidativo, temperatura, luz, agentes patógenos) y senescencia en difentes plantas.

Tabla 3. Posibles elementos reguladores presentes en la secuencia 5'-upstream de PsTRXh1 descritos en genes relacionados con diferentes tipos de estrés. El número de referencia permite acceder, a través de la base de datos a toda la bibliografía relativa al motivo (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

Elemento	Secuencia	Nº repeticiones	Referencia
ABRELATERD1	ACGTG	1	S000414
ACGTATERD1	ACGT	6	S000415
CCAATBOX1	CCAAT	2	S000030
DOFCOREZM	AAAG	15	S000265
LTRE1HVBLT49	CCGAAA	1	S000250
MYB1AT	WAACCA	1	S000408
MYB2CONSENSUSAT	YAACKG	1	S000409
MYBCORE	CNGTTR	1	S000176
MYCCONSSENSUSAT	CANNTG	4	S000407
SEBFCONSSTPR10A	YTGTCWC	1	S000391
WBOXHVISO1	TGACT	1	S000442

Debido a otros resultados obtenidos en esta Tesis nos vemos obligados a considerar unos posibles motivos reguladores que determinan la expresión específica en determinadas células ó tejidos como el vascular, granos de polen o células de guardia de los estomas.

Tabla 4. Posibles elementos reguladores presentes en PsTRXh1, y descritos con la expresión específica en: Granos de polen, tejido vascular, células de guardia estomáticas. El número de referencia permite acceder, a través de la base de datos a toda la bibliografía relativa al motivo (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

Elemento	Secuencia	Nº repeticiones	Referencia
POLLEN1LELAT52	AGAAA	4	S000245
GTGANTG10	GTGA	8	S000378
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	12	S000098
TAAAGSTKST1	TAAAG	5	S000387

Por último, es interesante remarcar el gran número de posibles secuencias reguladoras presentes que se relacionan con genes cloroplastídicos y/o regulados por la luz

Tabla 5. Posibles elementos reguladores presentes en la secuencia 5'-upstream de PsTRXh1 descritos en genes regulados por la luz. El número de referencia permite acceder, a través de la base de datos a toda la bibliografía relativa al motivo (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>).

Elemento	Secuencia	Nº repeticiones	Referencia
-10PEHVPSBD	TATTCT	2	S000392
BOXIINTPATPB	ATAGAA	2	S000296
GATABOX	GATA	12	S000039
GT1CONSENSUS	GRWAAW	10	S000198
GT1CORE	GGTTAA	1	S000125
HDZIP2ATATHB2	TAATMATTA	1	S000373
IBOX	GATAAG	2	S000124
IBOXCORE	GATAA	4	S000199
IBOXCORENT	GATAAGR	1	S000424
INRNTPSADB	YTCANTYY	2	S000395
TBOXATGAPB	ACTTTG	1	S000383

Del análisis predictivo de las secuencias reguladoras en 5'-Upstream de PsTRXh2 (287 pb) se pueden destacar prácticamente los mismos elementos que para PsTRXh1. Además, encontramos secuencias descritas en genes regulados por hormonas, principalmente auxina, aunque también ácido salicílico y etileno.

iv) Estudio de las secuencias intrónicas

En la figura 13 se puede observar que los intrones descritos comienzan por la secuencias comunes a la mayoría de ellos, -gt- (5') y -ag- (3').

La secuencias intrónicas de ambas Trxs, h1 y h2, fueron alineadas entre ellas con el fin de estudiar algún patrón compartido, pero no se obtuvieron

semejanzas significativas. También se realizaron matrices de puntos con cada uno de los cuatro intrones con el fin de determinar la existencia de secuencias repetitivas dentro de cada una de ellas, de igual forma no se obtuvieron resultados significativos. Por último se realizó la búsqueda de homologías con la base de datos de ADN utilizando los programas FASTA y BLAST. En todos los casos se obtuvieron homologías de pequeños fragmentos, de no más de 30 nucleótidos que aparezcan con secuencias descritas como clones BAC de ADN, sin función conocida. Por esta razón no encontramos ningún dato significativo que aportar en este aspecto.

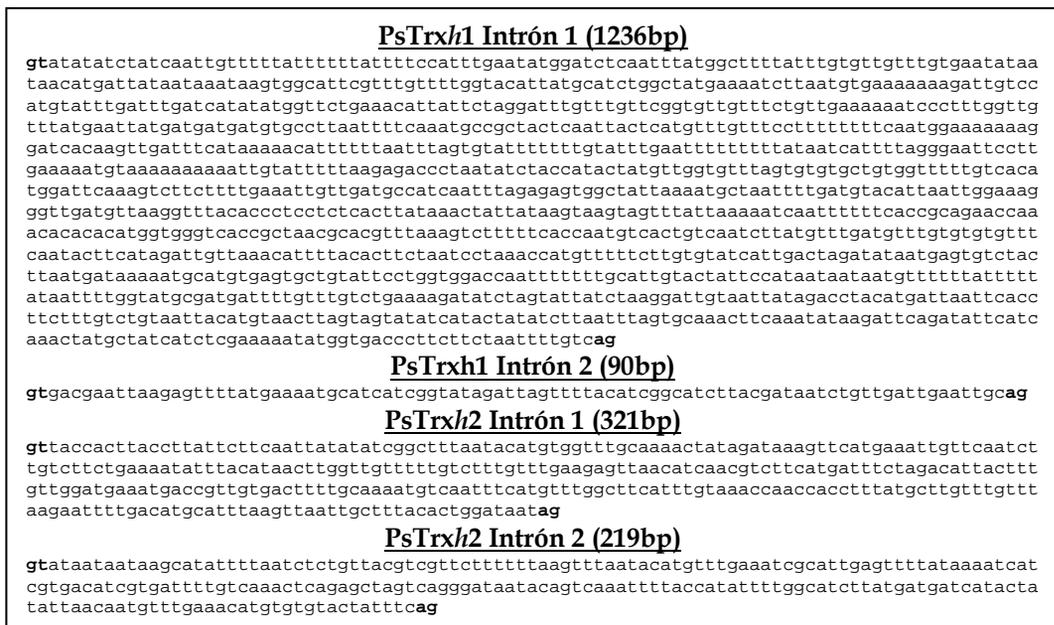


Figura 13. Secuencias intrónicas de PsTRXh1 y PsTRXh2.

II. Caracterización Proteínica

a. Caracterización aminoacídica de ambas Trxs citosólicas

Las secuencias aminoacídicas traducidas de las Trxs *h1* y *h2* de guisante se muestran en la figura 14, presentan todos los aminoácidos funcionales y estructurales para ser clasificadas como Trxs *h*. También presentan el centro activo -WCGPC- típico de la mayoría de las Trxs. En azul se marcan los aminoácidos presentes en todas las Trxs de plantas superiores, y en rojo se señalan los aminoácidos que discriminan a una Trx con tipo *h*.

El alineamiento entre las Trxs citosólicas de guisante (Fig. 15) muestra una homología del 60% entre PsTRX*h1* y PsTRX*h2*. PsTRX*h1* comparte un 68 y 40% frente a *h3* y *h4*, respectivamente, y PsTRX*h2* presenta valores del 75 y 43% frente a las mismas. La homología compartida entre PsTRX*h3* y PsTRX*h4* es del 46%. Estos datos revelan mayor proximidad entre las tres primeras frente a PsTRX*h4*, y especialmente entre PsTRX*h2* y PsTRX*h3*.

A continuación se muestran algunas características químicas predictivas, derivadas de sus composiciones aminoacídicas (Fig. 16). Ambas Trxs citosólicas poseen un peso molecular aproximado de 13 KDa. La proporción de aminoácidos apolares es muy parecida en ambas proteínas, sin embargo, PsTRX*h1* presenta una carga neta nula mientras su homóloga *h2* posee un valor de -5. Estos datos se traducen en un pI casi un punto más bajo en el caso de PsTRX*h2* (4.62).

A			B					
Aa	h1	h2		N° aa	ácidos	básicos	Carga neta	pI
Ala (A)	11	14	PsTRX <i>f</i>	109	15	16	+1	8.0
Cys (C)	3	2	PsTRX <i>m</i>	108	15	13	-2	5.4
Asp (D)	6	5	PSTRX <i>h1</i>	120	16	16	0	5.57
Glu (E)	10	15	PSTRX <i>h2</i>	118	20	15	-5	4.62
Phe (F)	7	4	Trx <i>E. coli</i>	109	16	11	-5	4.5
Gly (G)	8	4						
His (H)	3	2						
Ile (I)	7	10						
Lys (K)	10	12						
Leu (L)	8	9						
Met (M)	2	3						
Asn (N)	4	1						
Pro (P)	3	4						
Gln (Q)	4	4						
Arg (R)	3	1						
Ser (S)	9	6						
Thr (T)	5	8						
Val (V)	14	11						
Trp (W)	3	3						
Tyr (Y)	0	0						
Total	120	118						

C				
	KDa.	ϵ_{280} (L/mol/cm)	[] mol/L (DO ₂₈₀ =1)	[] g/L (DO ₂₈₀ =1)
PsTRX <i>h1</i>	13.196	16875	$5.93 \cdot 10^{-5}$	0.782
PsTRX <i>h2</i>	13.057	16750	$5.97 \cdot 10^{-5}$	0.78

Figura. 16. Características químicas predictivas de PsTRX*h1* y PsTRX*h2*. **A:** Composición aminoacídica de ambas Trxs. En negro se marcan los aminoácidos apolares, en verde polares sin carga, en rojo básicos y en azul ácidos. **B y C:** Algunos datos útiles extrapolados de su composición aminoacídica: Propiedades eléctricas, peso molecular, valor del coeficiente de extinción molar, etc. Se incluyen algunos datos de las Trxs *f* y *m1* de *P.sativum* y de la Trx de *E.coli*.

Para la determinación predictiva de la localización subcelular, utilizamos diferentes programas “online” (www.expasy.org) que predicen estadísticamente la existencia de péptidos de transito o dominios que dirigen las proteínas a los diferentes orgánulos (Psort, TargetP, ChloroP, MITOPROT, Predotar y PTS1). En ambas proteínas, todos los programas concluían afirmando la localización citoplásmica de ambas Trxs.

En el mismo portal se analizó la posibilidad de modificaciones post-traduccionales a través de diferentes programas (YingOYang, Sulfinator, DGPI, NMT, SUMOplot). Estos predicen la existencia de dominios o aminoácidos

susceptibles de ser fosforilados, glicosilados, sulfatados, etc. Las dos serinas iniciales de la molécula de PsTRXh1 -MAGSS-, presentan alta probabilidad (59% y 95%, respectivamente) de ser fosforiladas según el programa “NetPhos 2.0 Server”, especialmente la segunda (Fig. 17). Tanto PsTRXh1 como PsTRXh2 presentan dos dominios (Fig. 17) con alta posibilidad de ser reconocidas por proteínas SUMO-1. Estas proteínas son miembros de la superfamilia de las ubiquitinas y su funcionamiento en plantas ha sido puesto de manifiesto recientemente como moduladores reversibles e irreversibles de la función, localización y vida media de algunas proteínas (Viestra *et al.*, 1999).

La posibilidad de determinar estructuras tridimensionales predictivas por medio de programas informáticos se reserva para el apartado titulado “estructura tridimensional de Trxs de guisante”.

PsTRXh1	MAGSS	EEGQVISCHSVD	AWNDILHRGNES	KKLIVVDFTAS	WCGPCRFIAP
PsTRXh2	MAA---	ENEVI	AVHSDES	WKEQIQKGTES	KKLIVVDFTAS
		44.4%	90.6%		75.6%
PsTRXh1	FLGEL	<u>AKKF</u>	TNVIF	<u>LKVD</u>	VDELKSVAQD
PsTRXh2	ILAEIA	<u>KKTP</u>	QVIF	<u>LKVD</u>	IDELSVAE
		37.2%	90.6%		73.3%
		47.8%			
PsTRXh1	GAK	<u>KEEL</u>	QQTIERH---	VASSNA	
PsTRXh2	GAK	<u>KEEL</u>	QLAITKHATT	VATA	
		47.8%			

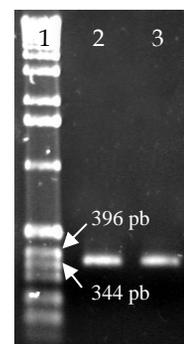
Figura 17. Secuencia de PsTRXh1 y PsTRXh2 susceptibles de ser modificadas post-traduccionalmente. En azul se marcan dos aminoácidos probables de ser fosforilados en PsTRXh1. En rojo las secuencias reconocidas por proteínas SUMO-1, se subraya el aa lisina principal responsable de la unión. El % de probabilidad de unión se indica al lado de cada dominio marcado.

b. Expresión y purificación de dos Trxs citosólicas recombinantes en *E. coli*.

Para la expresión heteróloga de las dos Trxs citosólicas de guisante, se utilizó el sistema pET, que produce grandes cantidades de proteína recombinante en *E. coli*.

Las secuencias nucleotídicas codificantes de PsTRXh1 y PsTRXh2, se amplificaron por RT-PCR, empleando las parejas de oligos PeahN/hC y Peah2N/h2C, respectivamente. Se utilizó ARNm de hojas de guisante (Fig. 18). Estos oligos están diseñados para incorporar en las hebras de ADN recién sintetizadas, las secuencias de restricción NcoI (PeahN y Peah2N) y BamHI (PeahC y Peah2C), a fin de facilitar los procesos de digestión y ligación dirigida. Las secuencias correspondientes a ambos ORFs se subclonaron tras la secuencia promotora de la polimerasa T7 en el vector pET-3d. Con esta construcción se transformó *E. coli* (BL21).

Figura 18. Electroforesis de agarosa al 1.5%. RT-PCR para reamplificar los ORFs de las dos Trxs citosólicas. Calle 1: marcador molecular, 2: oligos PeahN/PeahC, y 3: oligos Peah2N/Peah2C. En ambos casos se utilizaron ARNm de hojas de 15 días. Las condiciones de la PCR fueron: 94°C/2 min, 35x [94°C/30s, 65°C/1 min, 72°C/0.5 min], 72°C/10 min y 4°C hasta recogida.



En la figura 19 se aprecian los diferentes pasos de la purificación, visualizados por electroforesis SDS-PAGE, en condiciones reductoras. PsTRXh1 mostró una elevada termoestabilidad y alta resistencia a la precipitación por aumento de la fuerza iónica del medio, dando lugar a un protocolo rápido y muy eficiente, obteniéndose cantidades de hasta 10 mg de proteína, partiendo de un cultivo inicial de 3 L. PsTRXh2 fue expresada de forma más débil en *E. coli* y

durante los pasos iniciales de la purificación, parte de la proteína se perdía como cuerpo de inclusión (aproximadamente un 10-20%). Estos datos junto a su inestabilidad a temperaturas mayores de 50°C, dio lugar a un protocolo algo más complejo que produjo no más de 6 mg/3 L cultivo inicial.

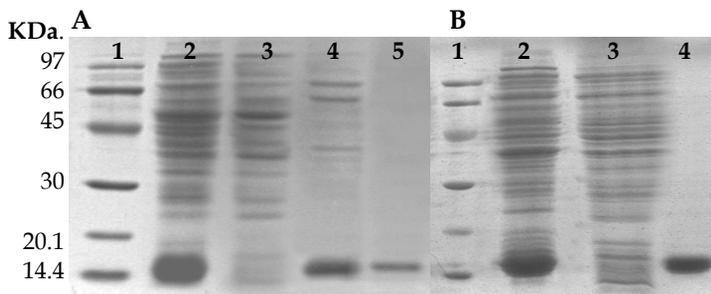


Figura 19. Electroforesis (SDS-PAGE) de los diferentes pasos de purificación de las dos Trxs citosólicas de guisante. **A. purificación de PsTRXh1:** calle 1: marcadores moleculares, pesos moleculares (KDa.); calle 2: extracto crudo de *E. coli* transformada con pET-3d-TRXh1; calle 3: extracto crudo de *E. coli* transformada con pET-3d; calle 4: extracto soluble de *E. coli* -pET-3d-TRXh1, tras calentar a 75°C, 10 min; calle 5: PsTRXh1, resultado de la unión de todas las fracciones de la salida de la columna de sephadex G-50. **B. purificación de PsTRXh2** calle 1: marcadores moleculares; calle 2: extracto crudo de *E. coli* transformada con pET-3d-TRXh2; calle 3: extracto crudo de *E. coli* transformada con pET-3d; Calle 4: PsTRXh2, resultado de la unión de todas las fracciones de la salida de la columna de sephadex G-50. En la purificación de esta proteína no se emplean calentamientos.

Tras estos pasos de purificación restaba la eliminación del ADN que permanecía en las muestras, éste poseía un tamaño muy pequeño, equivalente a proteínas de 11-14 KDa (8-12 pb). La eliminación se realizó a través de una columna de intercambio iónico de DEAE-celulosa, por gradiente de Na Cl (100-600 mM). Para visualizar las fracciones que contenían ADN y proteínas se realizaron electroforesis SDS-PAGE y de agarosa con las fracciones salientes de la columna cromatográfica. En ambos casos las Trxs eluían en las fases iniciales de

la cromatografía. El ADN queda fijado al polímero positivo, eliminándose cuando la fuerza iónica del NaCl es de 300-400 mM. En la figura 22 se muestra la eliminación del ADN para la muestra de PsTRXh1, para h2 fue muy parecido (Figura 20).

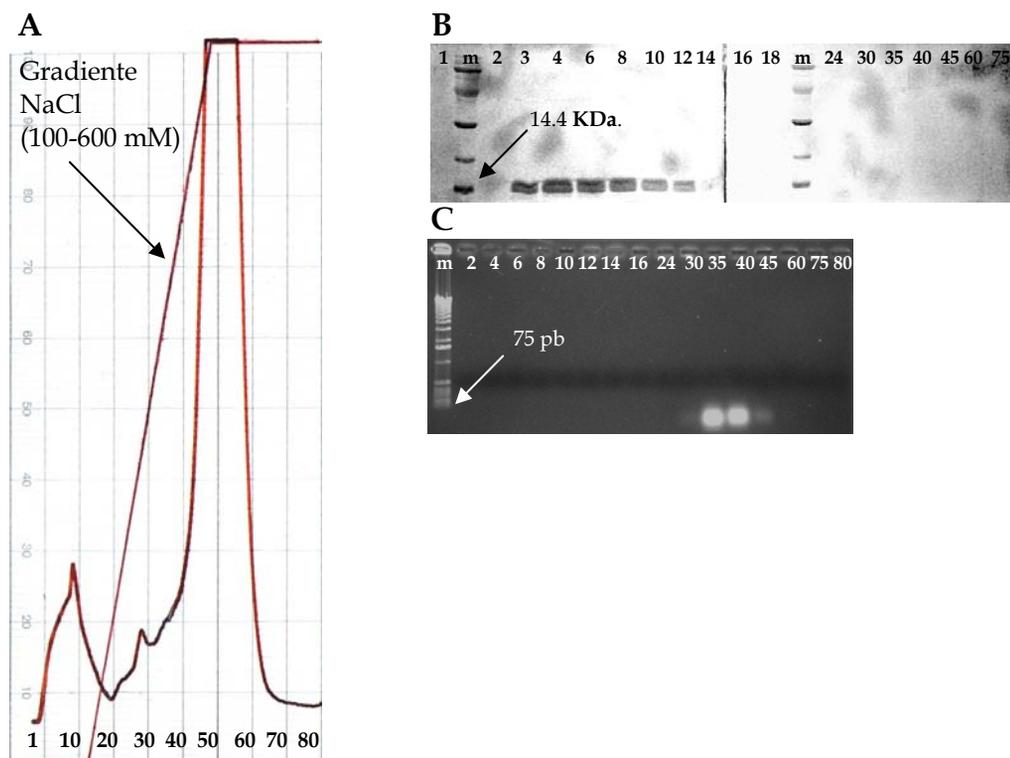


Figura 20. Eliminación del ADN contaminante de la muestra de PsTRXh1 por cromatografía de intercambio iónico. **A.** Cromatograma de la columna de DEAE-celulosa. Representa la medida espectrofotométrica de las fracciones salientes, el gradiente salino y la numeración de las fracciones. **B.** Electroforesis SDS-PAGE de las diferentes fracciones salientes, m: marcadores moleculares, el número superior representa la fracción cromatográfica. **C.** Electroforesis de agarosa (1.5%) para visualizar las fracciones que contenían el ADN, m: marcadores moleculares, el número superior representa la fracción.

En la figura 21 se aprecian las 4 Trxs de guisante purificadas. Las Trxs citosólicas poseen un peso molecular aproximado mostrando un patrón electroforético idéntico, aunque diferente al mostrado por las Trxs cloroplastídicas *m1* y *f*. La cantidad de proteína cargada nos permite apreciar el grado de pureza de estas Trxs recombinantes.

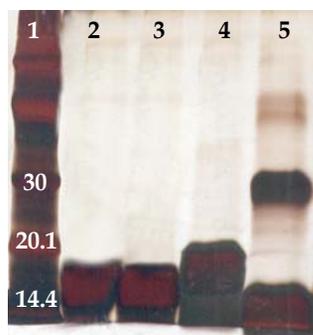


Figura 21. Electroforesis SDS-PAGE de las Trxs purificadas, teñida con plata. Calle 1: marcador molecular (KDa.); calle 2: PsTRX*h1*; calle 3: PsTRX*h2*; calle 4: PsTRX*m1*, calle5: PsTRX*f*. 12µg de cada una.

Para la obtención de anticuerpos policlonales anti-PsTRX*h1* y anti-PsTRX*h2* de guisante se utilizaron las muestras anteriores purificadas, con las que se inmunizaron conejos en el servicio de producción animal de la Universidad de Sevilla. La eficiencia y título de los anticuerpos se comprobó mediante análisis por western blot con las proteínas purificadas y con extractos de hojas maduras.

c. Actividad Trx por medio de medidas enzimáticas *in vitro*

i) Reducción de la insulina

Dentro de la caracterización proteínica, un aspecto importante es determinar la capacidad funcional de las proteínas recombinantes mediante ensayos *in vitro*. La capacidad de reducir las cadenas de insulina por DTT, es intrínseca a toda proteína con actividad Trx (Holgrem, 1979). Esta reducción produce un aumento de la turbidez del medio, lo cual se puede medir a 650 nm.

Las cuatro proteínas recombinantes demuestran su actividad Trx por medio de este ensayo, pero PsTRX $m1$ y PsTRX $h1$ son las que mayor capacidad de reducción presentan sobre la molécula de insulina (Fig. 22).

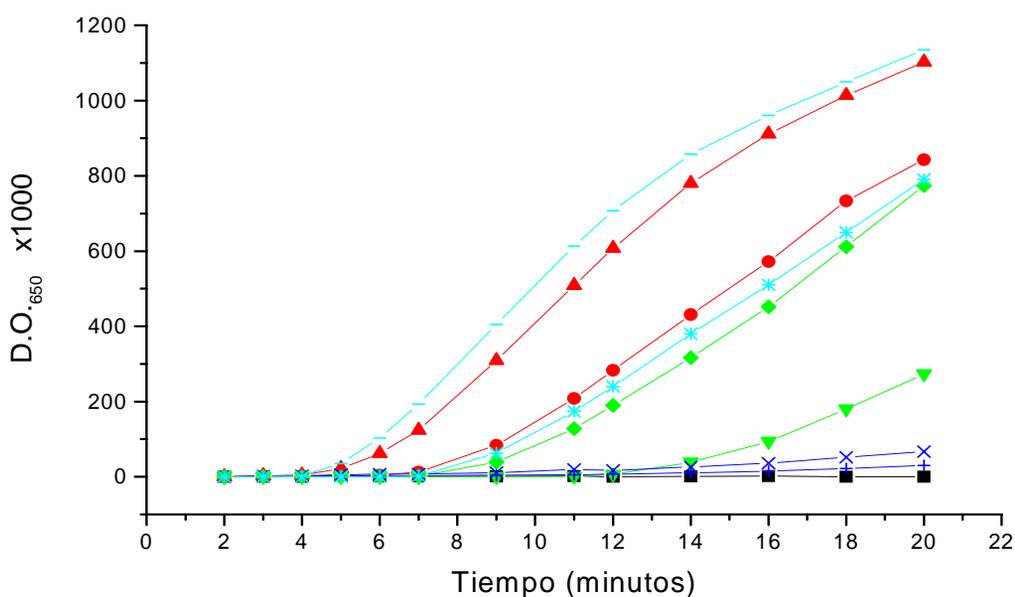


Figura 22. Actividad reductora de insulina por Trx y DTT. ▲: PsTRX $h1$, 5 mM, ●: PsTRX $h1$, 2.5 mM, ○: PsTRX $h2$, 5 mM, ▼: PsTRX $h2$, 2.5 mM, —: PsTRX $m1$, 5 mM, *: PsTRX $m1$, 2.5 mM, x: PsTRX f , 5 mM, +: PsTRX f , 2.5 mM, ■: sin Trx.

ii) Actividad FBPasa cloroplastídica dependiente de Trx

La actividad FBPasa dependiente de Trx fue ensayada con los siguientes resultados: Las dos Trxs cloroplastídicas poseen mayor eficiencia en la activación de esta proteína, especialmente PsTRXf, considerada su activador fisiológico; PsTRXh1 posee tal capacidad, aunque en menor grado que las dos cloroplastídicas. PsTRXh2, no solo no posee tal cualidad, sino que da lugar a un efecto inhibitorio sobre la FBPasa que presentando menor actividad que el control sin Trx (Fig. 23).

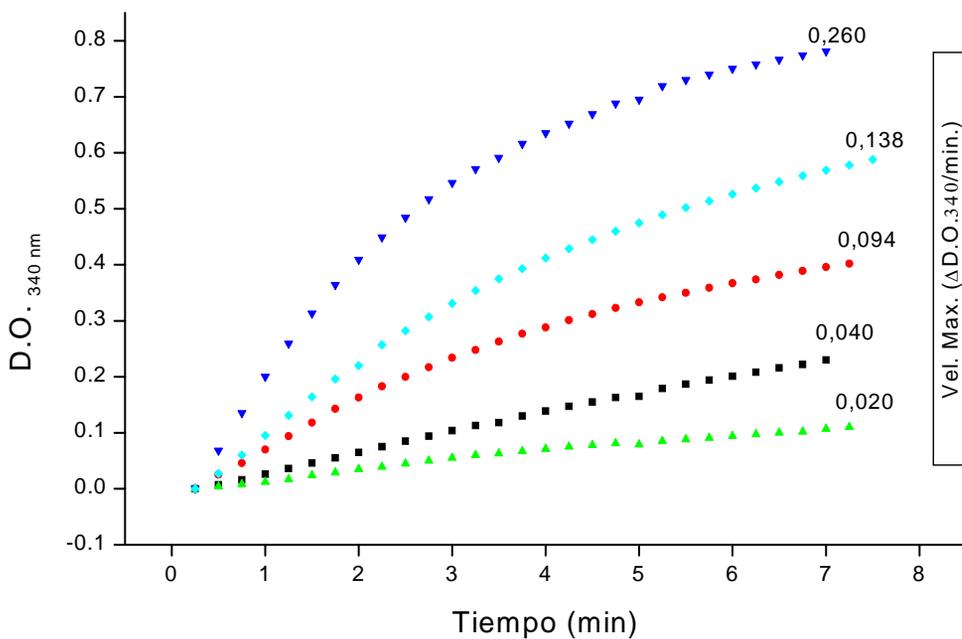


Figura 23. Capacidad de activación de la FBPasa cloroplastídica por Trxs. La actividad se realiza con 2.5 mM de cada Trx y 2.5 µg / ml de FBPasa. ▼: PsTRXf, ◆: PsTRXm1, ●: PsTRXh1, ▲: PsTRXh2, ■: sin Trx.

d. Estructura tridimensional de Trxs de guisante.

La estructura tridimensional supone un paso más en el conocimiento del modo de actuación de las Trxs de guisante. En las etapas finales de este trabajo se han iniciado experiencias para la resolución de las estructuras por medio de técnicas cristalográficas, aunque desde el principio realizamos modelos tridimensionales predictivos de conformación terciaria. Estos modelos están basados en la existencia de otras Trxs ya resueltas y disponibles en la base de datos, a través de la plataforma de "Swiss-Model" (Peitsch, 1995).

i) Estudios de modelización

López-Jaramillo (1995) ya obtuvo modelos teóricos para las tiorredoxinas *f* y *m* de guisante. Wangenstein *et al.* (2002) actualizó los modelos existentes gracias a la presencia de nuevas proteínas resueltas y más afines a las secuencias cloroplastídicas.

Para la modelización de las 2 Trxs citosólicas se utilizaron las coordenadas aportadas por las siguientes estructuras:

Para modelizar PsTRX $h1$: Trx humana mutada C73S (1ERV, resuelta por difracción de rayos X, 1996), Trx humana reducida (1ERT, rayos X, 1996), Trx humana oxidada (1AUC, rayos X, 1997), Trx humana oxidada (1ERU, rayos X, 1996).

Para modelizar PsTRX $h2$: Trx *h* de *Chlamydomonas reinhardtii* (1EP7A, rayos X, 2001), Trx *h* de *C. reinhardtii* (1EP7B, rayos X, 2001), Trx *h* oxidada de *C. reinhardtii* (1AUC, resuelta por RMN, 1997), Trx *h* de *C. reinhardtii* mutada D30A (1EP8A, rayos X, 2000).

Según nuestros modelos (Fig 24) , ambas Trxs están en concordancia con el típico “folding” de Trx. Están formadas por 5 hebras- β , que dan lugar a una clásica lámina- β “mezclada” y 4 helices- α que rodean la lámina. Se aprecia la sucesión típica a lo largo de la estructura secundaria: $\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$ y $\alpha 4$. Otro aspecto interesante es la posición del centro activo (Fig 25), la primera cisteína se encuentra en el bucle anterior a la hélice $\alpha 2$, y la segunda en el inicio de esta hélice. Esta posición es característica de las Trxs ya que dejan su centro activo en un surco o hendidura de la superficie molecular.

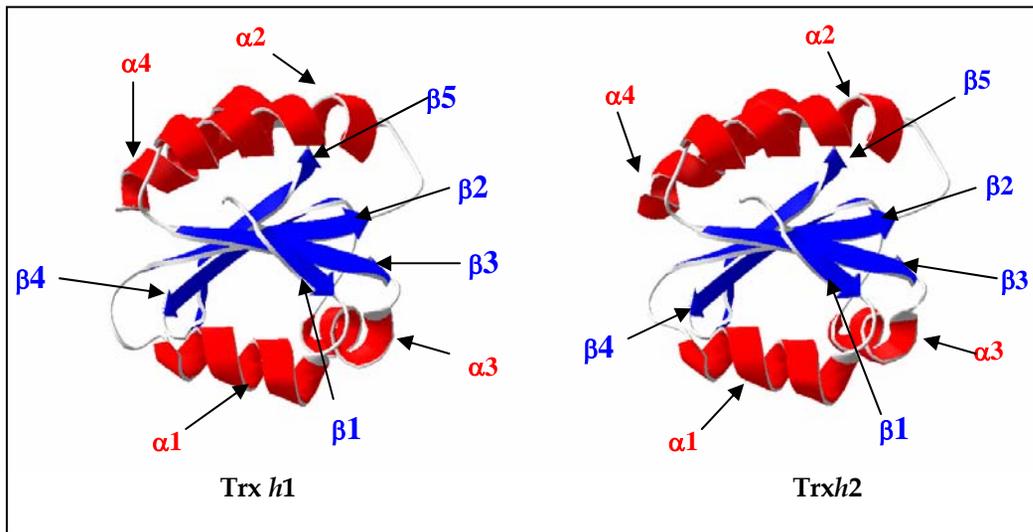


Figura 24. Modelización de las Trxs h1 y h2 de guisante. Se realizó bajo el software “on line” de Swiss-Model. Ambas moléculas presentan el típico folding de Trx.

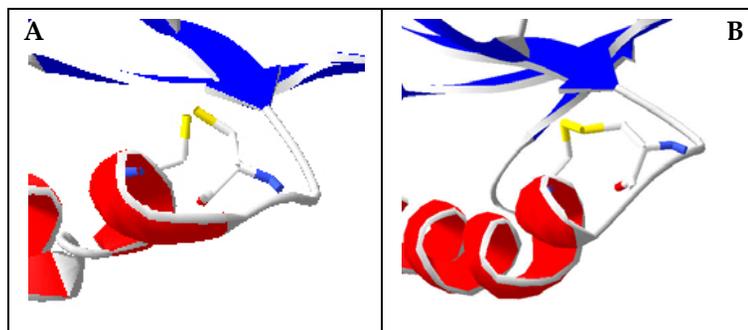


Figura 25. Centro activo de las Trxs *h1* y *h2* modelizadas. **A:** PsTRX*h1* en estado reducida. **B:** PsTRX*h2* en estado oxidada.

ii) Estudios de cristalización de las proteínas recombinantes

Tras realizar un barrido de las posibles condiciones de cristalización de nuestras proteínas, se obtuvieron resultados positivos en las siguientes condiciones de cristalización:

Nº	Condiciones:	<i>h1</i>	<i>h2</i>	<i>f</i>	<i>m</i>
1	30% MPD, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.02 M Calcium Chloride	x		x	
10	30% PEG 4000, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Ammonium Acetate				x
12	30% iso-Propanol, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Magnesium Chloride				x
14	28% PEG 400, 0.1 M Na Hepes pH 7.5, 0.2 M Calcium Chloride	x		x	
24	20% iso-Propanol, 0.1 M Na Acetate pH 4.6, 0.2 M Calcium Chloride	x		x	

Figura 26. Condiciones de cristalización para cada una de las Trxs ensayadas.

A partir de estas condiciones, se optimizó el proceso de cristalización, siendo las condiciones finales de cada proteína las descritas en las siguientes figuras

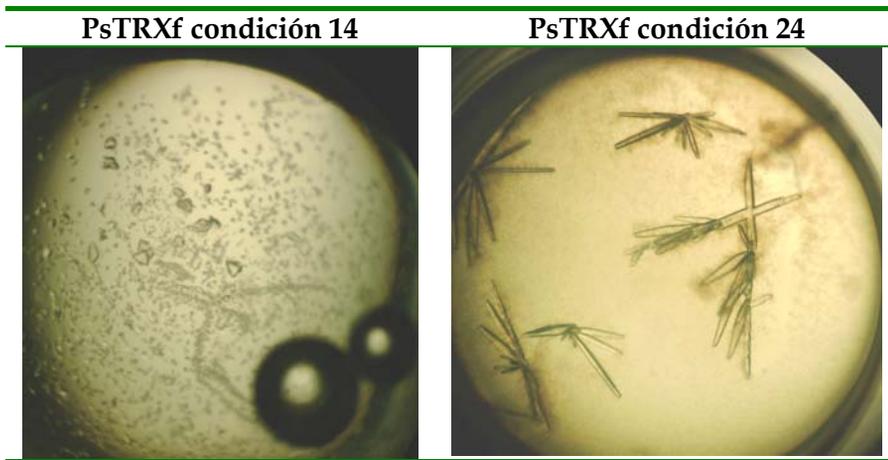


Figura 27. Fotografías de cristales de PsTRXf. Se obtuvieron cristales en tres condiciones de las cuales las mejores son las correspondientes a las condiciones 14 y 24 de kit de barrido (*Hampton research*). En las fotos se muestran los cristales obtenidos utilizando el procedimiento de la gota colgante. La morfología de los cristales en la condición 14 son pequeños tetraedros de unos 50 μm de tamaño máximo. En el caso de la condición 24 se obtuvieron cristales en forma de agujas de una longitud de 200 μm

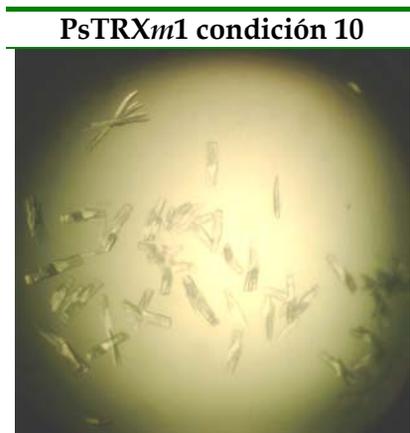


Figura 28. Fotografías de cristales de PsTRXm1. En este caso los mejores cristales se obtuvieron en la condición 10 del kit de Hampton Research. El volumen de la gota de proteína fue de 20 μL (10 μL de proteína a 10 mg/mL + 10 μL de disolución precipitante) y un volumen de disolución precipitante en el depósito de 1 mL. En este caso los cristales crecieron con morfología de platos de unas dimensiones aproximadas de 100 x 20 x 5 μm .

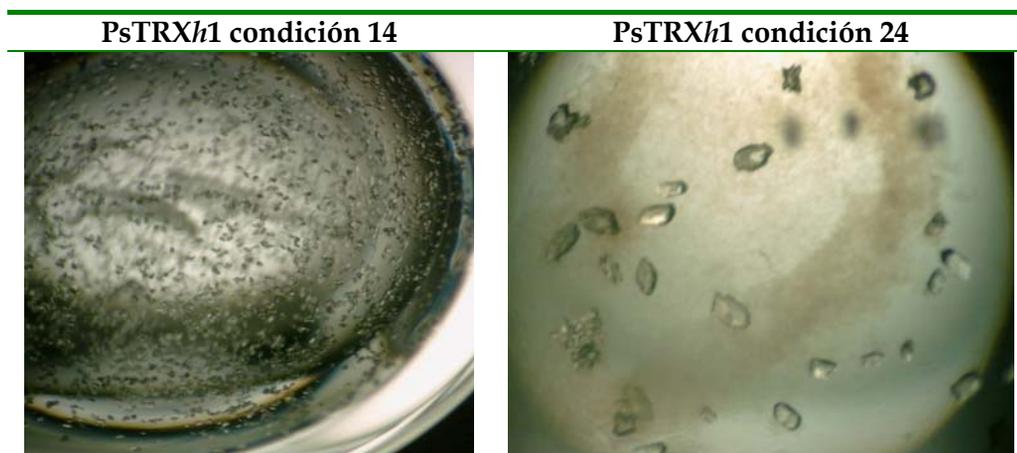


Figura 29. Fotografías de cristales de PsTRX*h1*.- En el caso de esta proteína las condiciones son equivalentes a las obtenidas con PsTRX*f*, pero la morfología de los cristales obtenidos es distinta.

Respecto a PsTRX*h2*, en el momento de la escritura de esta Tesis Doctoral aún no se habían conseguido cristales.

Actualmente, estos estudios se encuentra en fase de optimización de las morfologías de los diferentes cristales de tal forma que permitan un patrón de difracción de mejor calidad.

III. Estudios de complementación heteróloga en levadura.

Las experiencias de complementación heteróloga en *S. cerevisiae* nos permite aproximarnos al conocimiento de las posibles las posibles funciones celulares de las proteínas. EMY63 es una cepa de levadura común derivada de EMY60, que presenta una característica especial para nuestro trabajo. A diferencia de la cepa originaria, posee los dos genes codificantes de sus Trxs citosólica inactivos, produciendo un efecto pleiotropico con unas consecuencias fenotípicas descritas por Muller (1991): auxotrofía frente a la metionina, hipersensibilidad al peróxido de hidrógeno, alteración del ciclo celular e incapacidad de utilizar sulfóxido de metionina como única fuente de S orgánico. En este trabajo expresamos 4 Trxs de guisante (*h1*, *h2*, *f* y *m1*) en un contexto heterólogo, consistente en células de levadura EMY63 con el fin de analizar el efecto fenotípico que esto produce. La restauración total o parcial de un fenotipo de EMY63, por el original presente en EMY60, nos puede indicar su posible papel celular, y también nos aporta datos sobre la especificidad o solapamiento funcional entre todos los tipos de Trxs ensayados.

Para la expresión heteróloga de Trxs en las células de levadura, se han utilizado dos vectores: Ycp2, que da lugar a una expresión mínima y pFL61, que da lugar a una gran cantidad de proteína recombinante. Las construcciones se realizaron reamplificando las secuencias de las Trxs *h1*, *h2*, *f* y *m1* de construcciones previas (pGemT o pET3d), siendo subclonadas, vía MluI y BamHI para Ycp2, o vía NotI para el vector pFL61. Las parejas de oligos empleadas fueron, para *h1*: MluIhN-peahC (Ycp2), y NotIhN-NotIhC (pFL61); para *h2*: MluIh2N-peah2C (Ycp2), y NotIh2N-NotIh2C (pFL61); para *f*: MluIfN-TfC (Ycp2), y NotIfN-NotIfC (pFL61); para *m1*: MluImN-PeamC (Ycp2), y NotImN-NotImC (pFL61). Una vez obtenidas las construcciones en *E. coli*, éstas eran utilizadas para transformar la levadura.

La presencia de las construcciones de ADN en la levadura transformante fue comprobada por PCR, con las parejas de oligos, Ycp2-5'-Ycp2-3' para Ycp2, y pFL61Dr-pFL61Ga para pFL61 (Fig. 30), sobre ADN plasmídico extraído. En ambos casos los oligos flanquean el lugar de inserción. La presencia de Trx exógena en la levadura transformante fue corroborada por "western blot" con anticuerpos específicos frente a las cuatro Trxs (Fig. 31).

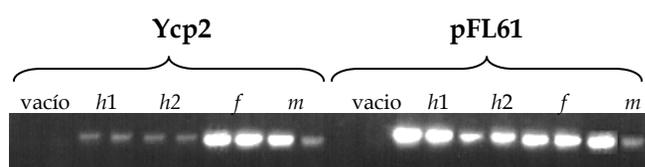
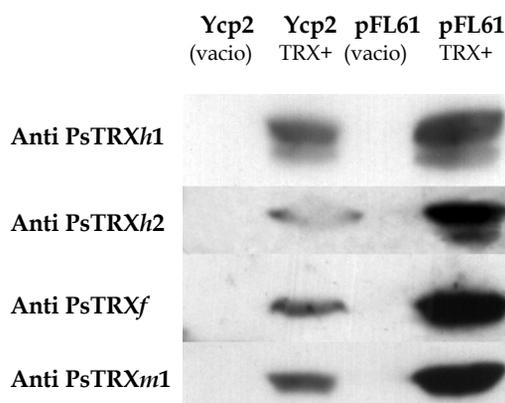


Figura 30. PCR sobre ADN plasmídico de la levadura EMY63 transformada con las construcciones. Todas las PCR se realizaron por duplicado. Cada clon de levadura empleado en las experiencias de complementación fue comprobado de esta forma. Se puede apreciar la reamplificación de la secuencia de Trx correspondiente a cada vector.

Figura 31. Western blot sobre extractos de levaduras transformadas, con anticuerpos policlonales frente a cada una de las Trxs de guisante. Cada clon de levadura empleado en las experiencias de complementación fue comprobado de esta forma. Todos ellos expresaban la proteína, excepto los transformados por el vector vacío.



a. Complementación de Trxs de guisante frente a la presencia de agentes oxidantes.

A lo largo de los últimos años, ha sido sugerido que las Trxs protegen al organismo frente al estrés oxidativo producido por las especies reactivas de oxígeno y, participan en la regeneración de las proteínas inactivadas por estos agentes oxidantes. La cepa EMY63 muestra una elevada sensibilidad frente a la presencia de determinados agentes oxidantes, cuyo origen parece deberse a la ausencia de Trxs citosólicas que reduzcan a una peroxiredoxina tipo II (Verdouq, 2001).

Para comprobar la capacidad de las Trxs de guisante, para complementar la sensibilidad presentada por EMY63 frente a agentes oxidantes, células transformadas con las construcciones que expresan Trxs exógenas, se ensayaron sobre medio con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (0, 0.4, 0.8, 1.2 mM). Se tomaron fotografías del crecimiento de las levaduras a partir del 2º día, pudiéndose apreciar en las experiencias con Ycp2 (Fig. 32 A), que a concentraciones de 0.4 mM del peróxido no existe crecimiento de la levadura transformada con el vector vacío a las 72 h, sin embargo cuando la TRX 1 de levadura (ScTRX1) se expresa con este sistema, se produce una reversión al fenotipo EMY60, que le permite crecer a concentraciones de 1.2 mM del agente oxidante. PsTRX_{h1} es la Trx exógena, de todas las ensayadas, que mayor crecimiento aportó al microorganismo, permitiéndole crecer de forma evidente a concentraciones de 0.8-1 mM. Un aspecto interesante de este resultado es la nula complementación presentada por PsTRX_{h2} a pesar de la homología existente entre ella y PsTRX_{h1}. Las Trxs cloroplastídicas mostraron un papel importante en el crecimiento de la levadura, especialmente en el caso de PsTRX_{m1}, cuyos niveles de complementación a 0.8 mM son muy aparentes, produciendo PsTRX_f un crecimiento parcial a estas concentraciones.

Cuando la experiencia se realizó bajo el sistema de expresión pFL61, el patrón de crecimiento se repitió, aunque la magnitud de la complementación aumento en algunos casos (Fig. 32 B). PsTRXf permitió un mayor crecimiento de la levadura a concentraciones de 0.8 mM, mientras que PsTRXh2 confería un efecto de hipersensibilización de la levadura frente al peróxido de hidrógeno. Se puede apreciar que a 0.4 mM de peróxido de hidrógeno no existe crecimiento de la levadura que expresa PsTRXh2, sin embargo la levadura EMY63 transformada con el vector vacío, presentó crecimiento prácticamente igual al control positivo tras 72 h de crecimiento.

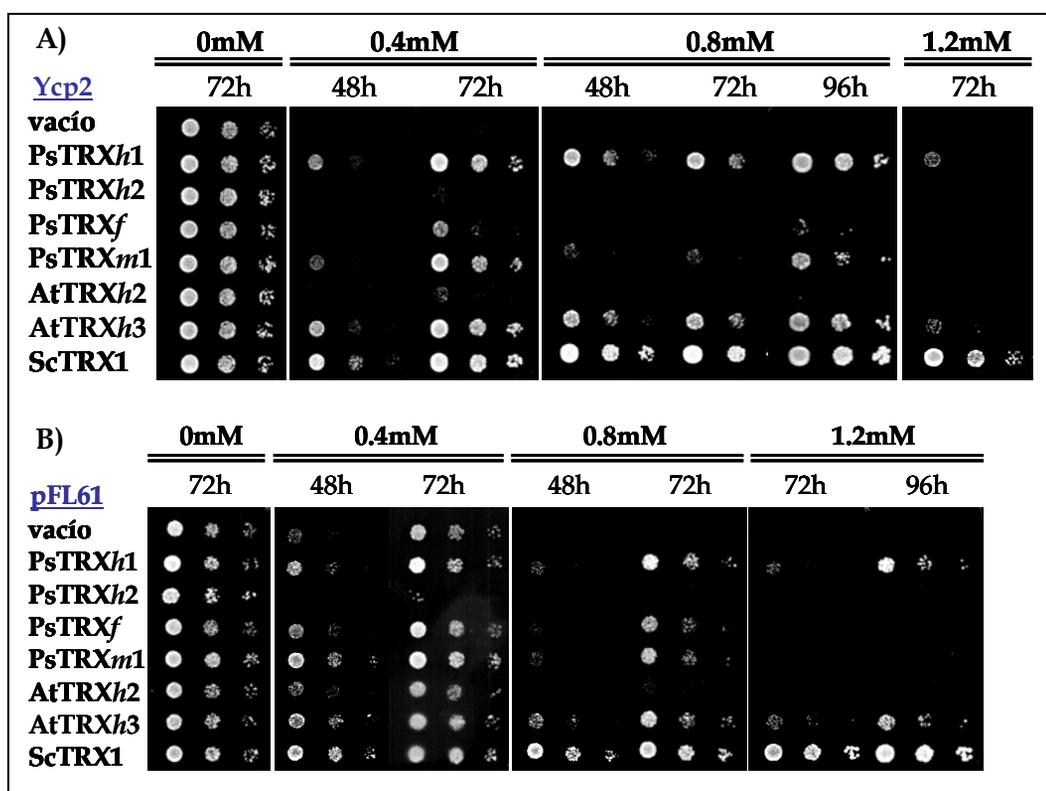


Figura 32. Complementación heteróloga en levadura en la defensa frente a agentes oxidantes, bajo el sistema de expresión de Ycp2 (A) y pFL61 (B). El experimento se realizó depositando 3 gotas de 7 μ l de cultivo con diferentes concentraciones celulares, como se explica en materiales y métodos. El medio contenía YNBgal (Ycp2) o YNBglu (pFL61) adicionado con adenina, lisina, histidina, metionina y peróxido de hidrógeno en las concentraciones indicadas.

Con el fin de corroborar la hipersensibilización que confiere la expresión de PsTRXh2, se creció la levadura bajo control de Ycp2 en placas redonda y comprobamos el halo de inhibición producido por un disco embebido en 100 mM de H₂O₂ (Fig. 33). El halo es mínimo en las células que expresan la Trx de levadura, demostrando una elevada complementación y baja sensibilidad. La expresión de PsTRXh1, AtTRXh3, PsTRXm1 y PsTRXf confirió sensibilidad del 22, 40, 45 y 66% respectivamente, comparada con la productividad por el vector vacío (referida al 100% de Ycp2, resultado de la cuantificación del diámetro del halo). La expresión de PsTRXh2, da lugar a una sensibilidad ligeramente mayor que la presentada por la levadura sin Trx citosólica (+18%).

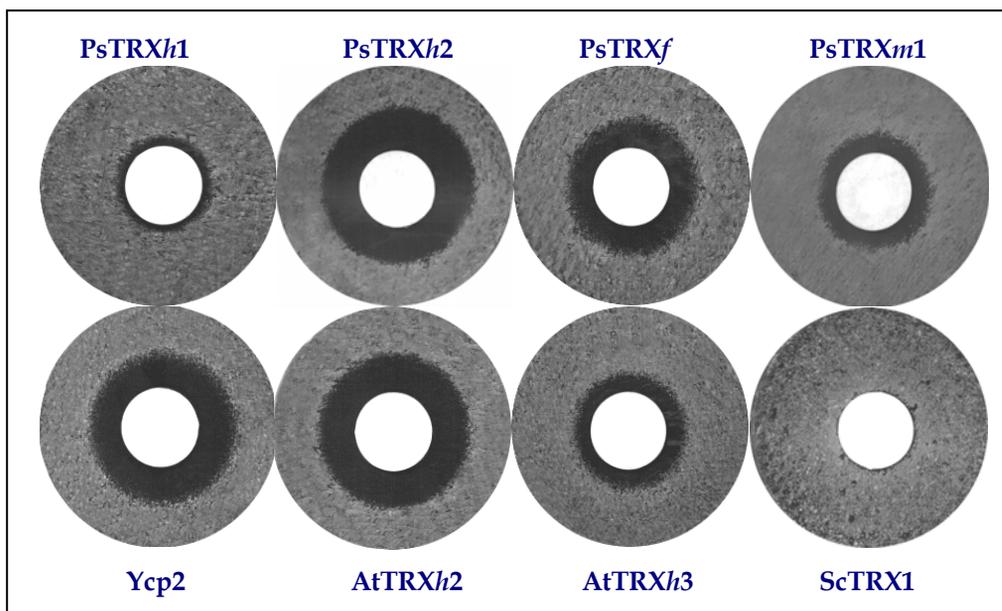


Figura 33. Complementación heteróloga frente a agentes oxidantes por medio de experiencia de halo de inhibición.

La sensibilidad frente a agentes oxidantes se ensayó también con tercbutil hidroperóxido (TBHP; 0.2, 0.4, 0.8 y 1.2 mM) en el mismo medio mínimo utilizado para las experiencias de H₂O₂. Bajo el control del vector centromérico

(Fig. 34, A) todas las Trxs ensayadas, excepto PsTRXf, complementaron el crecimiento a concentraciones de 0.4 mM, especialmente las dos Trxs citosólicas. A partir de esta concentración sólo presentó crecimiento la levadura que expresaba su propia TRX1. Cuando las experiencias se realizaron con pFL61 (Fig. 34, B), las 4 Trxs de guisante confirieron resistencia a concentraciones de 0.4 mM, e incluso PsTRXh1 lo hacía a concentraciones de 0.8 y 1.2 mM del agente oxidante.

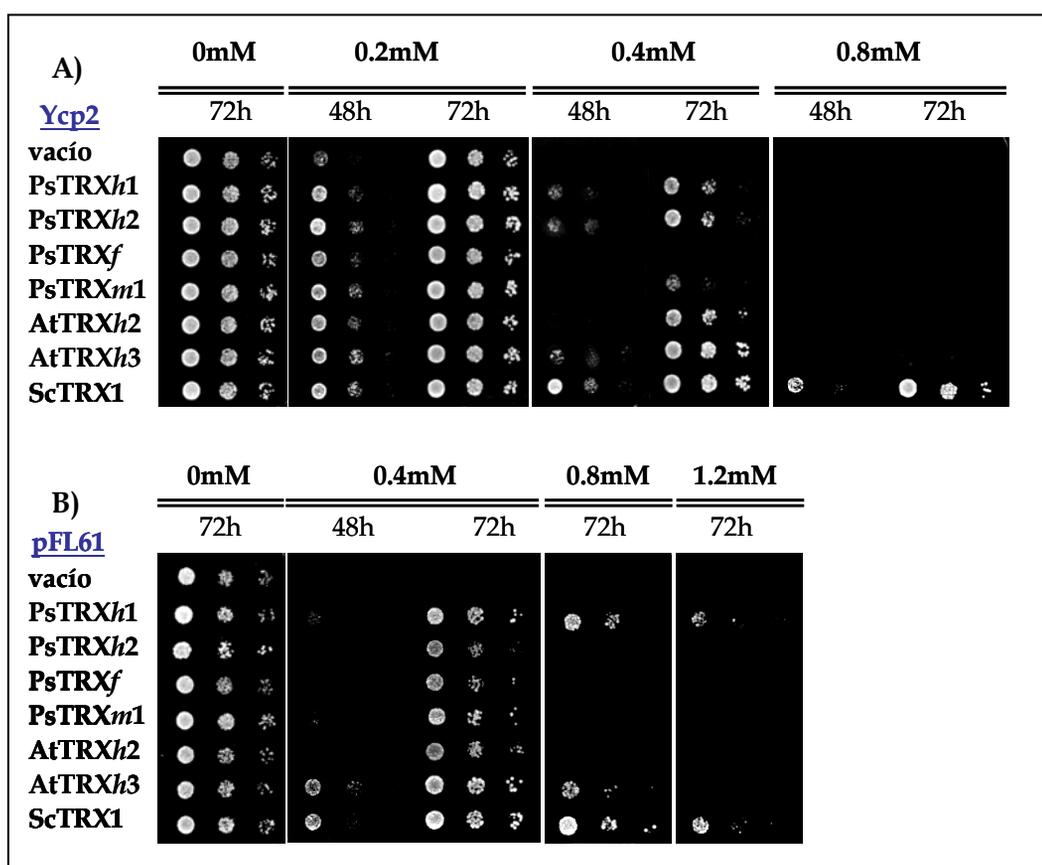


Figura 34. Complementación heteróloga en levadura en la defensa frente a tercbutilhidroperóxido, bajo el sistema de expresión de Ycp2 (A) y pFL61 (B). El experimento y los medios empleados se describen en la figura 30. Las concentraciones de agente oxidante se indican en la parte superior.

b. Complementación de Trxs de guisante en la utilización del S inorgánico como única fuente de S

El fenotipo más evidente de todos los que presenta la levadura EMY63 es el requerimiento de metionina. Esta carencia se traduce en la incapacidad de usar los iones sulfato del medio para la biosíntesis de aminoácidos azufrados, y esto se debe al hecho de que se necesita Trx que aporte equivalentes de reducción a una enzima implicada en la ruta de asimilación del sulfato. De hecho, en los últimos años se ha discutido mucho sobre la posibilidad de que la Trx lleve a cabo la reducción del 3'-fosfoadenosina 5'-fosfosulfato (PAPS) a sulfito en *E. coli* y levadura.

La incapacidad de EMY63 para crecer en un medio carente de S orgánico puede ser solventada por la expresión de Trxs exógenas en estas células. Para ello, las levaduras fueron sembradas en medio B, adicionado con lisina, histidina y adenina. Este medio mínimo presenta la cualidad de estar libre de S orgánico. La auxotrofia del aminoácido metionina dependiente de la carencia de Trx, se puede comprobar en la figura 35, en el fenotipo mostrado por las células transformadas con Ycp2, mientras que la expresión de ScTRX1 conduce a una reversión de este fenotipo hacia un prototrofismo de la metionina. Bajo la expresión heteróloga de Ycp2, ninguna de las Trxs de planta ensayadas en estas experiencias complementaron el crecimiento en este medio. Bajo pFL61 sólo PsTRXh1 de las Trxs de guisante, confería un débil crecimiento en este medio, frente al mayor crecimiento aportado por las Trxs de *Arabidopsis*.

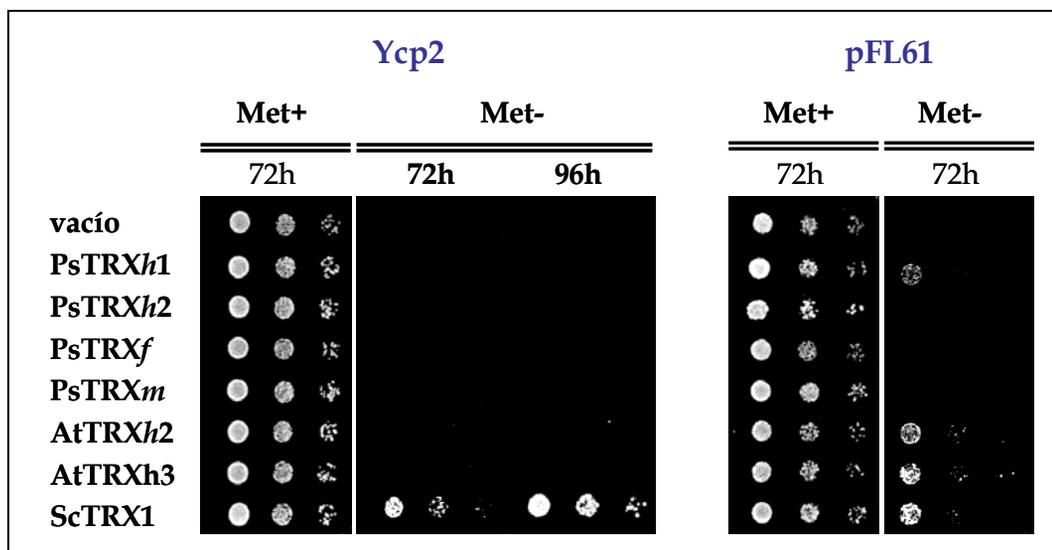


Figura 35. Complementación heteróloga en levadura en medio libre de S orgánico. El experimento se describe en la figura 30. En esta ocasión las levaduras se depositan en medio mínimo carente de S orgánico (medio B).

c. Complementación de Trxs de guisante en la reversión del sulfóxido de metionina (SOMet).

La amplia existencia en seres vivos de sistemas enzimáticos dedicados a la reducción de sulfóxido de metionina fue descrita por Brot y Weissbach. La metionina es un aminoácido especialmente susceptible al daño oxidativo, existiendo, en procariotas y eucariotas, enzimas capaces de reducir específicamente el sulfóxido de metionina, tanto como aminoácido libre como cuando forma parte de las cadenas polipeptídica. En levadura se ha comprobado la capacidad de ésta para usar el sulfóxido de metionina como fuente de metionina, y que en esta ruta metabólica está involucrada la enzima sulfóxido metionin reductasa que a su vez es reducida por Trxs citosólicas. Por tal razón, la carencia de Trxs citosólicas en EMY63 da lugar a que la cepa sea incapaz de metabolizar el sulfóxido de metionina (Mouaheb *et al.*, 1998). La existencia de sulfóxido de metionina en un medio libre de S orgánico nos permite evaluar la capacidad de las Trxs heterólogas de complementar el crecimiento de EMY63. Como ninguna Trx de guisante fue capaz de producir crecimiento en medio libre de S orgánico, podremos concluir que el crecimiento en presencia de SOMet se deberá exclusivamente a la metabolización de este compuesto.

Para estas experiencias, los diferentes clones fueron sembrados en medio sólido, libre de S orgánico (medio B, adicionado con lisina, histidina y adenina) al que se le añadió sulfóxido de metionina, 0.5 mM. De esta forma, el crecimiento de la levadura depende, de la capacidad de la Trx exógena para reducir el sulfóxido de metionina. Como se aprecia en la figura 36, las células transformadas con el vector vacío Ycp2 fueron incapaces de utilizar el sulfóxido de metionina para crecer en este medio, mientras que la levadura que expresó ScTRX1 bajo el control del promotor *gal1*, fue la que mayor crecimiento presentó, corroborándose así, la actuación de la Trx en la reducción indirecta del

compuesto. Ambas Trxs citosólicas de guisante fueron capaces de complementar el crecimiento en este medio, especialmente PsTRXh2. Cuando las Trxs eran expresadas por pFL61 las cuatro Trxs de guisante complementaron el crecimiento de forma evidente.

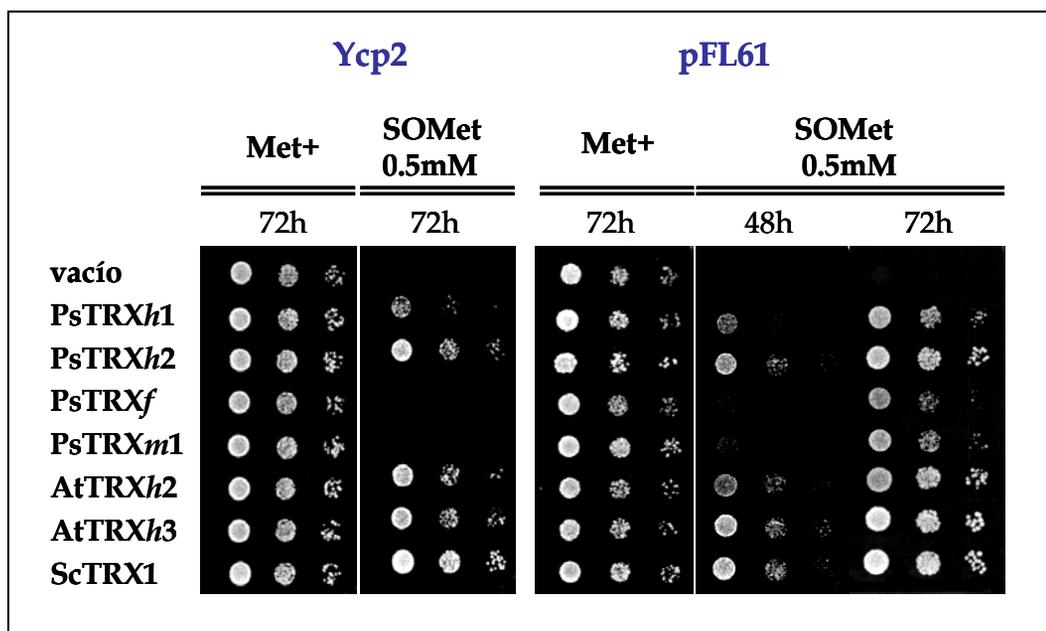


Figura 36. Complementación heteróloga en levadura en medio B con sulfóxido de metionina como única fuente de S orgánico. El experimento se describe en la figura 30. Las levaduras son depositadas en medio mínimo carente de metionina, pero con 0.5 mM de sulfóxido de metionina. El crecimiento en este medio es proporcional a la capacidad de las Trxs exógenas, en la reducción de la enzima sulfoxido metionin reductasa, responsable directa de la reversión a metionina del producto de la oxidación de este aminoácido.

IV. Estudios de expresión génica de las Trxs citosólicas de guisante.

A lo largo del desarrollo de este trabajo decidimos estudiar la expresión génica de las Trxs citosólicas de guisante, tanto en su magnitud como su localización tisular. Con tal fin decidimos emplear dos técnicas diferentes, en primer lugar se realizaron las cuantificaciones relativas de los niveles de ARNm de *PsTRXh1* y *PsTRXh2*, en diferentes órganos de plantula y de planta adulta por medio de PCR en tiempo real. En segundo lugar, estudiamos el patrón de expresión tisular por medio de la expresión heteróloga de plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresaban el gen *GUS* bajo el control de los promotores de ambas Trxs citosólicas de guisante, permitiéndonos visualizar directamente la localización tisular de estas expresiones.

a. Cuantificación de la expresión génica de ambas Trxs citosólicas por PCR en tiempo real

Para medir los niveles de ARNm de las dos Trxs citosólicas de guisante en diferentes órganos de planta adulta, se realizaron cuantificaciones relativas por PCR a tiempo real. En los cálculos de la cuantificación se utilizó el ARNr 18s como control normalizador en cada tejido u órgano analizado. En la figura 37A se muestran los niveles de expresión de *PsTRXh1*, en diferentes órganos. Este gen se expresó prácticamente en todos los tejidos ensayados, principalmente en hojas. Sin embargo, los niveles presentados por *PsTRXh2* fueron mucho más bajos que los valores obtenidos para su homóloga *h1* en el mismo tejido, aunque detectables por PCR. Sus niveles de expresión nunca superó el 1% del mostrado por *h1* (Fig. 37B).

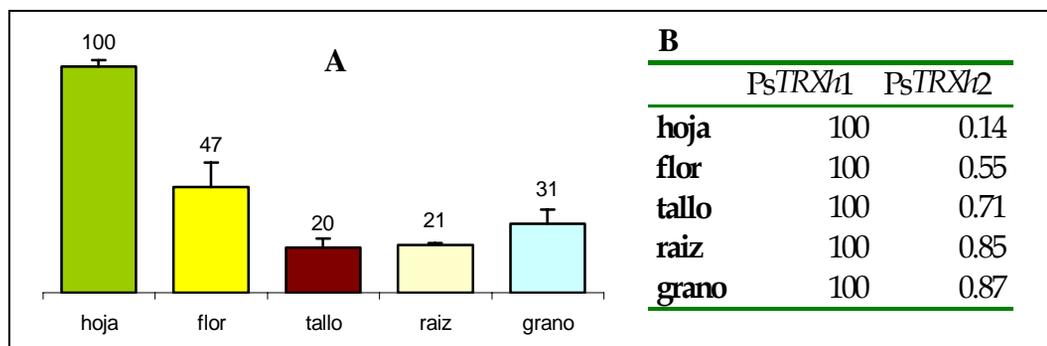


Figura 37. Cuantificación de la expresión génica de PsTRXh1 y PsTRXh2 en diferentes órganos. La expresión se estudia por PCR en tiempo real, empleando ARNr 18s como control interno. Los valores finales se obtienen tras aplicar el método doble delta. **A.** Expresión relativa de PsTRXh1 en diferentes órganos. **B.** Comparación de los valores de expresión de PsTRXh2 en relación a la expresión de PsTRXh1 en el mismo órgano.

La expresión de PsTRXh2 fue muy baja en tejidos de plantas adultas. Sin embargo, cuando se comparó la expresión entre ambos genes en plantulas de 12 días, estas diferencias se acortaban, mostrando PsTRXh2 un nivel de expresión medio del 16% y 18% respecto al de h1, en hojas y raíces, respectivamente.

b. Localización de la expresión génica en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.

La construcción de plantas transgénicas que expresan el gen *GUS*, promovido por las secuencias promotoras de plantas, ha sido un tipo de experimento muy desarrollado en los últimos años que ha permitido un avance enorme en el campo de la expresión génica de plantas. En este trabajo llevamos a cabo la construcción de plantas transgénicas, vía *A. tumefaciens*, y utilizando el vector binario comercial pBI101 diseñado para estas experiencias. A partir de las secuencias genómicas 5'-*Upstream*, obtenidas por PCR walking se diseñaron oligos específicos con las secuencias de restricción BamHI (directo) y Sall (inverso). Por PCR se reamplificaron los fragmentos correspondientes de 1037pb para el gen *PsTRXh1* y 297pb para *PsTRXh2*, desde el triplete de inicio de la traducción en sentido 5'-*upstream*. Ambas secuencias fueron subclonadas en el vector pBI101, en posición 5' del gen de la β -glucuronidasa, de tal forma que la expresión de éste dependiera de las secuencias insertadas precedentes. Las construcciones resultantes, pBI101prh1 y pBI101prh2 fueron utilizadas para transformar *A. tumefaciens*, siendo esta bacteria utilizada para transfectar plantas de *A. thaliana*. También se utilizó la construcción control con el vector vacío pBI101.

En la primera generación de transformantes se obtuvieron 4 plántulas o líneas de la construcción pBI101prh1, 8 plántulas de pBI101prh2 y 3 de la construcción pBI101. Cuando fueron sometidas a autofecundación las descendencias de cada una de ellas mostraron proporciones de transformantes del 50-75%. De cada línea se seleccionaron 3 descendientes homocigotos para realizar los diferentes experimentos con sus semillas (3ª generación). Todos ellos eran homocigotos para la inserción.

El análisis histoquímico de la actividad GUS se realizó periódicamente sobre las plántulas (crecidas en placa) y los diferentes tejidos de plantas adultas (crecidas en tierra). Inicialmente se tomaron muestras cada día, tras la germinación, y posteriormente se realizaron estudios más específicos, centrados en un órgano. Las plantas transgénicas transformadas con pBI101 vacío no mostraron coloración en ningún tejido.

i) Patrón de expresión de *A. thaliana* PrTRXh1::GUS

En experiencias preliminares con las diferentes líneas transgénicas transformadas con la construcción pBI101prh1, determinamos un patrón de expresión tisular bien definido. El análisis histoquímico de la actividad GUS de las plantas de *A. thaliana* en desarrollo, mostró coloración específica en tejido conductor. Como se puede apreciar en la figura 38, tras dos días de germinación aparece señal en cotiledones. Esta señal va quedando relegada a los haces vasculares de tejidos verdes, conforme el sistema circulatorio se diferencia. Se puede apreciar a los 12 días que la expresión se da en haces vasculares de tallos, cotiledones y hojas, siendo su expresión más fuerte en tejidos jóvenes.

Cuando la señal se estudió sobre plantas con flor, el patrón de expresión sufrió un cambio cualitativo y cuantitativo. Los haces vasculares siguen expresando GUS pero lo hacen de forma más débil en las hojas de la roseta (Fig 39). Sin embargo, descubrimos que este promotor inducía la expresión GUS en determinados tejidos florales (Fig. 40). La localización específica de actividad glucuronidasa se daba en estigma floral (Fig. 41A) y en granos de polen (Fig. 41B)

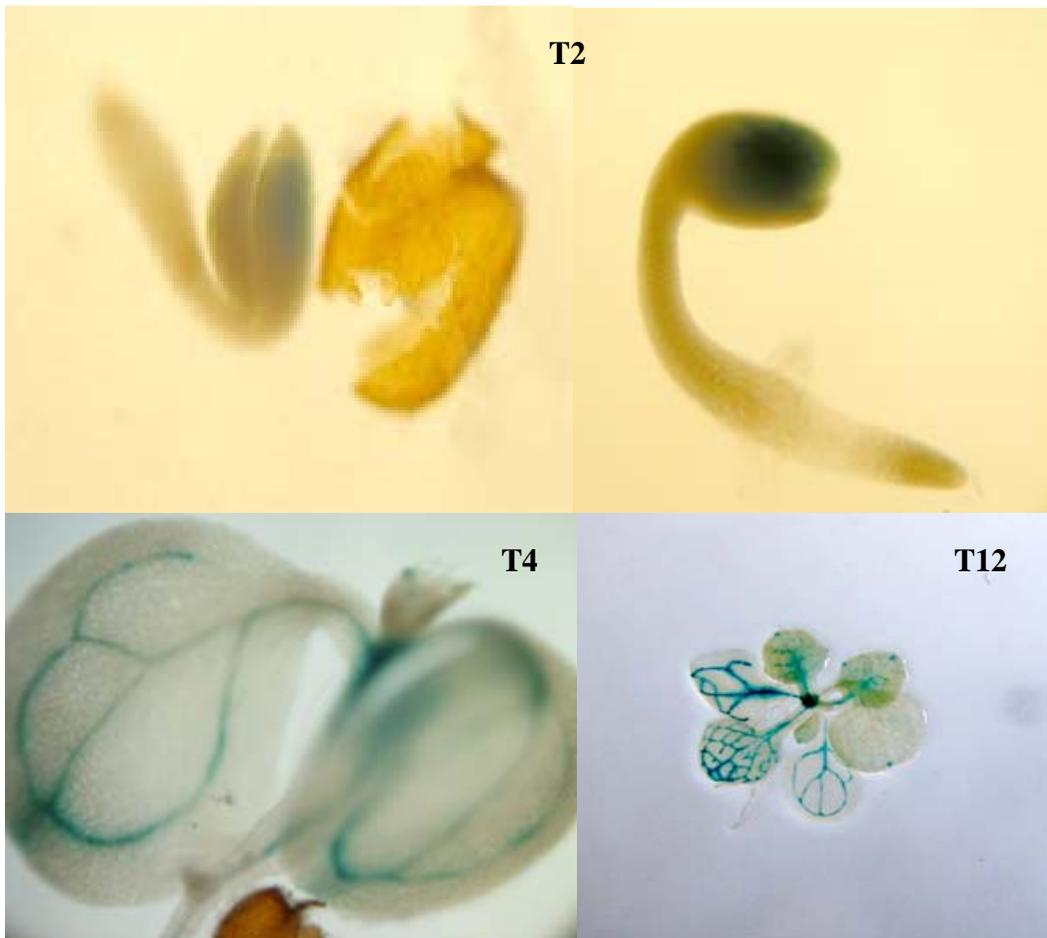


Figura 38. Expresión del gen *GUS* en plántulas transgénicas de *A. thaliana* bajo el control de las secuencias reguladoras del gen *PsTRXh1* (*PrTRXh1::GUS*).



Figura 39. Expresión del gen *GUS* bajo el control de las secuencias reguladoras del gen *PsTRXh1* (*PrTRXh1::GUS*) en hojas de la roseta de plantas transgénicas de *A. thaliana*

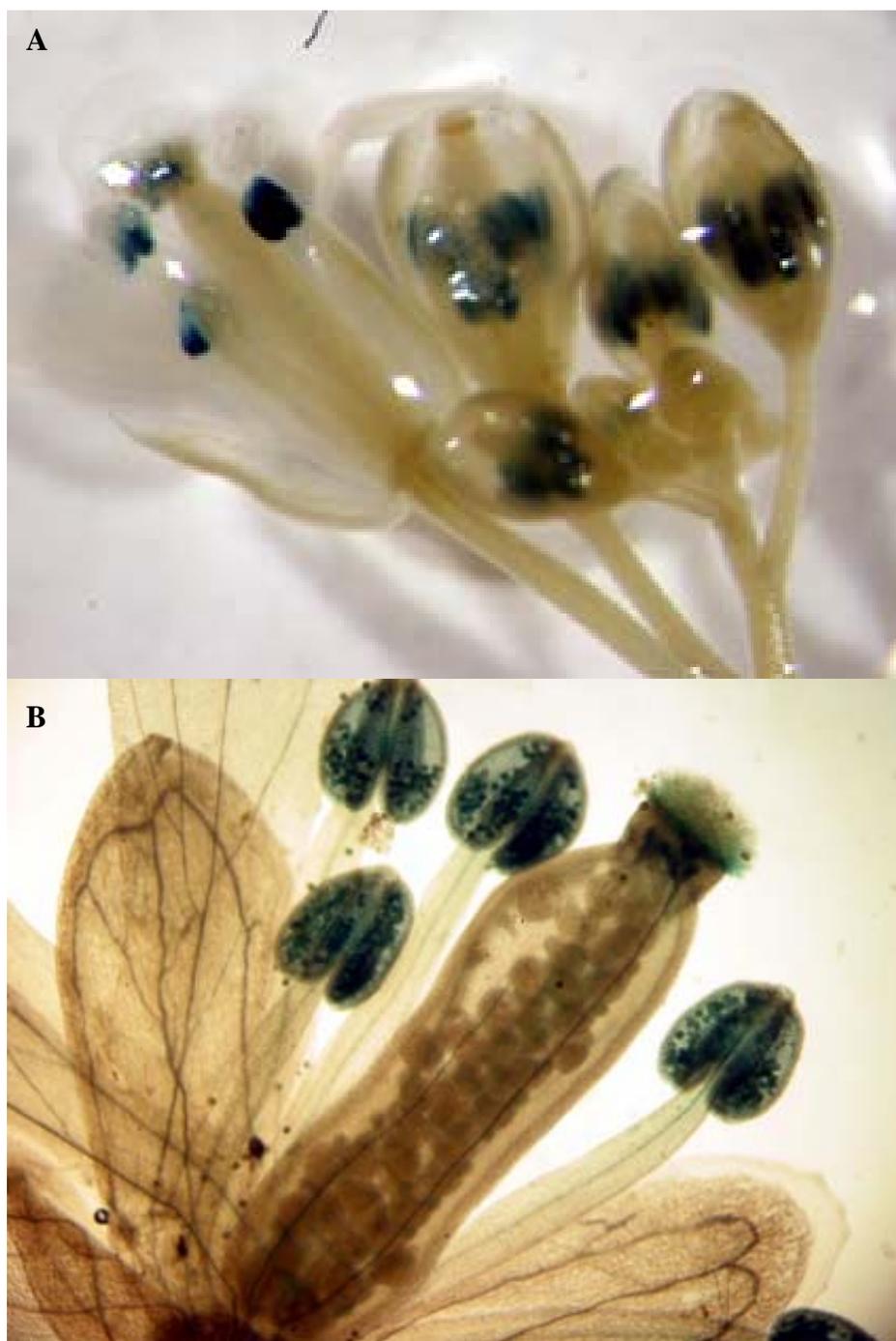


Figura 40. Expresión del gen *GUS* bajo el control de las secuencias reguladoras del gen *PsTRXh1* (*PrTRXh1::GUS*) en flores de plantas transgénicas de *A. thaliana*. La expresión queda relegada a determinados tejidos florales. **A.** Visión a la lupa. **B.** Visión de un aplastado a microscopía óptica



Figura 41. Expresión *GUS* en plantas transgénicas de *A. thaliana* (*PrTRXh1::GUS*). Localización específica en tejidos florales. **A.** El gen *GUS* se expresa en estigma floral. **B.** La expresión se da específicamente en granos de polen.

ii) Patrón de expresión de *A. thaliana* *PrTRXh2::GUS*

Las plantas de *A.thaliana* transformadas con la construcción *pBI101prh2* no mostraron coloración por expresión del gen *GUS*, a lo largo de su desarrollo en ningún tejido de la planta.

V. Estudios de expresión proteínica de Trxs tipo *h* de guisante

a. cuantificación proteínica de plántulas en desarrollo

Para estudiar la cantidad de Trxs durante las primeras etapas del desarrollo se tomaron muestras de plántulas de 4 a 20 días de germinación (Fig. 42A). Muestras de hojas y raíces fueron procesadas como se describe en materiales y métodos, y un total de 30 µg de proteínas fueron utilizadas en el reconocimiento inmunológico. El valor obtenido tras la cuantificación de la banda por *western blot* está normalizado por cantidad de proteína (Fig. 42B). La cantidad de proteína por célula es un valor muy variable durante los primeros días del desarrollo en los tejidos verdes, por la aparición del aparato fotosintético, de tal forma que para evitar este problema, se normalizó respecto al contenido en ADN, por medio de la cuantificación de bandas obtenidas en electroforesis de agarosa (ADN) (Fig. 42C). El valor final es proporcional al contenido celular (Fig. 42D).

En la figura 38D, se aprecia que las cantidades de proteínas cuantificadas con cada anticuerpo policlonal, durante el desarrollo plantular describe patrones cuantitativos diferentes entre las Trxs de guisante. Las Trxs cloroplastídicas aumentan en tejidos verdes, paralelas al crecimiento del desarrollo fotosintético, mientras que su detección en tejidos radiculares no fue posible por medio de esta técnica. Los anticuerpos frente a Trxs citosólicas dieron lugar a dos patrones de expresión drásticamente diferentes. El anticuerpo frente a PsTRX*h1* mostró una disminución de proteína a lo largo del desarrollo plantular, en hojas y en raíces, mientras que el anticuerpo frente a PsTRX*h2* dio lugar a un patrón contrario, con aumento en tejidos foliares y detección proteínica en raíces a partir del día 15 del desarrollo. En ambos casos, los niveles proteínicos fueron mayores en hojas que en raíces.

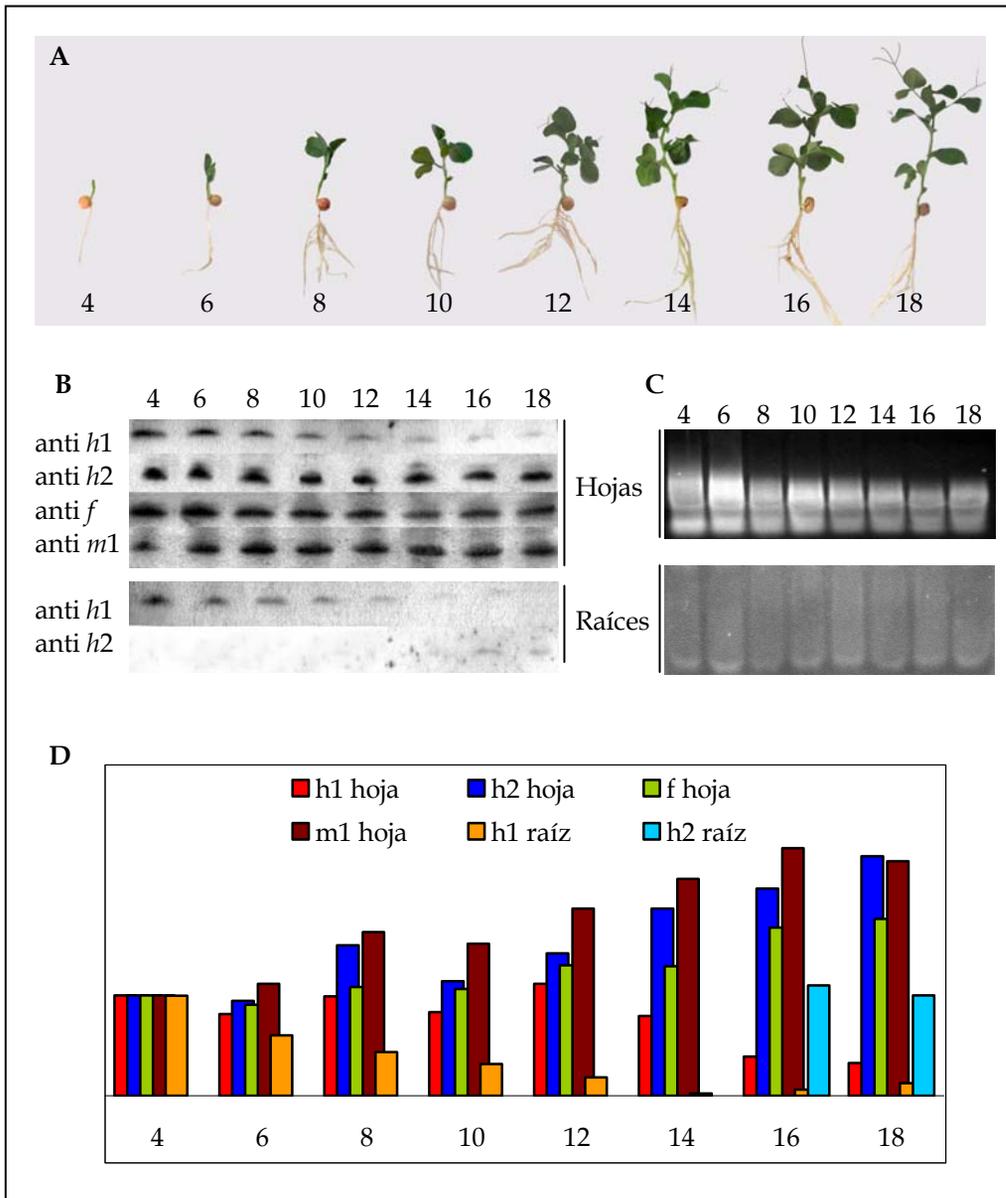


Figura 42. Patrón de expresión proteínica relativa en el desarrollo plantular. A. Plantas de guisante a lo largo del estudio plantular. Se mide en días (4-18) tras la germinación **B.** Western blot con los diferentes anticuerpos policlonales sobre 30 μ g de extracto proteínicos, en hojas y raíces **C.** Electroforesis de agarosa con los extractos de hoja y raíz, utilizando el mismo volumen empleado en la electroforesis de proteína (30 μ g). **D.** Cuantificación realtiva con los diferentes anticuerpos tras normalizar con ADN, para relacionarlo por contenido celular. Nos son comparables entre los diferentes anticuerpos.

b. Inmunolocalización tisular de ambas Trxs de guisante

Para conocer el patrón de expresión, a nivel tisular, de ambas Trxs *h* decidimos realizar inmunolocalizaciones utilizando ambos anticuerpos policlonales frente a ambas Trxs *h*. Para ello, se incluyeron muestras de hoja, raíz, tallo y tejidos florales de plantulas de 10 días en parafina, y tras los cortes y el tratamiento inmunocitoquímico identificamos el patrón de expresión proteínico mostrado por ambos anticuerpos a nivel tisular (microscopía óptica).

i) Inmunolocalización utilizando anticuerpos frente PsTRX*h1*

Las fotografías (fig. 43) revelaron la presencia de señal de reconocimiento principalmete en tejidos conductores, a diferentes niveles (Floema y xilema). Por otro lado, se puede identificar que muchas de estas señales se localizaron a nivel de nucleos celulares de células de guardia de los estomas.

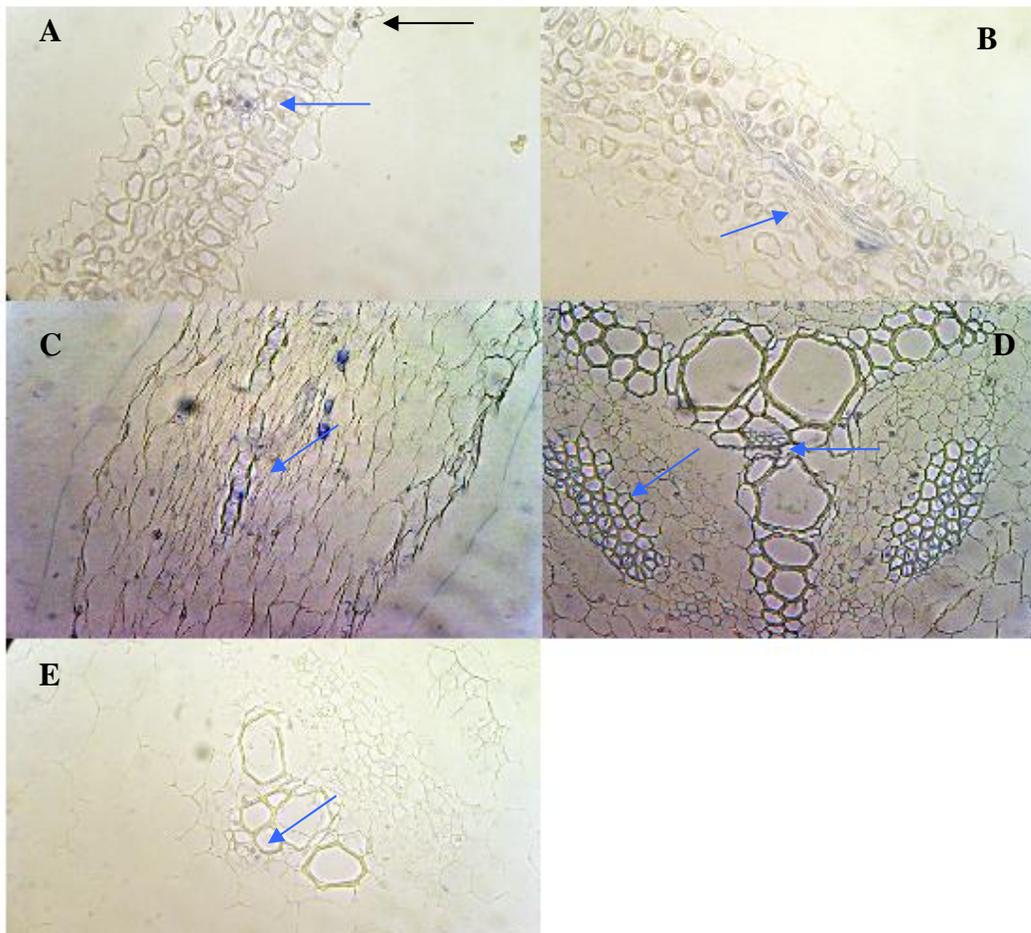


Figura 43. Inmunolocalización tisular empleando anticuerpos frente a PsTRXh1 A y B: Hoja. C: Raíz longitudinal. D: Raíz transversal. E: Tallo transversal. Las flechas azules indican señales en tejido vascular (xilema y floema). Las flecha negra indica señal en el núcleo de las células de guardia

ii) Inmunolocalización utilizando anticuerpos frente PsTRXh2

El patrón de expresión mostrado por estos anticuerpos fue igual al identificado en el caso anterior, aunque estas señales fueron mucho más intensas, especialmente en cortes de tallo (Fig. 44).

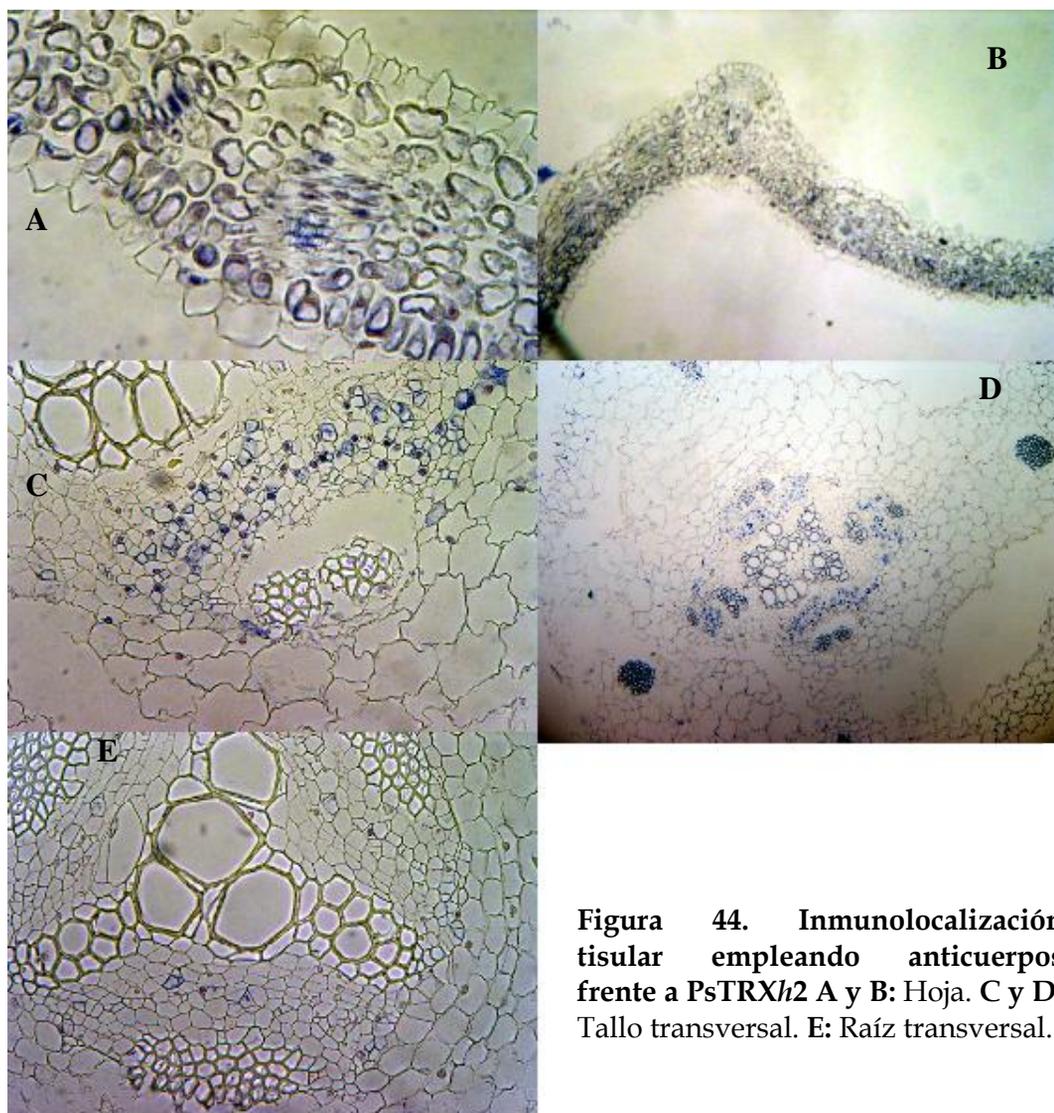


Figura 44. Inmunolocalización tisular empleando anticuerpos frente a PsTRXh2 A y B: Hoja. C y D: Tallo transversal. E: Raíz transversal.

VI. Papel *in planta* de las Trxs de guisante en la defensa frente a agentes oxidantes.

Tras los resultados obtenidos en las experiencias de complementación heteróloga en levadura decidimos corroborar el papel *in planta* de las Trx como moléculas antioxidantes. Para ello, plántulas de guisante fueron tratadas con en concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno y TBHP (0, 5, 10, 15, 20, 25 mM), realizándose cuantificaciones de la expresión génica y de la cantidad proteínica, para cada una de las Trxs estudiadas, por PCR a tiempo real y western blot con anticuerpos, respectivamente.

a. Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real de raíces y hojas de plantulas tratadas con agentes oxidantes

Las gráficas de la figura 45 muestran que los niveles de expresión de PsTRXh2 decrecen en presencia de ambos agentes oxidantes, especialmente los transcritos de raíces tratadas con TBHP donde, en ocasiones los niveles llegan a ser inapreciables. Sin embargo, PsTRXh1 mostró un patrón de expresión contrario, bajo estas condiciones de estrés. Este gen aumentó sus niveles de expresión en raíces tratadas con peróxido de hidrógeno, mientras que en las hojas tratadas con este hidroperóxido no parecía variar su expresión. Cuando el agente oxidante era TBHP los niveles aumentaron principalmente; en hojas, aunque con una tendencia más irregular.

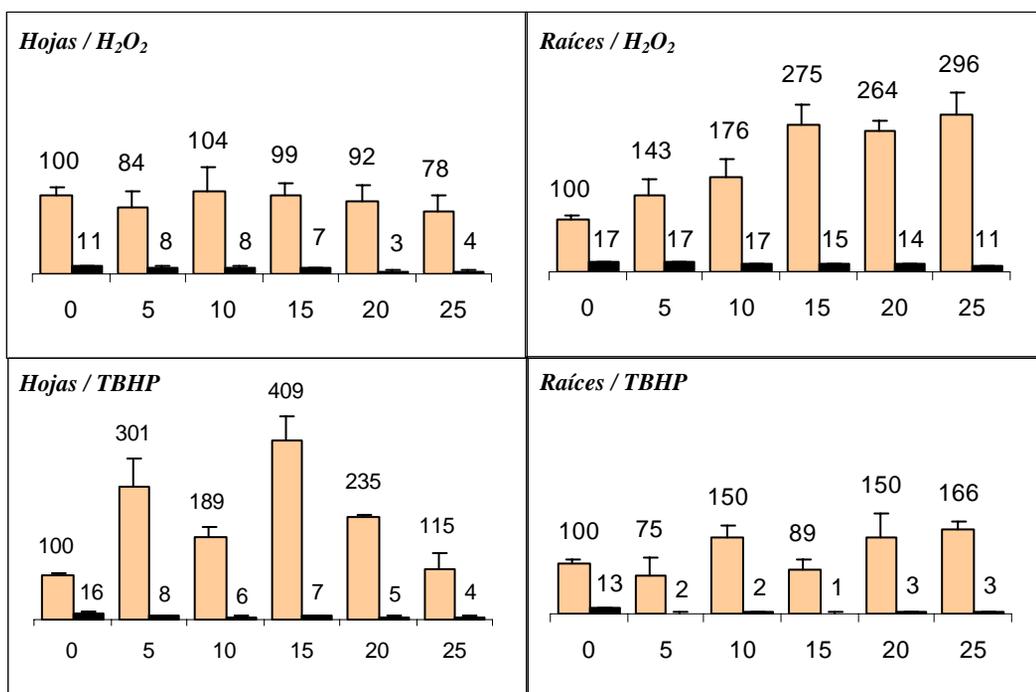


Figura 45. Cuantificación relativa por PCR en tiempo real de ambas Trxs *h* de guisante. En color naranja representan los valores de expresión de *PsTRXh1*, Las barras negras representan el valor de expresión de *PsTRXh2*. El eje de abcisa representa la concentración de agente oxidante utilizado (mM). Los valores de expresión se obtienen por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ normalizándose con los niveles de transcritos del ARNr 18S. Las expresiones de ambos genes están relacionadas respecto al valor de expresión de *PsTRXh1* en la condición control (0 mM). Estos datos son el resultado de tres experimentos diferentes e independientes.

b. Cuantificación de la cantidad de proteína por *western blot* de raíces y hojas de plántulas tratadas con peróxido de hidrógeno

Los *Western blots* (Fig. 46) mostraron, en el caso de anticuerpos anti *h1* un claro patrón de aumento en raíces, mientras que en hojas, este incremento no fue tan evidente como en el tejido radical. En el caso del anticuerpo frente a *PsTRXh2* estos incrementos de cantidad de proteína fueron más evidentes en ambos tejidos, aunque con determinada irregularidad en la respuesta creciente.

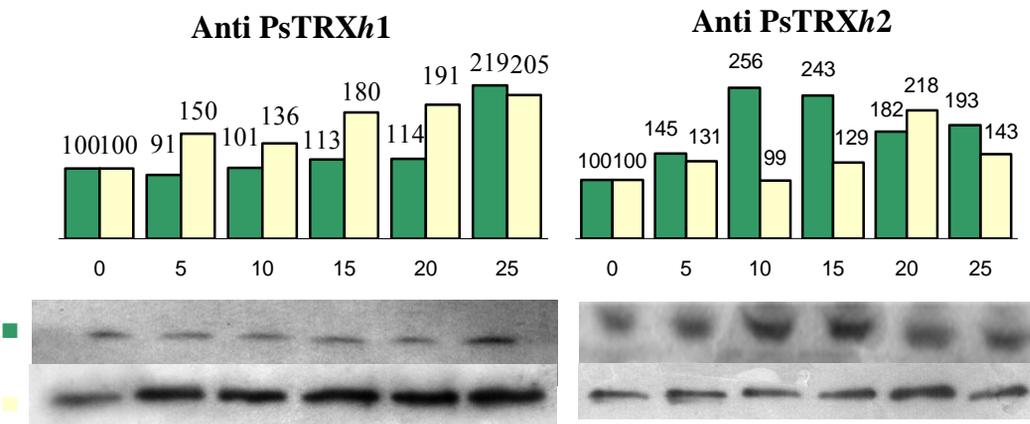


Figura 46. Cuantificación de la cantidad de proteína por *Western blot*: En verde se representan los valores obtenidos en hoja, y en amarillo en raíces. El eje de abcisas representa la concentración de agente oxidante empleando. En la electroforesis se emplearon 50 μg de extractos de hojas y 30 μg de raíces. En todas las experiencias se repitieron las tendencias mostradas al emplear cada uno de los anticuerpos.

DISCUSIÓN

Las Trxs *h* de plantas superiores constituyen un sistema de proteínas muy complejo, compuesto en *A. thaliana*, tras la finalización de su proyecto de secuenciación genómica. Esta planta está compuesta por 8 Trxs *h* y otras proteínas relacionadas (Meyer *et al.*, 2002). En el álamo, cinco miembros han sido recientemente descritos (Gelhaye *et al.*, 2004b) y otras cuantas secuencias son conocidas en diferentes especies de mono y dicotiledoneas. Sin embargo, actualmente es necesaria la realización de diferentes trabajos que consigan aclarar su implicación en diferentes funciones celulares, y sobre todo la cuestión impuesta referente a la especificidad o redundancia funcional entre todos los subtipos diferentes de Trxs *h* coexistentes en un mismo organismo.

Nuestra intención al comenzar este trabajo fue describir y comenzar a caracterizar el sistema de Trxs *h* de guisante para poder aumentar el conocimiento de esta subfamilia de Trxs en plantas superiores. Por aquellas fechas, no estaba descrita en la base de datos de *PubMed* ninguna secuencia nucleotídica o aminoacídica de Trx *h* de guisante. Sin embargo, actualmente, sabemos de la existencia de 4, dos de ellas recientemente caracterizadas, cuyas funciones parecen estar relacionada con la germinación de la semilla, son las denominadas PsTRX*h*3 y PsTRX*h*4 (Montrichard *et al.*, 2003). En nuestro trabajo describimos y caracterizamos PsTRX*h*1 and PsTRX*h*2 como dos Trxs *h*, que muestran comportamientos fisiológicos muy diferentes y que muestran diferentes comportamientos frente a los desequilibrios redox.

I. Justificación del trabajo realizado

Desde su primera descripción en microorganismos hasta el día de hoy, la presencia de Trxs se ha puesto de manifiesto en la gran mayoría de los organismos estudiados. Sus papeles fisiológicos han sido y son, especialmente hoy en día, un campo de trabajo en el cual resta una gran cantidad de incógnitas. Actualmente el estudio funcional de estas proteínas se encuentran en proceso de resolución gracias a un enorme número de trabajos de investigación publicados “diariamente” en la bibliografía científica. Su importancia radica en el hecho de que estas proteínas están siendo involucradas, en un número cada vez más creciente, de rutas metabólicas. Este hecho confiere a las Trxs una gran importancia teórica y práctica que, por otro lado, está derivando en estudios de otra índole (Industria farmacéutica, alimenticia y médica). Sus funciones son tan variadas como importantes, estando las Trxs involucradas en papeles fisiológicos tan relevantes como, por ejemplo, la regulación de ciertos factores de transcripción, la participación en el control del equilibrio redox y la eliminación de los daños producidos por los ROS, intervienen en el control del ciclo celular, en el desarrollo embrionario en mamíferos y plantas, y regulan varias enzimas clave de multitud de rutas metabólicas.

Dentro del estudio de las Trxs de plantas, las clásicamente denominadas como *h* (de heterotrofas, haciendo alusión a su descubrimiento en tejidos no fotosintéticos) son las más numerosas y complejas en su estudio. Funcionalmente son poco conocidas y es necesaria la realización de experiencias que aporten nuevos datos estructurales y funcionales para llegar a conocer el papel fisiológico de estas proteínas.

Esta Tesis se realizó estudiando las Trxs tipo de *h* en guisante, debido a que esta especie ha sido el modelo de trabajo en nuestro laboratorio en los últimos 20 años. La fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica ha sido el centro de los proyectos de investigación en nuestro grupo, y a partir de ésta, en años posteriores, se describieron y caracterizaron dos Trxs cloroplastídicas (PsTRX*m1* y PsTRX*f*) que realizan una regulación redox sobre ésta y otras enzimas fotosintéticas.

Por estas razones, en nuestro laboratorio existían, al inicio de este trabajo, el material de partida y la infraestructura necesaria para abordar el estudio de Trxs en localizaciones diferentes al cloroplasto. Por otro lado, todos los años de experiencia en el estudio de estas pequeñas proteínas han sido decisivos para la obtención de los resultados finales de esta Tesis.

Además el estudio de Trxs en guisante suponen una alternativa a los modelos descritos en *A. thaliana*.

II. Caracterización de las Trxs

Tras la obtención de las secuencias nucleotídicas de PsTRX*h1* y PsTRX*h2*, estas fueron identificadas como Trxs tipo *h*, ya que sus secuencias aminoacídicas traducidas poseía todas las características para ser clasificadas como tales. Además, las secuencias genómicas de ambos genes contenían los dos intrones en posiciones conservadas dentro del grupo de las Trxs *h* de plantas (Sahrawy *et al.*, 1996). Las secuencias aminoacídicas revelaron que ambas Trxs poseían similar peso molecular, contiendo en su estructura primaria todos los aminoácidos funcionales y estructurales para ser agrupadas dentro del grupo de las Trxs tipo *h*. Además poseían el típico centro activo de las Trxs -WCGPC-. Ambas proteínas, junto con su homóloga PsTRX*h3*, pertenecen a la subclase 1 dentro de la reciente clasificación de las Trxs *h* (Gelhay *et al.*, 2004b), mientras que

PsTRX*h4* está agrupada dentro de la subclase 2, junto a las Trxs AtTRX*h2* ó PtTRX*h5*, debido principalmente a su extensión N-terminal.

Ambas Trx carecen de péptido de tránsito por lo que se asume que son proteínas citosólicas. Posiblemente no se encuentren asociadas a membranas ya que durante el proceso de purificación siempre se mantenían en la fracción soluble. Sin embargo, otras consideraciones respecto a sus localizaciones subcelulares deben tenerse en cuenta, sobre todo desde que se ha descrito la presencia de Trx tipo *h* en otros orgánulos como las mitocondrias (Gelhaye *et al.*, 2004a).

El clásico proceso de purificación de estas proteínas nos permitió conocer diferentes características físicas y químicas de ellas. PsTRX*h1* posee una mayor termoestabilidad, presentando una temperatura media de desnaturalización de aproximadamente 70°C. PsTRX*h2* es más termolábil, desnaturalizándose completamente a temperaturas cercanas de 55°C. PsTRX*h2* presentó una solubilidad menor y una mayor tendencia a la formación de estructura cuaternarias, espècialmente dimeros.

El comportamiento de ambas proteínas durante los experimentos *in vivo* (complementación heteróloga en EMY63) e *in vitro* (actividades enzimáticas) confirmaron que ambas pertenecen al grupo de proteínas con actividad Trx. Además, su modelización tridimensional se ajustó perfectamente al clásico *fold*ing presentado por todas las Trxs resueltas por el momento.

III. Localización tisular

PsTRX*h3* y PsTRX*h4*, han sido recientemente descritas (Montrichard *et al.*, 2003) y su expresión queda relegada casi exclusivamente a la semilla. Por consiguiente, su papeles fisiológicos están probablemente asociados con la geminación de la semilla, ya que PsTRX*h4* desaparece tras la protusión de la

radícula, y las cantidades de PsTRXh3 disminuyen tras la germinación. En nuestro trabajo hemos demostrado que ambos genes muestran un patrón de expresión drásticamente diferente. PsTRXh1 se expresó en todos los tejidos ensayados de la plántula, mientras que PsTRXh2 mostró unos niveles de expresión muy bajos, aunque existentes. La diferencia de magnitud entre ambas expresiones es un dato importante que refleja un diferente papel fisiológico.

Las experiencias de fusión con el gen chivato *GUS* nos permitió conocer que PsTRXh1 se expresa en tejido vascular y órganos reproductores (polen y estigma floral). La expresión *GUS* en haces vasculares explica la presencia de transcritos en todos los tejidos ensayados por PCR, sin embargo la carencia de señal en haces de raíz nos plantea la duda de si la información necesaria para la expresión en tejidos radiculares, está presente, o no, en el fragmento regulador que se empleó para la construcción de las plantas transgénicas. Por otro lado, quizás la secuencia reguladora utilizada era suficientemente grande, pero en este caso no se podría explicar la expresión demostrada en raíz por PCR. De cualquier manera, en este trabajo, se utilizaron secuencias reguladoras de guisante en plantas de *A. thaliana*, lo cual podría explicar que la información obtenida no sea completa. Las inmunolocalizaciones de PsTRXh1 corroboran la presencia de esta proteína en tejido vascular, a nivel de floema y xilema.

La carencia de señal *GUS* en las construcciones con promotores de *h2* se debe, probablemente, al bajo nivel de expresión de este gen, como hemos demostrado por PCR. Algunas Trxs *h* de *A. thaliana* presentan, así mismo muy bajos niveles de expresión, casi indetectables por Northern blot (por ejemplo, AtTRXh2 ó AtTRXh7) (Reichheld *et al.*, 2001). Sin embargo, es posible que con apenas 300 pb de secuencias reguladoras, falten esos elementos reguladores que proporcionan la presencia de *GUS* en *A. thaliana*. Las inmunolocalizaciones utilizando los anticuerpos frente a PsTRXh2 dan un patrón idéntico al de

PsTRX*h1* pero más fuerte, siendo lo más probable ésta que se deba a reacciones cruzadas entre este anticuerpo y PsTRX*h1* u otra proteína Trx.

IV. Posibles funciones fisiológicas de PsTRX*h1* y PsTRX*h2*

a. Metabolismo del azufre

La complementación heteróloga mostró que ninguna Trx de guisante de las ensayadas en este trabajo parecen estar involucradas en la biosíntesis de metionina. Estos datos están de acuerdo con un trabajo previo donde sólo una Trx *h* de *A. thaliana*, AtTRX*h2*, parecía estar involucrada en tal función (Mouaheb *et al.*, 1998). Este dato, junto con el continuo descubrimiento de nuevas Trxs de plantas superiores, nos sugiere que otra Trx *h* de guisante, aún desconocida, podría estar involucrada en tal función. Inicialmente podemos pensar que la alta identidad entre PsTRX*h4* y AtTRX*h2*, ambas agrupadas en la subclase 2 dentro del grupo de las Trxs, sugiere que PsTRX*h4* podría cumplir tal función en EMY63 y por consiguiente en las células de guisante. Sin embargo la no expresión de este gen en estadios, ni siquiera plantulares, podría invalidar esta suposición. En cualquier caso, experiencias de complementación heteróloga con PsTRX*h3* y PsTRX*h4* permitirían aportar algo de conocimiento sobre tal cuestión.

b. Estrés oxidativo

Sin embargo, las experiencias con levadura nos permitió conocer que ambas Trxs estaban fisiológicamente relacionadas con el control de los daños producidos por agentes oxidantes. Por un lado, ambas Trxs *h* parecen estar involucradas en la reversión de compuestos celulares oxidados. En las experiencias de complementación del crecimiento de EMY63 transformada.

Utilizando SOMet como única fuente de S orgánico descubrimos que ambas Trxs *h* eran capaces de proporcionar crecimiento de la cepa mutante que las expresaba. La habilidad del doble mutante para usar el SOMet como única fuente de S orgánico depende de la actividad presentada por la enzima sulfóxido-metionil-reductasa. Que la levadura transformada crezca en este medio, implica la eficiencia de la Trxs exógena para reducir a esta enzima. Las dos, PsTRX*h*1 y PsTRX*h*2 podrían estar involucradas en tal función en las células de guisante, sobre todo desde que ha sido descrita la interacción entre esta enzima y una Trx *h* de *A. thaliana* (Marchand *et al.*, 2004).

Por otro lado, la restauración de la sensibilidad frente al peróxido de hidrógeno que presenta EMY63 nos permitió relacionar a PsTRX*h*1 con el control de los desequilibrios redox a través de la detoxificación de los agentes oxidantes. Además, los resultados encontrados en la cuantificación de la expresión génica de plántulas estresadas, junto con la cuantificación proteínica nos permitió corroborar los resultados extraídos, para esta proteína, de las experiencias con EMY63. La complementación heteróloga frente a los agentes oxidantes de las Trxs *h* de plantas superiores se debe, según ha sido descrito, a la interacción directa entre la proteína heteróloga de planta y una peroxirredoxina (Prx) tipo-II de levadura (Verdoucq *et al.*, 1999). Una Prx, también tipo-II, homóloga a la descrita en levadura fue descrita en planta, siendo caracterizada como proteína cloroplastídica, mitocondrial y citosólica (Verdoucq *et al.*, 1999; Brehelin *et al.*, 2003, Horling *et al.*, 2003). Las Prxs son proteínas ubicuas que actúan como moléculas antioxidantes (Dietz *et al.*, 2002, Dietz, 2003), siendo las Trxs identificadas como uno de sus agentes reductores en la cadena de detoxificación celular NADP-Trx-Prx (Chae *et al.*, 1994, Kwon *et al.*, 1994). Además, recientemente ha sido descrita una Prx tipo-II en *A. thaliana* como diana de una Trx *h* (Yamazaki *et al.*, 2004).

Basandonos en nuestros datos experimentales y en la bibliografía precedente, proponemos a PsTRXh1 como una proteína antioxidante que actúa principalmente a través de su capacidad de reducción de Prxs. Además, ha sido descrito en *A. thaliana* una Prx tipo-II (PrxIIB) que no mostró variaciones de su expresión génica en estrés inducido por luz, sales o agentes oxidantes (Brehelin *et al.*, 2003), y por tal razón, PsTRXh1 podría actuar regulando la capacidad detoxificadora de estas Prxs a través de su capacidad de reducción. Resultados similares se obtuvieron en una nueva Prx tipo-II de guisante caracterizada recientemente, cuyos niveles de expresión génica frente a agentes oxidantes permanecían invariables (Bernier-Villamor *et al.*, in process)

Un aspecto interesante es, que según el tejido ensayado y el hidróperóxido empleado la respuesta de PsTRXh1 fue diferente. Las raíces de plantas tratadas con H₂O₂ mostraron un mayor aumento en el número de transcritos del gen, sin embargo, las hojas de esas mismas plantas no sufrieron variaciones aparentes en la expresión génica. Esto podría ser explicado teniendo en cuenta que en el tratamiento empleado para estresar las plantas, los tejidos radiculares se ven más afectados que la hoja, donde quizás llega menos agente oxidante, debido a que este fuera detoxificado camino a los tejidos verdes. También se puede contemplar la posibilidad de diferentes sistemas de detoxificación en los diferentes tejidos de la planta, con determinadas preferencias en función del tejido. Por otro lado, en los *western blots* se puede apreciar que existe un paralelismo en la respuesta de expresión proteínica con respecto al aumento de transcritos de PsTRXh1, lo cual indicaría una regulación principalmente transcripcional. Cuando el agente oxidante empleado fue el TBHP, el estrés inducido era mayor. A partir de 20 mM encontramos las plantas decaídas, con tejidos laxos. El aumento de los transcritos fue más evidente en hojas que en raíces. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que este hidróperóxido posee una mayor capacidad de transporte a través de los tejidos

debido a su hidrofobicidad. Sin embargo, este aumento fue más irregular posiblemente debido a la mayor capacidad dañina de este hidroperóxido, como pudimos apreciar visualmente en las plantas tras el tratamiento. Este hecho podría producir una respuesta no completamente fisiológica, a elevadas concentraciones del agente oxidante, en los diferentes tejidos, explicando así que estos niveles en hojas se mantuvieran prácticamente invariables. El comportamiento proteínico en este tratamiento también mostró un perfil creciente pero irregular. Sin embargo, deberíamos indicar la posibilidad de una especificidad detoxificadora en función del hidroperóxido oxidante en la planta.

Cuando analizamos los datos obtenidos de PsTRX*h2* en las experiencias de complementación y de plantas extresadas encontramos un comportamiento muy diferente para esta proteína respecto a su homóloga PsTRX*h1*. Primero, la expresión de PsTRX*h2* en EMY63 conducía a un diferente patrón de crecimiento dependiendo del hidroperóxido empleado. En presencia de TBHP, esta Trx confirió crecimiento a la levadura transformada; sin embargo, cuando el agente oxidante empleado fue el peróxido de hidrógeno, esta proteína no fue capaz de complementar para tal función en el doble mutante. Un efecto similar fue observado en la expresión heteróloga de AtTRX*h2* in esta levadura. Este hecho podría ser explicado fácilmente teniendo en cuenta el trabajo de Jeong y col. (Jeong *et al.*, 1999), quienes caracterizaron dos tipos diferentes de Prxs que mostraron preferencias opuestas en la reducción de peróxido de hidrógeno o alquil hidroperóxidos. Otra posibilidad que nos permitiría explicar esta dualidad de comportamiento sería una compensación metabólica como la que ha sido recientemente explicada (Munhoz and Netto, 2004). La levadura mutante, carente de una de sus Prxs citosólicas, mostraba una elevada sensibilidad frente al TBHP, aunque presentó resistencia al H₂O₂. Esta resistencia se demostró que se debía a una aumento de la actividad catalasa en las células mutantes. De esta forma, la

ausencia de Prx reducida en EMY63 podría producir una compensación metabólica similar debido a la expresión heteróloga de PsTRXh2 o de AtTRXh2.

En segundo lugar, en las experiencias de halo de inhibición frente al H₂O₂ y de expresión heteróloga en pFL61, la expresión de PsTRXh2 confirió a EMY63 una mayor sensibilidad frente a este hidropéroxido que la mostrada por la cepa control (vector vacío). Este fenómeno ya fue descrito para una Trx cloroplastídica de *A. thaliana*, AtTRXm3 (Issakidis-Bourguet *et al.*, 2001). PsTRXh2 mostró un comportamiento contrario al de su homóloga h1 en EMY63, y según los datos precedentes pensamos que esta expresión heteróloga podría conducir a la inhibición de la Prx de levadura. La elevada expresión de PsTRXh2 en EMY63, utilizando pFL61 como vector causó una mayor hipersensibilización. Este vector produce una sobre expresión heteróloga en la levadura transgénica, lo cual podría conducir a interacciones inespecíficas entre la proteína heteróloga y la diana de levadura, sin embargo en este caso, estas experiencias nos sirvieron para demostrar que un exceso de PsTRXh2 causa una mayor hipersensibilidad, posiblemente debido a una mayor inhibición de la Prx.

Inicialmente pensamos que la hipersensibilización presentada por EMY63 podría deberse a las diferencias evolutivas sufridas entre las proteínas dianas correspondientes, entre guisante y levadura. Sin embargo, en las experiencias con plantas estresadas, utilizando ambos hidropéroxidos, encontramos que los niveles de transcritos de PsTRXh2 mostraron una disminución de sus niveles en los tratamientos con agentes oxidantes, siendo este descenso muy drástico en el caso del TBHP donde en ocasiones sus niveles llegaron a ser inapreciables. Sin embargo, cuando lo que estudiamos era la variación en la cantidad de proteína, utilizando anticuerpos frente a PsTRXh2, éstos, mostraron aumentos en ambos tejidos tratados, raíces y hojas. Estas diferencias entre niveles de transcritos de ARNm y de proteína puede ser fácilmente explicable teniendo en cuenta la posibilidad de reacción cruzada mostrada por este anticuerpo frente a PsTRXh1.

Además los niveles de expresión de PsTRXh2 fueron tan bajos que es posible que sus niveles proteínicos sean difícilmente detectables, y lo peor, enmascarados por otras Trxs más abundantes como puedan ser PsTRXh1, o incluso PsTRXh3 con la que comparte alta homología. Poder explicar el papel que esta Trx posee en la célula es difícil. Por un lado, si tenemos en cuenta que sus niveles de ARNm son muy bajos, esto dará lugar a una muy baja cantidad de proteína y ésta podría cumplir alguna función desconocida por ahora, siendo posible que no llegue a interactuar con Prxs, por lo que no se daría este efecto inhibitor a nivel fisiológico. Otros datos experimentales son necesarios para poder explicar de forma fehaciente su función celular. Pero, en cualquier caso, no debemos olvidar la posibilidad de que PsTRXh2 esté actuando a nivel celular inhibiendo a Prxs de guisante. Este hecho supondría un nuevo papel dentro de las Trxs *h*. En cualquier caso, lo que queda demostrado es que esta proteína posee unos determinantes de especificidad en su superficie molecular que condiciona la inhibición de algunas proteínas con las que interactúa. Estas proteínas diana pueden ser perfectamente reducidas por otras Trxs, como PsTRXh1, sin embargo, PsTRXh2 interactuaría con ellas actuando a modo de competidor. Este hecho puede ser apoyado por la inhibición que esta misma proteína ejerce sobre la FBPasa cloroplástica en los ensayos *in vitro*. Inicialmente este ensayo enzimático se realizó con un interés más bien estructural, principalmente, debido a la diferente compartimentación que ambas proteínas presentan. Esta inhibición nos podía aportar alguna información estructural clave en la interacción entre Trxs y proteínas diana, ya que en nuestro laboratorio se han realizado estudios estructurales de los aminoácidos implicados en tales interacciones (Wangensteen *et al.*, 2001). Esta inhibición fisiológica podría tener un significado biológico teniendo en cuenta que ha sido establecido que algunos radicales libres pueden actuar como señales de transducción bajo condiciones de estrés bióticas y abióticas (Karpinski *et al.*, 1999, Mullineaux and Karpinski, 2002, Orozco-

Cardenas *et al.*, 2001). En ausencia de desequilibrios redox los ROS están presentes en unas concentraciones mínimas y necesarias para el buen funcionamiento celular. En cualquier caso, para poder demostrar tales afirmaciones se hace necesaria la realización de nuevos experimentos, siendo la superficie molecular de de PsTRXh2 un aspecto muy interesante.

CONCLUSIONES

1. Se han clonado dos nuevas Trxs de guisante (*Pisum sativum* cv. Lincoln), cuyas secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas han sido caracterizadas, permitiendonos clasificarlas como pertenecientes a la subfamilia de las Trxs *h*. Ambas, fueron expresadas y purificadas como proteínas recombinantes, lo cual nos permitió caracterizarlas como enzimas con actividad Trx.
2. PsTRX*h1* es una Trxs *h* de guisante, con un patrón de expresión génica tisular muy característico, se expresa en haces vasculares, granos de polen y estigma floral, habiendo sido detectada como proteína en haces vasculares. Funcionalmente parece estar relacionado con la defensa frente a agentes oxidantes. La presencia de esta proteína en núcleos de las células de guardia de los estomas, podría representar algún tipo de papel regulador.
3. PsTRX*h2* es una Trx *h* de guisante cuyos niveles de expresión génicos son muy bajos, por lo que no ha sido posible su detección tisular. El papel fisiológico de esta proteína permanece de momento desconocido aunque parece ejercer una función inhibidora con algunas proteínas con las que interacciona.
4. PsTRX*m1* y PsTRX*f* son dos Trxs de guisante de localización cloroplastídica que se revelaron como posibles moléculas antioxidantes en las experiencias de complementación heteróloga en levadura.
5. Las Trxs en *Pisum sativum* constituyen una familia multigénica, al igual que en *A. thaliana*, compuesta hasta ahora por siete Trxs, cuatro tipo *h*, y tres cloroplastídicas. Todas ellas presentan diferentes patrones de expresión y estando involucradas en diferentes funciones, indicando estos hechos la no existencia de redundancia funcional en sus papeles fisiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

Arner,E.S.J. and Holmgren,A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* **267**:6102-6109.

Baalmann,E., Backhausen,J.E., Rak,C., Vetter,S., and Scheibe,R. (1995) Reductive modification and nonreductive activation of purified spinach chloroplast NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**:201-208.

Ballicora,M.A., Frueauf,J.B., Fu,Y.B., Schurmann,P., and Preiss,J. (2000) Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **275**:1315-1320.

Bedford,E., Tabor,S., and Richardson,C.C. (1997) The thioredoxin binding domain of bacteriophage T7 DNA polymerase confers processivity on Escherichia coli DNA polymerase I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:479-484.

Besse,I., Wong,J.H., Kobrehel,K., and Buchanan,B.B. (1996) Thiocalcin: A thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:3169-3175.

Bhattacharyya,S., Habibi-Nazhad,B., Amegbey,G., Slupsky,C.M., Yee,A., Arrowsmith,C., and Wishart,D.S. (2002) Identification of a novel archaeobacterial thioredoxin: Determination of function through structure. *Biochemistry* **41**:4760-4770.

Bjornstedt,M., Xue,J.Y., Huang,W.H., Akesson,B., and Holmgren,A. (1994) The Thioredoxin and Glutaredoxin Systems Are Efficient Electron-Donors to Human Plasma Glutathione-Peroxidase. *Journal of Biological Chemistry* **269**:29382-29384.

Black,S., Harte,E.M., Hudson,B., and Wartofsky,L. (1960) Specific Enzymatic Reduction of L(-)Methionine Sulfoxide and A Related Nonspecific Reduction of Disulfides. *Journal of Biological Chemistry* **235**:2910-2916.

Bower,M.S., Matias,D.D., Fernandes-Carvalho,E., Mazzurco,M., Gu,T., Rothstein,S.J., and Goring,D.R. (1996) Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase. *Plant Cell* **8**:1641-1650.

Bradford,M.M. (1976a) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.

Bradford,M.M. (1976b) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-254.

Brandes,H.K., Larimer,F.W., and Hartman,F.C. (1996) The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f. *Journal of Biological Chemistry* **271**:3333-3335.

Brehelin,C., Meyer,E.H., de Souris,J.P., Bonnard,G., and Meyer,Y. (2003a) Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: Similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiology* **132**:2045-2057.

Brehelin,C., Meyer,E.H., de Souris,J.P., Bonnard,G., and Meyer,Y. (2003b) Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: Similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. *Plant Physiology* **132**:2045-2057.

Brehelin,C., Mouaheb,N., Verdoucq,L., Lancelin,J.M., and Meyer,Y. (2000) Characterization of determinants for the specificity of Arabidopsis thioredoxins h in yeast complementation. *J.Biol.Chem.* **275**:31641-31647.

Broin,M., Cuine,S., Eymery,F., and Rey,P. (2002) The plastidic 2-cysteine peroxiredoxin is a target for a thioredoxin involved in the protection of the photosynthetic apparatus against oxidative damage. *Plant Cell* **14**:1417-1432.

Broin,M. and Rey,P. (2003) Potato plants lacking the CDSP32 plastidic thioredoxin exhibit overoxidation of the BAS1 2-cysteine peroxiredoxin and increased lipid peroxidation in thylakoids under photooxidative stress. *Plant Physiology* **132**:1335-1343.

Brugidou,C., Marty,I., Chartier,Y., and Meyer,Y. (1993) The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. *Mol.Gen.Genet.* **238**:285-293.

Buchanan,B.B. (1991) Regulation of Co₂ Assimilation in Oxygenic Photosynthesis - the Ferredoxin Thioredoxin System - Perspective on Its Discovery, Present Status, and Future-Development. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **288**:1-9.

Bult,C.J., White,O., Olsen,G.J., Zhou,L.X., Fleischmann,R.D., Sutton,G.G., Blake,J.A., FitzGerald,L.M., Clayton,R.A., Gocayne,J.D., Kerlavage,A.R., Dougherty,B.A., Tomb,J.F., Adams,M.D., Reich,C.I., Overbeek,R.,

Kirkness,E.F., Weinstock,K.G., Merrick,J.M., Glodek,A., Scott,J.L., Geoghagen,N.S.M., Weidman,J.F., Fuhrmann,J.L., Nguyen,D., Utterback,T.R., Kelley,J.M., Peterson,J.D., Sadow,P.W., Hanna,M.C., Cotton,M.D., Roberts,K.M., Hurst,M.A., Kaine,B.P., Borodovsky,M., Klenk,H.P., Fraser,C.M., Smith,H.O., Woese,C.R., and Venter,J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**:1058-1073.

Cabrillac,D., Cock,J.M., Dumas,C., and Gaude,T. (2001) The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins. *Nature* **410**:220-223.

Capitani,G., Markovic-Housley,Z., DelVal,G., Morris,M., Jansonius,J.N., and Schurmann,P. (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *Journal of Molecular Biology* **302**:135-154.

Capitani,G. and Schurmann,P. (2004) On the quaternary assembly of spinach chloroplast thioredoxin m. *Photosynthesis Research* **79**:281-285.

Chae,H.Z., Chung,S.J., and Rhee,S.G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J.Biol.Chem.* **269**:27670-27678.

Cherest,H. and Surdinkerjan,Y. (1992) Genetic-Analysis of A New Mutation Conferring Cysteine Auxotrophy in *Saccharomyces-Cerevisiae* - Updating of the Sulfur Metabolism Pathway. *Genetics* **130**:51-58.

Cho,M.J., Wong,J.H., Marx,C., Jiang,W., Lemaux,P.G., and Buchanan,B.B. (1999) Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:14641-14646.

Cole,G.M., Stone,D.E., and Reed,S.I. (1990a) Stoichiometry of G protein subunits affects the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone signal transduction pathway. *Mol.Cell Biol.* **10**:510-517.

Cole,G.M., Stone,D.E., and Reed,S.I. (1990b) Stoichiometry of G-Protein Subunits Affects the *Saccharomyces-Cerevisiae* Mating Pheromone Signal Transduction Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **10**:510-517.

Coudevylle,N., Thureau,A., Hemmerlin,C., Gelhaye,E., Jacquot,J.P., and Cung,M.T. (2004) ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of the reduced form of thioredoxin h1 from Poplar, a CPPC active site variant. *J.Biomol.NMR* **30**:229-230.

Coudevylle,N., Thureau,A., Hemmerlin,C., Gelhaye,E., Jacquot,J.P., and Cung,M.T. (2005) Solution Structure of a Natural CPPC Active Site Variant, the Reduced Form of Thioredoxin h1 from Poplar(.). *Biochemistry* **44**:2001-2008.

Das,K.C. and Das,C.K. (2000) Thioredoxin, a singlet oxygen quencher and hydroxyl radical scavenger: Redox independent functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**:443-447.

Dean,M.F., Martin,H., and Sansom,P.A. (1994) Characterization of A Thioredoxin-Related Surface Protein. *Biochemical Journal* **304**:861-867.

Debarbieux,L. and Beckwith,J. (1998) The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the Escherichia coli periplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:10751-10756.

Delaunay,A., Isnard,A.D., and Toledano,M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *Embo Journal* **19**:5157-5166.

Delaunay,A., Pflieger,D., Barrault,M.B., Vinh,J., and Toledano,M.B. (2002) A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell* **111**:471-481.

Devic,M., Albert,S., Delseny,M., and Roscoe,T.J. (1997a) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**:331-339.

Devic,M., Albert,S., Delseny,M., and Roscoe,T.J. (1997b) Efficient PCR walking on plant genomic DNA. *Plant Physiology and Biochemistry* **35**:331-339.

Didier,C., Pouget,J.P., Cadet,J., Favier,A., Beani,J.C., and Richard,J.J. (2001) Modulation of exogenous and endogenous levels of thioredoxin in human skin fibroblasts prevents DNA damaging effect of ultraviolet A radiation. *Free Radical Biology and Medicine* **30**:537-546.

Dietz,K.J. (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu.Rev.Plant Biol.* **54**:93-107.

Dietz,K.J., Horling,F., Konig,J., and Baier,M. (2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J.Exp.Bot.* **53**:1321-1329.

Dyson,H.J., Gippert,G.P., Case,D.A., Holmgren,A., and Wright,P.E. (1990) Three-dimensional solution structure of the reduced form of Escherichia coli

thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **29**:4129-4136.

Eklund,H., Cambillau,C., Sjoberg,B.M., Holmgren,A., Jornvall,H., Hoog,J.O., and Branden,C.I. (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. *EMBO J.* **3**:1443-1449.

Eklund,H., Gleason,F.K., and Holmgren,A. (1991) Structural and Functional Relations Among Thioredoxins of Different Species. *Proteins-Structure Function and Genetics* **11**:13-28.

Feng,J.N., Model,P., and Russel,M. (1999) A trans-envelope protein complex needed for filamentous phage assembly and export. *Molecular Microbiology* **34**:745-755.

Florencio,F.J., Yee,B.C., Johnson,T.C., and Buchanan,B.B. (1988) An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. *Arch.Biochem.Biophys.* **266**:496-507.

Fox,G.E., Stackebrandt,E., Hespell,R.B., Gibson,J., Maniloff,J., Dyer,T.A., Wolfe,R.S., Balch,W.E., Tanner,R.S., Magrum,L.J., Zablen,L.B., Blakemore,R., Gupta,R., Bonen,L., Lewis,B.J., Stahl,D.A., Luehrsen,K.R., Chen,K.N., and Woese,C.R. (1980) The Phylogeny of Prokaryotes. *Science* **209**:457-463.

Freemerman,A.J. and Powis,G. (2000) A redox-inactive thioredoxin reduces growth and enhances apoptosis in WEHI7.2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **274**:136-141.

Gan,Z.R., Sardana,M.K., Jacobs,J.W., and Polokoff,M.A. (1990) Yeast Thioltransferase - the Active-Site Cysteines Display Differential Reactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **282**:110-115.

Gaude,T. and Cabrillac,D. (2001) Self-incompatibility in flowering plants: The Brassica model. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie Iii-Sciences de la Vie-Life Sciences* **324**:537-542.

Geck,M.K., Larimer,F.W., and Hartman,F.C. (1996) Identification of residues of spinach thioredoxin f that influence interactions with target enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **271**:24736-24740.

Gelhaye,E., Rouhier,N., Gerard,J., Jolivet,Y., Gualberto,J., Navrot,N., Ohlsson,P.I., Wingsle,G., Hirasawa,M., Knaff,D.B., Wang,H., Dizengremel,P.,

Meyer,Y., and Jacquot,J.P. (2004b) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:14545-14550.

Gelhaye,E., Rouhier,N., Gerard,J., Jolivet,Y., Gualberto,J., Navrot,N., Ohlsson,P.I., Wingsle,G., Hirasawa,M., Knaff,D.B., Wang,H., Dizengremel,P., Meyer,Y., and Jacquot,J.P. (2004a) A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**:14545-14550.

Gelhaye,E., Rouhier,N., and Jacquot,J.P. (2003) Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS Lett.* **555**:443-448.

Gelhaye,E., Rouhier,N., and Jacquot,J.P. (2004c) The thioredoxin h system of higher plants. *Plant Physiol Biochem.* **42**:265-271.

Giranton,J.L., Dumas,C., Cock,J.M., and Gaude,T. (2000) The integral membrane S-locus receptor kinase of Brassica has serine/threonine kinase activity in a membranous environment and spontaneously forms oligomers in planta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:3759-3764.

Gleason,F.K. and Holmgren,A. (1988) Thioredoxin and related proteins in procaryotes. *FEMS Microbiol.Rev.* **4**:271-297.

Gonzalez,P.G. and Baldeste,A. (1970) Purification of A Thioredoxin System from Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **245**:2363-&.

Gonzalez,P.G. and Baldesten,A. (1970) Involvement of Thioredoxin System in Reduction of Methionine Sulfoxide and Sulfate. *Journal of Biological Chemistry* **245**:2371-&.

Goto,Y., Noda,Y., Narimoto,K., Umaoka,Y., and Mori,T. (1992) Oxidative Stress on Mouse Embryo Development Invitro. *Free Radical Biology and Medicine* **13**:47-53.

Gronenborn,A.M., Clore,G.M., Louis,J.M., and Wingfield,P.T. (1999) Is human thioredoxin monomeric or dimeric? *Protein Science* **8**:426-429.

Guex,N. and Peitsch,M.C. (1997b) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.

- Guex,N. and Peitsch,M.C.** (1997a) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**:2714-2723.
- Haffani,Y.Z., Gaude,T., Cock,J.M., and Goring,D.R.** (2004) Antisense suppression of thioredoxin h mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Mol.Biol.* **55**:619-630.
- Hall,D.E., Baldesten,A., Holmgren,A., and Reichard,P.** (1971) Yeast thioredoxin. Amino-acid sequence around the active-center disulfide of thioredoxin I and II. *Eur.J.Biochem.* **23**:328-335.
- Hartman,H., Syvanen,M., and Buchanan,B.B.** (1990) Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Mol.Biol.Evol.* **7**:247-254.
- Hartman,H., Wu,M., Buchanan,B.B., and Gerhart,J.C.** (1993) Spinach Thioredoxin *m* Inhibits DNA-Synthesis in Fertilized *Xenopus* Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**:2271-2275.
- Hayashi,T., Ueno,Y., and Okamoto,T.** (1993) Oxidoreductive Regulation of Nuclear Factor-Kappa-B - Involvement of A Cellular Reducing Catalyst Thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **268**:11380-11388.
- Hayman,D.L. and Richter,J.** (1992) Mutations Affecting Self-Incompatibility in *Phalaris-Coerulescens* Desf (Poaceae). *Heredity* **68**:495-503.
- Hertig,C. and Wolosiuk,R.A.** (1980) A dual effect of Ca²⁺ on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **97**:325-333.
- Higo,K., Ugawa,Y., Iwamoto,M., and Korenaga,T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Research* **27**:297-300.
- Himawan,J.S. and Richardson,C.C.** (1992) Genetic-Analysis of the Interaction Between Bacteriophage T7 DNA Polymerase and *Escherichia coli* Thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:9774-9778.
- Hirota,K., Matsui,M., Iwata,S., Nishiyama,A., Mori,K., and Yodoi,J.** (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**:3633-3638.

Hirota,K., Murata,M., Sachi,Y., Nakamura,H., Takeuchi,J., Mori,K., and Yodoi,J. (1999) Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus - A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappa B. *Journal of Biological Chemistry* **274**:27891-27897.

Hirota,K., Nakamura,H., Masutani,H., and Yodoi,J. (2002) Thioredoxin superfamily and thioredoxin-inducing agents. *Alcohol and Wine in Health and Disease* **957**:189-199.

Hodges,M., MiginiacMaslow,M., Decottignies,P., Jacquot,J.P., Stein,M., Lepiniec,L., Cretin,C., and Gadal,P. (1994a) Purification and Characterization of Pea Thioredoxin-F Expressed in Escherichia-Coli. *Plant Molecular Biology* **26**:225-234.

Hodges,M., Miginiacmaslow,M., Decottignies,P., Jacquot,J.P., Stein,M., Lepiniec,L., Cretin,C., and Gadal,P. (1994b) Purification and Characterization of Pea Thioredoxin-F Expressed in Escherichia-Coli. *Plant Molecular Biology* **26**:225-234.

Holmgren,A. (1976) Hydrogen donor system for Escherichia coli ribonucleoside-diphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **73**:2275-2279.

Holmgren,A. (1979a) Reduction of disulfides by thioredoxin. Exceptional reactivity of insulin and suggested functions of thioredoxin in mechanism of hormone action. *J.Biol.Chem.* **254**:9113-9119.

Holmgren,A. (1979b) Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J.Biol.Chem.* **254**:9627-9632.

Holmgren,A. (1985) Thioredoxin. *Annu.Rev.Biochem.* **54**:237-271.

Holmgren,A. and Soderberg,B. (1970) Crystallization and preliminary crystallographic data for thioredoxin from Escherichia coli B. *J.Mol.Biol.* **54**:387-390.

Holmgren,A., Soderberg,B.O., Eklund,H., and Branden,C.I. (1975) Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 A resolution. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **72**:2305-2309.

Horling,F., Lamkemeyer,P., Konig,J., Finkemeier,I., Kandlbinder,A., Baier,M., and Dietz,K.J. (2003) Divergent light-, ascorbate-, and oxidative stress-dependent

regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**:317-325.

Hu,J.D., Ma,X.R., Lindner,D.J., Karra,S., Hofmann,E.R., Reddy,S.P.M., and Kalvakolanu,D.V. (2001) Modulation of p53 dependent gene expression and cell death through thioredoxin-thioredoxin reductase by the interferon-retinoid combination. *Oncogene* **20**:4235-4248.

Huber,H.E., Russel,M., Model,P., and Richardson,C.C. (1986) Interaction of mutant thioredoxins of Escherichia coli with the gene 5 protein of phage T7. The redox capacity of thioredoxin is not required for stimulation of DNA polymerase activity. *J.Biol.Chem.* **261**:15006-15012.

Ishiwatari,Y., Fujiwara,T., McFarland,K.C., Nemoto,K., Hayashi,H., Chino,M., and Lucas,W.J. (1998) Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* **205**:12-22.

Ishiwatari,Y., Honda,C., Kawashima,I., Nakamura,S., Hirano,H., Mori,S., Fujiwara,T., Hayashi,H., and Chino,M. (1995) Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**:456-463.

Ishiwatari,Y., Nemoto,K., Fujiwara,T., Chino,M., and Hayashi,H. (2000) In situ hybridization study of the rice phloem thioredoxin h mRNA accumulation - possible involvement in the differentiation of vascular tissues. *Physiologia Plantarum* **109**:90-96.

Issakidis-Bourguet,E., Mouaheb,N., Meyer,Y., and Miginiac-Maslow,M. (2001) Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin. *Plant Journal* **25**:127-135.

Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* **153**:163-168.

Izawa,S., Maeda,K., Sugiyama,K., Mano,J., Inoue,Y., and Kimura,A. (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **274**:28459-28465.

JacquierSarlin,M.R. and Polla,B.S. (1996) Dual regulation of heat-shock transcription factor (HSF) activation and DNA-binding activity by H₂O₂: Role of thioredoxin. *Biochemical Journal* **318**:187-193.

Jacquot, J.P., Gelhaye, E., Rouhier, N., Corbier, C., Didierjean, C., and Aubry, A. (2002) Thioredoxins and related proteins in photosynthetic organisms: molecular basis for thiol dependent regulation. *Biochemical Pharmacology* **64**:1065-1069.

Jacquot, J.P., Lancelin, J.M., and Meyer, Y. (1997) Tansley review no 94 - Thioredoxins: Structure and function in plant cells. *New Phytologist* **136**:543-570.

Jaramillo, J.L., Chueca, A., Jacquot, J.P., Hermoso, R., Lazaro, J.J., Sahrawy, M., and Gorge, J.L. (1997b) High-yield expression of pea thioredoxin m and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant Physiology* **114**:1169-1175.

Jaramillo, J.L., Chueca, A., Jacquot, J.P., Hermoso, R., Lazaro, J.J., Sahrawy, M., and Gorge, J.L. (1997a) High-yield expression of pea thioredoxin m and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation. *Plant Physiology* **114**:1169-1175.

Jaramillo, J.L., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lazaro, L.J., Prado, F.E., and Gorge, J.L. (1994) Cloning and Sequencing of A Pea Cdna Fragment Coding for Thioredoxin M. *Plant Physiology* **105**:1021-1022.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987) Beta-Glucuronidase (Gus) As A Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Plants. *Journal of Cellular Biochemistry*:57.

Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., and Dyson, H.J. (1994) High-Resolution Solution Structures of Oxidized and Reduced Escherichia-Coli Thioredoxin. *Structure* **2**:853-868.

Jeong, J.S., Kwon, S.J., Kang, S.W., Rhee, S.G., and Kim, K. (1999) Purification and characterization of a second type thioredoxin peroxidase (type II TPx) from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry* **38**:776-783.

Jiao, J.A., Yee, B.C., Kobrehel, K., and Buchanan, B.B. (1992) Effect of Thioredoxin-Linked Reduction on the Activity and Stability of the Kunitz and Bowman-Birk Soybean Trypsin-Inhibitor Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **40**:2333-2336.

Johnson, T.C., Cao, R.Q., Kung, J.E., and Buchanan, B.B. (1987a) Thioredoxin and NADP-thioredoxin reductase from cultured carrot cells. *Planta* **171**:321-331.

Johnson, T.C., Wada, K., Buchanan, B.B., and Holmgren, A. (1987b) Reduction of purothionin by the wheat seed thioredoxin system. *Plant Physiology* **85**:446-51.

Juttner,J., Olde,D., Langridge,P., and Baumann,U. (2000) Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *European Journal of Biochemistry* **267**:7109-7117.

Kallis,G.B. and Holmgren,A. (1980) Differential reactivity of the functional sulfhydryl groups of cysteine-32 and cysteine-35 present in the reduced form of thioredoxin from *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* **255**:10261-10265.

Karpinski,S., Reynolds,H., Karpinska,B., Wingsle,G., Creissen,G., and Mullineaux,P. (1999) Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science* **284**:654-657.

Katti,S.K., LeMaster,D.M., and Eklund,H. (1990) Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **212**:167-184.

Kim,Y.B., Garbisu,C., Pickering,I.J., Prince,R.C., George,G.N., Cho,M.J., Wong,J.H., and Buchanan,B.B. (2003) Thioredoxin h overexpressed in barley seeds enhances selenite resistance and uptake during germination and early seedling development. *Planta* **218**:186-191.

Kobrehel,K., Wong,J.H., Balogh,A., Kiss,F., Yee,B.C., and Buchanan,B.B. (1992a) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol* **99**:919-924.

Kobrehel,K., Wong,J.H., Balogh,A., Kiss,F., Yee,B.C., and Buchanan,B.B. (1992b) Specific reduction of wheat storage proteins by thioredoxin h. *Plant Physiol* **99**:919-924.

Kobrehel,K., Yee,B.C., and Buchanan,B.B. (1991) Role of the NADP Thioredoxin System in the Reduction of Alpha-Amylase and Trypsin-Inhibitor Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **266**:16135-16140.

Koncz,C. and Schell,J. (1986) The Promoter of Tl-Dna Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by A Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector. *Molecular & General Genetics* **204**:383-396.

Kuge,S. and Jones,N. (1994) Yap1 Dependent Activation of Trx2 Is Essential for the Response of *Saccharomyces-Cerevisiae* to Oxidative Stress by Hydroperoxides. *Embo Journal* **13**:655-664.

Kuras,L. and Thomas,D. (1995) Functional analysis of Met4, a yeast transcriptional activator responsive to S-adenosylmethionine. *Mol.Cell Biol.* **15**:208-216.

Kurooka,H., Kato,K., Minoguchi,S., Takahashi,Y., Ikeda,J., Habu,S., Osawa,N., Buchberg,A.M., Moriwaki,K., Shisa,H., and Honjo,T. (1997) Cloning and characterization of the nucleoredoxin gene that encodes a novel nuclear protein related to thioredoxin. *Genomics* **39**:331-339.

Kwon,S.J., Park,J.W., Choi,W.K., Kim,I.H., and Kim,K. (1994) Inhibition of metal-catalyzed oxidation systems by a yeast protector protein in the presence of thioredoxin. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **201**:8-15.

Laemmli,U.K. (1970a) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Laemmli,U.K. (1970b) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.

Laloi,C., Mestres-Ortega,D., Marco,Y., Meyer,Y., and Reichheld,J.P. (2004) The Arabidopsis cytosolic thioredoxin h5 gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiol* **134**:1006-1016.

Laloi,C., Rayapuram,N., Chartier,Y., Grienenberger,J.M., Bonnard,G., and Meyer,Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:14144-14149.

Lamotte-Guery,F., Pruvost,C., Minard,P., Delsuc,M.A., Miginiac-Maslow,M., Schmitter,J.M., Stein,M., and Decottignies,P. (1997) Structural and functional roles of a conserved proline residue in the alpha 2 helix of Escherichia coli thioredoxin. *Protein Engineering* **10**:1425-1432.

Lancelin,J.M., Guilhaudis,L., Krimm,I., Blackledge,M.J., Marion,D., and Jacquot,J.P. (2000) NMR structures of thioredoxin m from the green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Proteins-Structure Function and Genetics* **41**:334-349.

Laughner,B.J., Sehnke,P.C., and Ferl,R.J. (1998) A novel nuclear member of the thioredoxin superfamily. *Plant Physiology* **118**:987-996.

Laurent, Moore,E.C., and Reichard,P. (1964) Enzymatic Synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *E. coli* B. *J.Biol.Chem.* **239**:3436-3444.

Lee,J., Godon,C., Lagniel,G., Spector,D., Garin,J., Labarre,J., and Toledano,M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **274**:16040-16046.

Lemaire,S., Keryer,E., Stein,M., Schepens,I., Issakidis-Bourguet,E., Gerard-Hirne,C., Miginiac-Maslow,M., and Jacquot,J.P. (1999) Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **120**:773-778.

Levine,R.L., Berlett,B.S., Moskovitz,J., Mosoni,L., and Stadtman,E.R. (1999) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. *Mechanisms of Ageing and Development* **107**:323-332.

Levine,R.L., Moskovitz,J., and Stadtman,E.R. (2000) Oxidation of methionine in proteins: Roles in antioxidant defense and cellular regulation. *Iubmb Life* **50**:301-307.

Levine,R.L., Mosoni,L., Berlett,B.S., and Stadtman,E.R. (1996) Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:15036-15040.

Lewis,D. (1976) Incompatibility in flowering plants. *Recept.Recog.Ser.A* **2**:167-198.

Li,X., Nield,J., Hayman,D., and Langridge,P. (1994) Cloning a putative self-incompatibility gene from the pollen of the grass *Phalaris coerulescens*. *Plant Cell* **6**:1923-1932.

Li,X., Nield,J., Hayman,D., and Langridge,P. (1995) Thioredoxin activity in the C terminus of *Phalaris* S protein. *Plant J.* **8**:133-138.

Li,X., Nield,J., Hayman,D., and Langridge,P. (1996) A self-fertile mutant of *Phalaris* produces an S protein with reduced thioredoxin activity. *Plant J.* **10**:505-513.

Li,X.M., Paech,N., Nield,J., Hayman,D., and Langridge,P. (1997) Self-incompatibility in the grasses: Evolutionary relationship of the S gene from *Phalaris coerulescens* to homologous sequences in other grasses. *Plant Molecular Biology* **34**:223-232.

Lindley,H. (1960) Study of the Kinetics of the Reaction Between Thiol Compounds and Chloroacetamide. *Biochemical Journal* **74**:577-584.

- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001a) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* **25**:402-408.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001b) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* **25**:402-408.
- Lozano, R.M., Wong, J.H., Yee, B.C., Peters, A., Kobrehel, K., and Buchanan, B.B.** (1996) New evidence for a role for thioredoxin h in germination and seedling development. *Planta* **200**:100-106.
- Ludemann, H., Dormeyer, M., Sticherling, C., Stallmann, D., Follmann, H., and Krauth-Siegel, R.L.** (1998) Trypanosoma brucei tryparedoxin, a thioredoxin-like protein in African trypanosomes. *Febs Letters* **431**:381-385.
- Machado, A.K., Morgan, B.A., and Merrill, G.F.** (1997) Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in Saccharomyces cerevisiae. *Journal of Biological Chemistry* **272**:17045-17054.
- Maeda, K., Finnie, C., Ostergaard, O., and Svensson, B.** (2003) Identification, cloning and characterization of two thioredoxin h isoforms, HvTrxh1 and HvTrxh2, from the barley seed proteome. *Eur.J.Biochem.* **270**:2633-2643.
- Maeda, K., Finnie, C., and Svensson, B.** (2004a) Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochem.J.* **378**:497-507.
- Maeda, K., Finnie, C., and Svensson, B.** (2004b) Cy5 maleimide labelling for sensitive detection of free thiols in native protein extracts: identification of seed proteins targeted by barley thioredoxin h isoforms. *Biochem.J.* **378**:497-507.
- Makino, Y., Tanaka, H., Okamoto, K., and Makino, I.** (1997) Redox regulation of glucocorticoid-mediated gene expression with reference to the role of thioredoxin. *Faseb Journal* **11**:A1074.
- Makino, Y., Yoshikawa, N., Okamoto, K., Hirota, K., Yodoi, J., Makino, I., and Tanaka, H.** (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *Journal of Biological Chemistry* **274**:3182-3188.
- Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E., and Decottignies, P.** (2004b) New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**:2696-2706.

Marchand,C., Le Marechal,P., Meyer,Y., Miginiac-Maslow,M., Issakidis-Bourguet,E., and Decottignies,P. (2004a) New targets of Arabidopsis thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* **4**:2696-2706.

Margullis,L. (1970) *The origin of eukaryotic cells*. New Haven USA.

Marty,I., Brigidou,C., Chartier,Y., and Meyer,Y. (1993) Growth-Related Gene-Expression in Nicotiana-Tabacum Mesophyll Protoplasts. *Plant Journal* **4**:265-278.

Marx,C., Wong,J.H., and Buchanan,B.B. (2003) Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes. *Planta* **216**:454-460.

Mazzurco,M., Sulaman,W., Elina,H., Cock,J.M., and Goring,D.R. (2001) Further analysis of the interactions between the Brassica S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, THL1 and THL2) in the yeast two-hybrid system. *Plant Mol.Biol.* **45**:365-376.

Mcdonell,M.W., Simon,M.N., and Studier,F.W. (1977) Analysis of Restriction Fragments of T7 Dna and Determination of Molecular-Weights by Electrophoresis in Neutral and Alkaline Gels. *Journal of Molecular Biology* **110**:119-146.

Menchise,V., Corbier,C., Didierjean,C., Jacquot,J.P., Benedetti,E., Saviano,M., and Aubry,A. (2001a) Crystal structure of the W35A mutant thioredoxin h from *Chlamydomonas reinhardtii*: the substitution of the conserved active site Trp leads to modifications in the environment of the two catalytic cysteines. *Biopolymers* **56**:1-7.

Menchise,V., Corbier,C., Didierjean,C., Saviano,M., Benedetti,E., Jacquot,J.P., and Aubry,A. (2001b) Crystal structure of the wild-type and D30A mutant thioredoxin h of *Chlamydomonas reinhardtii* and implications for the catalytic mechanism. *Biochem.J.* **359**:65-75.

Mestres-Ortega,D. and Meyer,Y. (1999) The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin. *Gene* **240**:307-316.

Meyer,Y., Grosset,J., Chartier,Y., and Cleyet-Marel,J.C. (1988) Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts. *Electrophoresis* **9**:704-712.

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

Meyer,Y., Vignols,F., and Reichheld,J.P. (2002b) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**:394-402.

Meyer,Y., Vignols,F., and Reichheld,J.P. (2002a) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Methods Enzymol.* **347**:394-402.

Minet,M., Dufour,M.E., and Lacroute,F. (1992) Complementation of *Saccharomyces-Cerevisiae* Auxotrophic Mutants by *Arabidopsis-Thaliana* Cdnas. *Plant Journal* **2**:417-422.

Miranda-Vizuete,A., Damdimopoulos,A.E., Gustafsson,J.A., and Spyrou,G. (1997) Cloning, expression, and characterization of a novel *Escherichia coli* thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **272**:30841-30847.

Miranda-Vizuete,A., Ljung,J., Damdimopoulos,A.E., Gustafsson,J.A., Oko,R., Pelto-Huikko,M., and Spyrou,G. (2001) Characterization of Sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *Journal of Biological Chemistry* **276**:31567-31574.

Miranda-Vizuete,A., Sadek,C.M., Jimenez,A., Krause,W.J., Sutovsky,P., and Oko,R. (2004) The mammalian testis-specific thioredoxin system. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**:25-40.

Mittard,V., Blackledge,M.J., Stein,M., Jacquot,J.P., Marion,D., and Lancelin,J.M. (1997a) NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur.J.Biochem.* **243**:374-383.

Mittard,V., Blackledge,M.J., Stein,M., Jacquot,J.P., Marion,D., and Lancelin,J.M. (1997b) NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *European Journal of Biochemistry* **243**:374-383.

Mittard,V., Morelle,N., Brutscher,B., Simorre,J.P., Marion,D., Stein,M., Jacquot,J.P., Lirsac,P.N., and Lancelin,J.M. (1995) ¹H, ¹³C, ¹⁵N-NMR resonance assignments of oxidized thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii* using new methods based on two-dimensional

triple-resonance NMR spectroscopy and computer-assisted backbone assignment. *Eur.J.Biochem.* **229**:473-485.

Montrichard,F., Renard,M., Alkhalfioui,F., Duval,F.D., and Macherel,D. (2003) Identification and differential expression of two thioredoxin h isoforms in germinating seeds from pea. *Plant Physiol* **132**:1707-1715.

MoraGarcia,S., Ballicora,M.A., and Wolosiuk,R.A. (1996) Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: Modification of non-covalent interactions promote the activation by chimeric *Escherichia coli* thioredoxins. *Febs Letters* **380**:123-126.

Moskovitz,J., Bar-Noy,S., Williams,W.M., Berlett,B.S., and Stadtman,E.R. (2001) Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:12920-12925.

Mouaheb,N., Thomas,D., Verdoucq,L., Monfort,P., and Meyer,Y. (1998) In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**:3312-3317.

Muller,E.G.D. (1991) Thioredoxin Deficiency in Yeast Prolongs-S Phase and Shortens the G1 Interval of the Cell-Cycle. *Journal of Biological Chemistry* **266**:9194-9202.

Muller,E.G.D. (1994) Deoxyribonucleotides Are Maintained at Normal Levels in A Yeast Thioredoxin Mutant Defective in Dna-Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **269**:24466-24471.

Muller,E.G.D. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell* **7**:1805-1813.

Mullineaux,P. and Karpinski,S. (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr.Opin.Plant Biol.* **5**:43-48.

Munhoz,D.C. and Netto,L.E.S. (2004) Cytosolic thioredoxin peroxidase I and II are important defenses of yeast against organic hydroperoxide insult - Catalases and peroxiredoxins cooperate in the decomposition of H₂O₂ by yeast. *Journal of Biological Chemistry* **279**:35219-35227.

Nakamura,H., Kondo,N., Bai,J., and Yodoi,J. (2002) Thioredoxin-dependent redox regulation in infection and inflammation. *Free Radical Biology and Medicine* **33**:S93-S94.

Nakamura,H., Nakamura,K., and Yodoi,J. (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annual Review of Immunology* **15**:351-369.

Natsuyama,S., Noda,Y., Yamashita,M., Nagahama,Y., and Mori,T. (1993) Superoxide-Dismutase and Thioredoxin Restore Defective P34(Cdc2) Kinase Activation in Mouse 2-Cell Block. *Biochimica et Biophysica Acta* **1176**:90-94.

Nicastro,G., de Chiara,C., Pedone,E., Tato,M., Rossi,M., and Bartolucci,S. (2000) NMR solution structure of a novel thioredoxin from *Bacillus acidocaldarius* - Possible determinants of protein stability. *European Journal of Biochemistry* **267**:403-413.

Nogoceke,E., Gommel,D.U., Kiess,M., Kalisz,H.M., and Flohe,L. (1997) A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biological Chemistry* **378**:827-836.

Nordberg,J. and Arner,E.S.J. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* **31**:1287-1312.

Orozco-Cardenas,M.L., Narvaez-Vasquez,J., and Ryan,C.A. (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**:179-191.

Pagano,E.A., Chueca,A., and Lopez-Gorge,J. (2000a) Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *J.Exp.Bot.* **51**:1299-1307.

Pagano,E.A., Chueca,A., and Lopez-Gorge,J. (2000b) Expression of thioredoxins f and m, and of their targets fructose-1,6-bisphosphatase and NADP-malate dehydrogenase, in pea plants grown under normal and light/temperature stress conditions. *J.Exp.Bot.* **51**:1299-1307.

Pasternak,C., Haberzettl,K., and Klug,G. (1999) Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* **181**:100-106.

Pearson,G.D. and Merrill,G.F. (1998) Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *Journal of Biological Chemistry* **273**:5431-5434.

Pedrajas,J.R., Kosmidou,E., Miranda-Vizuet,A., Gustafsson,J.A., Wright,A.P.H., and Spyrou,G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **274**:6366-6373.

Pekkari,K., Gurunath,R., Arner,E.S.J., and Holmgren,A. (2000) Truncated thioredoxin is a mitogenic cytokine for resting human peripheral blood mononuclear cells and is present in human plasma. *Journal of Biological Chemistry* **275**:37474-37480.

Pekkari,K. and Holmgren,A. (2004) Truncated thioredoxin: Physiological functions and mechanism. *Antioxidants & Redox Signaling* **6**:53-61.

Powis,G. and Montfort,W.R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **30**:421-455.

Powis,G., Mustacich,D., and Coon,A. (2000) The role of the redox protein thioredoxin in cell growth and cancer. *Free Radical Biology and Medicine* **29**:312-322.

Prado,F.E., Lazaro,J.J., Hermoso,R., Chueca,A., and Gorge,J.L. (1992) Purification and Properties of Pea (*Pisum-Sativum* L) Thioredoxin-F, A Plant Thioredoxin with Unique Features in the Activation of Chloroplast Fructose-1,6-Bisphosphatase. *Planta* **188**:345-353.

Qin,J., Clore,G.M., and Gronenborn,A.M. (1994) The High-Resolution 3-Dimensional Solution Structures of the Oxidized and Reduced States of Human Thioredoxin. *Structure* **2**:503-522.

Qin,J., Clore,G.M., Huth,J., Kennedy,W.P., and Gronenborn,A.M. (1995) The 3-Dimensional Solution Structure of Human Thioredoxin Complexed with Its Target Binding-Site from Nfkb. *Journal of Cellular Biochemistry*:36.

Qin,J., Clore,G.M., Kennedy,W.P., Kuszewski,J., and Gronenborn,A.M. (1996) The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal. *Structure* **4**:613-620.

Raines,C.A., Lloyd,J.C., Willingham,N.M., Potts,S., and Dyer,T.A. (1992) cDNA and Gene-Sequences of Wheat Chloroplast Sedoheptulose-1,7-Bisphosphatase Reveal Homology with Fructose-1,6-Bisphosphatases. *European Journal of Biochemistry* **205**:1053-1059.

Reichheld, J.P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C., and Meyer, Y. (2002) The multigenic family of thioredoxin h in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**:685-690.

Rey, P., Pruvot, G., Becuwe, N., Eymery, F., Rumeau, D., and Peltier, G. (1998) A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant Journal* **13**:97-107.

Richardson, J.M., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P., and Makhatadze, G.I. (2000) Difference in the mechanisms of the cold and heat induced unfolding of thioredoxin h from *Chlamydomonas reinhardtii*: spectroscopic and calorimetric studies. *Biochemistry* **39**:11154-11162.

Ritz, D., Patel, H., Doan, B., Zheng, M., Aslund, F., Storz, G., and Beckwith, J. (2000) Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **275**:2505-2512.

Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M., and Meyer, Y. (1995) Evidence for five divergent thioredoxin h sequences in *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:5620-5624.

Ruelland, E. and Miginiac-Maslow, M. (1999) Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends in Plant Science* **4**:136-141.

Russel, M. and Model, P. (1985) Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **82**:29-33.

Russel, M. and Model, P. (1986) The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins. *J.Biol.Chem.* **261**:14997-15005.

Saarinen, M., Gleason, F.K., and Eklund, H. (1995) Crystal-Structure of Thioredoxin-2 from *Anabaena*. *Structure* **3**:1097-1108.

Sahrawy, M., Hecht, V., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Chartier, Y., and Meyer, Y. (1996) Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J.Mol.Evol.* **42**:422-431.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of Dna with A Thermostable Dna-Polymerase. *Science* **239**:487-491.

- Saitoh,M., Nishitoh,H., Fujii,M., Takeda,K., Tobiume,K., Sawada,Y., Kawabata,M., Miyazono,K., and Ichijo,H.** (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo Journal* **17**:2596-2606.
- Santandrea,G., Guo,Y., O'Connell,T., and Thompson,R.D.** (2002) Post-phloem protein trafficking in the maize caryopsis: ZmTRXh1, a thioredoxin specifically expressed in the pedicel parenchyma of *Zea mays* L., is found predominantly in the placentochalaza. *Plant Molecular Biology* **50**:743-756.
- Sasaki,T., Chino,M., Hayashi,H., and Fujiwara,T.** (1998) Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39**:895-897.
- Sasaki,Y. and Hatano,M.** (1997) Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-Coenzyme A carboxylase. *Plant Physiology* **114**:273.
- Schagger,H. and Vonjagow,G.** (1987b) Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Analytical Biochemistry* **166**:368-379.
- Schagger,H. and Vonjagow,G.** (1987a) Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Analytical Biochemistry* **166**:368-379.
- Schobert,C., Baker,L., Szederkenyi,J., Grossmann,P., Komor,E., Hayashi,H., Chino,M., and Lucas,W.J.** (1998) Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Planta* **206**:245-252.
- Schopfer,C.R., Nasrallah,M.E., and Nasrallah,J.B.** (1999) The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science* **286**:1697-1700.
- Schwarz,O., Schurmann,P., and Strotmann,H.** (1997) Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry* **272**:16924-16927.
- Schwede,T., Kopp,J., Guex,N., and Peitsch,M.C.** (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**:3381-3385.
- Serrato,A.J. and Cejudo,F.J.** (2003) Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta* **217**:392-399.

Serrato,A.J., Crespo,J.L., Florencio,F.J., and Cejudo,F.J. (2001a) Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol.Biol.* **46**:361-371.

Serrato,A.J., Crespo,J.L., Florencio,F.J., and Cejudo,F.J. (2001b) Characterization of two thioredoxins h with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Mol.Biol.* **46**:361-371.

Shi,J. and Bhattacharyya,M.K. (1996) A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean. *Plant Mol.Biol.* **32**:653-662.

Spyrou,G., Enmark,E., MirandaVizuete,A., and Gustafsson,J.A. (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *Journal of Biological Chemistry* **272**:2936-2941.

Spyrou,G., Wilson,W., Padilla,C.A., Holmgren,A., and Miranda-Vizuete,A. (2001) A genome-wide survey of human thioredoxin and glutaredoxin family pseudogenes. *Human Genetics* **109**:429-439.

Stephenson,A.G., Doughty,J., Dixon,S., Elleman,C., Hiscock,S., and Dickinson,H.G. (1997) The male determinant of self-incompatibility in Brassica oleracea is located in the pollen coating. *The Plant Journal* **12**:1351-1359.

Stewart,E.J., Aslund,F., and Beckwith,J. (1998) Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *Embo Journal* **17**:5543-5550.

Szederkenyi,J., Komor,E., and Schobert,C. (1997) Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from Ricinus communis L and characterisation of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* **202**:349-356.

Takasaki,T., Hatakeyama,K., Suzuki,G., Watanabe,M., Isogai,A., and Hinata,K. (2000) The S receptor kinase determines self-incompatibility in Brassica stigma. *Nature* **403**:913-916.

Tanaka,T., Hosoi,F., Yamaguchi-Iwai,Y., Nakamura,H., Masutani,H., Ueda,S., Nishiyama,A., Takeda,S., Wada,H., Spyrou,G., and Yodoi,J. (2002) Thioredoxin-2 (TRX-2) is an essential gene regulating mitochondria-dependent apoptosis. *Embo Journal* **21**:1695-1703.

Tonissen,K., Wells,J., Cock,I., Perkins,A., Orozco,C., and Clarke,F. (1993) Site-Directed Mutagenesis of Human Thioredoxin - Identification of Cysteine-74 As

Critical to Its Function in the Early-Pregnancy Factor System. *Journal of Biological Chemistry* **268**:22485-22489.

Toriyama,K., Hanaoka,K., Okada,T., and Watanabe,M. (1998) Molecular cloning of a cDNA encoding a pollen extracellular protein as a potential source of a pollen allergen in *Brassica rapa*. *Febs Letters* **424**:234-238.

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979a) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**:4350-4354.

Towbin,H., Staehelin,T., and Gordon,J. (1979b) Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**:4350-4354.

Ueno,M., Masutani,H., Arai,R.J., Yamauchi,A., Hirota,K., Sakai,T., Inamoto,T., Yamaoka,Y., Yodoi,J., and Nikaido,T. (1999) Thioredoxin-dependent redox regulation of p53-mediated p21 activation. *Journal of Biological Chemistry* **274**:35809-35815.

Verdoucq,L., Vignols,F., Jacquot,J.P., Chartier,Y., and Meyer,Y. (1999) In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family. *J.Biol.Chem.* **274**:19714-19722.

Vernoux,T., Wilson,R.C., Seeley,K.A., Reichheld,J.P., Muroy,S., Brown,S., Maughan,S.C., Cobbett,C.S., Van Montagu,M., Inze,D., May,M.J., and Sung,Z.R. (2000) The Root Meristemless1/Cadmium Sensitive2 Gene Defines A Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division During Postembryonic Root Development. *Plant Cell* **12**:97-109.

Vignols,F., Mouaheb,N., Thomas,D., and Meyer,Y. (2003) Redox control of Hsp70-Co-chaperone interaction revealed by expression of a thioredoxin-like Arabidopsis protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**:4516-4523.

Wangensteen,O.S., Chueca,A., Hirasawa,M., Sahrawy,M., Knaff,D.B., and Gorge,J.L. (2001b) Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase-thioredoxin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**:156-166.

Wangensteen,O.S., Chueca,A., Hirasawa,M., Sahrawy,M., Knaff,D.B., and Gorge,J.L. (2001a) Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase-

thioredoxin interaction. *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1547**:156-166.

Wehling,P., Hackauf,B., and Wricke,G. (1994) Phosphorylation of Pollen Proteins in Relation to Self-Incompatibility in Rye (*Secale-Cereale L*). *Sexual Plant Reproduction* **7**:67-75.

Weichsel,A., Gasdaska,J.R., Powis,G., and Montfort,W.R. (1996) Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: Evidence for a regulatory homodimer. *Structure* **4**:735-751.

Wenderoth,I., Scheibe,R., and vonSchaewen,A. (1997) Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **272**:26985-26990.

Woese,C.R. (1987) Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**:221-271.

Wong,J.H., Cai,N., Balmer,Y., Tanaka,C.K., Vensel,W.H., Hurkman,W.J., and Buchanan,B.B. (2004) Thioredoxin targets of developing wheat seeds identified by complementary proteomic approaches. *Phytochemistry* **65**:1629-1640.

Wong,J.H., Kim,Y.B., Ren,P.H., Cai,N., Cho,M.J., Hedden,P., Lemaux,P.G., and Buchanan,B.B. (2002) Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleurone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**:16325-16330.

Xu,Z.Y., Mayer,A., Muller,E., and Wickner,W. (1997) A heterodimer of thioredoxin and I-2(B) cooperates with Sec18p (NSF) to promote yeast vacuole inheritance. *Journal of Cell Biology* **136**:299-306.

Xu,Z.Y. and Wickner,W. (1996) Thioredoxin is required for vacuole inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Cell Biology* **132**:787-794.

Yamazaki,D., Motohashi,K., Kasama,T., Hara,Y., and Hisabori,T. (2004) Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **45**:18-27.

Yano,H., Wong,J.H., Lee,Y.M., Cho,M.J., and Buchanan,B.B. (2001) A strategy for the identification of proteins targeted by thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**:4794-4799.

Zhang,N. and Portis,A.R. (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive

activation by thioredoxin-f. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**:9438-9443.

Zheng,M., Aslund,F., and Storz,G. (1998) Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. Science **279**:1718-1721.