

TIORREDOXINAS
CLOROPLASTÍDICAS *f y m* DE
GUISANTE: REGULACIÓN POR LUZ Y
AZÚCARES Y SU LOCALIZACIÓN EN
TEJIDOS NO FOTOSINTÉTICOS.



Tesis Doctoral
Granada, Noviembre 2007

Juan de Dios Barajas López
Estación Experimental del Zaidín-CSIC

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)-
Estación Experimental del Zaidín.

Y

Universidad de Granada



**Tiorredoxinas cloroplastídicas *f* y *m* de guisante:
localización en tejidos no fotosintéticos y regulación
por luz y azúcares.**

Juan de Dios Barajas López.

TESIS DOCTORAL
Noviembre 2007

**Tiorredoxinas cloroplastídicas *f* y *m* de guisante:
localización en tejidos no fotosintéticos y regulación
por luz y azúcares.**

Memoria que presenta el licenciado en Ciencias Bioquímicas Juan de Dios Barajas López para optar al grado de doctor.

Fdo: Juan de Dios Barajas López

Vº Bº
El Director del Trabajo

Fdo: Dra. Mariam Sahrawy Barragán
Doctor en Farmacia
Científico Titular del CSIC

Granada Noviembre 2007

El trabajo que se presenta en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular de Plantas de la Estación Experimental del Zaidín de Granada, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, con una ayuda de una beca dentro de Formación de Personal Investigador dentro del III Plan Andaluz de Investigación de la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Andalucía, y ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyectos BFI2002-0401, proyecto BIO2005-0157 y BIO2006-2816) y la Junta de Andalucía (grupo de investigación CVI -154).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en los siguientes congresos y reuniones científicas:

XXV Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular (SEBBM). León, 17-20 Septiembre 2002.

VII Internatinal Congress of Plant Molecular Biology
Barcelona, 23-28 Junio 2003

Congres International de Biochimie-Forum des Jeunes.
Marrakech (Marruecos), Mayo 2004

VII Reunión de Biología Molecular de Plantas
Benalmádena (Málaga), 3-5 Junio 2004

Redoxins and related proteins meeting
Aussoie (Francia), 27-30 Junio 2005

VIII Reunión de Biología Molecular de Plantas
Pamplona (España), 28 de Junio – 1 de julio 2006

XV Federation of European Societies of Plant Biology Congress
Lyon (Francia), 17-21 Julio de 2006

14th International Congress of Photosynthesis
Glasgow (Escocia), 22-27 Julio 2007

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han dado lugar a la siguiente publicación:

Barajas-López, J.D., Serrato, A. J., Olmedilla, A., Chueca, A. and Sahrawy, M. (2007) "Localization in roots and flowers of pea chloroplast thioredoxin f and m proteins reveals new roles in non-photosynthetic organs" *Plant Physiol.* 145: 1-15.

ÍNDICE.-

I.- INTRODUCCIÓN.	1
A.- Breve introducción a los enlaces disulfuro.	
A.1.- Naturaleza y función de los enlaces disulfuro. Tipo de grupos disulfuro.	4
A.2.- Función de los enlaces disulfuro.	4
A.3.- Proteínas activas en la formación y liberación de enlaces disulfuro.	6
3.a.- Glutarredoxinas.	6
3.b.- Peroxirredoxinas.	7
3.c.- Proteín-disulfuro isomerasas.	10
3.d.- Otras proteínas disulfuro.	11
B.- Las tiorredoxinas.	12
B.1.- ¿Qué son las TRXs?	12
B.2.- Las tiorredoxinas en plantas.	13
B.3.- Comparación de secuencias y diversidad de TRXs en plantas.	15
B.4.- Las tiorredoxinas desde los organismos fotosintéticos como modelo estructural.	18
4.a.- Estructura secundaria.	18
4.b.- Estructura terciaria.	18
4.c.- Centro activo. Mecanismo de reacción.	20
B.5.- Funciones fisiológicas.	21
5.a.- Organismos no fotosintéticos	21
5.b.- Organismos fotosintéticos	23
B.6.- Sistemas de reducción de tiorredoxina.	24
6.a.- NADPH tiorredoxina reductasa (NTR).	24
6.b.- Ferredoxina-tiorredoxina-reductasa (FTR).	25
6.c.- Sistema Glutarredoxina.	27
B.7.- El sistema tiorredoxina en cloroplasto. Composición, modo de reducción y enzimas diana.	28

ÍNDICE.-

C.-	Regulación de la expresión por luz.	31
C.1.-	La luz y sus efectos en la regulación de la expresión	31
C.2.-	Regulación por luz.	32
C.3.-	El sistema circadiano (<i>A. thaliana</i>).	36
3.a.-	Ruta de entrada de señales ambientales. Los fotorreceptores.	36
3.b.-	Transmisión de la señal luminosa.	38
3.c.-	Oscilador central.	39
D.-	Regulación de la expresión por azúcares.	46
D.1.-	Los azúcares y la regulación en la expresión de los genes.	46
D.2.-	Sensores de azúcares.	52
2.a.-	Hexoquinasa.	52
2.b.-	SnRK (Sucrose non-fermentating factor Related Kinase).	54
2.c.-	Trehalosa.	55
2.d.-	Receptores de membrana.	57
D.3.-	Mecanismos Moleculares en la Regulación por Azúcares.	60
3.a.-	Diferentes Rutas de Señalización.	60
3.b.-	Control transcripcional y post-transcripcional.	61
3.c.-	Elementos reguladores y factores de transcripción.	61
3.d.-	Estabilidad del transcrito y procesamiento.	62
3.e.-	Traducción.	63
3.f.-	Estabilidad proteica.	64

II.- MATERIALES Y MÉTODOS. 67

A.-	Sección I: material biológico.	69
A.1.-	Material vegetal.	69
1.a.-	Guisante (<i>Pisum sativum</i>).	69
Cultivo.	69	
Solución de riego.	70	
1.b.-	Arabidopsis thaliana.	70
Cultivo.	70	
Solución de riego y medio de cultivo.	71	
Transformación de plantas de Arabidopsis thaliana.	72	
Selección de líneas transformadas de Arabidopsis thaliana	73	

ÍNDICE.-

A.2.-	Material bacteriano.	74
2.a.-	Escherichia coli DH5 α .	74
	Cultivo.	74
	Obtención de células competentes.	75
	Transformación de células E. coli.	75
2.b.-	Escherichia coli BL21.	76
	Cultivo.	76
	Transformación de células E. Coli BL21.	76
2.c.-	Agrobacterium tumefaciens.	77
	Cultivo.	77
	Transformación de Agrobacterium tumefaciens.	77
	Selección de colonias transformadas.	77
	Conservación de clones.	78
	Medios de cultivo.	79
B.-	Sección II: ácidos nucleicos.	80
B.1.-	Vectores y Oligonucleótidos.	80
1.a.-	Vectores.	80
	Vector pGEMT [®] -easy.	80
	Vector pBI101.	81
	Vector pET28b.	81
1.b.-	Oligonucleótidos.	82
	PsTrx m1	82
	PsTrx f	83
	Generales	84
B.2.-	Extracción de ARN.	85
B.3.-	Síntesis de la cadena ADNc.	86
B.4.-	Estudio de expresión por PCR-semicuantitativa.	87
B.5.-	Análisis de resultados por Northern blot.	88
B.6.-	Extracción de ADN plasmídico.	90
B.7.-	Restricción de ADN.	91
B.8.-	Obtención de fragmentos de ADN de geles de agarosa.	91
B.9.-	Ligación de moléculas de ADN.	92
B.10.-	PCR de colonias.	93
B.11.-	Extracción de ADN genómico.	94
B.12.-	Hibridación in situ.	94
	12.a.-Fijación de las muestras.	95
	12.b.-Imbibición y modelado de los bloques.	95
	12.c.-Obtención de las secciones.	96
	12.d.-Obtención de las sondas.	96
	12.e.-Cuantificación del marcaje de las sondas.	98
	12.f.-Prehibridación.	99
	12.g.-Hibridación.	100
	12.h.-Lavados y revelado.	101
	12.i.-Montaje de las preparaciones y visualización.	102

ÍNDICE.-

C.-	Sección III: proteínas.	102
C.1.-	Extracción de proteínas totales.	102
C.2.-	Western Blot.	103
	2.a.-Electroforesis.	103
	2.b.-Transferencia de proteínas del gel hasta membrana de nitrocelulosa	104
	2.c.-Reacciones de reconocimiento inmunológico.	105
	2.d.-Revelado de western blot.	105
C.3.-	Sobreexpresión y purificación de DOF7.	106
	3.a.-Subclonaje de DOF7 en pET-28b.	106
	3.b.-Sobreexpresión de DOF7.	107
	3.c.-Purificación de DOF7.	108
C.4.-	Tinción histoquímica de GUS.	109
C.5.-	Geles de retardo.	110
	5.a.-Marcaje y purificación de las sondas.	110
	5.b.-Reacción de unión sonda-factor de transcripción.	111
C.6.-	Extracción y análisis de azúcares.	112
	6.a.-Extracción de azúcares solubles.	112
	6.b.-Análisis del contenido de azúcares.	113
C.7.-	Cuantificación de la actividad fotosintética.	115
C.8.-	Determinación del contenido en clorofilas.	115
D.-	Software informático.	115
III.-	OBJETIVOS.	119
IV.-	RESULTADOS.	123
A.-	Estudios histológicos de PsTrx f y PsTrx m1.	125
A.1.-	Aislamiento y caracterización de las secuencias reguladoras de PsTrx f y PsTrx m1 y sus correspondientes delecciones.	125
A.2.-	Análisis bioinformático de las secuencias reguladoras de PsTrx f y PsTrx m1 de guisante.	129
A.3.-	Análisis funcional de las secuencias promotoras.	134
A.4.-	Obtención de las plantas transgénicas con las secuencias reguladoras fusionadas al gen GUS.	138
A.5.-	Estudios histoquímicos de las plantas de A. thaliana transformadas con promotores fusionados al gen GUS.	140
	5.a.-Fusión PsTrxf::GUS	140
	5.b.-Fusión PsTrxm::GUS	142

ÍNDICE.-

A.6.-	Hibridación in situ de ARNm de PsTrx f y PsTrx m1.	146
	6.a.-Preparación de sondas.	146
	6.b.-Hibridación in situ con las sondas dirigidas hacia PsTrx f.	150
	6.c.-Hibridación in situ con las sondas dirigidas hacia PsTrx m1.	153
A.7.-	Estudios de expresión mediante RT-PCR.	155
	7.a.-Diseño de los oligonucleótidos para PsTrx f y PsTrx m1.	156
	7.b.-Diseño de los oligonucleótidos para PsFtr.	158
	7.c.-Patrón de expresión en tejidos de guisante	160
A.8.-	Estudios de expresión mediante western blotting.	162
	8.a.-Preparación y titulación de los anticuerpos anti-TRX f y anti-TRX m1 de guisante.	162
	8.b.-Patrón de expresión en diferentes tejidos de guisante de PsTRX f y PsTRX m1.	165
B.-	Regulación por luz.	166
B.1.-	Niveles de expresión de PsTrx f y PsTrx m1.	166
	1.a.-Síntesis de las sondas.	167
	1.b.-Niveles de expresión de ARNm y proteínas de PsTRX f y PsTRX m1.	170
B.2.-	Papel de los elementos cis de las regiones de los promotores implicados en la regulación por luz de PsTrx f y PsTrx m1. Especificidad en la unión del factor de transcripción CCA1 y los elementos reguladores.	174
	2.a.-Estudios in silico de las secuencias reguladoras de PsTrx f y PsTrx m1.	174
	2.b.-Selección de plantas transformadas.	176
	2.c.-Estudio de los niveles de expresión de ARNm de GUS.	177
	2.d.-Ensayos de unión al factor de transcripción CCA1.	180
	Reacciones de unión LumrF-CCA1.	180
	Reacciones de unión Lum2M-CCA1.	183
C.-	Regulación por azúcares.	187
C.1.-	Estudios de expresión de PsTrx f y m1 dependientes de azúcares.	187
	1.a.-Determinación de la actividad fotosintética.	187
	1.b.-Determinación del contenido de azúcares.	190
	Contenido de glucosa.	190
	Contenido de fructosa.	191
	Contenido de sacarosa.	193
	1.c.-Modificación en la expresión de los ARNm de las TRXs cloroplastídicas.	196
	Expresión de PsTrx f por luz y azúcares.	197
	Expresión de PsTrx m1 por luz y azúcares.	198

ÍNDICE.-

C.2.- Estudio de la expresión de las Trxs cloroplastídicas en oscuridad.	199
2.a.-Determinación del contenido de clorofila.	200
2.b.-Contenido de azúcares.	202
Determinación de glucosa.	202
Determinación de fructosa.	203
Determinación de sacarosa.	204
2.c.-Medidas de niveles de ARNm.	205
Expresión de PsTrx f por azúcares.	206
Expresión de PsTrx m1 por azúcares	207
2.d.-Medidas de Proteínas TRX f y TRX m.	208
Expresión de PsTRX f por azúcares.	208
Expresión de PsTRX m1 por azúcares.	209
C.3.- Ensayos de EMSA:	210
3.a.-Clonación del ADNc de DOF7.	210
3.b.-Expresión de la proteína recombinante DOF7	212
3.c.-Purificación del factor de transcripción DOF7.	213
3.d.-Reacciones de unión EMSA.	214
V.- DISCUSIÓN.	221
A.- Localización de PsTrx f y PsTrx m1 en tejidos no fotosintéticos.	223
A.1.- PrTrxf1::GUS muestra señal en tejido no heterotrófico.	223
A.2.- PrTrxm1::GUS muestra señal en tejidos heterotróficos.	225
A.3.- Las TRXs cloroplastídicas de guisante pueden participar de otros procesos metabólicos no relacionados con el metabolismo del carbono.	227
A.4.- Expresión de las TRXs cloroplastídicas en los haces vasculares de raíces.	228
A.5.- Expresión de las TRXs cloroplastídicas en plastidios.	229
B.- Regulación de PsTrx f y PsTrx m1 por luz.	234
B.1.- Efecto de la luz en la expresión de PsTRX f y PsTRX m1.	234
B.2.- Funcionalidad de los elementos reguladores presentes en los promotores de PsTrx f y PsTrx m1.	242
B.3.- El factor de transcripción CCA1 interactúa in vitro con elementos presentes en los promotores de PsTRX f y PsTRX m1.	248

ÍNDICE.-

C.- Regulación de PsTrx f y PsTrx m1 por azúcares solubles.	254
C.1.- Efecto sobre la actividad fotosintética.	254
C.2.- Modificación del contenido de azúcares solubles.	255
C.3.- Efecto de los azúcares sobre los niveles de TRXs f y m1.	257
C.4.- El factor de transcripción DOF7 interactúa in vitro con elementos presentes en los promotores de PsTRX f y PsTRX m1.	260
VI.- CONCLUSIONES.	265
VII.- BIBLIOGRAFÍA.	271
VIII.- APÉNDICES.	309
A.- Abreviaturas.	311
B.- Índice tablas.	315
C.- Índice figuras.	317

I.- INTRODUCCIÓN

A.- Breve introducción a los enlaces disulfuro.

En los últimos años se ha producido un aumento de la investigación de los procesos biológicos regulados por mecanismos redox, en los que se producen reacciones bioquímicas de reducción/oxidación. La función principal del control redox consiste en un sistema que emplea grupos tioles para desarrollar los intercambios de equivalentes reducción/oxidación entre diferentes proteínas. Las proteínas que contienen tioles son los antioxidantes mayoritarios en las células. Además, el sistema redox es probablemente el sistema regulador de las funciones celulares más utilizado por los organismos vivos de tal forma que casi todos los aspectos de la vida celular han sido relacionados con él. La oxidación reversible de los grupos tioles de varias fosfatasa, quinasas y factores de transcripción relaciona la química redox basada en los tioles con la señalización por fosforilación, apoptosis, el proceso de envejecimiento y la regulación génica. La disfunción de la regulación redox en la homeostasis está implicada en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, cáncer (Biaglow, J.E. and Miller, R.A. 2005; Berndt, C., *y cols.* 2007). En plantas, aunque inicialmente se descubrió en el contexto de la fotosíntesis, la regulación redox a través de la reducción/oxidación de grupos tioles ($S-S \rightarrow 2SH$) está extendida en casi todos los procesos de la biología vegetal.

A.1.- Naturaleza y función de los enlaces disulfuro. Tipo de grupos disulfuro.

Existen tres tipos de enlaces disulfuro, dependiendo del origen de los dos residuos cisteínas que participan del enlace, enlace intramolecular, intermolecular y mixto. El grupo mayoritario lo constituyen los enlaces S-S formados entre cisteínas del mismo péptido. Los dos aminoácidos que interactúan pueden estar cerca en la estructura primaria de la proteína o alejadas dentro de la misma. En este último caso, los aminoácidos que participan en el enlace están próximos en el espacio gracias a la estructura secundaria y el plegamiento terciario de la proteína siendo posible la formación del puente disulfuro. El siguiente grupo de unión por enlace S-S, ocurre entre grupos tioles de diferentes polipéptidos, en la mayoría de los casos entre subunidades idénticas, lo que conduce a la formación de un dímero mediante un enlace covalente. En el tercer tipo de enlace, una variante del anterior, la cisteína reacciona con su homólogo de una molécula de glutatión oxidado. Este mecanismo es conocido como glutatiónilación, que ha sido estudiado extensamente en sistemas animales, pero poco en plantas.

A.2.- Función de los enlaces disulfuro.

Las modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación, en general resultan en un cambio en la actividad enzimática o son un mecanismo de señalización (Kalume, D.E., y cols. 2003). Sin embargo, la formación de un enlace disulfuro puede ser puramente estructural y actuar

para estabilizar la proteína manteniendo su estructura terciaria. En plantas, esta estabilización mediante modificación covalente es especialmente importante en proteínas secretadas y de almacenamiento, dónde ayuda a prevenir la desnaturalización y disminuye la susceptibilidad a la degradación proteolítica (Roesler, K.R. and Rao, A.G. 2000).

El cambio reversible en el estado redox entre la forma en estado oxidado (S-S) o en estado reducido (-SH SH-), permite un cambio de las propiedades catalíticas de la enzima o una modificación reguladora de la misma (Buchanan, B.B. 1980; Yano, H., *y cols.* 2002; Hogg, P.J. 2003). En este caso, la secuencia del centro activo está formada por dos cisteínas separadas por uno o dos aminoácidos y funciona tanto como donador de electrones como receptor de electrones. En el caso de la regulación catalítica, la formación de un puente disulfuro puede físicamente bloquear el centro activo de la proteína como ocurre con la enzima fosforibuloquinasa cloroplastídica (Brandes, H.K., *y cols.* 1996). Mientras que si el puente disulfuro está alejado del centro catalítico de la proteína, la reducción produce un pequeño cambio conformacional que afecta las propiedades catalíticas de la enzima como ocurre en el caso de la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica (Chiadmi, M., *y cols.* 1999) o NADP-malato deshidrogenasa (Krimm, I., *y cols.* 1999).

Por último, la tercera función del enlace S-S es la capacidad de unirse a glutatión para proteger grupos -SH. En algunos casos la formación de enlaces disulfuros intra o intermolecular podría tener los mismo efectos de protección. Los tioles pueden ser oxidados a HSO₂ y HSO₃ como resultado de un estrés oxidativo. Este tipo de daño, que generalmente conduce a la proteólisis de la proteína afectada, se puede evitar mediante la formación de un enlace entre el grupo -SH y el glutatión. Hay que resaltar que la

formación de enlaces disulfuro inducido por estrés parecen jugar un papel esencial en la regulación de las enzimas, como se propone en el caso de proteínas cloroplastídicas (Balmer, Y., y cols. 2003a).

A.3.- Proteínas activas en la formación y liberación de enlaces disulfuro.

Varias son las proteínas que participan en la formación de enlaces disulfuros, algunas de ellas forman parte de sistemas reguladores con importantes funciones celulares, tales como glutaredoxinas, peroxiredoxinas y tioredoxinas, estas últimas son objeto del estudio de esta tesis doctoral.

3.a.- Glutarredoxinas.

Las glutarredoxinas (GRXs) son proteínas pequeñas, muy próximas evolutivamente a las tioredoxinas, que muestran una estructura tridimensional compacta. Con 31 miembros descritos en *Arabidopsis thaliana*, las glutarredoxinas representan un grupo bastante heterogéneo. Las primeras glutarredoxinas descritas contenían un centro redox con el motivo conservado -CPYC-. El análisis filogenético distribuye las glutarredoxinas de *A. thaliana* en tres grupos en función de sus distintos centros activos: glutarredoxinas clásicas con el centro activo típico -CPYC-, glutarredoxinas con dos cisteínas contiguas con el motivo -CCXC/S/G-, y por último, las glutarredoxinas con una sola cisteína en la secuencia conservada -CGFS- (Lemaire, S.D. 2004; Rouhier, N., y cols. 2004b). Algunos estudios indican que sólo la primera cisteína es esencial en la

actividad sobre la enzima peroxirredoxina (Rouhier, N., *y cols.* 2002b,2002a).

En plantas, se conoce relativamente poco acerca de la familia de las glutarredoxinas. Además de interactuar con las peroxirredoxinas, una de las funciones propuestas para estas proteínas es la de liberar los enlaces disulfuro mixtos que se forman entre las cisteínas de una proteína y el glutathione.

Además del papel de las glutarredoxinas en respuesta al estrés oxidativo, algunas glutarredoxinas del subgrupo II (con centro activo -CGFS-) interactúan con transportadores de iones Ca^{2+} , lo que sugiere que podrían estar involucradas en la señalización celular a través del control de la concentración de iones Ca^{2+} (Cheng, N.H. and Hirschi, K.D. 2003). Estas proteínas podrían igualmente funcionar como reguladoras de factores de transcripción y de enzimas con actividad fosfatasa, así se ha descrito en el caso de la enzima tirosina fosfatasa 1B de soja regulada a través de la glutathionización de una cisteína (Dixon, D.P., *y cols.* 2005). Por último, se sabe que las enzimas pertenecientes al grupo III (con centro activo -CCM/LC/S-) están implicadas en el desarrollo de los pétalos (Xing, S., *y cols.* 2005).

3.b.- Peroxirredoxinas.

Las peroxirredoxinas (PRXs) son peroxidases presentes en todos los tipos de células, que catalizan la reducción de peroxinitritos e hidroperóxidos (Chae, H.Z., *y cols.* 1994b; Bryk, R., *y cols.* 2000) gracias a una cisteína conservada en todas ellas que actúa como reductor. Esta cisteína provoca un ataque nucleofílico sobre los peroxinitritos y/o

hidroperóxidos, lo que convierte el grupo tiol en un ácido sulfinico (HSO), que es regenerado bien por una reducción directa o mediante la formación de un puente disulfuro inter o intramolecular (Wood, Z.A., *y cols.* 2003).

El enlace disulfuro es reducido con ayuda de varios sistemas reductores, las tiorredoxinas, glutarredoxinas, ciclofilinas en organismos eucariotas mientras que en bacterias se recurre a las flavoproteínas con actividad oxidoreductasa AhpF y AhpB (Chae, H.Z., *y cols.* 1994a; Poole, L.B. 1996; Lee, S.P., *y cols.* 2001; Rouhier, N., *y cols.* 2001; Bryk, R., *y cols.* 2002).

En plantas, existen cinco grupos de PRXs dependientes de TRX diferentes de acuerdo con el número y la posición de las cisteínas catalíticas conservadas. Cuatro grupos están definidos como peroxirredoxinas que mediante análisis filogenético se han identificado como 1-Cys-PRX, 2-Cys-PRX, PRX tipo II y tipo PRX Q, mientras que el último grupo lo constituye el grupo de las glutathione-peroxidases que poseen un centro activo que difiere en posición y en composición del resto de PRXs (Rouhier, N. and Jacquot, J.P. 2002; Dietz, K.J. 2003). Para todas las PRXs, el primer paso de la reacción catalítica es común: tras la formación del grupo HSO, este puede ser reducido directamente, como es el caso de las PRX II formando un enlace disulfuro intermolecular (Cheong, N.E., *y cols.* 1999; König, J., *y cols.* 2002; König, J., *y cols.* 2003) y presumiblemente ocurre igual en el caso de las 1-Cys-PRXs aunque no poseen ninguna cisteína conservada entre todas ellas (Rouhier, N., *y cols.* 2002b). También, el grupo HSO podría ser también atacado por otra cisteína para formar un enlace intramolecular entre dos PRXs (PRX Q) (Kong, W., *y cols.* 2000; Rouhier, N., *y cols.* 2004a).

Las proteínas 1-Cys-PRXs poseen un péptido señal que los dirige al núcleo del embrión de cebada y de las células de la aleurona (Stacy, R.A., y cols. 1999), pero experimentos con GFP han localizado la proteína igualmente en el citosol (Haslekas, C., y cols. 2003b) indicando que en estos casos actuaría en el mantenimiento de la dormancia de la semilla y en la protección de los tejidos frente a daños oxidativos estando implicada con la regulación de la germinación, evitando este proceso en condiciones desfavorables (Haslekas, C., y cols. 1998; Lee, K.O., y cols. 2000). Recientemente se ha indicado que las enzimas de la clase 1-Cys-Prx se expresan también en tejidos vegetativos, hojas y zona de unión del tallo con pecíolo siendo inducida en respuesta a estreses abióticos tales como la deshidratación, el calor, la alta intensidad lumínica, ABA y NaCl (Mowla, S.B., y cols. 2002; Haslekas, C., y cols. 2003a).

La proteína 2-Cys-PRX es una proteína unida al tilacoide del cloroplasto (König, J., y cols. 2002) y se ha encontrado en casi todos los tejidos de plantas excepto en raíces (Cheong, N.E., y cols. 1999; Broin, M., y cols. 2002). La actividad fisiológica estudiada en mutantes de *Arabidopsis thaliana* deficientes en esta proteína, muestra que algunas proteínas del cloroplasto se dañan y la fotosíntesis está desactivada lo que sugiere un papel protector del aparato fotosintético para la 2-Cys-PRX (Baier, M. and Dietz, K.J. 1999; Baier, M., y cols. 2000). Se cree que actúa conjuntamente con la proteína CDSP32 contra la peroxidación lipídica de membranas del tilacoide (Broin, M. and Rey, P. 2003).

Las PRXs Tipo II están presentes en todos los orgánulos de las células vegetales (Choi, Y.O., y cols. 1999; Rouhier, N., y cols. 2001; Brehelin, C., y cols. 2003). Su función está relacionada con la respuesta de las plantas frente a patógenos y situaciones de estrés oxidativo por H₂O₂ y t-butil-

hidroperóxido (Horling, F., *y cols.* 2002; Horling, F., *y cols.* 2003; Kandlbinder, A., *y cols.* 2004; Rouhier, N., *y cols.* 2004a).

Por último, la enzima PRX Q está presente en los cloroplastos de hojas, aunque no se detecta ni en tallos ni en raíces (Rouhier, N., *y cols.* 2004a). La expresión de este tipo de PRX se altera por el estrés salino, la presencia de ascorbato, agentes oxidantes y el cambio en la intensidad lumínica (Horling, F., *y cols.* 2003).

3.c.- Proteín-disulfuro isomerasas.

Las proteín-disulfuro isomerasas (PDIs) pertenecen a la familia de las oxidoreductasas, y en su secuencia tienen en general dos, o en algunos casos más, dominios tiorredoxinas implicados en la formación de enlaces S-S (Frand, A.R., *y cols.* 2000; Jacquot, J.P., *y cols.* 2002; Lemaire, S.D. and Miginiac-Maslow, M. 2004). El análisis del genoma de *Arabidopsis thaliana* ha mostrado 9 secuencias con el centro activo conservado -PWCGHC-. Las PDIs se organizan en cinco dominios de los cuáles dos dominios son homólogos a la tiorredoxina (Darby, N.J., *y cols.* 1996) y cada uno contiene un centro activo independiente con la secuencia consenso -WCGHCK- responsable de su actividad (Edman, J.C., *y cols.* 1985). En su forma reducida las proteínas PDI actúan probablemente, en la reordenación de los puentes disulfuro incorrectamente formados durante el plegamiento de las proteínas (Frand, A.R., *y cols.* 2000; Frand, A.R. and Kaiser, C.A. 2000). Así, mientras las tiorredoxinas y glutarredoxinas parecen actuar en la regulación de enzimas a través de la reducción de enlaces disulfuro, las PDIs actúan principalmente como enzima ditiol-oxidasa controlando el correcto plegamiento de las proteínas mediante la formación, isomerización

y la reducción/oxidación de puentes disulfuro. Constitutivamente, se expresa de forma generalizada en todas las células, aunque son muy abundantes en el retículo endoplasmático, debido a la alta expresión del gen (Pollard, M.G., *y cols.* 1998) y su elevada estabilidad (Ohba, H., *y cols.* 1981).

En el retículo endoplasmático (RE), las proteínas que se están sintetizando tienen sus cisteínas reducidas, reciben del retículo los equivalentes de poder oxidante y el mecanismo de corrección de errores en el emparejamiento de los enlaces disulfuro a través de las PDIs. Además del papel “reparador” de enlaces disulfuro, se las relaciona con el papel de las chaperonas inhibiendo la agregación de proteínas no plegadas como es el caso de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Cai, H., *y cols.* 1994), citrato sintasa y alcohol deshidrogenasa (Primm, T.P., *y cols.* 1996), algunas de las cuales no tienen puentes disulfuro. Y esto se puede explicar ya que en su actividad chaperona no necesita las cisteínas catalíticas de su centro activo (Quan, H., *y cols.* 1995).

3.d.- Otras proteínas disulfuro.

Existe una gran variedad de proteínas que probablemente estén implicadas en la interconversión de grupos tiol-disulfuro. Una búsqueda en la bases de datos ha revelado un gran número de proteínas *thioredoxin-like* (proteínas que muestran alguna homología con las tiorredoxinas) y polipéptidos que contienen dominios tiorredoxinas. Un caso interesante es el de la proteína de 32 kDa inducida por sequía (CDSP32) que está compuesta por dos motivos tiorredoxina y que se expresa bajo condiciones de estrés oxidativo (Broin, M., *y cols.* 2000). Otras proteínas con dominio

tiorredoxina están surgiendo en plantas, así, se ha identificado una proteína HIP (HP70 Interacting Protein) que interactúa con el dominio ATPasa de la chaperona de levadura SSB2 que contiene un dominio tiorredoxina dotándole de actividad proteín-disulfuro reductasa en *A. thaliana* (Webb, M.A., y cols. 2001; Vignols, F., y cols. 2003). Otras proteínas con dominio tiorredoxina son la proteína HCF164 del lumen tilacoidal necesaria en la biogénesis del citocromo *b₆f* (Lennartz, K., y cols. 2001) y la proteína CITRX (Cf-9-interacting thioredoxin), implicada en la resistencia a virus en tomate (Rivas, S., y cols. 2004).

B.- Las Tiorredoxinas.

B.1.- ¿Qué son las Trxs?

Las tiorredoxinas (TRXs) son proteínas que poseen actividad oxido-reductasa y regulan el intercambio redox tiol-disulfuro. Fueron descubiertas en *Escherichia coli* donde funcionan como donadoras de hidrógeno de la enzima ribonucleótido reductasa, una enzima clave en la replicación del ADN ya que convierte ribonucleótidos a desoxyribonucleótidos (Laurent, T.C., y cols. 1964). El peso molecular de estas proteínas es bajo (≈ 12 KDa) lo que favorece su elevada termoestabilidad. La secuencia aminoacídica de la TRX de *E. coli* tiene una longitud de 108 aminoácidos con un centro activo característico y conservado cuya secuencia es -WCGCP- (Holmgren, A. 1968). Las dos cisteínas del centro activo pueden formar un enlace

disulfuro en estado oxidado de la proteína mientras que en estado reducido forman dos grupos tioles.

Rápidamente se observó que el papel de la TRX de *E. coli* no era sólo ejercer de donador de hidrógeno de la enzima ribonucleótido reductasa ya que células de *E. coli* incapaces de expresar su TRX podían crecer perfectamente. Este hecho conllevó el descubrimiento de un donador alternativo para dicha enzima como fue la glutarredoxina (Russel, M. and Model, P. 1985).

La estructura tridimensional de la TRX, de la que depende la reactividad del puente disulfuro/ditiol, es muy simple, y está formada por una lámina β con 5 hebras en el centro del complejo rodeado por 4 α -hélices (Eklund, H., y cols. 1984). Este tipo de organización se conoce como plegamiento tiorredoxina, y se ha descrito para numerosas enzimas relacionadas con las TRXs. En esta molécula, el centro activo está situado en una región relativamente hidrofóbica que sobresale de la superficie de la molécula.

B.2.- Las tiorredoxinas en plantas.

Clásicamente, los procesos fotosintéticos se dividieron en dos fases, durante la fase luminosa la radiación luminosa es absorbida por pigmentos especializados (clorofila, carotenos, xantofilas) y complejos de proteínas localizados en las membranas de los tilacoides del cloroplasto. Esta fase transcurre con la liberación de O_2 y la producción de moléculas de elevado poder energético como son ATP y NADPH. Estas dos moléculas son usadas en las reacciones bioquímicas catalizadas por enzimas localizadas en el

estroma del cloroplasto con el resultado neto de la incorporación de moléculas de CO₂ a compuestos carbonados. Esta segunda fase, llamada Ciclo de Calvin ó ciclo reductivo de las pentosas fosfato, se llevaba a cabo durante la fase oscura de la fotosíntesis. Sin embargo entre los años 1960-1970 se describió que varias enzimas del ciclo de Calvin necesitaban la luz para su activación, los ejemplos más conocidos son la fructosa-1,6-bisfosfatasa cloroplastídica (FBPasa), gliceraldehido-3P-deshidrogenasa (GAPDH), sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa) y NADP-malato deshidrogenasa (NADP-MDH). El uso de inhibidores de la transferencia electrónica del aparato fotosintético y la reconstitución de la actividad enzimática de la FBPasa gracias a la ferredoxina reducida condujo al descubrimiento del sistema ferredoxina-tiorredoxina, en el que la TRX *f* era la proteína que reducía la enzima FBPasa (Schürmann, P., y cols. 1976). Pero el sistema de regulación por luz se volvió más complejo cuando se descubrió que la enzima NADP-malato deshidrogenasa era activada por un mecanismo similar, en el cual estaba involucrada otro tipo de tiorredoxina denominado tipo *m* para diferenciarla del tipo *f* que modula la actividad de forma específica de la enzima FBPasa cloroplastídica (Jacquot, J.P., y cols. 1976; Buchanan, B.B., y cols. 1978; Jacquot, J.P., y cols. 1978). Además de éstas dos TRXs presentes en el cloroplasto, se describió la existencia de una tercera TRX tipo *c* (por ser citosólica, pero posteriormente renombrada como tipo *h* por heterotrófica) en la fracción citosólica (Wolosiuk, R.a., y cols. 1979). Tras el descubrimiento de las TRXs, se ha podido destacar que estas proteínas están presentes en una gran diversidad de estructuras en las células vegetales, con funciones y proteínas diana específicas. Con estos primeros resultados se iniciaba un nuevo campo de investigación sobre la regulación redox en plantas que no ha cesado de crecer.

B.3.- Comparación de secuencias y diversidad de TRXs en plantas.

Aunque las TRXs están presentes en prácticamente todos los organismos, en plantas las TRXs forman un sistema particularmente desarrollado y complejo, así en *A. thaliana* se han descrito, al menos, 20 genes de TRXs en toda su secuencia genómica (Meyer, Y., y cols. 2002). El análisis de la estructura primaria permite clasificar las TRXs en relación a sus diferentes isoformas. El genoma de *A. thaliana* contiene 9 genes que codifican TRXs citosólicas de tipo *h*, 2 genes que codifican para TRXs *o* mitocondriales y varios genes para TRXs cloroplásticas, 4 TRXs *m*, 2 TRXs *f*, 1 TRX *x* y dos TRX *y*. El aumento de secuencias ESTs en las bases de datos revela que los diferentes grupos de TRXs están también presentes en todas las plantas superiores (álamo, pino, soja, tomate, etc...) sugiriendo que la diversidad encontrada en *A. thaliana* es representativa de todas las plantas superiores. El genoma de guisante también muestra cierta complejidad en cuanto a diversidad de TRXs se refiere, hasta ahora se han descrito 4 genes que codifican para TRXs de tipo *h*, 2 TRXs *m* y 1 TRX *f* (Lepiniec, L., y cols. 1992; López-Jaramillo, J., y cols. 1994; Montrichard, F., y cols. 2003; Traverso, J.A., y cols. 2007).

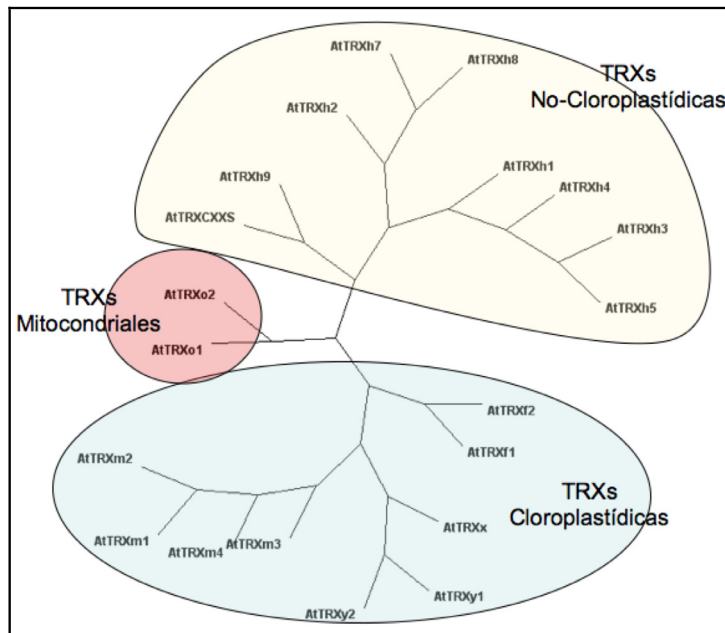


Fig. 1.- Árbol filogenético de las diferentes clases de TRXs presentes en *Arabidopsis thaliana* agrupadas en citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales. Los números de accesos de las proteínas son: EcTRX A: AP 004016, HsTRX: NP 003320, AtTRX CXXC: NP 172620, AtTRX *f1*: NP 186922, AtTRX *f2*: NP 197144, AtTRX *h1*: NP 190672, AtTRX *h2*: NP 198811, AtTRX *h3*: NP 199112, AtTRX *h4*: NP 173403, AtTRX *h5*: NP 175128, AtTRX *h7*: NP 176182, AtTRX *h8*: NP 177146, AtTRX *h9*: NP 001078124, AtTRX *m1*: NP 849585, AtTRX *m2*: NP 192261, AtTRX *m3*: NP 188155, AtTRX *m4*: NP 188155, AtTRX *o1*: NP 001078006, AtTRX *o2*: NP 564371, AtTRX *x*: NP 564566, AtTRX *y1*: NP 177802, AtTRX *y2*: NP 175021.

Un análisis filogenético y la comparación de secuencias ha permitido deducir que las TRXs *m*, *x* e *y* son de origen procariota (Meyer, Y., y cols. 2002; Lemaire, S.D., y cols. 2003), por el contrario, se sugiere un origen eucariota para las TRXs *f*, *h* y *o* (Sahrawy, M., y cols. 1996; Laloi, C., y cols. 2001; Meyer, Y., y cols. 2002). Además del análisis de la estructura primaria, la localización subcelular de las diferentes isoformas de TRXs es un factor importante para entender el sistema de las TRXs en plantas. En el

cloroplasto se encuentran las proteínas TRX *f*, *m*, *x* e *y*, además de la proteína CDSP32 (del inglés *chloroplast drought-induced protein*) cuyas secuencias contienen una extensión que corresponde al péptido de tránsito que las dirige hacia el cloroplasto. La localización de TRX *f*, *m* y *x* ha sido confirmada en *A. thaliana* mediante la técnica de fusión de las secuencias correspondientes a los péptidos de tránsito de las distintas isoformas de las TRXs a GFP (Collin, V., y cols. 2003). Se ha demostrado la presencia de la TRX *o* de *A. thaliana*, en mitocondria mediante experimentos de importación a la mitocondria (Laloi, C., y cols. 2001) y mediante experimentos de fusión a GFP (Collin, V., y cols. 2003). Al mismo tiempo, el sistema TRX en la mitocondria se podría completar con al menos una isoforma del tipo *h* (Gelhay, E., y cols. 2004).

El grupo mayoritario de las TRXs lo forman, en *A. thaliana*, las 9 isoformas de TRX tipo *h*. Se considera que estas isoformas son citosólicas aunque hay pruebas de que podrían estar presentes en otros compartimentos subcelulares como son las mitocondrias (Marcus, F., y cols. 1991; Konrad, A., y cols. 1996) y retículo endoplasmático (Marcus, F., y cols. 1991). Por otro lado, las TRX *h1* y TRX *h2* de soja tienen una extensión en el extremo amino-terminal que sugiere que podrían unirse a membranas (Shi, J. and Bhattacharyya, M.K. 1996), mientras que se ha descrito también la presencia de una TRX tipo *h* en el núcleo (Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. 2003).

Una tiorredoxina se define tanto por su estructura tridimensional como por sus características catalíticas como reductor de enlaces disulfuro. La gran particularidad de las TRXs es la presencia de dos residuos cisteínas en su centro catalítico -WCG/PPC-, aunque algunas isoformas de TRX *h* tienen un centro catalítico inusual con sólo una cisteína, mientras que el otro

residuo se convierte en una serina -CXXS- (Meyer, Y., y cols. 2002; Gelhaye, E., y cols. 2003).

B.4.- Las tioredoxinas desde los organismos fotosintéticos como modelo estructural.

4.a.- Estructura secundaria.

La estructura terciaria de la TRX de *E. coli* (Eklund, H., y cols. 1991) ha sido utilizada como modelo en los estudios estructurales de las demás proteínas pertenecientes a este grupo. A pesar del bajo grado de homología aminoacídica entre las distintas TRXs de plantas, su estructura secundaria es similar a la descrita por Eklund para la TRX de *E. coli* (Genovesiotaverne, J.C., y cols. 1991; Lancelin, J.M., y cols. 1993; Mittard, V., y cols. 1995; Saarinen, M., y cols. 1995). La secuencia de elementos de la estructura secundaria es la siguiente: $\beta 1$, $\alpha 1$, $\beta 2$, $\alpha 2$, $\beta 3$, $\alpha 3$, $\beta 4$, $\beta 5$, $\alpha 4$, de los cuales los elementos $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 5$ son hebras en paralelo mientras $\beta 4$ está dispuesta en sentido antiparalelo con respecto a los demás elementos, mientras que las α -hélices están dispuestas rodeando la lámina β . En esta estructura, el centro activo se sitúa entre $\beta 2$ y $\alpha 2$, una zona prominente de la superficie.

4.b.- Estructura terciaria.

Las TRXs son pequeñas y bastante estables lo que ha facilitado que se hayan podido cristalizar y estudiar su estructura terciaria. Varias proteínas

TRX han sido cristalizadas, la TRX *f* y TRX *m* de espinaca, la TRX *m* y TRX *h* de *Chlamydomonas reinhardtii* (Mittard, V., y cols. 1997; Capitani, G., y cols. 2000; Lancelin, J.M., y cols. 2000). La estructura de la TRX de *Anabaena 2* está muy próxima a la estructura de la TRX de *E. coli*, a pesar de la diferencia en la reactividad de ambas proteínas. La TRX *m* es estructuralmente similar a la TRX de *E. coli* (Katti, S.K., y cols. 1990), mientras que la estructura de la TRX tipo-*h* está más relacionada con la TRX de mamíferos.

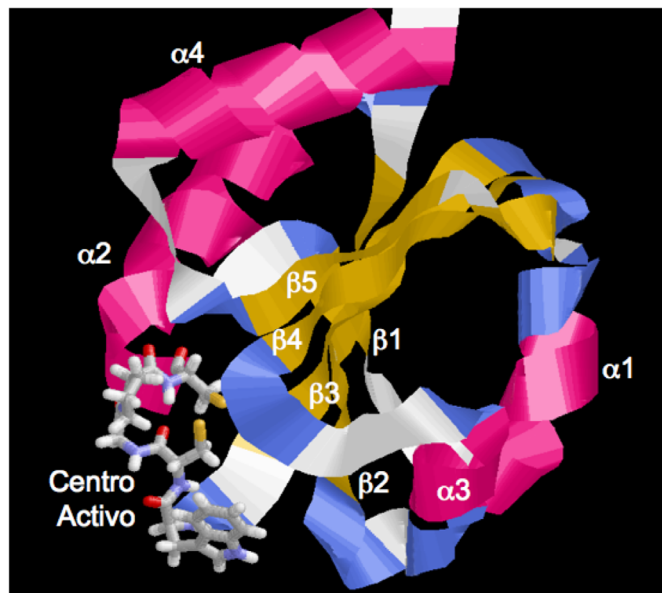


Fig.2.- Estructura terciaria de la TRX reducida de *E. Coli* (1XOB) (Jeng, M.F., y cols. 1994). Se han señalado los elementos secundarios típicos de este tipo de plegamiento y la situación del centro activo.

Todos estos resultados están en concordancia con las comparaciones entre las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas. Además de la diferencia existente entre la TRX *m* y la TRX *h* anteriormente mencionada, al comparar cada una de las estructuras de TRXs de *C.*

reinhardtii se observa como el empaquetamiento hidrofóbico es diferente, así el fragmento $\alpha 1$ es mayor en el caso de la TRX *h* y el fragmento $\alpha 3$ de TRX *h* no se empaqueta dentro del centro hidrofóbico.

En relación con la conformación del centro activo, hay que resaltar que el aminoácido Trp30 (siguiendo la numeración de *C. reinhardtii*) de la TRX *m* mantiene esa posición gracias a la interacción con el residuo Asp59 mediante un puente de hidrógeno. Además de estos dos residuos, los aminoácidos Asp24 y Cys33 forman una geometría tridimensional conservada en todas las distintas TRXs (Takahashi, N. and Creighton, T.E. 1996).

4.c.- Centro activo. Mecanismo de reacción.

Independientemente de la especie a la que pertenecen las tiorredoxinas, todas ellas comparten un plegamiento tridimensional similar con la siguiente sucesión de elementos secundarios $\beta 1-\alpha 1-\beta 2-\alpha 2-\beta 3-\alpha 3-\beta 4-\beta 5-\alpha 4$. Este tipo de organización, conocido como plegamiento tiorredoxina, es necesario para exponer el centro activo -WCGPC- en su conformación activa entre los elementos $\beta 2-\alpha 2$.

Ambas cisteínas del centro activo juegan papeles diferentes en la catálisis de la enzima, la primera reacción la lleva a cabo el residuo Cys32 (según la numeración de *E. coli*) que rompe el puente disulfuro de la proteína diana, reduciendo una cisteína y con el otro residuo forma un puente disulfuro (Paso 1 y 2 Fig. 3). Este enlace covalente entre la TRX y la proteína diana se rompe por el ataque nucleofílico de la otra cisteína reducida del centro activo de la TRX liberándose la propia TRX en forma oxidada y la proteína diana en forma reducida (Paso 3, Fig. 3).

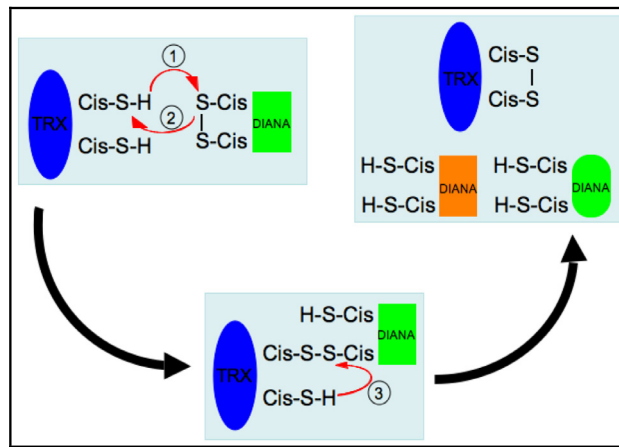


Fig.3.- Esquema del mecanismo de reacción de las TRXs. Los productos finales son la TRX en estado oxidado, mientras que la reducción de la proteína diana conduce hacia la modificación del centro activo o a un cambio conformacional.

Este mecanismo de reacción ha sido establecido mediante la obtención de mutantes de TRX en los cuales se sustituye una de las cisteínas, o las dos cisteínas, del centro activo por una serina. Así, los mutantes C32S y doble mutante C32S/C35S son proteínas inactivas, mientras que la proteína mutada en C35S es capaz de formar complejos estables con las proteínas diana (Wynn, R., y cols. 1995).

B.5.- Funciones fisiológicas.

5.a.- Organismos no fotosintéticos

En *E. Coli*, la actividad de la TRX participa en la reducción de la enzima 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato (PAPS) y metionina reductasa (González, P. and Baldeste, A. 1970; Niehaus, A., y cols. 1992), en la

reducción de selenio y de hidroxiperóxidos (Bjornstedt, M., *y cols.* 1995; Cha, M.K., *y cols.* 1995) además participa en la procesividad de la enzima ADN polimerasa del fago T7 (Tabor, S., *y cols.* 1987). En células procariotas, las TRXs tienen funciones específicas tales como formar parte de los sistemas de reducción de glicina y arsénico, además de participar en la ruta metabólica de síntesis de penicilina (Lubbers, M. and Andreesen, J.R. 1993; Cohen, G., *y cols.* 1994).

Cuando se eliminan las dos TRXs de *Saccharomyces cerevisiae*, las nuevas cepas además de tener un fenotipo complejo son incapaces de crecer en medio con sulfato o sulfóxido de metionina como fuente de azufre, tienen un ciclo celular distorsionado con una fase S muy larga, sin fase G1 cuando crece en medio con metionina o cisteína, y por último, son hipersensibles a oxidantes (Muller, E.G.D. 1991). La larga fase S sugiere que la síntesis de ADN es, en parte, dependiente de la actividad TRX. Cuando se complementan levaduras sin sus dos TRXs con TRXs citosólicas de guisante estos mutantes revierten el fenotipo de hipersensibilidad frente a agentes oxidantes sugiriendo un papel de las TRXs como protector frente a fenómenos oxidantes (Traverso, J.A., *y cols.* 2007), aunque el mecanismo de defensa aun no se ha podido describir.

En células animales, las TRXs se han relacionado con multitud de procesos entre los que destaca su función como factor autocrino (Wollman, E.E., *y cols.* 1988) y se sabe que se sobreexpresan en células cancerosas (Wakasugi, N., *y cols.* 1990). Se ha comprobado que la TRX humana regula la unión de factores de transcripción al ADN (Schenk, H., *y cols.* 1994), y existen mecanismos relacionados con la TRX que la implican en el control de receptores de hormonas y de interleuquinas participando en la transducción de señales (Tagaya, Y., *y cols.* 1989; Boniface, J.J. and

Reichert, L.E., Jr. 1990; Santa-Coloma, T.A., *y cols.* 1991; Iwata, S., *y cols.* 1995; Patel, J.M., *y cols.* 1996). También, varios estudios han confirmado que las TRXs ejercen alguna función en importantes procesos como son la embriogénesis, la división celular y el ciclo celular (Hartman, H., *y cols.* 1993; Natsuyama, S., *y cols.* 1993; Salz, H.K., *y cols.* 1994).

5.b.- Organismos fotosintéticos

Existen numerosos procesos que se desarrollan en el cloroplasto bajo el control de la luz que están regulados a través del sistema ferredoxina-tiorredoxina. Así, enzimas que forman parte del ciclo de Calvin y que se encuentran en el cloroplasto tales como la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplastídica, sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa, fosforibuloquinasa y gliceraldehído-3-fosfato, la NADP-malato deshidrogenasa y la subunidad CF₁-ATPasa son activadas por las TRXs cloroplastídicas (Buchanan, B.B., *y cols.* 1994a; Buchanan, B.B., *y cols.* 1994b), mientras que otras enzimas son inactivadas por el mismo sistema regulador, como ocurre con la isoforma cloroplastídica de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa que participa en el metabolismo catabólico de la planta (Scheibe, R. 1991; Wenderoth, I., *y cols.* 1997). Pero además de la relación ya conocida de las TRXs con estas enzimas, el desarrollo de técnicas de proteómica han asociado la actividad de las TRXs cloroplastídicas a procesos metabólicos tan variados como la biosíntesis de isoprenoides, tetrapirrol y vitaminas, plegamiento de proteínas, degradación de proteínas, equilibrio entre CO₂/HCO₃⁻ y la replicación y transcripción del ADN cloroplastídico durante la división del cloroplasto (Balmer, Y., *y cols.* 2003b).

B.6.- Sistemas de reducción de tiorredoxina.

6.a.- NADPH tiorredoxina reductasa (NTR).

La enzima NADPH tiorredoxina reductasa (NTR) es una proteína que reduce la tiorredoxina en presencia de un donador de electrones que en este caso es el NADPH (Fig. 4). La enzima NTR ha sido extensamente estudiada en *E. coli* además de en hojas y raíces de diferentes plantas superiores y algas verdes (Johnson, T.C., y cols. 1987; Florencio, F.J., y cols. 1988; Huppe, H.C., y cols. 1991; Van Langendonck, A. and Vanden Driessche, T. 1992). La proteína NTR de organismos eucariotas es de codificación nuclear sin ningún péptido de tránsito que la dirija a una organela (Jacquot, J.P., y cols. 1994). En *A. thaliana*, la proteína NTR es una flavoproteína dimérica de codificación nuclear constituida por dos subunidades idénticas de 35 KDa cada una (Jacquot, J.P., y cols. 1994). Cada subunidad contiene un dominio FAD formado por el extremo amino y carboxilo terminal de la cadena polipeptídica, y el dominio NADPH se sitúa en la parte central de la cadena polipeptídica. Las diferentes NTR de plantas muestran una elevada homología con otros grupos de flavoproteínas como es el caso de la enzima glutatión reductasa. En la enzima, los electrones son transferidos desde NADPH al grupo FAD y éste reduce a un puente disulfuro conservado con la siguiente secuencia, en *A. thaliana*, -SACATCDG-. Estos azufres están lo suficientemente cerca del anillo FAD como para facilitar la transferencia electrónica intramolecular (Dai, S., y cols. 1996). La reactividad de la enzima NTR muestra sus mejores resultados en la activación de la TRX *h* más que con las enzimas TRX *f* o TRX *m* ya NTR es una proteína citosólica (Jacquot, J.P., y cols. 1994). A pesar de la alta homología y la conservada

estructura tridimensional, la desigual reactividad de las enzimas tiorredoxina reductasa de *E. coli* y la enzima NTR de *A. thaliana* sugiere que los sitios de reconocimiento de la tiorredoxina para cada proteína son diferentes (Dai, S., y cols. 1996).

Además de esta isoforma citosólica, se ha descrito un sistema NTR (NTR-A/NTR-B) en la mitocondria como resultado de un procesamiento alternativo del gen NTR codificando para una proteína NTR más el péptido de tránsito hacia la mitocondria (Reichheld, J.P., y cols. 2005).

En el mismo sentido, estudios del genoma de *A. thaliana* han mostrado la presencia de una NTR que contiene además un dominio tiorredoxina. Esta proteína, NTRC, se ha caracterizado en arroz y funciona tanto como tiorredoxina como NTR, pero no como un sistema NTR/tiorredoxina, aunque el dominio NTR es capaz de reducir las tiorredoxinas testadas, especialmente TRX *f* y TRX *m* (Serrato, A.J., y cols. 2002; Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. 2003).

6.b.- Ferredoxina-tiorredoxina-reductasa (FTR).

La enzima ferredoxina-tiorredoxina-reductasa (FTR) transfiere electrones de la ferredoxina fotorreducida a las tiorredoxinas cloroplastídicas (Fig. 4). Todos los componentes de este sistema ferredoxina-tiorredoxina, ferredoxina, tiorredoxina y ferredoxina-tiorredoxina-reductasa han sido aislados de distintos organismos, desde las cianobacterias y algas verdes, hasta las plantas C3 y C4 lo que indica la universalidad de este sistema en el reino de las plantas oxigénicas, siendo posiblemente el único sistema reductor de tiorredoxinas en cianobacterias (Droux, M., y cols. 1987; Huppe, H.C., y cols. 1990).

La proteína FTR es una proteína heterodimérica formada por una subunidad conservada de 13 kDa y una subunidad variable con un tamaño entre 7 y 12 kDa. Esta proteína contiene un centro hierro-azufre (4Fe-4S), además del enlace disulfuro reactivo (Droux, M., *y cols.* 1987). Ambas subunidades son codificadas en el núcleo. Aunque la secuencia de la subunidad variable difiere a lo largo de la evolución, conserva dominios con alta homología entre plantas superiores y cianobacterias. El análisis de las distintas secuencias han mostrado que la subunidad conservada es la subunidad catalítica que contiene el centro Fe-S y el enlace disulfuro (Szekeres, M., *y cols.* 1991; Marc-Martin, S., *y cols.* 1993; Falkenstein, E., *y cols.* 1994; Iwadate, H., *y cols.* 1994; Chow, L.P., *y cols.* 1995). La subunidad catalítica tiene siete cisteínas conservadas en el polipéptido maduro (Marc-Martin, S., *y cols.* 1993). En espinaca, los grupos disulfuros activos lo constituyen los residuos Cys54 y Cys84, mientras que el centro Fe-S está anclado con los residuos Cys52, Cys71, Cys73 y Cys82 (Chow, L.P., *y cols.* 1995). Esta distribución confirma que el centro Fe-S está cercano al puente disulfuro catalítico como en el caso de la enzima NTR con el grupo prostético FAD (Dai, S., *y cols.* 1996). Como sucede con otras flavoproteínas disulfuro reductasas, una de las cisteínas, en el caso de espinaca es el aminoácido Cys54, es el más reactivo frente a los grupos tioles y es el residuo que inicia el ataque nucleofílico en la reacción de intercambio tiol-disulfuro (Chow, L.P., *y cols.* 1995). El centro Fe-S es el responsable de la estabilización del radical que se forma tras el primer ataque nucleofílico por parte del puente disulfuro activo (Salamon, Z., *y cols.* 1995). Esta enzima además interactúa de modo muy intenso con la ferredoxina a través de interacciones electrostáticas implicando cargas negativas localizadas en el extremo carboxilo terminal (De Pascalis, A.R., *y*

cols. 1994). Aunque la enzima FTR actúa eficazmente en la activación de las enzimas cloroplásticas TRX *f* y TRX *m*, es muy versátil siendo eficaz también reduciendo a la TRX *h* citosólica, al contrario que la enzima NTR que es mucho más selectiva en la eficiencia reductora sobre las diferentes TRXs (Jacquot, J.P., *y cols.* 1994).

6.c.- Sistema Glutarredoxina.

Además de los sistemas descritos anteriormente, las glutarredoxinas son capaces de modular la actividad de las tiorredoxinas de forma directa sin mediar el sistema NTR (Reichheld, J.P., *y cols.* 2007) como sucede en el caso de AtTrx *h3*. De hecho, la actividad TRX humana es modificada por unión a glutatión (Casagrande, S., *y cols.* 2002). En plantas, PtTRX *h4* es reducida directamente por la glutarredoxina y la actividad de PtTRX *h2* se modifica mediante la unión a glutatión (Gelhaye, E., *y cols.* 2005).

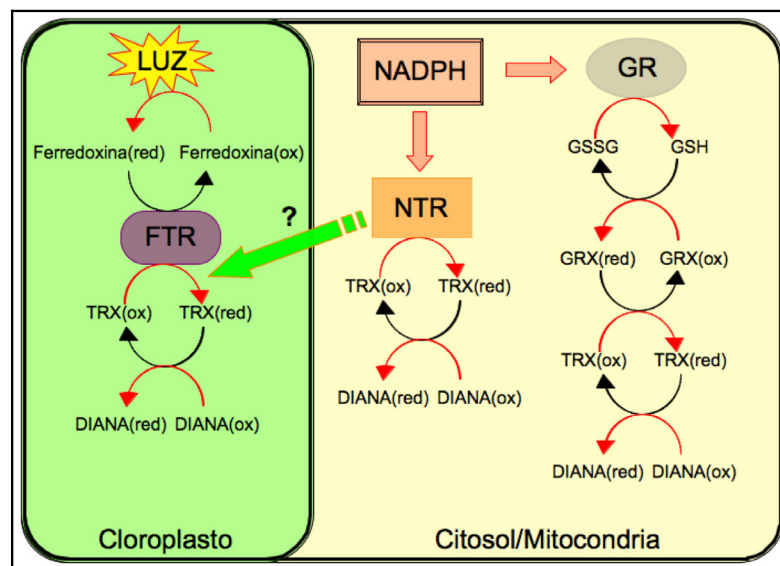


Fig.4.- Esquema de los sistemas de reducción de TRXs en plantas.

B.7.- El sistema tiorredoxina en cloroplasto. Composición, modo de reducción y enzimas diana.

La multiplicidad de las diferentes isoformas presentes en el cloroplasto de *A. thaliana*, 4 TRX *m*, 2 TRX *f*, 1 TRX *x* y 2 TRX *y* (Meyer, Y., y cols. 2002), pone de manifiesto la pregunta acerca de la especificidad y funcionalidad de estas proteínas. Está documentado que el papel de las TRXs cloroplastídicas está asociado con el control que ejerce la luz sobre el metabolismo del carbono a través de la regulación de algunas enzimas del ciclo de Calvin en plantas C3 y C4. En oscuridad y condiciones oxidantes, un número de enzimas son inactivadas debido al estado redox de los residuos cisteínas de dichas enzimas. Después de la transición oscuridad-luz, estos residuos se reducen al estado tiol gracias a las TRXs presentes en el estroma del cloroplasto conduciendo a la activación de la biocatálisis del metabolismo del carbono con la excepción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Wenderoth, I., y cols. 1997). El poder reductor dado por la luz es mediado por el sistema ferredoxina/tiorredoxina compuesto por la ferredoxina, ferredoxina-tiorredoxina-reductasa y las TRXs. Sólo los isotipos TRX *m* y *f* han sido relacionadas con el sistema ferredoxina/tiorredoxina. Históricamente, la TRX *m* ha sido denominada así por ser capaz de activar la enzima NADP malato deshidrogenasa (Schürmann, P. and Jacquot, J.P. 2000), mientras que la TRX *f* actúa como activador específico de la enzima fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplastídica, aunque se ha comprobado que la TRX *m* es también capaz de reducir a la fructosa-1,6-bifosfatasa cloroplastídica, aunque con menor eficacia (López-Jaramillo, J., y cols. 1997). Entre las diferentes dianas caracterizadas

bioquímicamente, muchas enzimas pertenecientes al ciclo de Calvin son reguladas a través de la TRX *f* lo que confirma la función de esta proteína en la asimilación del carbono durante la fotosíntesis (Motohashi, K., *y cols.* 2001a; Balmer, Y., *y cols.* 2003b; Balmer, Y., *y cols.* 2004; Lemaire, S.D., *y cols.* 2004; Marchand, C., *y cols.* 2004; Wong, J.H., *y cols.* 2004; Balmer, Y., *y cols.* 2006). Además del papel de la TRX *m* sobre la NADP-malato deshidrogenasa, se ha asociado la actividad de esta proteína con la membrana del tilacoide donde se ha localizado una peroxirredoxina tipo 2-Cys (König, J., *y cols.* 2002; Peltier, J.B., *y cols.* 2002; Friso, G., *y cols.* 2004) y se le involucra en la reducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Horling, F., *y cols.* 2003). No obstante, las cuatro isoformas que están presentes en los cloroplastos, incluso la proteína CDP32 (Broin, M. and Rey, P. 2003) son capaces de reducir *in vitro* tanto a la peroxirredoxina tipo 2-Cys de *A. thaliana* como la PRX Q de álamo (Collin, V., *y cols.* 2003; Rouhier, N., *y cols.* 2004a), aunque la más efectiva reduciendo la proteína 2-Cys-PRX es la TRX *x* involucrando a esta tiorredoxina en la destoxicación de peróxidos (Collin, V., *y cols.* 2003). Por otra parte, la proteína de *A. thaliana* TRX *m3* no es capaz de reducir a la proteína diana NADP malato deshidrogenasa, ni a la enzima FBPasa cloroplastídica (Collin, V., *y cols.* 2003), además de tener un patrón de expresión diferente al resto de las TRX *m* (Mestres-Ortega, D. and Meyer, Y. 1999) lo que indicaría que puede estar implicada en funciones no relacionadas con los cloroplastos.

Se ha podido caracterizar una TRX *y* de *Chlamydomonas reinhardtii* y se ha comprobado su eficiencia en la reducción de varias PRXs (Lemaire, S.D., *y cols.* 2003; Rouhier, N., *y cols.* 2004a), pero no está involucrada en

la activación *in vivo* de FBPasa cloroplastídica o NADP-malato deshidrogenasa (Lemaire, S.D., *y cols.* 2003).

Es probable que la ruta de reducción de las TRXs a través del sistema FTR en el cloroplasto sea el único, de hecho, en el genoma de *A. thaliana* se ha detectado la presencia de una enzima NTR-C cloroplastídica que contiene un dominio tiorredoxina (Serrato, A.J., *y cols.* 2002; Serrato, A.J. and Cejudo, F.J. 2003). Esta enzima se ha caracterizado en arroz como una enzima homodimérica en la que el dominio NTR de la primera cadena transfiere los electrones al dominio TRX de la segunda cadena y es este último dominio es el que reduce a la proteína diana. Aunque el dominio NTR es incapaz de reducir TRX *f* o TRX *m*, experimentos con plantas que no expresan esta proteína son hipersensibles frente a estreses oxidativos, lo que implica que la enzima NTR-C cloroplastídica participa en el proceso de defensa frente a agentes oxidantes (Serrato, A.J., *y cols.* 2004).

La diversidad de las isoformas de tiorredoxinas cloroplastídicas está en concordancia con el número de proteínas dianas, identificadas o posibles, con las que interactúan. Sin embargo, en la mayoría de los casos la especificidad de las interacciones entre TRX y proteína diana está sin confirmar. Por otra parte, el desarrollo de la proteómica ha conducido a identificar un mayor número de proteínas que podrían ser posibles dianas de las TRXs en el cloroplasto (Motohashi, K., *y cols.* 2001b; Balmer, Y., *y cols.* 2003b; Lee, K., *y cols.* 2004). Sin embargo muchas de ellas deben ser confirmadas como dianas de las TRXs cloroplastídicas. Las proteínas diana identificadas han sido agrupadas en relación a su localización y función ya conocida, y aunque muchas quedan por confirmar se puede sugerir que las TRXs cloroplastídicas están implicadas en procesos de activación de enzimas del metabolismo carbonado durante la transición oscuridad-luz,

como ya se había descrito, pero también participarían en procesos de división celular, en la replicación del ADN, en la síntesis de amino ácidos y lípidos, en la respuesta frente a ambientes oxidantes, en la destoxificación de ROS producidos por estreses abióticos o bióticos mediante la interacción con algunas isoformas de PRXs (König, J., *y cols.* 2002; Rouhier, N., *y cols.* 2004a), glutatión peroxidasa (Milla, M.A.R., *y cols.* 2003) y metionina sulfoxido reductasa (Sadanandom, A., *y cols.* 1996; Gustavsson, N., *y cols.* 2002).

C.- Regulación de la expresión por luz.

C.1.- La luz y sus efectos en la regulación de la expresión.

La gran variedad de isoformas de TRXs existentes dentro de la célula vegetal, algunas veces incluso coexistiendo dentro del mismo compartimiento celular, hace difícil encontrar la función específica de cada TRX (Meyer, Y., *y cols.* 2002). En los últimos años el uso de técnicas proteómicas ha permitido identificar posibles nuevas proteínas diana específicas para algunas TRXs, sin embargo no siempre se ha podido definir una función determinada en cada uno de los procesos que ocurren en la planta (Balmer, Y., *y cols.* 2003b). El desconocimiento de algunas de las funciones de las TRXs así como de sus proteínas diana hace que sea difícil determinar los factores endógenos y exógenos que podrían regular la expresión de los genes de TRXs. Sin embargo varios estudios han revelado que las TRX *h* responden ante fenómenos de estrés bióticos o abióticos

(Traverso, J.A., y cols. 2007) mientras que la luz y los azúcares podrían influir directamente sobre las TRX cloroplásticas *f* y *m* al activar enzimas implicadas en el metabolismo carbonado (Buchanan, B.B. 1980), desconociéndose aún todos los mecanismos implicados en estas respuestas. Sin embargo estas informaciones indican que existe una regulación a nivel transcripcional, a través de la formación de ARNm que controlaría la respuesta de las TRXs frente a factores internos o ambientales que les pueden afectar.

C.2.- Regulación por luz.

Contrariamente a los animales, las plantas no son capaces de desplazarse para evitar los cambios ambientales bruscos. Para resolver este problema, las plantas han desarrollado un elevado grado de plasticidad para optimizar el crecimiento y la reproducción en respuesta a las condiciones cambiantes del entorno. De entre todas las señales ambientales, la luz es el factor ambiental más importante que afecta a las plantas. La luz no sólo actúa como fuente primaria de energía para la fotosíntesis, sino que da información sobre las condiciones ambientales en las que se encuentran las plantas en cada momento de tal forma que puede influir en la germinación, en el crecimiento y estrategia de desarrollo de la planta.

Las plantas han desarrollado complejos métodos capaces de censar la calidad, dirección y duración de la luz e interpretar estas señales para producir las señales fisiológicas apropiadas (Montgomery, B.L. and Lagarias, J.C. 2002). Para captar la luz ambiental, las plantas poseen al menos tres tipos diferentes de fotorreceptores que se caracterizan por el tipo

de luz que perciben. La luz en la franja del espectro visible en el rojo/rojo lejano (infrarrojo) (600-750 nm) es percibido por la familia de los fitocromos (PHY), la franja del azul/UV-A (320-500 nm) se sensa a través de los criptocromos (CRY) y las fototropinas (PHO), y por último la franja entre (282/320 nm) UV-B se capta a través de un fotorreceptor aun no caracterizado (Fig. 5) (Kendrick, R.E. 1994; Briggs, W.R. and Huala, E. 1999; Briggs, W.R. and Christie, J.M. 2002).

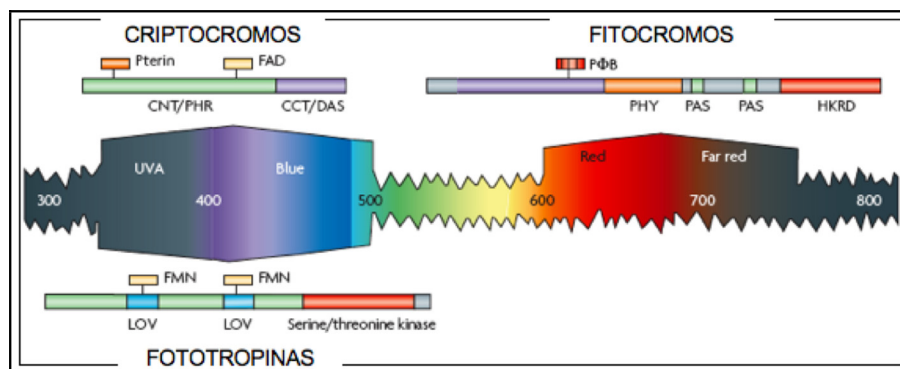


Fig.5.- Longitudes de ondas percibidas por las diferentes familias de fotorreceptores descritos en plantas.

Semillas germinadas durante seis días con luces de diferentes longitudes de onda, en la franja del rojo (600-700 nm), del azul (400-700 nm) y del infrarrojo (700-800 nm) mostraron un patrón de expresión similar al de semillas crecidas en oscuridad (Ma, L., y cols. 2001). Dado que estas longitudes de onda activan diferentes pigmentos, estos resultados sugieren que existe una convergencia en la transducción de las señales de estos fotorreceptores sobre un mismo conjunto de genes.

El análisis de plantas de *A. thaliana* mutadas y cuya función está alterada en uno o más fotorreceptores ha permitido identificar los fotorreceptores que controlan alguno de los aspectos del desarrollo

dependiente de la luz. El factor luz, solo o junto a otros factores ambientales, estimula los diferentes patrones de desarrollo de la planta. Así el proceso de la germinación no solo está controlado por la temperatura y el tiempo de almacenamiento en estado seco (Koornneef, M. and Karssen, C.M. 1994) sino también por la luz que se percibe a través de los fitocromos (Casal, J.J. and Sánchez, R.A. 1998). Numerosos estudios han permitido relacionar determinados procesos que ocurren en las plantas con el tipo de luz y los fotorreceptores implicados. Así, se sabe que en la fotomorfogénesis están involucrados los fitocromos y criptocromos (Nemhauser, J. and Chory, J. 2002), la “huída” (eludir la sombra) de la sombra está mediada por fitocromos (Smith, H. and Whitelam, G.C. 1997), el fototropismo positivo para tallo o negativo para el caso de la raíces primarias (Liscum, E. and Stowe-Evans, E.L. 2000; Liscum, E. 2002) se realiza gracias a la luz azul captada por las fototropinas (Sakai, T., y cols. 2001), mientras que el movimiento de los cloroplastos y la apertura y cierre de los estomas ambos fenómenos están mediados por la luz azul a través de las fototropinas (Briggs, W.R. and Christie, J.M. 2002).

Por último, la percepción de la longitud del día o fotoperiodo, permite a los organismos ajustar su desarrollo anticipándose a los cambios estacionales (Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. 2002). Las plantas, al igual que muchos organismos, tienen un reloj biológico endógeno que les permite organizar sus procesos fisiológicos, metabólicos y de desarrollo para que tengan lugar a tiempos óptimos. El reloj biológico mejor estudiado es el sistema circadiano que regula los ritmos diariamente (aprox. 24 h) en respuesta al ciclo día/noche (Devlin, P.F. 2002). Estos ritmos no sólo responden al ambiente, sino que también persisten en ausencia de cualquier elemento ambiental, indicando la presencia de una oscilación interna

(Millar, A.J. and Kay, S.A. 1991). En el corazón del sistema circadiano de cada organismo se encuentran los osciladores responsables de generar los ritmos circadianos. Estos osciladores se pueden establecer por la información procedente del ambiente, tal como los cambios diarios de la luz y la temperatura. Sin embargo, el reloj circadiano no está completamente aislado de los estímulos del exterior y debe de ser reprogramado para permitir la sincronización con el ciclo día/noche. En plantas, la luz es un factor fundamental en la sincronización del reloj circadiano (Devlin, P.F. 2002), ya que esta sincronización hace que las plantas aumenten su contenido en clorofila así como la velocidad de fijación del carbono y crezca rápidamente conduciendo hacia un incremento en la tasa de supervivencia, lo que se convierte en una ventaja competitiva con respecto a plantas que presenten un ciclo interno diferente al externo (Dodd, A.N., y cols. 2005). El modelo del reloj circadiano se completa con las rutas que proporcionan un enlace entre el oscilador y los numerosos procesos cuya ritmicidad está controlada por el propio reloj. El sistema circadiano tiene un papel regulador en casi todos los aspectos de la vida de la planta: en la germinación, la elongación del hipocotilo, el movimiento de las hojas, la huida de la sombra, el tiempo de floración, la apertura de las hojas, la producción del olor, la tuberización, la dormancia en el invierno, la apertura de los estomas y el movimiento de los cloroplastos, la fotosíntesis, la fotoprotección y protección frente a las temperaturas altas (Yakir, E., y cols. 2007). Este fenómeno no sólo se cumple en plantas sino también en cianobacterias confirmándose el valor adaptativo del ciclo circadiano en un ambiente “rítmico” (Woelfle, M.A., y cols. 2004). Así, el ciclo circadiano sirve como un amortiguador contra los cambios inesperados en el ambiente tales como la alteración de la luz o la temperatura (Covington, M.F., y cols.

2001). Se ha demostrado en plantas de *A. thaliana* que tanto los fitocromos como los criptocromos contribuyen en el buen funcionamiento del reloj circadiano.

C.3.- El sistema circadiano (*A. thaliana*).

El modelo básico que refleja la estructura del reloj circadiano consta de tres componentes, la ruta de entrada de la señal ambiental que sincroniza el reloj, el oscilador central que genera la ritmicidad circadiana en función de su sincronización y la ruta de salida a la respuesta circadiana, que se traduce en la regulación del movimiento de las hojas, expresión génica, etc... (Eriksson, M.E. and Millar, A.J. 2003).

3.a.- Ruta de entrada de señales ambientales. Los fotorreceptores.

Aunque los ritmos circadianos persisten en ausencia de señal externa, sincronizan su fase mediante estímulos del medioambiente. Entre los parámetros ambientales que suministran estímulos al reloj, está la temperatura (Somers, D.E., y cols. 1998a), que llega a estimular dos clases distintas de reloj circadiano en *A. thaliana* en función de la sensibilidad a la temperatura (Michael, T.P., y cols. 2003), y la luz siendo este el estímulo más potente y mejor caracterizado.

La percepción de la luz en plantas ha sido estudiada en gran detalle (Quail, P.H. 2002b). Las tres clases de fotorreceptores conocidos en plantas realizan funciones fotosensoras distintas. Así, los criptocromos y

fototropinas absorben luz en la región azul-ultravioleta del espectro, mientras que los fitocromos lo hacen principalmente a longitudes de onda del rojo al infrarrojo (Fig. 5). Los fotorreceptores fitocromos están codificados, en *A. thaliana*, por los genes phyA, phyB, phyC, phyD, phyE, los criptocromos por los genes cry1, cry2, mientras que los fototropinas lo están por los genes phot1 y phot 2 (Quail, P.H., *y cols.* 1995; Cashmore, A.R., *y cols.* 1999; Kasahara, M., *y cols.* 2002; Lin, C. and Shalitin, D. 2003). Cada uno de estos genes está regulado de forma diferente en función de la respuesta frente a la luz.

Los transcritos de las proteínas estables a la luz (phyB, phyC, phyD, phyE y cry1) tienen un máximo de su expresión al comienzo del día, mientras que los genes que codifican para proteínas más lábiles a la luz (phyA y cry2) lo tienen cerca del ocaso (Bognar, L.K., *y cols.* 1999; Toth, R., *y cols.* 2001). Los criptocromos y los fitocromos controlan las respuestas de crecimiento y de desarrollo a variaciones en la longitud de onda, intensidad y duración de la irradiación diurna (Cashmore, A.R., *y cols.* 1999; Smith, H.B. 2000), mientras que la función principal de las fototropinas es la de controlar la dirección del crecimiento en respuesta a la dirección e intensidad de la luz (Sakai, T., *y cols.* 2001). Un dato importante es que la expresión de los fotorreceptores está bajo el control del reloj circadiano, indicando que además de formar parte de la ruta de entrada hacia el reloj, también son dianas de la ruta de salida (Fig. 6). Así, los criptocromos y fitocromos se encuentran regulados por la propia luz.

3.b.- Transmisión de la señal luminosa.

En la ruta de señalización hacia el reloj, el estímulo luminoso captado por los distintos fotorreceptores, llega al oscilador central mediante una cascada de señalización formada por distintos componentes. ELF3 y ELF4 (Early Light Flowering 3 y 4) son factores de transcripción que se encuentran entre los componentes con un papel demostrado en la transmisión de la señal hacia el reloj. El tiempo de floración en el mutante *elf3* de *A. thaliana* es independiente del fotoperiodo (Hicks, K.A., y cols. 1996), mientras que el mutante *elf4* conlleva la floración temprana bajo un fotoperiodo corto y bajo un fotoperiodo largo florece igual que el silvestre (Doyle, M.R., y cols. 2002). El mutante *elf3* es arrítmico en luz continua pero retiene la ritmicidad en oscuridad continua, sugiriendo que ELF3 es un componente de la ruta de entrada de luz hacia el oscilador (Hicks, K.A., y cols. 1996). La expresión rítmica del gen CAB2, que codifica para el complejo antena tipo I del fotosistema II, se vuelve constitutiva en el mutante *elf3* (McWatters, H.G., y cols. 2000), indicando su función como modulador negativo de la señal luminosa (Covington, M.F., y cols. 2001). El mutante *elf4* afecta la ritmicidad de genes regulados por el reloj, como CAB, pudiendo ELF4 estar estrechamente asociado al oscilador circadiano (Eriksson, M.E. and Millar, A.J. 2003). ELF3 codifica para una proteína que podría funcionar como un factor de transcripción y los transcritos de ELF4 al igual que ELF3, presentan expresión circadiana con un máximo hacia el final del día (Hicks, G.R., y cols. 2001; Liu, X.L., y cols. 2001).

PIF3 (Phytochrome Interacting Factor 3) es un factor de transcripción tipo bHLH con un dominio PAS, el cual se une directamente tanto a phyA como a phyB (Ni, M., y cols. 1998; Halliday, K.J., y cols. 1999; Toledo-Ortíz, G., y cols. 2003). Estudios recientes muestran que PIF3 es un

componente tanto negativo como positivo de la señalización por fitocromos, dependiendo de la naturaleza de la luz aplicada (Kim, J., *y cols.* 2003). Asimismo, PIF3 se une a la secuencia G-box (-CACGTG-) en el promotor del gen *Cca1*. Por tanto, PIF3 podría mediar en la activación por luz de CCA1 desde los fotorreceptores (Quail, P.H. 2002a). Otro dato interesante es la capacidad de otro de los componentes del oscilador, TOC1, de unirse a PIF3 y a una proteína relacionada denominada PIL1 (PIF3-Like 1) (Makino, S., *y cols.* 2002). Otra función en la señalización luminosa ha sido demostrada para GIGANTEA (GI), identificado en un mutante con retardo en la floración (Fowler, S., *y cols.* 1999). Los transcritos de GI presentan expresión circadiana y el mutante *gi* de *A. thaliana* presenta un acortamiento del periodo y amplitud de la expresión de genes regulados por el reloj, sugiriendo que GI media la entrada de luz hacia el reloj. Además este mutante *gi* acumula 5 veces más almidón en hojas que la planta silvestre. La ritmicidad de GI se ve alterada en el mutante *elf3* lo que sugiere que GI actúa por debajo de ELF3 (Fowler, S., *y cols.* 1999). La proteína GI presenta localización nuclear (Huq, E., *y cols.* 2000), habiéndose propuesto un modelo de acuerdo con el cual GI forma parte de un lazo de retroalimentación requerido por el oscilador central para mantener el periodo y la amplitud (Fowler, S., *y cols.* 1999; Park, D.H., *y cols.* 1999).

3.c.- Oscilador central.

La persistencia de los ritmos circadianos incluso en ausencia de la señal ambiental que los sincroniza indica que están conducidos por un oscilador automantenido. El oscilador central del reloj circadiano de todos los organismos incluye un circuito de retroalimentación negativa, que

implica una ritmicidad de 24 horas en los niveles de los transcritos de los reguladores que actúan tanto negativa como positivamente (Harmer, S.L., y cols. 2000; Young, M.W. and Kay, S.A. 2001). Adicionalmente, un sistema de regulación post-transcripcional de los transcritos del oscilador además de modificaciones post-traduccionales de las proteínas que codifican, contribuyen al mantenimiento de la periodicidad de 24 horas (Edery, I. 1999; Allada, R., y cols. 2001). La ritmicidad producida por las proteínas que conforman el oscilador, traduce la información temporal en la ritmicidad de los distintos procesos biológicos mediante las rutas de salida de la señal (Brown, S.A. and Schibler, U. 1999).

Por otro lado, se ha demostrado que no existe un único reloj circadiano que controle los distintos ritmos que tienen lugar dentro de la planta, sino que existen distintos relojes autónomos con especificidad de tejido, los cuales son sincronizados simultáneamente pero independientemente y que son responsables de mantener la ritmicidad de los procesos que controlan (Thain, S.C., y cols. 2000; Rascher, U., y cols. 2001; Hall, A., y cols. 2002; Thain, S.C., y cols. 2002). La situación es aun más compleja al existir dos osciladores circadianos en *A. thaliana* que se diferencian en función de su distinta sensibilidad frente a señales ambientales de temperatura (Michael, T.P. and McClung, C.R. 2003). El reloj está sincronizado por los fotorreceptores fitocromos y criptocromos, pero también estarían implicadas las proteínas ZTL (Zeitlupe)/FKF1 (Flavin Binding Kelch-Repeat F-Box)/LKP2 (LOV Kelch Protein-2) que podrían funcionar como fotorreceptores del fotoperiodo y del ciclo circadiano (Imaizumi, T., y cols. 2003; Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. 2003).

El control del ritmo circadiano en plantas está compuesto por un proceso *feedback* entre el proceso transcripcional y el transduccional. El

oscilador circadiano en *A. thaliana* está compuesto por varios elementos, los factores de transcripción de tipo MYB, CCA1 (Circadian Clock Associated 1), LHY (Late Elongated Hypocotyl) y ELF4 (Early Flowering 4), la proteína TOC1 (Timing of CAB Expression 1) (Schaffer, R., *y cols.* 1998; Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. 1998; Strayer, C., *y cols.* 2000; Alabadi, D., *y cols.* 2001; Doyle, M.R., *y cols.* 2002; Hazen, S.P., *y cols.* 2005) y LUX (Lux Arrhythmo) (Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. 2001). TOC 1 es una proteína nuclear con un motivo en la región amino-terminal similar al dominio receptor de reguladores de respuesta de los sistemas de transducción de señal (Makino, S., *y cols.* 2000; Strayer, C., *y cols.* 2000). Sin embargo, el residuo conservado de aspartato que normalmente media en la fosforilación en otros reguladores de este tipo de respuesta previamente caracterizados, se encuentra sustituido en TOC1, lo que presumiblemente hace que no funcione de la forma clásica, por lo que también se le conoce como APRR1 (Arabidopsis Pseudoresponse Regulator 1) (Matsushika, A., *y cols.* 2000). La mutación *toc 1* acorta el periodo varios ritmos bajo un amplio rango de condiciones de luz y temperatura, entre los que se encuentran el movimiento de la hoja y la apertura de los estoma, floración y expresión génica (Somers, D.E., *y cols.* 1998b).

Los factores de transcripción CCA1 y LHY, los cuales presentan un único dominio tipo MYB, se consideran que están implicados en la generación de la ritmicidad circadiana, ya que su sobreexpresión constitutiva altera distintos ritmos como el movimiento de la hoja y la expresión génica (Schaffer, R., *y cols.* 1998; Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. 1998). La sobreexpresión de CCA1 reprime la oscilación endógena del transcrito CCA1, de manera que tanto la proteína como el transcrito CCA1 forman parte de un circuito de autorregulación negativa. Además, la

transcripción de CCA1 y LHY se regulan mutuamente de forma negativa, lo que indica que están interrelacionados en el lazo de retroalimentación (Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. 1998; Fowler, S., y cols. 1999). Actualmente ha surgido un modelo mostrando que la regulación recíproca entre el lazo CCA1/LHY y TOC1 puede constituir el corazón del oscilador central en *A. thaliana* (Alabadi, D., y cols. 2001). CCA1/LHY tienen un pico de acumulación que coincide con el amanecer, mientras que TOC1 lo tiene por la tarde. Por un lado, en plantas que expresan constitutivamente CCA1 (*cca1-ox*) o LHY (*lhy*), la oscilación en los niveles de ARNm de TOC1 es reprimida, lo que implica que CCA1 y LHY son reguladores negativos de TOC1. Por otro lado, la oscilación de LHY y CCA1 en el mutante *toc1* tiene un periodo más corto y un máximo de acumulación de ARNm menor, lo que indica que TOC1 es necesario para inducir la expresión de los genes que codifican CCA1 y LHY (Alabadi, D., y cols. 2001). En resumen, las proteínas LHY y CCA1 se unen a la secuencia reguladora del factor *toc1* inhibiendo la transcripción de éste gen, pero TOC1 es necesario para la expresión de los genes *cca1* y *lhy*, por lo que los niveles de éstos van disminuyendo a lo largo del día, siendo mínima la expresión al final del día lo que daría lugar a un aumento en la expresión de TOC1, y es así como en la célula se regularía el cambio entre el periodo de luz y el de oscuridad (Alabadi, D., y cols. 2001). Sin embargo, el hecho de que la expresión de CCA1 y LHY todavía oscile en el mutante *toc1*, sugiere que algunos genes similares a TOC1 podrían actuar redundantemente con TOC1 en el control de la expresión de estos dos genes (Makino, S., y cols. 2000; Matsushika, A., y cols. 2000; Strayer, C., y cols. 2000). Por otro lado, una observación significativa es que la expresión de CCA1 se ve reducida en vez de incrementar y con un máximo de expresión retrasado, en plantas que

sobreexpresan TOC1 (Makino, S., *y cols.* 2000; Mas, P., *y cols.* 2003), lo que de nuevo implica participación de otros componentes como son las proteínas de la familia APRR (Yamamoto, Y., *y cols.* 2003).

CCA1 fue identificado por su interacción con el promotor del gen *cab2*, gen que codifica para el complejo antena tipo I del fotosistema II que presenta un máximo de expresión por la mañana, CCA1 se une al motivo CSB (CCA1 Binding Site) de secuencia -AAA/CAATCT- localizado en el promotor del gen CAB y que media en su regulación circadiana (Carre, I.A. and Kay, S.A. 1995). Un motivo denominado “Evening Element” (EE) de secuencia AAATATCT con gran similitud al sitio de unión de CCA1 se ha encontrado en genes que muestran niveles máximos de expresión por la tarde, incluyendo TOC1, a cuyo promotor se unen CCA1 y LHY ejerciendo la represión del gen TOC1 (Harmer, S.L., *y cols.* 2000; Alabadi, D., *y cols.* 2001; Mizoguchi, T., *y cols.* 2002).

Existen sin embargo, una serie de resultados que muestran que las actividades CCA1 y LHY no son suficientes por sí solas para el mantenimiento de la ritmicidad circadiana. Así, un mutante *cca1-1* carente en la expresión de CCA1 pero manteniendo la de LHY, sigue manteniendo ritmicidad circadiana aunque con un acortamiento en sus periodos, lo que sugiere que CCA1 por sí sólo no es imprescindible para la función del oscilador y que las funciones de CCA1 y LHY no son totalmente redundantes (Green, R.M. and Tobin, E.M. 1999). En este sentido, un mutante *cca1-1 lhy-R* carente de CCA1 y con expresión de LHY fuertemente reducida, es incapaz de mantener la oscilación circadiana tanto en luz como en oscuridad continua, aunque sí la pueden mantener en ciclos luz/oscuridad muy cortos, sugiriendo que el reloj circadiano de *A. thaliana* no depende únicamente de las actividades de CCA1 y LHY. Estos

resultados se ven apoyados por estudios complementarios que añaden un nuevo componente denominado EPR1 (Early Phytochrome-Responsive 1) al reloj circadiano de *A. thaliana* (Kuno, N., y cols. 2003). EPR1 es una proteína de localización nuclear con un único dominio tipo MYB con alta similitud a CCA1 y LHY. Al igual que CCA1 y LHY, exhibe acumulación circadiana de sus transcritos con un máximo de acumulación al amanecer, aunque ligeramente desfasado de CCA1 y LHY, y reprime su propia expresión, sugiriendo que es parte del lazo regulador de retroalimentación negativa. EPR1 está regulado tanto por PHY A como por PHY B y su ritmicidad se pierde tanto en el mutante *cca1-ox* como en el mutante *lhy*. Plantas que sobreexpresan la proteína de EPR1 presentan un retraso en la floración y una alteración en la apertura de los cotiledones. Estos resultados indican que EPR1 forma parte del reloj circadiano en *A. thaliana*, sin embargo su sobreexpresión no afecta la ritmicidad de CCA1 y LHY, lo que indica que EPR1 no es un componente del oscilador central de la planta, por lo que EPR1 puede jugar un papel en el ajuste “fino” del reloj circadiano.

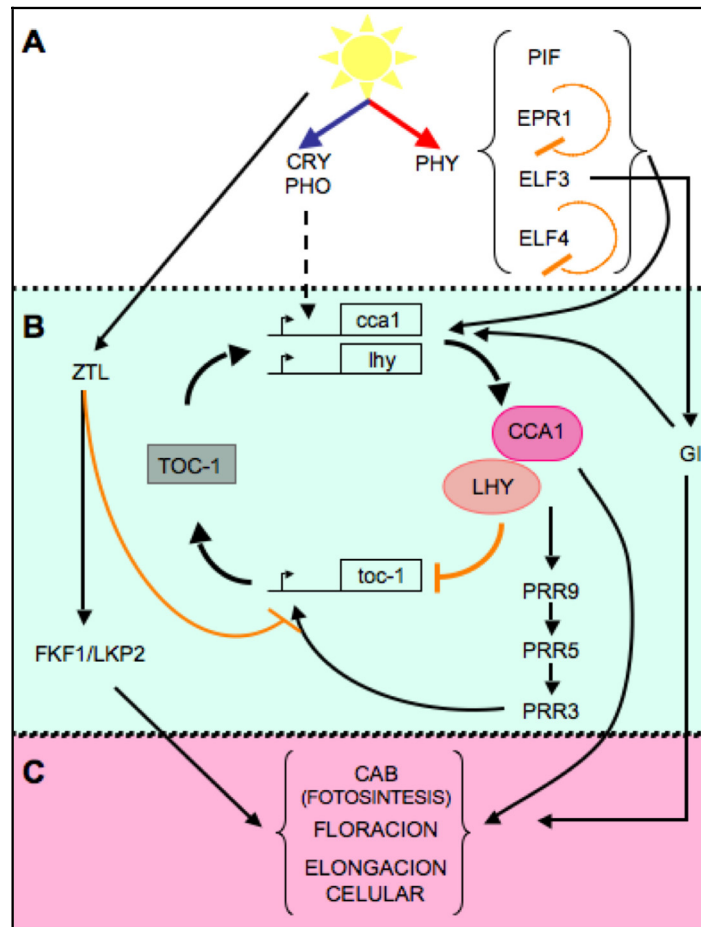


Fig. 6.- Esquema de los elementos que participan en la regulación del reloj circadiano. A) En la parte superior se encuentran los elementos que participan de la transmisión de la señal luminosa hacia la parte central, B) en la que se encuentra el reloj que va a originar C) la ritmicidad de los diferentes procesos de la célula. En naranja, se representan los procesos de represión a nivel transcripcional de la expresión de los diferentes genes implicados.

D.- Regulación de la expresión por azúcares.

D.1.- Los azúcares y la regulación en la expresión de los genes.

La vida en la Tierra depende de la energía luminosa y de la fijación del carbono que se almacena en forma de azúcares en las plantas, con la consecuente producción de oxígeno. Estos azúcares no solo son la fuente de energía y de carbono celular para el crecimiento y desarrollo sino que tienen un papel crucial como moléculas señales en los vegetales. Al ser unos organismos autótrofos, tanto en los tejidos de las plantas que importan azúcares como en los que lo exportan se generan una serie de señales por parte de los azúcares de tal forma que existe una regulación fina que permite mantener el equilibrio en el contenido de azúcares entre estos dos tipos de tejidos. Los azúcares han adquirido una gran importancia en funciones reguladoras durante la evolución, controlando el metabolismo de las células, la resistencia a estreses, en el proceso de crecimiento y desarrollo de las bacterias, levaduras, plantas y animales, de tal forma que los azúcares pueden alterar la expresión de los genes de igual modo que lo pueden hacer las hormonas, aunque el rango de concentración en el que actúan es diferente.

El papel regulador de los azúcares es más evidente en microorganismos en vida libre cuyo ambiente está constantemente sometido a dramáticos cambios ambientales. El primer modelo en el que se ha estudiado el sistema de detección y señalización por azúcares ha sido la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Este es un organismo anaerobio

facultativo pero incluso en presencia de oxígeno, prefiere la fermentación de azúcares, tales como glucosa, fructosa y sacarosa a desarrollar la respiración más eficaz energéticamente. La rápida proliferación celular de estos organismos y la reutilización de la producción de etanol durante la fermentación ofrece aparentemente una ventaja selectiva para realizar estudios sobre otros organismos menos tolerantes al etanol. Esta levadura, además, ha desarrollado una gran variedad de sensores de glucosa así como de rutas de señalización permitiendo un uso de la fuente de carbono óptima y exclusiva (Rolland, F., y cols. 2002). En numerosos organismos, el mantenimiento de la homeostasis de los nutrientes y la energía dentro de las células y tejidos es de vital importancia y requiere de los constantes controles y ajustes en la disponibilidad de los nutrientes, ya que un error puede llevar consecuencias graves para el mantenimiento de la vida de la célula o tejido.

En plantas, que carecen de la posibilidad de moverse, el mantenimiento de la homeostasis requiere incluso un mecanismo más sofisticado y flexible acorde con la asombrosa plasticidad en la fisiología y el desarrollo que las plantas presentan. Estudios de respuestas a azúcares en diferentes especies de plantas y mutantes de *A. thaliana* que son hipersensibles o insensibles a azúcares han revelado que los azúcares son clave en la regulación de la expresión de genes implicados en la proliferación y muerte celular, en la germinación de las semillas, en raíces, en tallo, en el crecimiento de las inflorescencias, en la expansión de las hojas, en la senescencia y en el desarrollo de la semilla (Koch, K.E. 1996; Smeeckens, S. 2000; Gibson, S.I. 2005; Rolland, F., y cols. 2006).

La regulación de los azúcares en plantas es bastante compleja. En primer lugar, es un organismo multicelular que necesita mecanismos de

señalización a larga distancia, que sean específicos dependiendo del tipo de célula y tejido y debe existir una coordinación entre los cambios fisiológicos y el desarrollo de la planta y las alteraciones de su entorno. El metabolismo de los azúcares es un proceso muy dinámico, y los flujos de metabolitos y las concentraciones de los azúcares se modifican durante el desarrollo en respuesta a las señales generadas por el entorno de la planta tales como los cambios en la luz, temperatura y estreses bióticos y abióticos (Roitsch, T. 1999; Borisjuk, L., *y cols.* 2003; Bläsing, O.E., *y cols.* 2005; Smith, A.M., *y cols.* 2005; Weber, H., *y cols.* 2005). Es evidente que el mecanismo de señalización por azúcares está estrechamente unido a la regulación por hormonas. Por último, la fotosíntesis y el metabolismo del carbono, que están sujetos a una regulación estricta por retroalimentación, son un punto de control esencial de la señalización por parte de los azúcares. Existe una estrecha interrelación entre los tejidos “fuente” de azúcares y los tejidos “sumideros” que controlan la mayor o menor síntesis de azúcares dependiendo de las necesidades de la planta.

En general, los procesos metabólicos que se suceden en los tejidos “fuente” como son la fotosíntesis, la movilización de nutrientes y exportación de nutrientes son favorecidos cuando la concentración de azúcares es baja, mientras que las actividades típicas de los tejidos “sumidero” como son crecimiento y almacenamiento se favorecen en situaciones en las que las fuentes de carbono son abundantes.

Estos procesos deben de estar rigurosamente coordinados, implicando una regulación metabólica basada en los niveles de azúcares. Aunque la sacarosa es el producto mayoritario de la fotosíntesis y la forma en la que los azúcares son transportados a largas distancias por la planta, muchos efectos causados por los azúcares y que afectan al crecimiento y al

metabolismo pueden ser debidos a la acción de los productos de su hidrólisis, glucosa y fructosa (o productos derivados del metabolismo de éstos). Sin embargo, nuevos datos sugieren que la sacarosa y la trehalosa (T6P) regulan procesos específicos que no son afectados por las hexosas. Un modelo actual simplificado del flujo del carbono muestra como las señales generadas por sacarosa y hexosas pueden ser percibidas en las células “fuente” y “sumidero” (Fig. 7 y Fig. 8).

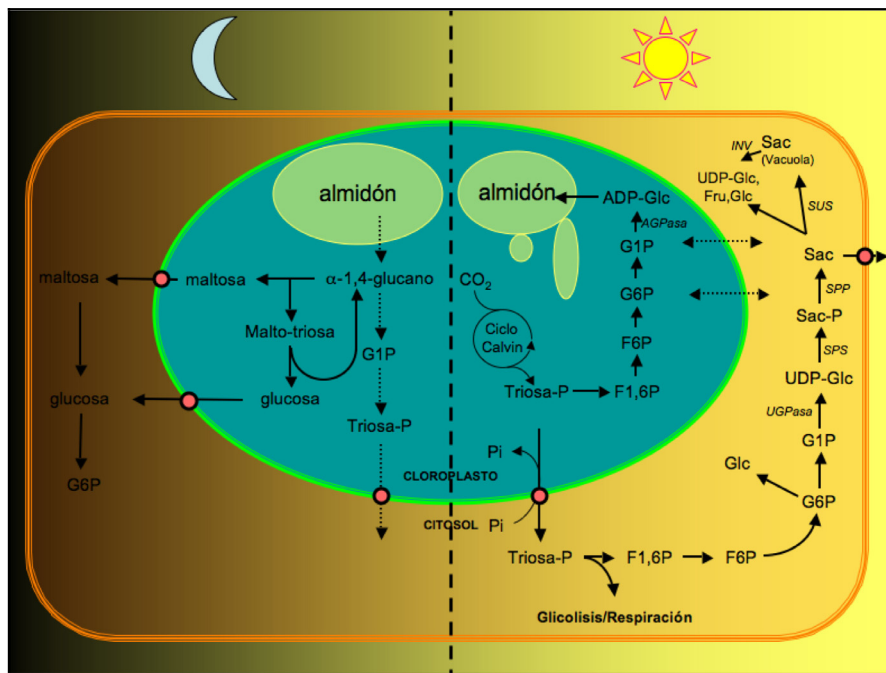


Fig. 7.- Modelo simplificado de los principales flujos de carbono en las células fotosintéticas y la formación de moléculas señal generadas por la fotosíntesis, el transporte y la hidrólisis de compuestos carbonados tanto durante la noche (parte izquierda del esquema) como durante el día (parte derecha del esquema). SPS: sacarosa fosfato sintasa, SPP: sacarosa fosfato fosfatasa, AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa, UGPasa: UDP-glucosa pirofosforilasa, INV: invertasa, SUS: sacarosa sintasa.

En las células fotosintéticas, el fotosintato generado en el ciclo de Calvin es exportado, principalmente como triosas fosfato, desde el cloroplasto hasta el citosol, donde son usados en la glicólisis, y por lo tanto en la respiración o en la biosíntesis, o convertido en sacarosa para uso de la propia célula o exportado a los tejidos “sumideros” (Fig. 7). El transporte neto hacia uno u otro destino va a depender del estado de los tejidos “fuente” o “sumidero”.

El exceso de fotosintato es transitoriamente almacenado como almidón en el cloroplasto de las hojas durante el día. La fuente más importante de señales de glucosa es la degradación del almidón transitorio de los cloroplastos de las células de las hojas durante la noche (principalmente vía exportación de maltosa y glucosa) y de los amiloplastos en los órganos que almacenan almidón (Fig. 7) (Smith, A.M., *y cols.* 2005).

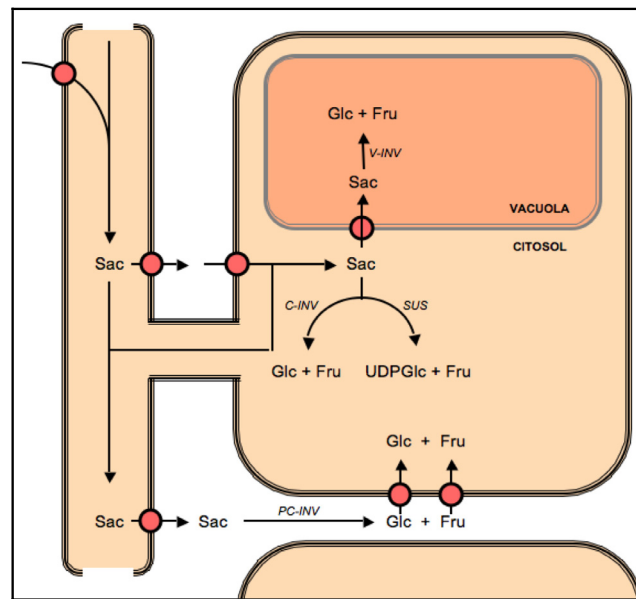


Fig. 8.- Generación y transporte de azúcares señal en células “sumidero”. SUS: sacarosa sintasa, C-INV: invertasa citosólica, V-INV: invertasa vacuolar, PC-INV: invertasa de la pared celular.

En los tejidos “sumideros” (Fig. 8), la sacarosa puede ser importada en las células a través del plasmodesma (transporte simplástico) ó a través de la pared celular (transporte apoplástico). La sacarosa intracelular es hidrolizada por la INV citoplásmica (C-INV), generando glucosa y fructosa, o por la enzima sacarosa sintasa (SUS) produciendo fructosa y UDP-glucosa (Fig. 8).

La sacarosa puede ser importada y almacenada en la vacuola dónde la enzima invertasa vacuolar (V-INV) es la mayor fuente intracelular de hexosas en tejidos en expansión. En el apoplasto, la sacarosa extracelular es hidrolizada por PC-INV (invertasa de la pared celular), la fuerza más importante que conduce la descarga de los azúcares y el mantenimiento del gradiente y por lo tanto la fuerza de los tejidos “sumidero”. Estas enzimas generan altos niveles de glucosa y fructosa extracelular que son recogidos por los transportadores de hexosas, que se coexpresan y que están regulados de forma coordinada con la invertasa de la pared celular (PC-INV) (Roitsch, T. and González, M.C. 2004).

Está claro que el transporte y la hidrólisis de sacarosa juegan un papel clave en la distribución y la generación de señal de azúcar. La amplia regulación por retroalimentación de las enzimas INV y SUS por señalización por azúcares genera un sistema autorregulador muy sensible (Koch, K. 2004). La situación actual es bastante más compleja teniendo en cuenta el transporte de azúcares e intermediarios fuera y dentro de plastidios y vacuolas (Weber, A.P., y cols. 2005).

Además de la fotosíntesis y la ruptura de sacarosa y almidón, es muy probable que la hidrólisis de los polisacáridos que se encuentran en la pared celular genere señales de azúcar. Varias glicosil hidrolasas de la pared celular son inducidas en situaciones de estrés tales como la oscuridad, la

falta de azúcar, la senescencia y la infección (Fujiki, Y., *y cols.* 2001; Lee, E.J., *y cols.* 2004). La señalización por azúcares también se debe de integrar en la disponibilidad de otros nutrientes esenciales tales como el nitrógeno, fósforo y sulfato. Los cambios diurnos de la disponibilidad de los nutrientes son anticipados por la planta, y la regulación circadiana de las enzimas implicadas en la distribución del carbono contribuye de forma significativa a un uso óptimo de los recursos disponibles. Por otra parte, estudios recientes han mostrado fundadas evidencias acerca del papel esencial y crítico de la señal por azúcar en la actual regulación diurna de la expresión de los genes (Bläsing, O.E., *y cols.* 2005; Dodd, A.N., *y cols.* 2005).

D.2.- Sensores de azúcares.

La detección de azúcar puede ser definido como la interacción de una molécula de azúcar con una proteína sensor de tal manera que se genera una señal. La señal es el inicio de una cadena de reacciones en cascada que resulta en respuestas celulares tales como la alteración en la expresión o en la actividad enzimática.

La señalización por parte de los azúcares tiene efectos en todas las etapas de la vida de la planta desde la germinación, durante el crecimiento vegetativo como en el desarrollo reproductivo y en la formación del fruto.

2.a.- Hexoquinasa.

El sensor de glucosa más conservado en levaduras, mamíferos y plantas es la enzima hexoquinasa (HXK) que cataliza la fosforilación de

glucosa, y cualquier hexosa en general (Moore, B., *y cols.* 2003; Wilson, J.E. 2003; Dentin, R., *y cols.* 2004; Moreno, F., *y cols.* 2005). La proteína de levadura HXK2 es conocida por su papel en la represión de genes mediada por glucosa desde hace casi treinta años (Entian, K.D. 1980). En levadura, la proteína HXK2 se ha localizado en el núcleo y es capaz de interactuar con el factor de transcripción MIG1 que es fosforilado por la quinasa Snf1 y desfosforilado por el complejo fosfatasa Glc7-Reg1 en función de los niveles de glucosa. La regulación conjunta por parte del complejo HXK2/MIG1/Snf1/Glc7-Reg1 es específico de levadura (Ahuatzi, D., *y cols.* 2004; Moreno, F., *y cols.* 2005; Santangelo, G.M. 2006).

En general, las plantas contienen dos tipos de HXKs: la HXK tipo A con un péptido de tránsito que la dirige al cloroplasto, mientras que la HXK tipo B posee un segmento de unión a membrana (Olsson, T., *y cols.* 2003). Además, en *Arabidopsis thaliana*, la proteína AtHXK1 es capaz de pasar al núcleo (Yanagisawa, S., *y cols.* 2003). Además de estas hexoquinas generales, las plantas tienen algunas fructoquinasas, algunas de las cuales pueden estar involucradas en la señalización por azúcar (Pego, J.V. and Smeekens, S.C. 2000).

En los mutantes *gin2* de *A. thaliana* se ha descubierto que la hexoquinasa es el componente central en la detección y señalización de los azúcares en la célula de la planta (Moore, B., *y cols.* 2003; Yanagisawa, S., *y cols.* 2003). La prueba inicial de la función de la HXK en plantas como sensor de glucosa surgió tras los estudios con diferentes azúcares, análogos de azúcares e intermediarios metabólicos en sistemas de expresión transitoria en protoplastos de mesófilo y en análisis de plantas transgénicas de *A. thaliana* (Jang, J.C., *y cols.* 1997). Genéticamente la HXK funciona corriente arriba de las proteínas GIN1/ABA2 en la ruta de señalización de la

glucosa (Zhou, L., y cols. 1998). Para estudiar la función de la proteína AtHXK1 en un contexto más fisiológico, las plantas se crecieron bajo diferentes condiciones lumínicas alterando los niveles endógenos de azúcar y las señales de los mismos. En plantas silvestres iluminadas a alta intensidad, el crecimiento se vio acelerado, mientras que plantas mutantes *gin2/hxk1* permanecieron pequeñas debido a la poca expansión de las células vegetales. Además de modular y detener el desarrollo en presencia de glucosa exógena, AtHXK1 tiene un importante papel en el crecimiento de la planta. El empleo de hormonas han revelado que plantas mutantes *gin2* son relativamente insensibles a la inducción de la proliferación celular por auxinas y la formación de raíces por citoquininas. En concordancia con esta observación, plantas con unos niveles de citoquininas constitutivos o en presencia de citoquininas exógenas son insensibles a altas concentraciones de glucosa. Las plantas *gin2* también presentan un retraso en la senescencia y una fertilidad reducida al igual que sucede en algunas mutaciones que afectan a la longevidad de eucariotas (Moore, B., y cols. 2003).

2.b.- SnRK (Sucrose non-fermentating factor Related Kinase).

Las proteínas quinasas SnRKs de plantas están relacionadas con la proteína Snf1 de levadura y la proteína de mamíferos AMPK (Halford, N.G., y cols. 2003), aunque existen diferencias en la activación de las mismas. Existe homología entre las proteínas SnRK1 de distintas especies pudiendo complementar el fenotipo mutante de levadura *snf1* Δ lo que sugiere que durante la evolución se ha conservado la función. La actividad de estas quinasas está controlada por la fosforilación de un residuo treonina

conservado en el “loop” de la subunidad catalítica. Sin embargo, la regulación y la actividad de esta enzima en plantas está bien definida e incluye la activación por sacarosa, la fosforilación de enzimas de plantas y la activación de la síntesis de almidón en tubérculos de patata (Fig. 9) (Halford, N.G., *y cols.* 2003). Dado su papel en el almacenamiento de almidón, la presencia de azúcares fosforilados, especialmente la G6P (Glucosa-6-fosfato), inhibe la actividad quinasa de SnRK1 (Toroser, D., *y cols.* 2000). Es una proteína heteromérica fruto de la unión de la subunidad catalítica α con dos subunidades, β y γ , que están reguladas por las hormonas, las señales ambientales, el tipo celular y de tejido y el estadio de desarrollo de la planta, lo que le confiere un mecanismo complejo y dinámico en la regulación de su actividad (Hardie, D.G., *y cols.* 1998) .

2.c.- Trehalosa.

La trehalosa es un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa que se sintetiza en una reacción con dos pasos secuenciales en el cual la trehalosa-6- fosfato (T6P) es sintetizado a partir de glucosa-6-fosfato (G6P) por la acción de la enzima trehalosa fosfato sintasa (TPS) y a continuación se produce la desfosforilación del sustrato gracias a la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). La trehalosa-6-fosfato (T6P) es un intermediario en la ruta de biosíntesis de trehalosa en bacteria, hongos, invertebrados y plantas (Cabib, E. and Leloir, L.F. 1958). En levadura, T6P es una molécula señal esencial involucrada en la regulación de la entrada de glucosa y fructosa en la glucólisis (glycolysis) inhibiendo la actividad hexoquinasa (Blázquez, M.a., *y cols.* 1993). Salvo en el caso de algunas plantas que usan la trehalosa como medio para sobrevivir a condiciones extremas de

deseccación (Iturriaga, G., *y cols.* 2000), la mayoría de las plantas angiospermas, entre ellas *A. thaliana*, contienen pequeñas cantidades de trehalosa. Sin embargo, se están encontrando evidencias del importante papel de esta molécula en el metabolismo de las plantas. En este sentido, la interrupción de la expresión del gen *tps1* de *A. thaliana* es letal para el desarrollo del embrión (Eastmond, P.J., *y cols.* 2002). Además, la expresión inducida de la proteína TPS en estas mismas plantas resulta en un retraso en el desarrollo vegetativo siendo incapaces de florecer cuando TPS no se induce a lo largo de todo el desarrollo (van Dijken, A.J.H., *y cols.* 2004). Los efectos observados cuando se sobreexpresa la proteína TPS o TPP en *A. thaliana* indican que los cambios en los niveles de T6P son responsables de las alteraciones en los fenotipos de las plantas mutantes más que la trehalosa si misma (Schluepmann, H., *y cols.* 2003). Además, el papel de la T6P toma relevancia ya que se ha comprobado que los niveles de transcritos de TPS como de TPP en *A. thaliana* responden a los cambios en el contenido de azúcares (Price, J., *y cols.* 2004; Scheible, W.R., *y cols.* 2004; Schluepmann, H., *y cols.* 2004a; Thimm, O., *y cols.* 2004). El crecimiento de embriones *tps1* puede ser parcialmente normal si el embrión crece en un medio con bajas concentraciones de sacarosa (Eastmond, P.J., *y cols.* 2002). La sobreexpresión de forma constitutiva de TPS en plantas de *A. thaliana* supera la inhibición de la germinación por efecto de altas concentraciones de glucosa o ABA, y favorece el crecimiento en un medio con concentración de sacarosa alta (Schluepmann, H., *y cols.* 2003; Schluepmann, H., *y cols.* 2004a). Por otra parte la sobreexpresión de AtTPS (Avonce, N., *y cols.* 2004b) o la adición de trehalosa (Schluepmann, H., *y cols.* 2004a) altera la expresión de otros genes que responden ante azúcares. El genoma de *A. thaliana* contiene 11 genes que codifican para TPS,

algunas de ellas son diana de la fosforilación mediada por la proteína SnRK-1, por quinasas dependientes de calcio o de unirse a proteínas 14-3-3, y todos estos procesos están afectados por el contenido de azúcares de la célula (Moorhead, G., *y cols.* 1999; Glinski, M. and Weckwerth, W. 2005). Todos estos datos indican que existe una regulación transcripcional de T6P en plantas dependiente del contenido en azúcares así como una regulación post-transduccional de las enzimas TPS y TPP.

Otro nexo de unión entre el metabolismo del carbono y la T6P es la proteína AGPasa, dado que se ha observado que si se alimenta con bajas concentraciones de T6P a cloroplastos aislados, la AGPasa es activada mediante la regulación redox de la enzima (Kolbe, A., *y cols.* 2005) a través de la formación de un puente disulfuro reversible intermolecular entre las dos subunidades pequeñas de la enzima (Fu, Y.B., *y cols.* 1998) lo que refuerza el papel de T6P en la activación de la síntesis de almidón (Lunn, J.E., *y cols.* 2006). Así, se puede considerar que la T6P es un disacárido que funciona como una molécula señal que es capaz de comunicar al cloroplasto el nivel de sacarosa del citosol. Además de estas propiedades, la trehalosa-6-fosfato está asociada con la expresión de SnRK1 (Schluepmann, H., *y cols.* 2004b) y con el factor ABI4 (Avonce, N., *y cols.* 2004a; Ramon, M., *y cols.* 2007) que regula la ruta de señalización de ABA.

2.d.- Receptores de membrana.

Al contrario que en animales, dónde los receptores de azúcares acoplados a proteínas G son numerosos, en plantas, al parecer, sólo existe una proteína G, denominada GPA1 en *A. thaliana* y RGA1 en arroz. Estas proteínas están implicadas en una gran variedad de procesos relacionados

con el desarrollo, la luz, los fosfolípidos, respuesta frente a hormonas, estrés oxidativo y resistencia frente a patógenos (Perfus-Barbeoch, L., *y cols.* 2004). Es muy interesante saber que la proteína GPA1 interacciona con un receptor acoplado a proteínas G (GCR1) además de interactuar con un regulador de la actividad de la proteína anterior (RGS1) que regula negativamente el receptor GCR1 acelerando su actividad GTPasa (Fig. 9). En concordancia con estos resultados, la carencia de RGS1 aumenta la actividad de GPA1 lo que resulta en un aumento en la elongación de los hipocotilos en la oscuridad y un incremento en la producción de células en las raíces crecidas en la luz (Chen, J.G., *y cols.* 2003). Además la carencia de la proteína RGS1 ha mostrado en plantas transgénicas que son insensibles a concentraciones del 6% de glucosa, mientras que unos niveles mayores a los normales de la misma proteína hace que el efecto frente a la presencia de azúcares sea el contrario (Chen, J.G., *y cols.* 2003; Chen, J.G. and Jones, A.M. 2004). Haciendo uso de diferentes análogos de azúcares, se ha sugerido que el papel de la proteína AtRGS1 es independiente de la ruta de señalización de la HXK (Chen, J.G. and Jones, A.M. 2004).

Otros sistemas probables de detección de glucosa o sacarosa en plantas podría involucrar proteínas análogas a los transportadores de azúcares de levadura Snf3 y RGT2 (Lalonde, S., *y cols.* 1999). La proteína Snf3 detecta bajas concentraciones de glucosa, mientras que RGT2 detecta altas concentraciones de glucosa. En experimentos en los que se ha mutado alguna de estas dos proteínas se ha comprobado que se desencadena la cascada de señales de estos receptores sin mediar glucosa (Ozcan, S., *y cols.* 1996).

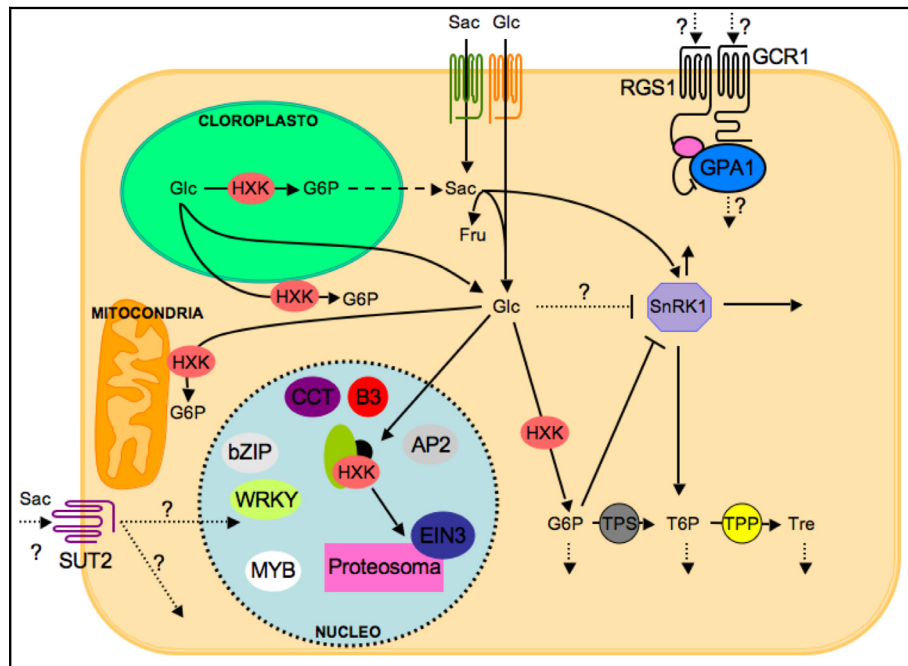


Fig. 9.- Esquema de los elementos implicados en la señalización de azúcares en las células vegetales.

Glc: glucosa, G6P: glucosa-6-fosfato, HXK: hexoquinasa, Sac: sacarosa, TPS: trehalosa fosfato sintasa, TPP: trehalosa fosfato fosfatasa, T6P: trehalosa-6-fosfato, Tre: trehalosa.

El homólogo al transportador de sacarosa de *A. thaliana* y tomate SUT2, sin actividad transportadora detectable, tiene un dominio citoplasmático con alta homología estructural a Snf3/RGT2 lo que sugiere que las proteínas homólogas a SUT2 también podrían tener un papel en la detección de sacarosa (Barker, L., y cols. 2000).

D.3.- Mecanismos Moleculares en la Regulación por Azúcares.

3.a.- Diferentes Rutas de Señalización.

Basándose en el papel de la enzima HXK, se pueden distinguir tres tipos de transducción de señales dependiente de glucosa en plantas (Xiao, W., y cols. 2000). En la primera ruta la expresión de los genes está mediada por la actividad señalizadora de la HXK. El papel principal de esta ruta es la de reprimir la expresión de genes que participan en la fotosíntesis (Xiao, W., y cols. 2000; Moore, B., y cols. 2003). La segunda ruta es dependiente de la glicólisis como sucede en el caso de la inducción por glucosa de los genes *PR1* y *PR5* (*Pathogenesis-Related gene*) (Xiao, W., y cols. 2000). Por último, existen evidencias de regulación por glucosa sin la participación de la enzima HXK, como resulta en las inducciones de los genes *chs* (*chalcone syntase*), *pall* (fenilalanina amonio-liasa) y los genes que codifican para la enzima AGPasa y la represión de *as1* (*asparagine synthetase*) cuya expresión es independientemente de los niveles de la enzima AtHXK (Xiao, W., y cols. 2000).

Además de estas tres rutas de señalización para el caso de la glucosa, existe una ruta de señalización específica para la sacarosa implicando la existencia de, al menos, un sistema de señalización de disacáridos en la membrana celular (Loreti, E., y cols. 2000; Fernie, A.R. and Willmitzer, L. 2001; Atanassova, R., y cols. 2003; Tiessen, A., y cols. 2003) tras comprobarse que la expresión de genes, entre los cuales se encuentra el transportador protón/sacarosa en remolacha, está regulada por sacarosa y no por glucosa o fructosa (Vaughn, M.W., y cols. 2002).

3.b.- Control transcripcional y post-transcripcional.

Un gran número de genes son regulados transcripcionalmente por azúcares, en relación con la regulación que existe entre las actividades metabólicas de los tejidos “fuente” y los tejidos “sumidero”. Algunos genes que participan en la generación de señales de azúcares son regulados por retroalimentación por sus propios productos. Además, cuando los niveles de azúcares son altos, se induce el almacenamiento de carbohidratos a través de la síntesis de almidón favoreciendo la expresión de la enzima AGPasa (Crevillén, P., *y cols.* 2005). Tanto la fosforilación o desfosforilación para estabilizar las proteínas, como la regulación redox están surgiendo como un mecanismo importante en el control post-transduccional del metabolismo de los azúcares de la planta. (Tiessen, A., *y cols.* 2003). Es conocida la activación reversible de varias enzimas fotoinducibles del cloroplasto vía regulación redox. Se ha demostrado igualmente que este mecanismo regula también enzimas de tejidos heterotróficos como es el caso de la enzima AGPasa de patata que es activada mediante reducción de un puente disulfuro entre dos subunidades de la enzima (Tiessen, A., *y cols.* 2003).

3.c.- Elementos reguladores y factores de transcripción.

Actualmente, la mayoría de los elementos reguladores implicados en la señalización por azúcares han sido descritos para algunos genes de patata, semillas de cereales y genes implicados en la fotosíntesis de maíz. A partir de los promotores de estos genes se han identificado secuencias como *Sucrose-responsive element* (AATAGAAAA), *A-Box* (TACGTA) y *B-Box* (GCTAAACAAT), el motivo SP8 (ACTGTGTA), y el elemento TGGACGG, todos relacionados con la regulación de la expresión de los

genes por azúcares (Ishiguro, S. and Nakamura, K. 1992; Grierson, C., y cols. 1994; Izawa, T., y cols. 1994; Zourelidou, M., y cols. 2002; Morikami, A., y cols. 2005). Igualmente se ha descrito el papel de los factores de transcripción DOF que son unas proteínas que contienen 4 cisteínas (C₂C₂) (*zinc finger type*) para la unión a ADN, cuyo motivo de unión a la secuencia de ADN es -(A/T)AAAG-. Estos factores de transcripción DOF actuarían como represor o activador por unión directa al ADN (Yanagisawa, S. and Izui, K. 1993), 1999). Los factores de transcripción DOF forman una gran familia que participa en numerosos procesos metabólicos relacionados con el control de la expresión de los genes en respuesta a la luz (Yanagisawa, S. and Sheen, J. 1998; Yanagisawa, S. 2000), a las hormonas giberelinas o auxinas (De Paolis, A., y cols. 1996; Baumann, K., y cols. 1999; Washio, K. 2001) y al metabolismo del carbono en plantas (Yanagisawa, S. 2000) además de participar en el desarrollo embrionario (Vicente-Carbajosa, J., y cols. 1997; Mena, M., y cols. 1998).

3.d.- Estabilidad del transcrito y procesamiento.

Los azúcares no solo controlan la expresión y el contenido de ARNm a nivel transcripcional sino también a nivel post-transcripcional. La represión del gen de arroz α -Amy3 implica una regulación tanto a nivel transcripcional como a nivel de la estabilidad del ARNm. Existen secuencias específicas en la región 3'UTR de los transcritos que pueden controlar la estabilidad del ARNm por medio de azúcares (Chan, M.T. and Yu, S.M. 1998). Cuando se utiliza un agente que bloquea el proceso de la transcripción (actinomicina D) para estudiar la vida media de ARNm, se han podido detectar otros genes implicados en procesos de respuesta frente a

estrés y relacionarlos con el crecimiento de la planta y cuya estabilidad de las moléculas de ARNm está controlada por los azúcares (Ho, S., *y cols.* 2001). La expresión del gen de maíz Incw-1, que codifica para una invertasa de pared celular, está regulada por azúcares de forma diferencial, así que azúcares metabolizables y no metabolizables son capaces de inducir la expresión del gen, aunque sólo la sacarosa es capaz de aumentar la estabilidad de transcritos de esta proteína (que difieren en el extremo 3'UTR) lo que resulta en un aumento en la síntesis de la proteína y en el aumento de la actividad enzimática (Cheng, W.H., *y cols.* 1999).

3.e.- Traducción.

El mecanismo de regulación de los azúcares a éste nivel implica la presencia de un micro *open reading frame* (μ ORF) en la secuencia 5'UTR del gen que afecta positivamente, o negativamente, en la traducción de la secuencia CDS que se encuentra “corriente abajo”. Un ejemplo de este caso es la transcripción de los factores *trans* de clase S del tipo bZIP ATB2/bZIP11 de *A. thaliana* que presentan una secuencia 5'UTR anormalmente larga y que son estimulados tanto por la luz como por azúcares, pero su posterior traducción es reprimida ante niveles altos de sacarosa (Rook, F., *y cols.* 1998). El control de estas secuencias μ ORF por la sacarosa está conservado en otros factores de transcripción relacionados con procesos de defensa frente a estrés y con la expresión de hormonas, lo que indica que este tipo de regulación está generalizado en los factores de transcripción de plantas bZIP (Wiese, A., *y cols.* 2004).

3.f.- Estabilidad proteica.

Una vez que la proteína ha sido sintetizada, su actividad puede ser regulada de muchas maneras, y una de ellas es por el control de su estabilidad a través de la proteólisis. La glucosa es capaz de contrarrestar los efectos del etileno aumentando la degradación del regulador transcripcional EIN3 en el núcleo mediada por proteosoma (Yanagisawa, S., *y cols.* 2003), mientras que el etileno aumenta la estabilidad de dicho factor (Yanagisawa, S., *y cols.* 2003; Gagne, J.M., *y cols.* 2004). Curiosamente, la actividad de la glucosa sobre el factor EIN3 es dependiente de la actividad quinasa de AtHXK1 que está presente en el núcleo. El proteosoma es capaz de modular muchas quinasas dependientes de ciclinas (Smalle, J. and Vierstra, R.D. 2004), como la ciclina tipo D CYCD3;1, que es transcripcionalmente regulada por azúcares permitiendo la transición G1/S en el ciclo celular (Riou-Khamlichi, C., *y cols.* 2000), es una proteína muy inestable y es degradada por proteosoma en condiciones de niveles reducidos de sacarosa (Planchais, S., *y cols.* 2004). CYCD3;1 es fosforilado en condiciones de bajos niveles de sacarosa marcando esta proteína para su destrucción (Planchais, S., *y cols.* 2004), asimismo provocan cambios en la expresión y en las propiedades enzimáticas del proteosoma 20S mediado por procesos de oxidación (Basset, G., *y cols.* 2002).

II.- MATERIALES Y MÉTODOS

A.- Sección I: Material biológico.

A.1.- Material vegetal.

1.a.- Guisante (*Pisum sativum*).

Cultivo.

Para llevar a cabo los diferentes experimentos a lo largo de esta tesis doctoral, se ha utilizado la planta de guisante como modelo (*Pisum sativum* cv. *Lincoln*) que se ha germinado en vermiculita y crecido en una cámara de cultivo cuyo fotoperíodo ha sido de 12 horas de luz y otras 12 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 150 $\mu\text{moles/ m}^2 \text{ seg}$ (PAR) gracias a unos tubos fluorescentes y la temperatura de 21 °C.

Al cabo de dos semanas de crecimiento, parte de las plántulas se emplearon para los estudios bioquímicos, de expresión e inmunológicos, mientras que el resto de las plantas de guisante eran traspasadas a tierra para su completo desarrollo con el fin de seleccionar los tejidos florales para los mismos análisis a los que se han añadido los estudios de hibridación *in situ*.

Para los estudios de expresión de las TRXs *f* y *m1* dependiente de los azúcares, se cultivaron las plantas de guisante en las mismas condiciones indicadas anteriormente, y a las dos semanas se utilizaron para sumergir en tubos de vidrio las raíces ó las hojas cortadas desde los peciolos en las disoluciones de azúcares y a distintas concentraciones.

Solución de riego.

Las plántulas de guisante se regaron con la solución nutritiva de (Hewitt, E.J. 1966):

Solución A de macronutrientes		Solución B de macronutrientes	
H ₃ BO ₃	2,47 gr	Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	22,52 gr
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,22 gr	KNO ₃	1,76 gr
MnCl ₂ •4H ₂ O	1,80 gr	Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	3,19 gr
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,20 gr	EDTA-Fe	1,41 gr
c.s.p. 1000 ml		c.s.p. 1000 ml	

Solución C de macronutrientes: 5,75 gr MgSO₄•7H₂O en 1000 ml.

Solución D de macronutrientes: 12,69 gr KH₂PO₄•3H₂O en 1000 ml.

Tabla 1.- Composición de las disoluciones que forman la solución nutritiva de guisante.

La solución nutritiva para guisante se prepara a partir de estas soluciones concentradas de macronutrientes en las siguientes proporciones:

Solución A de macronutrientes	5 ml
Solución B de macronutrientes	250 ml
Solución C de macronutrientes	250 ml
Solución D de macronutrientes	250 ml
c.s.p. 5000 ml	

Tabla 2.- Relación de cada una de las disoluciones en la solución de riego para guisante.

1.b.- Arabidopsis thaliana.

Cultivo.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo *Columbia* fueron germinadas en una mezcla de compost/vermiculita (2/1). Tras 3 días de

vernalización a 4°C, fueron cultivadas en una cámara de cultivo cuyo fotoperíodo fue de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ seg y 23 °C de temperatura. Para algunos experimentos con las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que llevaban las construcciones formadas por los fragmentos de los promotores de la TRX *f* y *m* fusionados al gen de la β -Glucuronidasa (GUS), el fotoperíodo fue modificado a 12h luz/12h oscuridad.

Solución de riego y medio de cultivo.

La solución nutritiva utilizada para regar las plantas de *Arabidopsis thaliana* sembradas en tierra está formada por los siguientes elementos:

Solución nutritiva para <i>A. thaliana</i>	Solución de micronutrientes
KNO ₃ 1 M 25 ml	HBO ₃ 0,5M 35 ml
H ₂ KPO ₄ 1 M pH 5,5 12,5 ml	MnCl ₂ 0,5M 7 ml
MgSO ₄ 1 M 10 ml	CuSO ₄ 1M 3,125 ml
Ca(NO ₃) ₂ 1 M 10 ml	ZnSO ₄ 0,5M 0,5 ml
EDTA-Fe 0,1 M 2,5 ml	NaMnO ₄ 0,1M 0,5 ml
Micronutrientes 5 ml	NaCl 5M 0,5 ml
Completar con agua hasta un volumen final de 5 litros	CoCl ₂ 0,1M 25 μl
	Completar con agua hasta una cantidad de 250 ml

Tabla 3.- Composición de la solución nutritiva para Arabidopsis thaliana.

Para el crecimiento de las semillas de *Arabidopsis thaliana* en medio de cultivo *in vitro* se sembraron en placas petri que contenían medio de Murashige and Skoog en agar (2,6 gr/l medio Murashige and Skoog con micro y macro elementos incluyendo vitaminas, 5 gr/l de sacarosa, 0,5 gr/l

de ácido morfolino 2-N etanosulfónico (MES) y 6 gr/l de agar. El pH se ajusta a 5,6 con KOH 1 M) (Murashige, T. and Skoog, F. 1962).

Transformación de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

Se preparó un precultivo de 5 ml de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción de interés, al día siguiente se pasó el precultivo a un matraz con 600 ml de medio MYA (ver pág. 79) (Tepfer, M. and Casse-Delbart, F. 1987) con kanamicina 30 µg/ml y se dejó crecer el cultivo durante dos días. Se recolectaron las células del cultivo centrifugando en frío a 6000 rpm durante 15 min. El precipitado celular se resuspendió en 200 ml de solución de infiltración (2,2 gr/l medio Murashige and Skoog + Vitaminas, 50 gr/l de sacarosa, 0,1 gr/l MES, ajustando pH a 5,9 con NaOH y se añade 100 µl de BAP (1 mg/ml en NaOH 1 M) justo antes de sumergir las plantas). Antes de llevar a cabo la transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se eliminaron las inflorescencias que ya estaban abiertas en ese momento con ayuda de unas tijeras y las silicuas con el fin de eliminar semillas a las cuales no se les modificará su contenido genético y evitar la proporción de semillas no transformadas. Se sumergieron las inflorescencias de las plantas en la solución de infiltración durante 5 min. Al terminar, las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas se enjuagan un poco para eliminar el exceso de cultivo bacteriano y se dejaron secar. Finalmente se cubrieron con una bolsa de plástico transparente a las que se le hicieron agujeros para que la planta transpirase. Se transfirieron las macetas a la cámara de cultivo y tras dos días en ella se les quitó la bolsa de plástico para que la planta siguiera su desarrollo normal de crecimiento.

Cuando la planta ha desarrollado las silicuas y estas se secan, se recolectaron las semillas con ayuda de un colador metálico de malla fina.

Selección de líneas transformadas de *Arabidopsis thaliana*.

La selección de las semillas transformadas que hayan incorporado la construcción del fragmento promotor fusionado al gen GUS se llevó a cabo en placas de cultivo petri estériles con medio MS suplementado con kanamicina a una concentración final de 30 µg/ml.

Para esterilizar las semillas, en primer lugar se lavaron con una solución de etanol al 70 % durante 1 min, transcurrido este tiempo se sumergieron las semillas durante 5 min en una solución de lejía comercial al 70 % con Tween-20 al 2,5 % en constante agitación. Finalmente, se enjuagaron las semillas tres veces con agua estéril. Las semillas se sembraron mezcladas con agarosa al 0,5 %, y formando una fina capa sobre el medio MS agar con kanamicina (kmc) para seleccionar la primera línea de plantas transgénicas. Con una pipeta Pasteur se han sembrado las semillas cuando se ha querido seleccionar las generaciones posteriores de transformantes. Las placas con las semillas se vernalizan a 4 °C durante dos días, al cabo de los cuales se trasladaron las placas a una cámara de cultivo Sanyo (Modelo MLR-350) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, con una intensidad lumínica de 100 µmol/m² seg y una temperatura de 21 °C.

Las primeras semillas transformadas sembradas en medio de selección que mostraron resistencia al antibiótico son consideradas la línea F₀ y fueron transferidas a macetas de alveolos en compost/vermiculita. Las semillas que se obtuvieron de estas primeras líneas se someten de nuevo a un nuevo

proceso de selección en medio *in vitro* MS suplementado con kmc. Las semillas que germinaron a esta segundo proceso de selección son las líneas F₁. Esta ronda de selección se repitió hasta que la relación entre plantas no resistentes y resistentes fue de 1:4 (F₁), ya que líneas con una tasa de supervivencia superior indica un número de inserciones de nuestra construcción superior a 1. Una vez recogidas las semillas de la generación F₁ se volvió a someterlas a otro proceso de selección en medio MS-agar con kanamicina. Las semillas de las líneas F₁ que han presentado un 100 % de resistencia son consideradas como líneas homocigotas para la inserción con la construcción deseada.

A.2.- Material bacteriano.

2.a.- **Escherichia coli DH5α.**

Cultivo.

Durante el desarrollo de la tesis se ha utilizado la cepa de *Escherichia coli* DH5α (genotipo *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 RecA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*) para la multiplicación de los distintos plásmidos y construcciones preparados a lo largo de esta tesis doctoral. Las células se han sembrado en placas petri con medio Luria Broth (LB) (ver pág. 79) y agar que se han cultivado en estufas de crecimiento durante toda la noche a una temperatura de 37 °C y en agitación, si el medio LB es líquido.

Obtención de células competentes.

Para llevar a cabo la transformación de bacterias con plásmidos se utilizaron células de *E. coli* “competentes”. Para obtener células “competentes” se inició un precultivo de esta cepa en 3 ml de medio LB sin antibiótico durante una noche en agitación a 37 °C. Al día siguiente se inoculó 100 ml de medio LB con este precultivo. Cuando el medio de cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,5 a una longitud de onda de 600 nm se recolectaron las células centrifugando en frío a 5000 rpm durante 10 min. Se resuspendió el precipitado en 10 ml de CaCl₂ 0,1 M previamente enfriado y se dejaron las células en dicha solución durante 30 min. Se volvió a centrifugar la suspensión de bacterias a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió el precipitado bacteriano en 4 ml de CaCl₂ 0,1 M frío al que se añadió glicerol estéril hasta lograr una concentración final en glicerol de 15 % (v/v). Finalmente, se alicuotaron las células competentes en un volumen de 100 µl en tubos de eppendorf y se congelaron en nitrógeno líquido. Los viales se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Transformación de células *E. coli*.

En la transformación de las células competentes con las secuencias de ADN plasmídico se ha empleado la técnica de choque térmico, para lo cual se ha mantenido el producto de ligación o minipreparación de ADN plasmídico en contacto con las células *E. coli* DH5α competentes durante 30 min en hielo, transcurrido este tiempo se introdujo el vial en un termobloque a 42 °C durante un minuto y medio y se transfirió rápidamente a hielo. A continuación se añadió 0,8 ml de medio LB y se incubaron las células durante una hora a 37 °C. Finalmente, se sembró la cantidad

adecuada en placas LBA con el antibiótico apropiado y a la concentración requerida y se dejó incubando la placa durante toda la noche a 37 °C (Hanahan, D. 1983).

2.b.- Escherichia coli BL21.

Cultivo.

Esta cepa bacteriana deriva de *Escherichia coli* con el genotipo $F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal \lambda dcm (DE3)$. Se caracteriza por tener dentro de su genoma la secuencia para la transcripción de la enzima T7 RNA polimerasa bajo el control del promotor *lac UV5*. Esta bacteria es utilizada para la expresión de proteínas fusionadas a la secuencia de la enzima T7 RNA polimerasa en vectores de expresión del tipo pET (Studier, F.W. and Moffatt, B.A. 1986). Esta cepa ha sido empleada para sobreexpresar la proteína DOF7 cuyo gen fue clonado en el vector de expresión pET-28b (Invitrogen®). El cultivo de esta cepa bacteriana se lleva a cabo de forma idéntica al descrito para la bacteria *E. coli* DH5 α , haciéndose la selección de las construcciones en pET-28b en medio LBA con kanamicina.

Transformación de células *E. Coli* BL21.

Para transformar este tipo de células se ha seguido el mismo protocolo al descrito anteriormente para *E. coli* DH5 α y la selección de las colonias transformadas con el vector pET28b se llevado a cabo en placas petri con medio LBA con kanamicina a una concentración final de 30 μ g/ml.

2.c.- *Agrobacterium tumefaciens.*

Cultivo.

La cepa utilizada en las transformaciones de *A. thaliana* ha sido *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90 (pTiC58T-DNA). Se ha utilizado para insertar las secuencias reguladoras, enteras o truncadas de *Trxs f* y *ml* de guisante, fusionadas al gen de la β -Glucuronidasa (GUS). Los cultivos de ésta bacteria se crecieron en cámara de cultivo a 28 °C durante toda la noche, en agitación si el medio es líquido.

Transformación de *Agrobacterium tumefaciens.*

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* se han transformado mediante el método de choque térmico modificado mediante el cual se han puesto en contacto las células con la construcción que se desee introducir en la bacteria y se han introducido durante 15 min en un baño de nieve carbónica/etanol (≈ -20 °C), para luego ponerlas en un bloque a 37 °C durante 20 min. A continuación se le añadió 1 ml de medio líquido MYA (ver pág. 79) en agitación durante dos horas a 28 °C. Finalmente, las colonias que han incorporado el material genético a sus células se han seleccionado en placa petri con medio MYA-agar con rifampicina, gentamicina y kanamicina en las concentraciones indicadas más adelante (Tepfer, M. and Casse-Delbart, F. 1987).

Selección de colonias transformadas.

Para la selección de bacterias que contienen las construcciones de interés se han seleccionado en medio de cultivo suplementado con

determinadas concentraciones de los siguientes antibióticos ampicilina 100 mg/ml, kanamicina 50 mg/ml, rifampicina 100 mg/ml en DMSO, gentamicina 40 mg/ml.

Las concentraciones finales en medio de cultivo han sido de 100 µgr/ml de ampicilina, 30 µgr/ml de kanamicina, 100 µgr/ml de rifampicina, 20 µgr /ml de gentamicina y 2 µgr /ml de X-Gal.

La selección de las colonias que han contenido construcciones en p-GEMT[®] easy se realizaba en medio LBA con ampicilina y X-Gal. Mientras que las colonias con construcciones en el vector pBI101 se han seleccionado en placas de medio LBA con kanamicina.

Las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* con construcciones con el vector pBI101 se han seleccionado en medio MYA con rifampicina, gentamicina y kanamicina.

Las colonias seleccionadas en medios con antibiótico específicos se analizaron mediante PCR de colonias, y las secuencias de los plásmidos aislados de las colonias que dieron positivo fueron secuenciadas por los servicios de secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (Granada) para comprobar la correcta subclonación de los fragmentos.

Conservación de clones.

Una vez identificadas las colonias de *Escherichia coli* DH5α y de *Agrobacterium tumefaciens* portadoras del plásmido con el inserto de interés, se han conservado añadiendo glicerol hasta lograr unas concentraciones del 15 % y 50 % (v/v) a los cultivos en medio adecuado para mantenerlas a -80 °C y -20 °C respectivamente. Así mismo, se ha

aislado el plásmido de cada construcción mediante una minipreparación alcalina y se han conservado a -20 °C.

Medios de cultivo.

Los medios de cultivo que se han utilizado durante el desarrollo de esta tesis han sido medio LB (Luria-Bertani) para la cepa de *E. coli*, mientras que para la cepa de *A. tumefaciens* se ha utilizado el medio MYA (Tepfer, M. and Casse-Delbart, F. 1987):

Medio Luria-Bertani		Medio MYA	
Extracto de levadura	5 gr	Extracto de levadura	5 gr
Triptona	10 gr	Caseína	500 mgr
NaCl	5 gr	Manitol	8 gr
Agar (LBA)	15 gr	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 gr
c.s.p. 1000 ml		NaCl	5 gr
		Agar (MYA-A)	16 gr
		c.s.p. 1000 ml. Ajustar pH 6,6	

Tabla 4.- Composición medios LB y MYA para E. coli y A. tumefaciens.

B.- Sección II: Ácidos nucleicos.

B.1.- Vectores y Oligonucleótidos.

1.a.- Vectores.

Vector pGEMT[®]-easy.

Vector pGEMT[®]-easy (Promega A1360) ha sido utilizado para subclonar los productos de PCR ya que es un vector del tipo “TA-Cloning”. Éste vector se caracteriza por facilitar la unión a sus extremos dónde se encuentra un dexosiribonucleórido “T” desapareado y que va a facilitar la unión de fragmentos amplificados por PCR con enzimas ADN polimerasas que carecen de la actividad 3'→5' exonucleasa y que añaden un dATP al final de la cadena sintetizada. En este caso, el gen marcador es el gen de la enzima β-lactamasa, con resistencia a ampicilina.

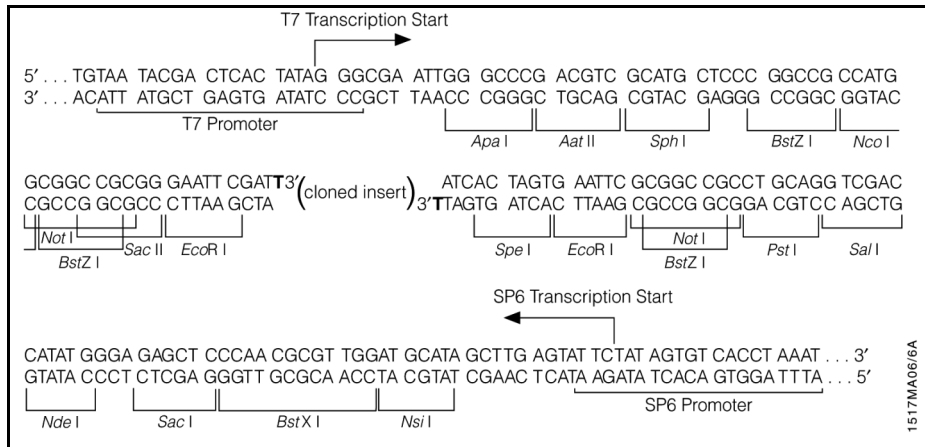


Fig. 10.- Mapa sitio clonaje del vector pGEM[®]-easy.

Vector pBI101.

Vector pBI101 (Clontech) es un plásmido que contiene la secuencia que codifica para la proteína de la β -Glucuronidasa en el vector binario pBIN19 cuyo sitio de poliadenilación es el gen de la nopalina sintasa del plásmido *Ti* de *Agrobacterium tumefaciens*. La selección de las bacterias de *E. coli* transformadas con este vector se realiza en medio LBA con kanamicina.

Este vector ha sido utilizado para subclonar la secuencia de la proteína β -Glucuronidasa bajo el control de las secuencias reguladoras de la *Trx f* y *m1* de guisante, permitiendo visualizar los tejidos dónde se expresan las Trxs cloroplastídicas en *Arabidopsis thaliana*.

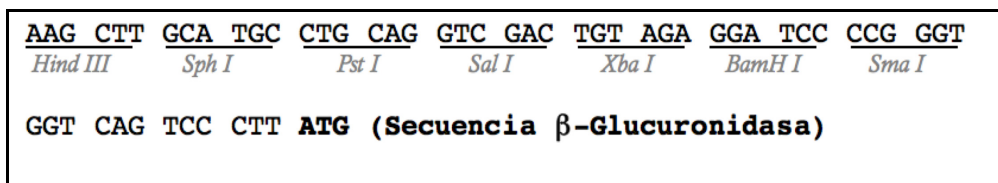


Fig. 11.- Mapa sitio clonaje del vector pBI101.

Vector pET28b.

Vector pET-28b (Novagen) es un vector empleado para la sobreexpresión de proteínas recombinantes y se caracteriza por añadir una cola de secuencias de histidinas al extremo amino o carboxilo de la proteína que se quiere expresar. Esta propiedad facilita su purificación a través de la unión de las cargas negativas de los aminoácidos de histidina con átomos de níquel (Ni^{2+}) que están fijadas a una matriz en una columna de purificación (HisTrap[®] FF Crude de GE Healthcare).

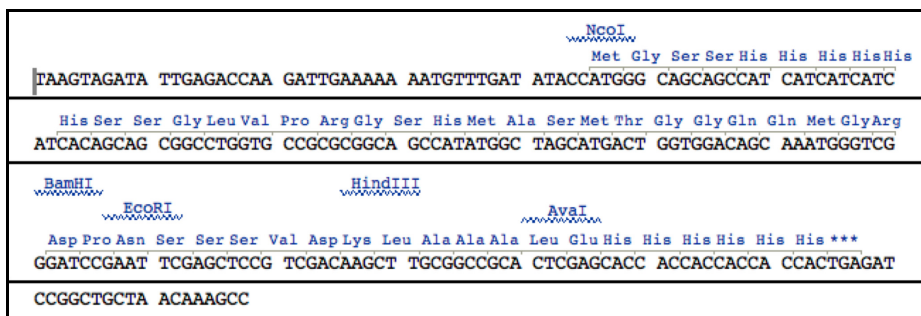


Fig. 12.- Esquema del sitio de clonaje del vector de expresión pET28b.

1.b.- Oligonucleótidos.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis doctoral han sido los siguientes:

PsTrx <i>m1</i>	
M1	5´ -gga aga caa tga ggt ctt ggt gtg g -3´
M2	5´ -act ctt aaa caa gct ctc aag ggc c -3´
PrTrxm1	5´ -gt <i>gtc gac</i> gtc ctt ggt gcc tct caa -3´
PrTrxm2	5´ -gt <i>gga tcc</i> cat gtt att ttc tgt gat t-3´
PrTrxm3	5´ -gt <i>gtc gac</i> gtt cat act ttt tcc ct -3´
PrTrxm4	5´ -gt <i>gtc gac</i> gtg ttt agg gta cat tc -3´
PrTrxm5	5´ -gt <i>gtc gac</i> gtg tgg aga agt act t -3´
PrTrxm6	5´ -gt <i>gtc gac</i> ccg cca caa cac tag -3´
TmbN	5´ -tt <i>gga tcc</i> atg gcc ctt gag agc -3´
TmbC	5´ -gc <i>gga tcc</i> tca aat ata ctt ttc ca -3´
rtTrxmF	5´ -gtt tca ctt cgc tgg tgt tgc -3´
rtTrxmR	5´ -ctt tct cag aca gag tag cc -3´
Lum2Ms	5´ -ttgacataagtagatattgaaagcaagattgaaaaaatgt-3´
Lum2Ma	5´ -ttacatTTTTTcaatccttgctttcaatatctacttatgtca-3´
Lum2MCs	5´ -ttgacataagtag <i>C</i> tattgaaagcaagattgaaaaaatgt-3´
Lum2MCa	5´ -ttacatTTTTTcaatccttgctttcaata <i>G</i> ctacttatgtca -3´
Lum2MDs	5´ -ttgacataagtagatattg <i>GCGA</i> caagattgaaaaaatgt -3´
Lum2MDa	5´ -ttacatTTTTTcaatccttg <i>TCGC</i> caatatctacttatgtca -3´

Tabla 5.- Nombres y secuencias de los oligonucleótidos relacionados con PsTrx *m1*. En negrita e itálica se representa la secuencias diana de las enzimas de restricción y los nucleótidos mutados para los experimentos de retardo.

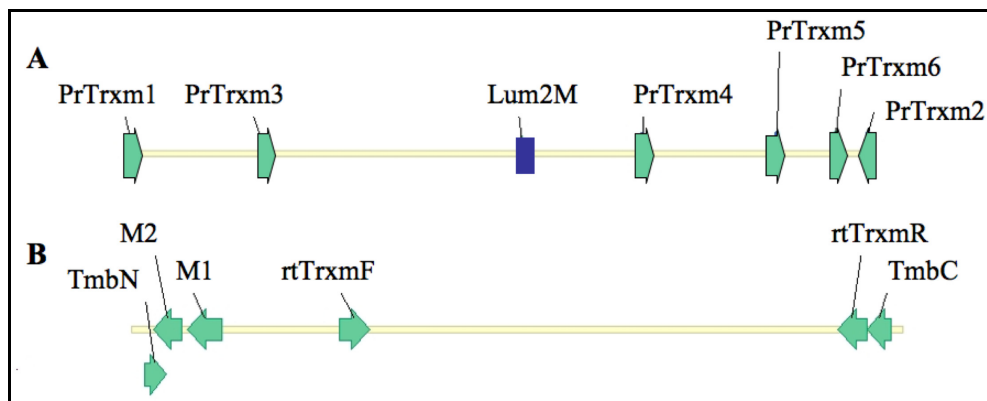


Fig.13.- Esquema de la situación de los oligonucleótidos para amplificar los diferentes fragmentos del promotor y la secuencia nucleotídica de PsTrx *m1*. Las flechas indican la disposición y orientación del oligonucleótido. En azul se muestra la región de la secuencia reguladora que ha sido utilizada en los estudios de unión con los factores de transcripción CCA1 y DOF7.

PsTrx <i>f</i>	
F1	5'-acc tct gta gac caa ccc tct tcg -3'
F2	5'-ggt gcc gat cca ttt agg gga ggt g -3'
PrTrxf1	5'-gt <i>gtc gac</i> gta aac aaa taa acc aca t -3'
PrTrxf2	5'-gt <i>gga tcc</i> cat tga tgt ggg gaa ga -3'
PrTrxf3	5'-gt <i>gtc gac</i> cca tac aca gac ttc aa -3'
TrxfbN	5'-tt <i>gga tcc</i> atg gct cta aat ctc tg -3'
TrxfbC	5'-aa <i>gga tcc</i> cta act aga ccg aac agt g -3'
rtTrxfN	5'-tga taa aac cgt cgt cct cga t -3'
rtTrxfC	5'-att tcc tca tct tcc cct cag c -3'
Lum rFs	5'-agt gaa aaa aaa aag aga tat tcg aag gg -3'
Lum rFa	5'-att ccc ttc gaa tat ctc ttt ttt ttt tc -3'
FmGs	5'-agt gaa aaa aaa aag ag <i>C</i> tat tcg aag gg -3'
FmGa	5'-att ccc ttc gaa ta <i>G</i> ctc ttt ttt ttt tc -3'
Lum2FDs	5'-agt gaa aaa aa <i>G CGA</i> aga tat tcg aag gg -3'
Lum2FDa	5'-att ccc ttc gaa tat ct <i>T CGC</i> ttt ttt tc -3'

Tabla 6.- Nombres y secuencias de los oligonucleótidos relacionados con PsTrx *f*. En negrita e itálica se representa la secuencias diana de las enzimas de restricción y los nucleótidos mutados para los experimentos de retardo.

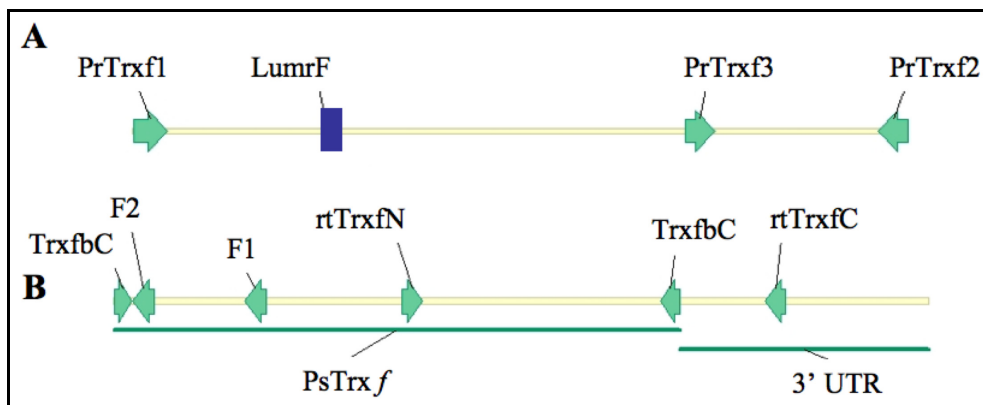


Fig.14.- Esquema de la situación de los oligonucleótidos para amplificar los diferentes fragmentos del promotor y la secuencia nucleotídica de *PsTrxf*. Las flechas indican la disposición y orientación del oligonucleótido. En azul se muestra la región de la secuencia reguladora que ha sido utilizado en los estudios de unión con los factores de transcripción CCA1 y DOF7.

Generales

AP-1	5'-cta ata cga ctc act ata ggg c -3'
AP-2	5'-cta tag ggc tcg agc ggc -3'
GUS I	5'-aac ggg gaa act cag caa gc -3'
GUS II	5'-tgt gag cgt cgc aga aca tt -3'
GUS III	5'-acg cgc ttt ccc acc aac gct g -3'
AvaN	5'-a tgg tgt ggt cca tgc a -3'
AvaC	5'-t gca tgg acc aca cca t -3'
FTR1	5'-caa gct tca acc ttc gcc gtc -3'
FTR2	5'-tgg cac tcc ttt ctc tct ctc -3'
T7	5'-taa tac gac tca cta tag gg -3'
SP6	5'-gat tta ggt gac act ata g -3'
T7-Term	5'-gct agt tat tgc tca gcg g -3'
DOF-1N	5'-ctt tga tca tca tca atc c -3'
DOF-1C	5'-cat ata gat gac ttt tcc tta a -3'
DOF-EcoRI	5'-t ttt <i>gaa ttc</i> gga tta cca tta tat cct cc -3'
DOF-NcoI	5'- t ttt <i>cca tgg</i> aca caa ctc aat ggc c -3'
PsActR	5'-agc aag atc caa acg aag ga -3'
PsActF	5'-aat ggt gaa ggc tgg att tg -3'
AtAct2F	5'-cgg tat tgt gct gga ttc tg -3'
AtAct2R	5'-atc tcc tgc tcg tag tca ac -3'
Cab 1	5'-tgg tac gga tcc gac cga g -3'
Cab 2	5'-ctt ctt ccg ttc ttg agc tcc -3'

Tabla 7.- Nombre y secuencias de los oligonucleótidos generales. En negrita e itálica se representa la secuencia diana de las enzimas de restricción.

B.2.- Extracción de ARN.

Para la extracción del ARN de los tejidos de las diferentes plantas se maceró el material vegetal con ayuda de nitrógeno líquido y un mortero de porcelana. A las diferentes muestras se añadió el reactivo de Trizol[®] (Invitrogen 15596-026) siguiendo las instrucciones del producto comercial. El precipitado final de ácidos nucleicos se han resuspendido en un volumen final de 50 µl de H₂O DEPC.

Además se ha utilizado el procedimiento de extracción del “Borato Caliente” (*Hot borate*) modificado (Wan, C.Y. and Wilkins, T.A. 1994) para la extracción de ARN. Para éste método se maceró el material vegetal en nitrógeno líquido y se añadió 1 ml de tampón de extracción (200 mM Borax pH 9,0 , 30 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1 % SDS, 1 % Deoxicolato sódico, 10 mM DTT, 100 mM β-mercaptoetanol, 2 % PVPP y 2 % PVP-40) previamente calentado a 95 °C. Tras mezclar se dejó incubando con 0,15 mgr de proteinasa K (ROCHE 3 115 879) a 37 °C durante una hora. A continuación se añadió 78 µl de KCl 2 M a cada muestra y se incubó en hielo durante 30 min. Tras centrifugar, el sobrenadante se lavó una vez con una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, tres veces con una mezcla fenol ácido:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1, y una última vez con cloroformo. Se precipitaron los ácidos nucleicos añadiendo un volumen de isopropanol frío y se incubaron las muestras en hielo durante 30 min. Las muestras se centrifugaron durante 15 min y el precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de H₂O-DEPC. A continuación se volvió a precipitar el ARN añadiendo un volumen igual de LiCl 4 M e incubando en hielo durante toda la noche. Al día siguiente se recuperó el precipitado

centrifugando durante 20 min a 13000 rpm y se lavó otras dos veces con etanol-DEPC 80 % frío. El precipitado se resuspendió en un volumen final de 50 μ l de H₂O-DEPC.

Cada una de las muestras se cuantificaron y se valoró la calidad del ARN a partir de 2 μ l del volumen final de cada muestra en un espectrofotómetro Nanodrop[®] ND-1000.

B.3.- Síntesis de la cadena ADNc.

Para el análisis de los niveles de expresión de determinados genes en los tejidos de guisante o de *A. thaliana* se utilizó el método de PCR semiquantitativa. Para ello, se trataron 5 μ gr del ARN total extraído con 1U de DNAsa (DNase Turbo[®] - AMBION AM1907) para evitar contaminación de ADN genómico. Tras este tratamiento, se tomó 1 μ l que se utilizó en una reacción de PCR para verificar que el ADN genómico ha sido completamente eliminado. La pareja de oligonucleótidos PsAct-R/PsAct-F se utilizó en la reacción de PCR para las muestras de guisante mientras que para *A. thaliana* se ha utilizado la pareja de oligonucleótidos utilizados ha sido AtAct2-F/AtAct2-R. Las condiciones del termociclador para ambas reacciones de PCR ha sido 2 min a 94 °C, 40 ciclos (30 seg 94 °C ,30 seg 55 °C ,30 seg 72 °C), 5 min 72 °C.

Tras comprobar que en las muestras no existía contaminación con ADN genómico visualizando el resultado de la reacción de PCR en un gel de agarosa al 1 % en TAE 0,5x, se sintetizó la cadena complementaria de ARN a partir 2,5 μ gr de ARN a los que se añadió 1 μ l de oligo-dT₂₀ (Invitrogen 18418-020) (500 μ g/ml), 1 μ l de mezcla de dNTP 10 μ M cada

deoxinucleótido, 1 μ l (40 U) de inhibidor de RNasa (RNase OUT[®]-Invitrogen 10777-019) y finalmente 1 μ l (200 U) de enzima retrotranscriptasa RNase H SuperScript-III[®] (Invitrogen 18080-040) en un volumen final de 20 μ l. Esta mezcla se incubó a 50 °C durante una hora.

B.4.- Estudio de expresión por PCR-semicuantitativa.

Para normalizar la cantidad de muestra que tendremos que utilizar para los análisis de PCR-semicuantitativa, se prepararon diluciones de las muestras que se sometieron a la reacción de PCR con la pareja de oligonucleótidos PsAct-R/PsAct-F en el caso de las muestras provenientes de guisante, mientras que para las muestras de *Arabidopsis thaliana* se utilizó la pareja AtAct-F/AtAct-R en las condiciones de T^a y tiempos siguientes en el termociclador, 2 min a 94 °C, 30 ciclos (30 seg 94 °C, 30 seg 55 °C , 30 seg 72 °C), 5 min 72 °C . El producto de la reacción se verificó en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificó la intensidad de las bandas obtenidas, lo que permitió determinar las diluciones adecuadas para llevar a cabo las reacciones finales para el estudio de expresión. Con estos estudios previos se pudo determinar el número de ciclos para el cual no había saturación de la señal de expresión del gen en estudio y del gen constitutivo β -Actina de *Arabidopsis thaliana* (AK230311) y la expresión de ambos se encuentre en fase de crecimiento lineal.

Una vez que se ha puesto a punto las condiciones de análisis, se han desarrollado las reacciones de PCR con las condiciones elegidas utilizando los oligonucleótidos del gen constitutivo, en nuestro caso el gen de la β -actina, así como para los genes a analizar, PsTrx *f* y PsTrx *m1*

(rtTrxfF/rtTrxfR y rtTrxmF/rtTrxmR, respectivamente), además de analizar la expresión del gen GUS (β - Glucuronidasa U12640) (con los oligonucleótidos GUS-I/GUS-II) en el caso de los estudios de expresión de las plantas transgénicas. El resultado de los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1,2 % y la intensidad de las bandas correspondientes a los fragmentos aplicados para cada gen se cuantificaron con el programa Quantity One[®] versión 4,6 para Mac[•] de BioRad.

B.5.- Análisis de resultados por Northern blot.

Para el análisis por Northern Blot, se ha partido de 15 μ gr de ARN de cada una de las muestras extraídas por el método del Trizol[®] y se mezclaron con tampón desnaturalizante (900 μ l. de formamida, 200 μ l. de MOPS 10x, 90 μ l. de formaldehído, 12 μ l. de bromuro de etidio 10 μ g/ μ l, azul de bromofenol) hasta un volumen final de 14 μ l. Las muestras se calentaron a 65 °C durante 5 min en un termobloque y se enfriaron rápidamente en hielo tras lo cual se cargaron en un gel de agarosa al 1,3% con formaldehído (10 ml de MOPS 10x, 75 ml de agua-DEPC y 15 ml. de formaldehído). La migración de las muestras se realizó en tampón MOPS 1x a 50 V. Tras comprobar la correcta migración del ARN en un transiluminador, el gel se lavó en tampón de transferencia (tampón fosfato 25 mM, 1 mM EDTA) y se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon con carga positiva (ROCHE 1 209 272) durante toda la noche en el mismo tampón de transferencia. Al día siguiente se lavó la membrana en tampón de transferencia y se fijó el ARN a la membrana sometiéndola a 80 °C durante

1 hora. También se verificó que no quedaron ácidos nucleicos en el gel observándolo al transiluminador.

Una vez que el ARN se fijó a la membrana, se prehibridó durante una hora a 42 °C con tampón de hibridación (50 % formamida, 0,5 % SDS, SSC 6x, solución Denhardt 5x, 50 µl de ADN del timo de ternera -Calf thymus- que se añadió a la mezcla una vez que se había desnaturalizado 5 min a 95 °C y puesto en hielo). Para preparar la sonda, se tomó 25-50 ngr del producto de PCR que correspondía al fragmento del gen que queremos hibridar y que se había purificado con anterioridad, se marcó con 50 µCi de α -³²P-dCTP siguiendo el protocolo de marcaje del kit de Amersham Rediprime II Labelling System (Amersham Pharmacia RPN 1633). Tras el marcaje de la sonda, se eliminó los desoxirribonucleótidos no incorporados pasando la muestra a través de una columna “*spin column*” G-30 (Bio Rad). La sonda se desnaturalizó a 100 °C durante 5 min. y se puso en hielo a continuación rápidamente. Acto seguido se añadió la sonda al tampón de hibridación y se incubaron las membranas en esta solución durante toda la noche a 42 °C. Al día siguiente, las membranas se lavaron dos veces durante 5 min a 42°C con una solución de SSC 2x y SDS 0,1 %. Se continuó lavando las membranas disminuyendo la concentración de SSC hasta eliminar la señal de hibridación inespecífica. Al final de los lavados, las membranas se secaron a vacío durante 1 hora a 80 °C, y se utilizan para exponer una película “Hyperfilm” durante toda la noche. A la mañana siguiente se obtuvo el resultado de la exposición en un phophorimager (Molecular ImageFX Bio-Rad). El análisis de las bandas obtenidas correspondientes a la hibridación con cada una de las sondas se llevó a cabo utilizando el programa informático Quantity One[®] versión 4,6 para Mac de Bio Rad .

B.6.- Extracción de ADN plasmídico.

Se ha empleado el método de lisis alcalina (Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979) a la hora de obtener el ADN plasmídico de las bacterias. Las células de un cultivo líquido que crecieron durante toda la noche se recogieron por centrifugación durante 5 min a 13000 rpm. Se resuspendieron en 100 µl de tampón de resuspensión (Tris•HCl 10 mM pH 8,0 , EDTA 1 mM). La envoltura bacteriana se lisó añadiendo 200 µl de tampón de lisis (NaOH 0,2 N, SDS 1%) y se mezcló por inversión varias veces. A continuación, se añadió 150 µl de tampón de neutralización (KAc 5 M pH 4,8) y se agitó la mezcla vigorosamente. Tras incubar la mezcla cinco minutos en hielo, la suspensión se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. Después se trató la solución con 10 µgr de RNAsa y se incubó la mezcla en un baño a 37 °C durante 1 hora.

El sobrenadante se lavó con 500 µl de una mezcla fenol:cloroformo 1:1. Las fases se separaron mediante centrifugación durante 5 min. a 13000 rpm. La fase acuosa se volvió a lavar con 500 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Tras la centrifugación, a la fase acuosa se le añadió 500 µl de isopropanol frío y se incubó a -20 °C durante al menos 2 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se precipitaron los ácidos nucleicos mediante centrifugación durante 10 min a 13000 rpm. El precipitado se lavó una vez con 1 ml de etanol al 70 % frío. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril.

B.7.- Restricción de ADN.

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción se llevó a cabo incubando el ADN (500 ng- 1 µg) con 3-5 U de la enzima correspondiente a 37 °C durante 2 horas, en el caso de ADN plasmídico, o durante 16 horas, si el ADN es genómico. El volumen final en el caso de las digestiones del ADN plasmídico era de 20 µl mientras que en el segundo caso se llegaba a 200 µl. Las reacciones de restricción se ha llevado a acabo en las condiciones determinadas por cada enzima específica y por la casa comercial que la suministra.

En las reacciones de restricción dobles se ha intentado en la mitad de lo posible buscar tampones de reacción compatible con las dos enzimas usadas. En el caso de no ser posible, se procedió a la digestión secuencial, en la cual en primer lugar se utilizaba una enzima, a continuación se inactivaba la enzima calentando 65 °C durante 15 min. Después, se ha dializado la mezcla de reacción gracias a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 25 µm durante 30 min. Finalmente se procedió con la segunda reacción de restricción.

B.8.- Obtención de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN, tanto inserto como vector, se purificaron del gel de agarosa a partir del trozo de gel que contenía la banda de ADN de interés. La agarosa se maceró con ayuda de una cuchilla en pequeños pedazos, tras lo cual se le añadió 500 µl de fenol y tras mezclar

vigorosamente en un agitador se introdujo en nitrógeno líquido hasta que la mezcla se congeló por completo. A continuación, se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante se lavó con 300 µl de fenol:cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 y se centrifugó otros 5 min a 13000 rpm. A la fase acuosa se le añadió 300 µl de isopropanol frío más 40 µl de NaAc 3M pH 4,8 y se incubó a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó la solución a 13000 rpm durante 20 min. El precipitado que se obtiene se lavó con 1 ml de etanol al 70 % frío y se volvió a centrifugar durante 10 min a 13000 rpm. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 15-20 µl de agua desionizada estéril. Se cargó 1 µl en un gel de agarosa al 1 % para determinar el estado y la cantidad del fragmento y el vector tras la purificación .

B.9.- Ligación de moléculas de ADN.

La construcción de moléculas recombinantes obtenidas por la inserción de fragmentos de ADN en los vectores de clonación pBI-101 y pET-28b se realizó utilizando el tampón y la enzima ligasa de ADN del fago T4 (ROCHE 10 481 001), enzima que cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre molécula de ADN que presentan tanto extremos cohesivos como romos.

En el caso de la ligación de los productos de PCR en el vector de clonación pGEM-T® easy se utilizó la enzima y tampón incluido en el kit comercial de Promega.

La ligación entre fragmento de ADN y vector se ha realizado en las proporciones 1:1 y 3:1 inserto:vector. La incubación de mezcla de ligación

se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche o a temperatura ambiente durante 2 horas.

B.10.- PCR de colonias.

Esta técnica se ha utilizado para el análisis de las colonias que han crecido en los medios de selección tras una transformación. Mediante una reacción de PCR analizamos el tamaño del inserto clonado en el vector que ha sido transferido a las bacterias. Para llevar a cabo esta técnica se prepara preparado una mezcla de reacción de PCR en la que el molde es una pequeña cantidad de biomasa bacteriana que se recoge de la placa de cultivo. Las condiciones que se utilizaron en el termociclador fueron las siguientes: 94 °C 2 min , 35 ciclos (94 °C 30 seg, 50 °C 45seg , 72 °C 45seg), 72 °C 5 min. El resultado de la PCR se visualizó en un gel de agarosa entre 0,8 % o 1,5 % en TBE 0,5x en función del tamaño del fragmento amplificado. Las parejas de oligonucleótidos utilizadas para analizar las colonias se seleccionaron, además de los oligonucleótidos específicos para cada fragmetno, en función del vector de clonaje fueron:

-T7/SP6 para las construcciones en el vector pGEM[®]-easy,

-Gen específico del promotor (PrTrxm1-PrTrxm6)/GUS III para las construcciones con los diferentes fragmentos de los promotores fusionados a GUS en el vector pBI-101,

-T7/T7term para la construcción en el vector de expresión pET-28b.

B.11.- Extracción de ADN genómico.

Para la extracción de ADN genómico, tanto de plantas de guisante como de plantas de *Arabidopsis thaliana*, se maceró el material vegetal con ayuda de nitrógeno líquido y mortero de porcelana al cual se añadió 500 µl de tampón de extracción (0,8 % CTAB, 0,14 M sorbitol, 0,22 M Tris•HCl pH 8,0 , 22 mM EDTA, 0,8 M NaCl y 1 % N-Lauroilsarcosina). La mezcla se incubó a 65 °C durante 30 min, y a continuación se lavó con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. Se mezcló vigorosamente y se centrifugó a máxima velocidad durante 10 min. Los ácidos nucleicos de la fase acuosa de la mezcla anterior se precipitaron añadiendo un volumen de isopropanol y 1/10 del volumen de la fase acuosa de acetato sódico 3 M y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se centrifugó para recoger el precipitado de ADN genómico que se lavó con etanol al 70 %. Finalmente se resuspendió el precipitado en un volumen de 50 µl de TE (10 mM Tris•HCl pH 8,0 , 1 mM EDTA pH 8,0).

B.12.- Hibridación in situ.

La técnica de hibridación *in situ* nos ha permitido determinar la localización de la expresión de ARNm de PsTrx *f* y PsTrx *m1* de guisante. Para ello hemos utilizado tejidos de plantas de guisante crecidas durante dos semanas en vermiculita y para obtener tejido floral se mantuvieron las plantas de guisante hasta 3 meses en tierra que se regaba con solución nutritiva y en las condiciones de cultivo descritos en apartados anteriores.

12.a.- Fijación de las muestras.

El material vegetal se fija para mantener intactas las estructura y organización celular. La fijación se llevó a cabo sometiendo el material vegetal a vacío en FAE (50 % etanol, 5 % de ácido acético y 3,7 % de formaldehído) durante 10 min. Transcurrido ese período de tiempo se cambió el fijador por uno fresco y se dejó durante dos horas. Se cambió el fijador por etanol 70 % durante media hora. Después se sustituyó el etanol al 70 % por otro de 96% durante otra media hora, para dejar durante otras dos horas el material sumergido en Eosina Y 0,2 % disuelto en etanol 96 %. Al cabo de ese tiempo, se sustituyó la solución de eosina y se dejó en ella las muestras durante toda la noche.

12.b.- Imbibición y modelado de los bloques.

A continuación se pasa a la imbibición del material vegetal y modelado de los bloques de parafina. Para ello las muestras se sometieron a la siguiente serie de lavados en viales de cristal:

- 2 x Etanol 100 %
- 1 x 25 % HistoClear / 75 % EtOH
- 1 x 50 % HistoClear / 50 % EtOH
- 1 x 75 % HistoClear / 25 % EtOH
- 2 x 100 % HistoClear

Estas incubaciones se sucedieron durante un período de una a dos horas. Tras la última incubación, se vació medio vial y se sustituyó el histoclear por parafina fundida y se dejó a 55 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se eliminaron los restos de disolvente orgánico mediante incubaciones en parafina de 3 horas cada una durante un mínimo de 4 lavados para poder pasar a crear los bloques de parafina.

Los bloques de parafina se obtuvieron vertiendo parafina caliente en los moldes metálicos junto con la muestra a incluir, y con ayuda de dos puntas de plástico las muestras se orientaron adecuadamente. Se deja enfriar la parafina en el molde metálico cubierto con una malla de plástico que nos sirvió a la hora de extraer el bloque de parafina con la muestra y a situar el bloque en el microtomo.

12.c.- Obtención de las secciones.

Las secciones se realizaron con un microtomo (Leica RM2164) perteneciente al grupo de “Citogenética Molecular y Evolutiva de Mamíferos” del Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, además se hizo uso del microtomo de los servicios técnicos de microscopía de IBMC-Primo Yufera- CSIC (Valencia).

Las secciones de los cortes para la hibridación *in situ* fue de 10 μm , salvo para el caso de las raíces cuya sección fue de 12 μm . Una vez que se colocaron los cortes en los portaobjetos, se realizó una selección de aquellas preparaciones que no se había roto tras una visualización al microscopio.

12.d.- Obtención de las sondas.

Las sondas de ARN que se utilizaron para la hibridación se obtuvieron a partir de los genes PsTrx *f* y PsTrx *m1*. Para preparar las sondas, los ADNc de los genes subclonados en el vector pGEM-T[®] easy se digirieron con una endonucleasa una por cada lado de la secuencia de ADNc que queremos hibridar, de tal manera que se obtuvo el vector linearizado en dos orientaciones. Los plásmidos linearizados se sometieron a una

retrotranscripción *in vitro* en la que se utilizó la enzima T7 ARN polimerasa y la enzima SP6 ARN polimerasa, y en función de la orientación del ADNc con respecto a la secuencia de inicio de la transcripción se obtuvo una hebra de ARN, marcado con digoxigenina, que corresponde con la secuencia que se quiere encontrar en el tejido, o bien la reversa complementaria, de tal forma que se consiguió una sonda en sentido y otra en antisentido. La primera sonda será la secuencia que nos servirá de control negativo pues no se unirá por complementariedad, mientras que la última sí se unirá y nos dará la localización de la expresión de nuestro gen. Las sondas se trataron con una solución con DNAsa libre de RNAsa durante 15 min a 37 °C. Una alícuota de 1 µl de la transcripción se cargó en un gel de agarosa para verificar que no había restos de plásmido y que el tamaño del producto de la transcripción se ajustaba a nuestro fragmento. Una vez que se verificó la retrotranscripción, se precipitó la sonda añadiendo:

1 µl ARNt de levadura 10 µg/µl
37,5 µl NH₄Ac 5 M
24 µl ddH₂O
220 µl de Etanol 100 %
Se deja a -20 °C durante, al menos, una hora.

Al día siguiente, se centrifugó y se lavó el precipitado con etanol 80 % en agua-DEPC y se resuspendió en 10 µl de agua-DEPC, de los cuales 1 µl se usó para preparar diluciones seriadas y cuantificar el marcaje de digoxigenina que se ha producido durante la transcripción *in vitro*. A los 9 µl restantes de sonda se le añadió 91 µl de tampón de hibridación (6x SSC, 3 % SDS, 50 % formamida y 100 µgr/ml ARNt) y se guardó a -20 °C hasta su uso.

12.e.- Cuantificación del marcaje de las sondas.

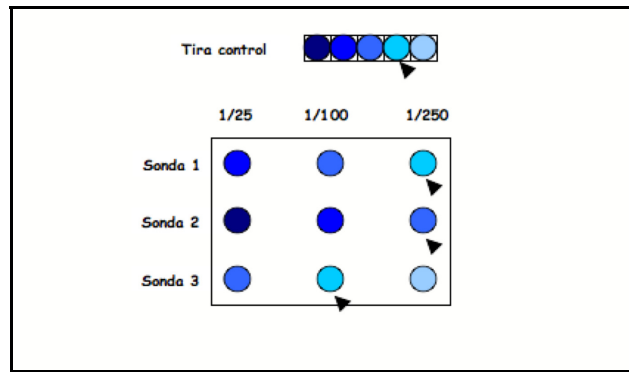
Con un 1 μ l de sonda se prepararon las siguientes diluciones seriadas:

Dilución	1/20	1/250	1/1000	1/2500
μ l sonda	1	2 (1/20)	4 (1/250)	4 (1/1000)
μ l H ₂ O	19	23	16	6

Una vez preparadas las diluciones de todas las sondas, se puso 1 μ l de cada una en papel de nylon cargado positivamente y se dejaron secar antes de fijar los ácidos nucleicos a la membrana someténdolas a una intensidad de radiación ultravioleta en un transiluminador de 12-15 J/cm². La membrana se reveló y se cuantificaron las sondas introduciendo la membrana dentro de un tubo *falcon* de 15 ml junto con una tira control (DIG Control Teststrips-ROCHE 1 669 966) y se procedió como se indica:

- lavado en TBS 1x (0,1 M Tris•HCl pH 7,5 , 0,4 M NaCl) durante 2 min,
- sumergir en TBS-Blocking (TBS 1x, Agente de Bloqueo 0,5 % (Roche)) durante 10 min,
- lavado con TTB (TBS 1x, 0,3 % Tritón X-100, 1 % BSA) durante 5 min,
- incubar con anti-Digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina (ROCHE 11 093 274 910) (1/3000) en TTB durante 20 min,
- se lava dos veces con TTB durante 5 min,
- se enjuaga con tampón de detección (0,1 M Tris•HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂•6H₂O) sin sustrato durante 1 min,
- se revela con tampón de detección y sustrato (15 mgr NBT/100 ml tampón y 7,5 mgr BCIP/100 ml tampón) hasta que se vea el último punto de la tira del test.

El resultado de este proceso debe ser algo semejante a esto:



En función a este resultado teórico, deberíamos utilizar la dilución 1/250 para la sonda 1, la misma para la sonda 2 y la 1/100 de la sonda 3 a partir de la sonda que ya está diluida en tampón de hibridación.

12.f.- Prehibridación.

Una vez las sondas preparadas, se inició la prehibridación. Se colocaron las preparaciones histológicas en gradillas de vidrio y se sometieron a los diferentes lavados de la prehibridación:

- desparafinamos los cortes con dos lavados de 10 min en histoclear,
- hidratamos en series de distinta concentración de etanol durante dos minutos cada uno: 2 x EtOH 100 %; 1 x EtOH 95 %; 1 x EtOH 70 %; 1 x EtOH 50 %; 1 x EtOH 30 %; 2 x H₂O,
- hidrólisis ácida del tejido para facilitar el acceso de la sonda, 0,2 M HCl 20 min a T^a ambiente. Éste lavado es delicado y hay que evitar excederse en el tiempo,
- lavados en agua destilada; en SSC 2x y un lavado final en agua todos durante 5 min cada uno y a T^a ambiente,

- se incubaba, a continuación, en tampón de proteinasa (100 mM Tris•HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0) que previamente se ha calentado hasta la temperatura del tratamiento. En el momento de lavado se añade proteinasa K a una concentración final de 1 µgr/ml y se incuban las preparaciones a 37 °C durante 15 min,

- lavar en PBS 1x (16 gr/l NaCl, 0,4 gr/l KCl, 2,88 gr/l Na₂HPO₄, 0,48 gr/l KH₂PO₄) 2 min a T^a ambiente,

- se bloquea la acción de la proteinasa K con 2 mg/ml de glicina (de alta pureza) en PBS 1X durante 2 min a T^a ambiente,

- se enjuagan dos veces en PBS 1x durante 2 min a T^a ambiente,

- se vuelve a fijar el tejido en formaldehído 4 % en PBS 1x 10 min a T^a ambiente,

- lavamos en PBS 1x dos veces 5 min a T^a ambiente,

- deshidratamos el tejido en series de etanol con lavados de 2 min cada uno 2 x ddH₂O; 1 x EtOH 30 %; 1 x EtOH 50 %; 1 x EtOH 70 %; 1 x EtOH 95 %; 2 x EtOH 100 %,

- se escurre y se dejan secar los portaobjetos con las secciones en vacío durante 20 min.

12.g.- Hibridación.

Cuando se inició hibridación se preparó suficiente tampón de hibridación teniendo en cuenta que por cada par de portaobjetos se necesita 300 µl de tampón, así se diluyó cada sonda a la concentración adecuada en tampón de hibridación en viales de 1 ml y se desnaturalizó durante 1 min a 80 °C, mientras los portaobjetos se calentaron sobre una placa calefactora a 42 °C. Tras desnaturalizar la sonda, se aplicaron 300 µl del vial sobre un

portaobjetos, al cual le enfrentamos otro portaobjetos a modo de “*sandwich*” y así se procedió con el resto de las muestras y de las sondas.

Todas las parejas de portaobjetos se dispusieron dentro de una cámara húmeda con solución de lavado (SSC 2x y 50 % formamida) y se colocaron en un horno de aire no forzado a 50 °C durante toda la noche.

12.h.- Lavados y revelado.

Al día siguiente, se separaron las parejas de portaobjetos en la misma solución que hemos añadido a la cámara húmeda, y se lavó dos veces en esa solución durante 90 min y a la misma temperatura a la que hemos llevado a cabo la hibridación.

Tras los lavados anteriores, se continuó con una serie de lavados que condujeron a la detección de la digoxigenina sobre los diferentes tejidos, se procedió tal como se indica:

- se lavan los portaobjetos en TBS 5 min,
- se pasan los portaobjetos a jarras *Coplin* e incubamos en tampón de bloqueo (0,5 % ROCHE blocking en TBS 1x) durante 1 h,
- se lavan con 1 % BSA, 0,3% Tritón X-100 en TBS 1x durante 30 min.
- se diluye el anticuerpo 1:3000 (anti-Digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina) con 1% BSA 0.3% Tritón X-100 en TBS 1X y se incuba durante 2 horas a T^a ambiente,
- se vuelve a lavar con 1% BSA 0,3% Tritón X-100 en TBS 1x tres veces durante 20 min cada una de ellas,
- se lava con tampón de detección (0,1 M Tris•HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl, 0,1 M MgCl₂•6H₂O) durante 5 min,

por último, se prepara tampón de detección con 15 mg NBT /ml y 7,5 mg BCIP/ml y se incuban los portaobjetos en oscuridad durante toda la noche y a T^a ambiente. A las doce horas se puede comprobar si hay señal. En caso negativo se puede mantener la reacción hasta 72 horas.

12.i.- Montaje de las preparaciones y visualización.

Una vez que se ha comprobado que la reacción se ha completado, se montaron los portaobjetos de forma permanente mediante el uso de DPX (Panreac), que es un gel de montaje para histología en medio acuoso. Para ello se deshidrataron las muestras mediante series crecientes en etanol durante 30 seg. Al final, la coloración que adquirió el tejido viró de violáceo a azul por efecto de la deshidratación.

Las preparaciones se han visualizado en el microscopio óptico Zeiaa Axioplan (Zeiss) de los Servicios de Instrumentalización Técnica de la Universidad de Granada (Dr. David Porcel).

C.- Sección III.- Proteínas

C.1.- Extracción de proteínas totales.

Para la obtención de los extractos de proteínas de los tejidos de interés, se maceraron las muestras en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido al que se añadía después el tampón de extracción que estaba compuesto por:

Tris•HCl 25 mM pH 7,6
NaCl 75 mM
DTT 1mM
PMSF 1 mM
Nonidet-P40 0,1 %

Tabla 8.- Composición del tampón de extracción de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford, M.M. 1976) (Bio-Rad assay protein 500-0006), y a continuación se diluyeron las proteínas con tampón de carga (5 % glicerol, 10 mM Tris•HCl pH 8,0 , 0,4 % SDS, 0,02 % azul de bromofenol y 1 mM de 2-Mercaptoetanol) y tampón de extracción para mantener las muestras a la misma concentración de 2 µgr/µl para su posterior uso en electroforesis en SDS-PAGE.

C.2.- Western Blot.

2.a.- Electroforesis.

Para poder desarrollar la técnica de *western blot* las proteínas se sometieron a una electroforesis en SDS-PAGE . Para ello, a las muestras de proteínas se les añadió tampón de carga para proteínas 5x (50 mM Tris•HCl pH 8,0 , 2 % SDS, 25 % glicerol, 0,1 % azul bromofenol) y se hirvieron en un baño a 100 °C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y favorecer la unión homogénea del SDS a las proteínas y se transfieren a hielo. A continuación se cargan las muestras en un gel de poliacrilamida (Laemmli, U.K. 1970). En los estudios de proteínas de peso molecular de alrededor de

40 kDa como son el caso de las proteínas FBPasa cloroplastídica y DOF7 se utilizó una concentración de acrilamida al 12 %, mientras que para los estudios de TRXs cloroplastídicas, cuyo peso molecular es de unos 14 kDa, el porcentaje de la acrilamida en el gel fue del 15 %. Los geles migraron durante 30 min a 30 V hasta que todas las muestras penetró en el gel concentrador (a concentración del 5 %). A continuación se aumentó el voltaje hasta 100 V y se dejó migrar hasta que el frente del colorante llegó al borde inferior del gel de acrilamida.

2.b.- Transferencia de proteínas desde el gel hasta membrana de nitrocelulosa.

Al finalizar la electroforesis, el gel se sumergió en el tampón de transferencia TGM (48 mM Tris, 29 mM Glicina, 0.037 % SDS y 15 % de Metanol) durante 10 minutos.

Durante el equilibrado del gen en tampón TGM, se preparó una membrana de nitrocelulosa cuyas dimensiones coincidía con las dimensiones del gel, y seis piezas de papel *Whatman 3 mm* de igual tamaño. Se preparó la transferencia humedeciendo tres piezas de papel *Whatman* con tampón de transferencia TGM, se colocó encima la membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad 162-0097) que lleva sumergida en el tampón de transferencia 10 min, a continuación se orientó el gel de poliacrilamida en la posición adecuada, y finalmente otros tres trozos de papel *Whatman* humedecidos en el mismo tampón. Se introdujo todo el montaje en el equipo de transferencia semihúmedo (Trans-blot semidry de BioRad Bio-Rad) y se aplicó una corriente de $0,8 \text{ mA/cm}^2$ de gel y un voltaje no superior a 24 V durante 60 minutos.

2.c.- Reacciones de reconocimiento inmunológico.

La membrana de nitrocelulosa se tiñió con solución de rojo *Ponceau* (1 gr en 1 ml de ácido acético y se diluye hasta 100 ml con agua destilada) para verificar que se ha transferido la misma cantidad de proteínas en todas las calles del gel. Se eliminó el colorante mediante lavados con agua destilada y se preparó la membrana para la reacción de reconocimiento inmunológico. Para ello se bloqueó la membrana sumergiéndola en una solución al 5 % de leche en polvo en TBST (0,1 M Tris•HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl, 0,1 % Tween-20) durante 1 hora a T^a ambiente. Después, se lavó tres veces durante 5 min con TBST y se incubó la membrana con una solución de anticuerpos policlonales específicos para cada una de las proteínas en estudio. Para lo cual se diluyó el anticuerpo de interés en la proporción adecuada en TBST. La incubación con el anticuerpo primario duró 2 horas a T^a ambiente o toda la noche a 4 °C. Tras la incubación con el anticuerpo primario, se lavó la membrana tres veces con TBST y se incubó la membrana con un anticuerpo secundario de conejo frente a IgG conjugado con enzima peroxidasa (SIGMA A9169). La incubación de éste anticuerpo fue de 2 horas a T^a ambiente. Después de tres lavados en TBST, y uno en TBS (0,1 M Tris•HCl pH 7,5, 0,9 % NaCl) para eliminar restos de anticuerpos, la membrana se reveló mediante quimioluminiscencia.

2.d.- Revelado de western blot.

La solución de revelado se preparó disolviendo en 20 ml de tampón de luminol (50 mM Tris•HCl pH 8,6, 150 mM NaCl), 100 µl. de solución de luminol (80 mgr/ml DMSO), 40 µl de solución de 4-Yodo-fenol (50 mgr/ml DMSO) y 3,4 µl de peróxido de hidrógeno al 33 % justo antes del revelado.

La membrana se expuso a una película fotográfica Hyperfilm™ ECL de GE Healthcare durante un tiempo dependiendo de la intensidad de la señal emitida.

El revelado de la película se lleva a cabo con soluciones de revelador y fijador a las concentraciones indicadas por los fabricantes para películas de negativos.

Para la visualización del estado tanto de los extractos de proteínas como de las proteínas purificadas, los geles desnaturalizantes de poliacrilamida utilizados se han sumergido, después de la electroforesis, en una solución de coloración (40 % etanol, 10 % ácido acético y 0,1 % Comassie Brilliant-Blue R-250) durante al menos 30 minutos tras el cual se cambia la solución por otra de decoloración (40 % etanol y 10 % de ácido acético) hasta la poder ver claramente las bandas de proteínas teñidas de azul.

C.3.- Sobreexpresión y purificación de DOF7.

3.a.- Subclonaje de DOF7 en pET-28b.

Para la amplificación del gen del factor de transcripción de guisante DOF7, se han utilizado los oligonucleótidos DOF-1N/DOF-1C y DOF-EcoRI/DOF-NcoI para llevar a cabo dos PCR consecutivas usando como molde el ADNc obtenido a partir del ARN total extraído de hojas de guisante.

Se ha utilizado la primera pareja de oligonucleótidos con la secuencia en el termociclador 94 °C 2 min, 35 ciclos (94 °C 30 seg, 55 °C 30 seg,

72 °C 30 seg), 72 °C 5 min. Tras esta primera reacción de PCR, se diluyó 1:100 la mezcla de reacción y se utilizó como molde en una segunda reacción de PCR con las mismas condiciones de temperatura y tiempo, pero utilizando la segunda pareja de oligonucleótidos DOF-EcoRI/DOF-NcoI. Tras esta segunda reacción se obtuvo el fragmento que codifica para la proteína DOF7 flanqueada con las dianas de restricción para las endonucleasas NcoI y EcoRI. Este fragmento se clonó en el vector pGEM-T® easy, y tras la posterior digestión con ambas enzimas se subclonó en el vector de expresión pET-28b.

3.b.- Sobreexpresión de DOF7.

Se inoculó 40 ml de medio de cultivo con kanamicina con bacterias *E. Coli* BL21 con la construcción pET-28b/DOF7-His₆-tag que creció durante toda la noche en agitación a 37 °C. A la mañana siguiente se añadieron 15 ml del cultivo saturado a un litro de medio LB con kanamicina y se dejó en agitación a 37 °C hasta que se alcanzó una densidad óptica de entre 0,3-0,4 a 600 nm. En este punto, el cultivo líquido se traspasó a una cámara de cultivo a una temperatura de 28 °C para ralentizar el crecimiento del cultivo y cuándo el cultivo alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,6-0,7, se indujo la expresión de la proteína añadiendo IPTG hasta una concentración final de 0,4 mM, y se dejó el cultivo creciendo en inducción a 28 °C durante 4-5 horas.

3.c.- Purificación de DOF7.

Transcurrido este tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min y se resuspendieron en un volumen final de 20 ml de tampón de lisis (20 mM tampón fosfato pH 7,4, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl más un cóctel de inhibidores de proteasas – Complete[®] EDTA free tablets (Roche) y se rompieron las células gracias a una prensa de French bajo una presión de 1000 PSI. Al producto de la lisis, se le añadió 100 µl de solución de Dnasa (1 mg/ml de DNasa, 1 mM CaCl₂, 50 % glicerol), 100 µl de MgCl₂ 1M y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Al finalizar el tratamiento con DNasa, se separó la parte soluble de los cuerpos de inclusión y restos celulares mediante centrifugación a 12000 rpm durante 20 min.

El sobrenadante que se obtuvo de la centrifugación se pasó por una columna de afinidad de níquel (HisTrap[®] FF Crude de GE Healthcare) a una velocidad de 1 ml/min, posteriormente se lavó la columna haciendo pasar por la columna 5 ml del mismo tampón de unión (20 mM tampón fosfato pH 7,4, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl y el cóctel de inhibidores de proteasas –ROCHE 875 580 001-) y a continuación se pasaron por la columna de afinidad 5 ml de tampón fosfato al que se añadió glicerol (20 mM tampón fosfato pH 7,4, 20 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 % glicerol). La elución de la proteína que está unida a la matriz se realizó haciendo pasar por la columna 5 ml de tampón de elución (20 mM tampón fosfato pH 7,4, 500 mM imidazol, 500 mM NaCl, 50 % glicerol). Al finalizar el proceso de purificación de la proteína DOF7 se visualizó en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12 %.

C.4.- Tinción histoquímica de GUS.

El análisis histológico de las plantas se llevó a cabo sumergiendo las plantas transgénicas de *A. Thaliana* en el tampón de coloración GUS y se sometió a infiltración a vacío tres veces durante 10 min, para después dejar los tejidos incubando en la solución durante toda la noche a 37 °C.

Componente	100 ml de tampón
X-GlcA	50 mgr
Dimetilformamida	1 ml
Fosfato Sódico 0,5 M pH 7,0	20 ml
Ferricianida Potásica 50 mM	1 ml
Ferrocianida Potásica 50 mM	1 ml
Tritón X-100	100 µl

Tabla 9.- Composición tampón de coloración GUS.

Al día siguiente, se decoloró la plántula o los tejidos mediante sucesivos lavados en una mezcla 50 % etanol/50 % ácido acético, con el fin de fijar los tejidos y eliminar la clorofila propia de la planta dejando única y exclusivamente la coloración debida a la reacción enzimática de la β -Glucuronidasa sobre el sustrato X-GlcA (Duchefa X1405.0100).

Las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con esta tinción se visualizaron en una lupa (Olympus AX-70) bien sobre un vidrio de reloj y agua, o montados en portaobjetos con solución de Hoyer (2,5 gr de goma arábica, 100 gr de hidrato de cloral, 5 ml de glicerol y 30 ml de agua).

Los estudios histológicos de hojas de las plantas transgénicas se ha completado con secciones semifinas. Las hojas, tras la tinción con el tampón GUS, fueron embebidas en Unicril (British BioCell International, Cardiff, UK) y los cortes se llevaron a cabo en un microtomo Leica RM2164. Los

cortes fueron sometidos a un baño con azul de toluidina para aumentar el contraste, y después las preparaciones se visualizaron en un microscopio Zeiaa Axioplan (Zeiss).

C.5.- Geles de retardo.

Para llevar a cabo los experimentos de unión entre sonda (ADN marcado radioactivamente) y factores de transcripción purificados se lleva a cabo en primer lugar el marcaje de la sonda con desoxiribonucleótidos marcados radiactivamente, en nuestro caso con α -³²P-dATP.

5.a.- Marcaje y purificación de las sondas.

Para ello, 5 μ gr de cada uno de los oligonucleótidos que nos van a servir de sonda específica de las regiones *cis* del promotor se desnaturalizan a 80 °C durante 5 min en un termobloque y se deja entonces que la temperatura disminuya hasta T^a ambiente dejando las muestras en el termobloque apagado. A continuación se marcó la sonda utilizando 2 U de enzima Klenow, 0,5 pmol dNTP's - dATP y 30 μ Ci de α -³²P-dATP que va a rellenar los huecos prominentes que han dejado la unión de las monohebras de la sonda. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37 °C.

A continuación, se cargó la mezcla anterior en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 8 % en TBE 1x (10,8 gr Tris, 5,5 gr ácido bórico, 4 ml 0,5 M EDTA pH 8,0), y se migró a 90 V a T^a ambiente. En este gel se van a separar los desoxiribonucleótidos no marcados de la sonda. Se autoradigrafió el gel y se cortó la parte del gel que contiene la

señal de la sonda marcada. El trozo de gel que contiene la sonda se eluyó en un vial con 400 μ l de TE (Tris•HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1mM) a 37 °C durante toda la noche. Se añadió 2 μ gr de poli dI/dC (ROCHE 1 010 881 200), 1 ml de etanol absoluto y se incubó la mezcla 15 min en hielo. Se centrifugó a máxima velocidad durante 15 min, se descartó el sobrenadante y se añadió 300 μ l de etanol 70 % para volver a centrifugar a máxima velocidad durante otros 15 min. Se deja secar el precipitado y finalmente se resuspendió en 50 μ l de TE, de los cuales 1 μ l de ellos se utilizó para cuantificar el marcaje en un contador de centelleo TRI-CARB 1500 PACKARD Perkin Elmer. Cuando fue necesario, se diluyó la muestra hasta 30000 cpm. La sonda se almacenó a -20 °C hasta su uso.

5.b.- Reacción de unión sonda-factor de transcripción.

Para llevar a cabo la unión de la sonda marcada y el factor de transcripción, se preparó una mezcla compuesto por tampón de unión (4,87 mM HEPES pH 7,9, 25 mM KCl, 2,5 mM DTT, 5 % glicerol), 30000 cpm de sonda marcada, 100 ngr de proteína purificada, poli dI/dC (entre un rango entre 1 μ gr y 5 μ gr) y sonda sin marcar con radioactividad (entre 100 ngr y 500 ngr de sonda fría) para desarrollar todos los experimentos de competición específica e inespecífica. El volumen final de la mezcla de reacción es de 20 μ l que se incubó en hielo durante 2 horas.

Mientras la mezcla está en hielo, se preparó un gel de poliacrilamida no desnaturante a una concentración del 6 %. Media hora antes de terminar la incubación, se inició la electroforesis a 60 V. Tras 30 minutos, se añadió 2 μ l de tampón de carga (TBE 0,5x , 60 % glicerol y 0,1 % azul de

bromofenol) a las muestras y se cargaron en el gel. La electroforesis migró durante dos horas en TBE 0,5x a 100 V.

Una vez terminada la electroforesis se secó el gel y se expuso una placa de autoradiografía durante el período que se estimó oportuno dependiendo de la señal. El velado de la película se llevó a cabo en un equipo *Molecular Image FX-Bio-Rad*.

C.6.- Extracción y análisis de azúcares.

6.a.- Extracción de azúcares solubles.

El primer paso en el análisis del contenido en azúcares solubles y almidón de las muestras ha sido anotar la cantidad de masa de cada una de las muestras. Una vez que se han pasado cada una de las hojas, se maceraron con ayuda de un mortero y nitrógeno líquido. Tras macerar las muestras, se añadió 500 µl de etanol 80 % diluido con tampón HEPES-KOH 10 mM pH 7,5 , y se incubó a 80 °C durante 30 minutos. Trascorrido ese periodo de tiempo, se centrifugó la suspensión 5 min a 13000 rpm y se tomó el sobrenadante que se pasó a un tubo eppendorf limpio. Después se procedió de igual modo, y se añadió 500 µl de etanol 80 % diluido con tampón HEPES y se incubó otros 30 minutos a 80 °C. A continuación se volvió a centrifugar en las mismas condiciones anteriores y se volvió a tomar el sobrenadante. Acto seguido, se añadió etanol 50 % diluido con tampón HEPES y se incubó otros 30 min a 80 °C. Se centrifugó a continuación en las condiciones descritas anteriormente y se volvió a tomar el sobrenadante. Finalmente, se incubaron las muestras 30 minutos a 80 °C

con agua y se volvió a centrifugar y tomar el sobrenadante tras la centrifugación, al igual que en las situaciones anteriores. El sobrenadante recolectado es utilizado para las mediciones.

6.b.- Análisis del contenido de azúcares.

El análisis de los azúcares se basa en una reacción enzimática múltiple en la que participa la hexoquinasa acoplada a la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH – ROCHE 10 127 761 001) que da lugar a la producción de NADPH y se puede medir a 340 nm de longitud de onda .

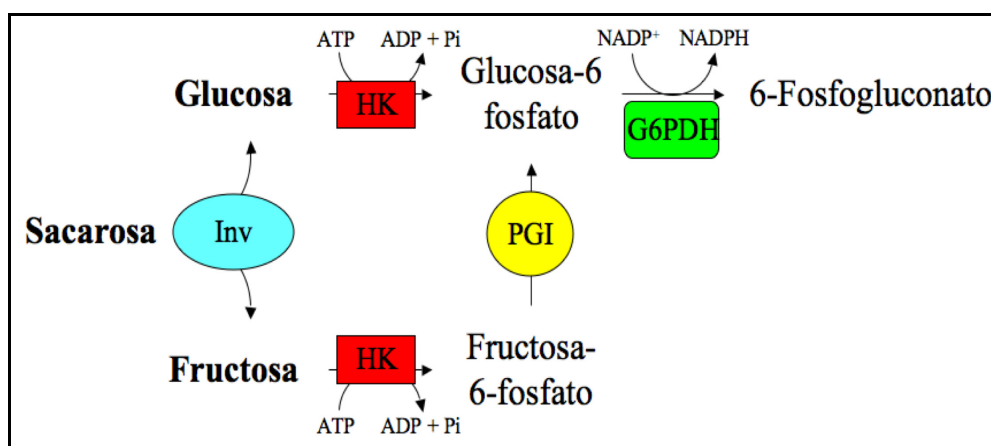


Fig. 15.-Esquema del ensayo enzimático en la medida de azúcares solubles.

Para el análisis de azúcares solubles en los tejidos de hojas, se ha utilizado un volumen de 2 μ l y 5 μ l del volumen del extracto, mientras que para las medidas de almidón se tomó 50 μ l de solución. Se preparó la mezcla de reacción con 20 ml tampón 100 mM HEPES-KOH pH 7,0 y 3 mM $MgCl_2$ y 12 mgr de NADP (SIGMA N0505), 20 mgr ATP (ROCHE 519 979) y 20 μ l GAPDH (ROCHE 10 127 761 001) (100 μ gr de enzima). Preparamos en una placa de 96 pocillos *microlite*, sobre la que vamos a

llevar a cabo las mediciones, las muestras con los volúmenes descritos anteriormente, 200 μ l del tampón de reacción y se coloca en un lector de placas Anthos *lit3* y se mide la variación en la absorbancia a 340 nm, utilizando la longitud de onda de referencia a 405 nm. A los cinco minutos de iniciada la medida se añadieron 0,6 U de hexoquinasa (ROCHE 11 426 362 001) a cada celda y se esperó a que la reacción se estabilizara durante 20-25 min para añadir 0,8 μ g de fosfoglucoisomerasa (ROCHE 127 396). Tras otros 30-35 min de medición, la señal se estabilizó y se añadió, finalmente, 400 μ gr por celda de invertasa (FLUKA 57629) y se dejó medir durante otros 30 minutos. Al final obtuvimos una gráfica con tres valles, en la cual la diferencia entre un valle y el anterior será la contribución equimolecular de cada uno de los azúcares en estudio al desprendimiento de NADPH relacionando este desprendimiento con la concentración de azúcar en el extracto.

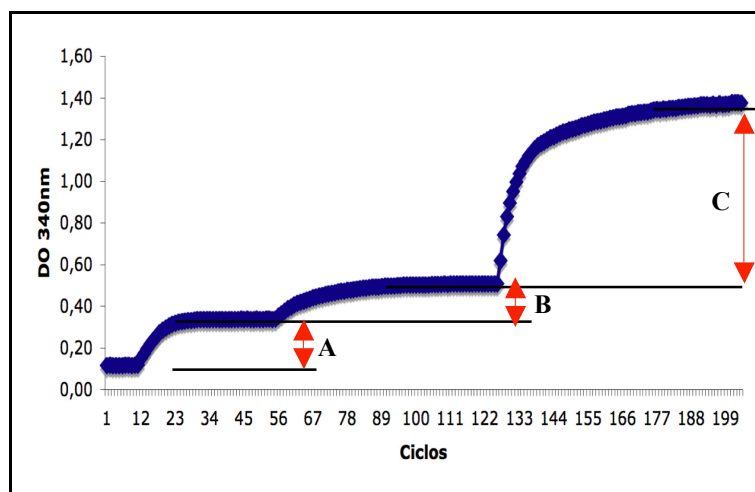


Fig. 16.- Esquema de la medición de azúcares. Cada una de las variaciones en las DO corresponde a las contribuciones de cada una de las enzimas A) hexoquinasa, B) fosfoglucoisomerasa y C) invertasa.

C.7.- Cuantificación de la actividad fotosintética.

La actividad fotosintética de las plantas de guisante tratadas con las diferentes soluciones de azúcares se determinaron con ayuda de un IRGA Licor-6400, situando las hojas apicales en la cámara del aparato. Las medidas obtenidas se han normalizado por centímetro cuadrado de hoja.

C.8.- Determinación del contenido en clorofilas.

Para la cuantificación del contenido en clorofilas hemos sometido las hojas han sido pulverizadas con ayuda de nitrógeno líquido y se ha sometido a cuatro extracciones de 400 µl en etanol 96 % a 80 °C durante 30 min. El volumen resultante se diluyó 20 veces en etanol 96 % y se cuantificó la DO a 645 nm y 663 nm. Los cálculos de la concentración de clorofilas por peso fresco de hoja se determinó en base a los cálculo descritos por (Lichtenthaler, H.K. 1897).

D.- Software informático.

Para el correcto desarrollo de la tesis y poder mostrar parte de los resultados que se presentan en esta tesis, he utilizado el programa Vector NTI® (Invitrogen) para la comparación, análisis y diseño de secuencias y oligonucleótidos (gracias Antoñico), y el programa Quantity One® ver. 4,6 para Mac OS X (Roche) que he utilizado para la cuantificación de las

bandas correspondientes tanto a los geles de agarosa de las PCR-semicuantitativa como de las bandas de las membranas correspondientes a los *western blots*.

Los recursos *on-line* que he utilizado constan en las siguientes líneas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> para obtener la información bibliográfica, <http://www.ebi.ac.uk/>, para obtener alineamientos múltiples. Además de aprender un poco de francés he utilizado más herramientas bioinformáticas en la dirección <http://bioweb.pasteur.fr/>.

La dirección siguiente la he utilizado para conversiones de tiempos/rotor en la ultracentrífuga http://www.beckman.com/resourcecenter/labresources/resource_centrif.asp

Por último, los sitios web <http://www.dna.affrc.go.jp/> y <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> han sido mis útiles para describir las secuencias reguladoras de ambas tiorredoxinas.

Y por supuesto...<http://www.eez.csic.es>

III.- OBJETIVOS

La presencia en el genoma de plantas de numerosas tiorredoxinas localizadas en distintos compartimentos, nos ha conducido a plantearnos determinar la localización de las isoformas cloroplastídica y analizar su regulación por luz y azúcares con el fin de especificar la actividad enzimática concreta de cada tiorredoxina. Por lo que en esta Tesis Doctoral se han planteado los siguientes objetivos:

1- Aislamiento y caracterización de las secuencias reguladoras de las tiorredoxinas *f* y *m1* de guisante (PsTrx *f* y PsTrx *m1*).

2- Análisis de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que contengan las secuencias reguladoras de ambas TRXs, enteras y truncadas, fusionadas al gen de la β -Glucuronidasa, delimitar las cajas reguladoras implicadas en la localización tisular y regulación por luz.

3- Localizar mediante estudios histológicos y *western blot* la expresión génica y proteínica de las tiorredoxinas *f* y *m1* en los diferentes tejidos de la planta de guisante.

4- Efecto de la luz sobre la expresión de las tiorredoxinas cloroplastídicas de guisante y papel del reloj circadiano. Análisis de los elementos reguladores en *cis* implicados en la regulación.

5- Influencia de los azúcares solubles sobre la expresión de las tiorredoxinas *f* y *m1* de guisante. Análisis de la regulación a través del factor de transcripción DOF7.

IV.- RESULTADOS

A.- Estudios histológicos de PsTRX *f* y PsTRX *m1*.

A.1.- Aislamiento y caracterización de las secuencias reguladoras de PsTrx *f* y PsTrx *m1* y sus correspondientes deleciones.

Con objeto de iniciar los estudios relacionados con la localización tisular de las Trxs cloroplásticas *f* y *m1* y con los factores ambientales y endógenos que afectan la expresión de estas proteínas, hemos aislado las secuencias promotoras de PsTrx *f* y PsTrx *m1* que se encuentran corriente arriba del codón de inicio de la traducción mediante la técnica de “PCR walking” descrita por Devic y colaboradores y que se detalla en el apartado “Materiales y Métodos” (Devic, M., y cols. 1997). Para ello, se aisló ADN genómico de guisante y tras la digestión con las enzimas de restricción Dra I, Eco RV, Hpa I, Sca I y Stu I que dejan extremos romos y la unión de adaptadores de la figura 17, se obtuvieron 5 genotecas de fragmentos de ADN de diferentes tamaños.



Fig. 17.-Secuencia del adaptador. Las flechas indican las secuencias y la orientación de los oligonucleótidos AP-1 y AP-2.

Dos reacciones de PCR secuenciales fueron llevadas a cabo utilizando las parejas de oligonucleótidos F1/AP1 y F2/AP2 en el caso de PsTrx *f*, mientras que en el caso de PsTrx *m1* las parejas de oligonucleótidos fueron M1/AP1 y M2/AP2. Las secuencias de los oligos AP1 y AP2 se encuentran dentro de los adaptadores, mientras que las secuencias F1/F2 y M1/M2 son parte de la secuencia de las Trxs *f* y *m1* de guisante, próximas al extremo 5' y orientadas corriente arriba. Tras la segunda reacción de PCR, los fragmentos obtenidos se clonaron en el vector p-GEM-T[®] easy y se secuenciaron para verificar que los fragmentos obtenidos se corresponden a las regiones reguladoras de los genes que codifican para PsTrx *f* y PsTrx *m1* de guisante. Se pudo confirmar que dos fragmentos procedentes de distintas genotecas eran parte de las regiones 5' corriente arriba para cada uno de los genes de interés. Para nuestros estudios seleccionamos los de mayor tamaño que se obtuvieron (Fig. 18), 444 pb en el caso de PsTrx *f*, obtenido a partir del banco de ADN digerido con Eco RV, mientras que en el caso de PsTrx *m1* el fragmento conseguido fue de 1996 pb a partir de un banco de ADN digerido con la enzima Stu I.

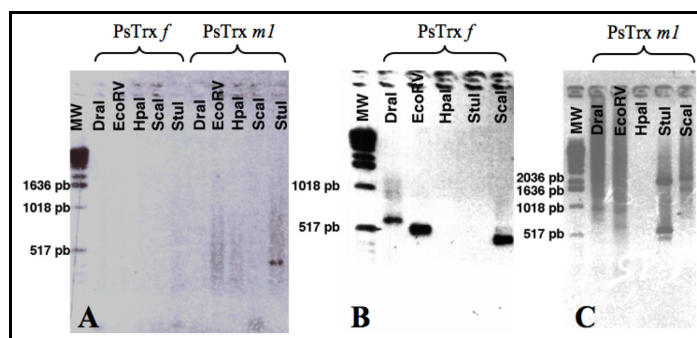


Fig. 18.- PCR-Walking sobre los diferentes bancos genómicos. A) 1ª PCR para cada uno de los genes con las parejas de oligonucleótidos AP1/F1 (para PsTrx *f*) y AP1/M1 (para PsTrx *m1*). B) Segunda reacción de PCR a partir de una dilución 1:100 de la 1ª PCR con la pareja de oligonucleótidos AP2/F2 (para PsTrx *f*). C) Segunda reacción de PCR a partir de una dilución 1:100 de la 1ª PCR con la pareja de oligonucleótidos AP2/M2 (para PsTrx *m1*).

Las secuencias que se obtuvieron para cada uno de los fragmentos fueron:

Pr-PsTrx *f* (EF483938)

5´ -GTAAACAAATAAACCACATTGCGTGATTCATATATAATAACTATAAAAATT
TTGCTCCATAAAAATTATTTGTTGTTGTTTATATTTGCGATTGAAAAAAG
TAAAGTGAAAAAAAAGAGATATTCGAAGGGAATCTTGCCATCCAATTA
TCCGGAAGAATGGTCAAACCTCTCCTAAAAAATCAGAAAAGGGTAATTT
GGTAATATTATATCCAAGCCTGGGCGATTTCACTAATTCCAACCTTCTCTT
TCATTCCTTTACGATTGTGTTTCATTGAATTTACTAACATCACCCCTCATT
TTCGCGATCAAATAATTCCATACACAGACTTCAAGGGCAGCACCGTATT
TTCAATCATCACACCCACTCTTCCTCCTCTTCACATCCACCACCACACTT
TCATATCTCAGTCCAATTCTCCACTCTTGGTCTTCCCCACATCA**ATG** -3´

Pr-PsTrx *m1* (EF483939)

5´ - GTCCTTGGTGCCTCTCAAACATAAATTTTTGTTAAAAGCTATGCATCCACT
TTGAAATTTGTATCACGAACTACGATGTTTTGATCCCTCATTTTTATGTT
GGTACGTAGGCACAAGTCCGAAGGTCTTGTCAAACACAAAAATATAATTA
ATGAATTCTCTTCTCATCCCCTCACTCTATTTGTTTGTAACATCACTTT
GTACAAAATACATATGCACACAAAAAGGGCTCCCTAGGAGTACCTAGGA
CACTTTGGGTGCTAACACCTTCCCTCTATGTAACCAACCCCTTACCTGT
AATCTCTGACATTTTTATTAGTTTTGATTTGAAAACCTTCTTACTTTTGGGT
TTTGTTACACTTTTTCCCTTTTCCCTTGGAACGAAAAAGCGCGGGG
CGACTCTTGTTATTTGATGCCTTGCTTATCCATAGCTCGATGATCATGAA
TTTACCGCTACAATCACTTATATTAATATGTAGTAGTTTAAAATTGTTG
TATTTTTAAAATTGATAGACGTTTTATTTTTAAAATATATAAATATATA
TTGCGCGGGTATGGGGCGTGGTGGTACTAAGGTGCACATCTCTGCTTAT
TTAAGTGGGTAAATTACCCGAGCTCGTGCCTGTTCCCATTTTTATGGATTT

TTACCCTACTAATTGTGGATAACCCATTGGGGATGAGTCAAACCTATCATCC
TTAGAAGTAAGAAACATAAACACAAATATAAATAGAGAAATTCAGATTTT
GTTATTCATATTAAGGGTTTGGATTTGGAAATTTGGATTACACGCAGAGA
GTAAAACCAGACGAAACGTCAACCTTAATCCTCAATTGTCCCAATTTTA
TACCAATTTAAGTAGGAATTACATTTTTTATTGGATATAATCTAATGTAGC
TTAACTATAATCTATTAAGCTATTAAGGAGTTACGTGTATAAAAAATCAT
AAAAAGTTAAGATATGAGAACTTATCAAATATGAGAGACGAATGTGCTT
AATTTGAAGGCGTAGAAGTTGATGAAGTATTTGATTTGAATGAACATAAG
TAGATATTGAAAGCAAGATTGAAAAAAATGTTTGATTCAAATGAGCGAGA
GTTTTGCTCTGCTCTTGAGAGAAGTTAAGAAGTTGGTTTCAAAGTAATG
GAATGTGGAGGGAAAGATTGTATATGCACACTCGAATAAATGTGTCATAA
TATTAACATTCGAAGGTTGAATCTGGGATTTCCAATCTTTGAACTGATTT
TTTTACTTGTATTTGCCGTGTTTGCTAAGATGGAGTTTGTGTTGTGATTAAA
AATGAATTTAAATTTCAATGCTCCGGACTTATTTTTTACTTCTATTTCCA
CATGTTTCTGAGATAGAGTTTGTGTTTAGGGTACATTCTGATTTTTATTTT
TAGATTTTAAGAATATTTTTTAAAATTCCGTTATGGTGAATGAGTAATATA
TGAGGTGCAATAAACAATGTTCAATAAAATCAAGAAATCCTCACCAATTT
ACTATGTAAAATTAACAAGAACAACATGATCAAACCTTTCAAACCTAGAT
CCAATAGTTAATGAATTTTAACTAAATAATTAATTTCAAATAGTCAATAA
ACTTTTCATTAAGCTCGCATAAAGAGTTTCTAAATTTGATCTCTATTTTT
AAATCTAATTTGTAAAGTTTTATTTACACCTCCCTACTAAAATGTGAAAC
AAAACCCCCCAGAGAAGAGAAGAGGATTTTGAGATAGTGTGGAGAAGTAC
TTTTTAGTGGGGACAGAAAGGAGAGAGAGGATTGAAAACCTAAATAACAT
CCACATGAATCCAAGCCATCTCATAACCTCACAATCTCAAATAATATCCA
GTTACAAACACACTTCACAATTTTCATCATACCCAACAAATTA AAAACCGC

CACAACACTAGAAGCTTATCCACAACAAGTGCTGAAAACCCTCCCTTCAT
TTTCCCCAAACTATTCAGTAGAGTTACATACACAGAAAATAAC**ATG**- 3´

Fig. 19 .-Secuencias reguladoras en 5´ corriente arriba obtenidas por PCR-Walking para PsTrx *f* y PsTrx *m1*. En negrita se indica el codón que codifica para la metionina, el primer aminoácido de la proteína. Entre paréntesis está el número de acceso a la base de datos de *Gene bank* en el que se ha depositado cada una de las secuencias reguladoras.

Las secuencias reguladoras obtenidas para cada uno de los genes comprenden una longitud de 444 pb en el caso de PsTrx *f*, mientras que en el caso de PsTrx *m1* se ha obtenido un fragmento de 1996 pb.

A.2.- Análisis bioinformático de las secuencias reguladoras de PsTrx *f* y PsTrx *m1* de guisante.

Una vez obtenidas las secuencias promotoras se procedió al análisis de los elementos reguladores que se encuentran en las mismas y que dirigen la expresión específica de cada uno de los genes Trx *f* y Trx *m1*. Para ello, las secuencias promotoras se compararon con los elementos reguladores ya descritos en otros promotores de plantas presentes en la base de datos PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) (Higo, K., y cols. 1999; Rombauts, S., y cols. 1999) y PlantCARE (Rombauts, S., y cols. 1999).

Así, el análisis bioinformático localizó los distintos elementos reguladores presentes en ambas secuencias (Fig. 20) y que están conservados en otros promotores de genes de plantas y que podrían estar relacionados con la localización, regulación de las TRXs y con las funciones específicas de cada una de las proteínas, y que se muestran en la figura 20:

Pr-PsTrx *f* (444 pb)

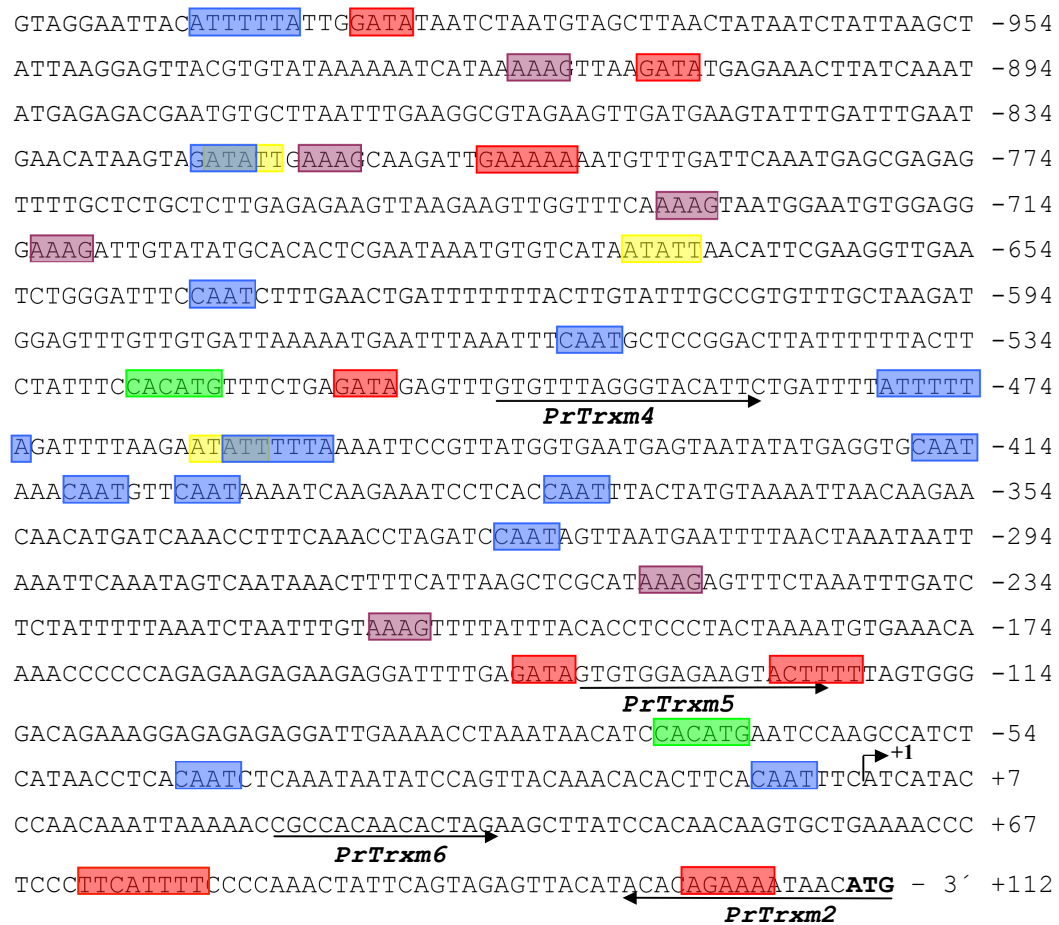
A

-394 5' -GTAACAATAAAACCACATTGCGTGATTCATATATAATAACTATAAAATT
 PrTrxf1→
-344 TTGCTCCATAAAATTATTTGTTGTTGTTT ATATTT GCGATT GAAAAA AAAG
-294 TAAAGT GAAAAA AA AAAGA GATA TT CGAAGGGAATCTTGGCATCCAATTA
-244 TCCGGAAGAATGGTCAAACCTCTCCTAAAAAATCAGA AAAGG GTAATT T
-194 GTAATA TT ATATCCAAGCCTGGGCGATTTCCTAATTCCAACCTTCTCTT
-154 TCATTCCTTTACGATTGTGTTTCATTGAATTTACTAACATCACCCCTCATT
-144 TTCGCGATCAAATAATTCCATACACAGACTTCAAGGGCAGCACCCGTATT
 PrTrxf3→
-94 TTCAATCATCACCCCCTCTTCCTCCTCCTTCACATCCACCACCACACTT
-44 TCATATCTCAGTCCAATTCTCCACTCTTGGTCTTCCCCACATCAATG -3
 ←
 PrTrxf2

Pr-PsTrx *m1* (1996 pb)

B

 5' - GTCCTTGGTGCCTCTCAA AACT -1854
 PrTrxm1→
AA ATTTTTG TTA AAAG CTATGCATCC ACTTTG GAAATTT GTATCACGA ACTACGATGTTTT -1794
GATCC CTC ATTTT TA TGTGGTACGTAGGCACAAGTCCGAAGGTCTTGTCAAACACAAAA -1734
ATATAATTAATGAATCTCTT CTCATC CCCTCACTCTATTTGTTTGTAAACATC ACTTTG -1674
TACAAAATACATATGCACACAAA AAAG GGCTCCCTAGGAGTACCTAGGAC ACTTTG GGTG -1614
CTAACACCTTCCCTCTATGTAACCAACCCCTTACCTGTAATCTCTGACATTTTATTAGT -1554
TTTGATTTGAAAACCTTCTACTTTTGGGTTTTGTTTCATACTTTTTCCCTTTCCCTTGGGA -1494
 PrTrxm3→
AAC GAAA AAAG CGCGGGGGCGACTCTTGTTATTTGATGCCTTGCTT ATCCATA GCTCGAT -1434
GATCATGAATTTACCGCTACAATCACTT ATATT AAATATGTAGTAGTTTTAAATTTGTTGT -1374
ATTTTTAAAAATTGATAGACGTTT ATTTTTTA AAATATATAAATAT ATATT GCGCGGGTA -1314
TGGGGCGTGGTGGTACTAAGGTGCACATCTCTGCTTATTTAAGTGG GTAAT TACCCGAG -1254
CTCGTGCCTGTTCC ATTTTTTA TGG ATTTTTTA CCCTACTAATTGTGGATACCCATTGGGG -1194
ATGAGTCAAACATATCATCTTAGAAGTAAGAAACATAAACACAAATATAAATAGAGAAAT -1134
TCAGATTTTGTATT ATATT AAGGGTTTGGATT GGAAAT TTGGATTACACGCAGAGAG -1074
TAAAACCGAGACGAAACGTCAACCTTAATCCT CAAT TGTC CAAT TTTATAC CAAT TTAA -1014



- Motivos presentes en genes que se localizan específicamente en raíces.
- Elementos reguladores presentes en genes relacionados con el metabolismo del carbono.
- Motivos dependientes de la luz.
- Motivos presentes en genes relacionados con el desarrollo de las semillas.
- Motivos presentes en genes regulados por hormonas.

Fig. 20.- Esquema de las secuencias reguladoras aisladas por PCR-Walking de PsTrx *fy* PsTrx *m1*. Los cuadros señalan los principales elementos reguladores identificados en las bases de datos PLACE y PlantCARE. Las flechas indican la localización y orientación de los oligonucleótidos utilizados para obtener los diferentes fragmentos de los promotores, enteros y truncados. En la secuencia reguladora de PsTrx *m1* se indica con "+1" el sitio de inicio de la transcripción.

No se ha identificado ninguna caja TATA típica, sin embargo, se ha localizado una caja TATA putativa a -31 pb desde el sitio de inicio de la transcripción en el caso de PsTrx *m1*, y a -128 pb de la secuencia ATG de inicio de la traducción de PsTRX *f*.

Se han identificado numerosos elementos reguladores que se han clasificado en tres grupos atendiendo a su interés, así estos grupos relacionan las TRXs cloroplásticas con su localización en la planta, con la regulación por luz así como con su papel dentro del metabolismo del carbono. Los elementos reguladores de Trx *f* de guisante se han clasificado en tres categorías: elementos dependientes de la luz, de tejido y del metabolismo del carbono (Fig. 20A). Los elementos relacionados con la luz más relevantes son los elementos GATA e Ibox, además del motivo GT1CONSENSUS (secuencia -GAAAAA- en la posición -315, la secuencia -GTAATA- en la posición -274 y la secuencia -GTAATT- en la posición -190 con respecto al codón de inicio de la traducción de la proteína) (Lam, E. and Chua, N.H. 1989; Gilmartin, P.M., y cols. 1990). Un “Evening Element” (EE) ha sido también identificado en la región promotora en la posición -326 en orientación antisentido, se le relaciona con la regulación por el reloj circadiano (Harmer, S.L., y cols. 2000). El análisis también ha reconocido en la secuencia promotora de PsTrx *f* el elemento ROOTMOTIFTAPOX1 (ATATT) relacionado con la expresión en raíces (Elmayan, T. and Tepfer, M. 1995). Finalmente, la secuencia reguladora contiene, además, cuatro elementos reconocidos por los factores de transcripción DOF (AAAG) (Yanagisawa, S. 1995, 1996). Estos factores de transcripción están relacionados con la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en el metabolismo del carbono (Yanagisawa, S. 2000).

En el caso de los elementos reguladores presentes en la secuencia promotora aislada de PsTrx *mI*, existen al menos 16 elementos diferentes dependientes de la luz entre los que se encuentran los elementos GATA, GT1CONSENSUS e Ibox (Fig. 20B) (Lam, E. and Chua, N.H. 1989; Gilmartin, P.M., y cols. 1990). Igualmente, se ha localizado en la posición -823 un elemento EE (Harmer, S.L., y cols. 2000) relacionado con la regulación circadiana. Varios elementos implicados en la expresión en raíces ROOTMOTIFTAPOX1 (Elmayan, T. and Tepfer, M. 1995) (ATATT) han sido localizados además de elementos CAATBOX1 (CAAT) que están presentes en genes que codifican para proteínas de reserva en semillas (Shirsat, A., y cols. 1989). El elemento SEF4MOTIFGM7S (ATTTTTA) está relacionado con la regulación del desarrollo de las plantas y con proteínas de reserva en semillas (Allen, R.D., y cols. 1989). Por último, el análisis ha revelado además secuencias relacionadas con los factores DOF (AAAG) implicados en la regulación de genes implicados en el metabolismo carbonado (Yanagisawa, S. 1995, 1996, 2000).

A pesar del distinto tamaño de las secuencias promotoras de PsTrx *f* y PsTrx *mI*, una comparación entre ambas revela que contienen elementos reguladores similares, que determinan la localización específica en la planta, la regulación por la luz, y su función dentro del metabolismo del carbono. Asimismo, los análisis también han revelado la presencia de elementos implicados en procesos tales como la formación de la semilla y del embrión (elementos CANBNNAPA (CNAACAC), ACACNNG; (Ellerstrom, M., y cols. 1996)), relacionados con la polinización (con elementos GTGANTG10 (GTGA) (Rogers, H.J., y cols. 2001); y elementos POLLEN1LELAT52 (AGAAA); (Bate, N. and Twell, D. 1998)) y la regulación hormonal por

ácido abscísico y giberelinas (elementos MYCATRD22 (CACATG) (Abe, H., y cols. 1997); y la secuencia TATCCA (Lu, C.A., y cols. 2002)).

A.3.- Análisis funcional de las secuencias promotoras.

Con objeto de poder delimitar los motivos que son esenciales en la regulación de la expresión de los genes *Trx f* y *Trx ml* se han diseñado una serie de oligonucleótidos con los que se han obtenido delecciones seriadas logrando fragmentos de diferentes tamaños de cada uno de los promotores (Fig. 20A y Fig. 20B). Estos fragmentos se han fusionado al gen reportero GUS con el fin de localizar la expresión de dicho gen en plantas de *A. thaliana* en función de cada una de las secuencias reguladoras. Esto permite poder definir los elementos de ambas TRXs cloroplastídicas de guisante implicados en la expresión específica en tejidos o dependientes de factores ambientales.

Este estudio se ha llevado a cabo teniendo en cuenta la estrecha relación que existe entre las TRXs de ambas especies como se puede comprobar en el árbol filogenético que ha sido construido en base a las secuencias de aminoácidos de las TRXs de *A. thaliana* y las secuencias aminoacídicas de las TRXs cloroplastídicas de guisante PsTRX *f* y PsTRX *m*, agrupándose éstas últimas en el grupo de las TRXs cloroplastídicas y dentro de él, cada una se sitúa dentro del subgrupo que corresponde a su isoforma (Fig. 21).

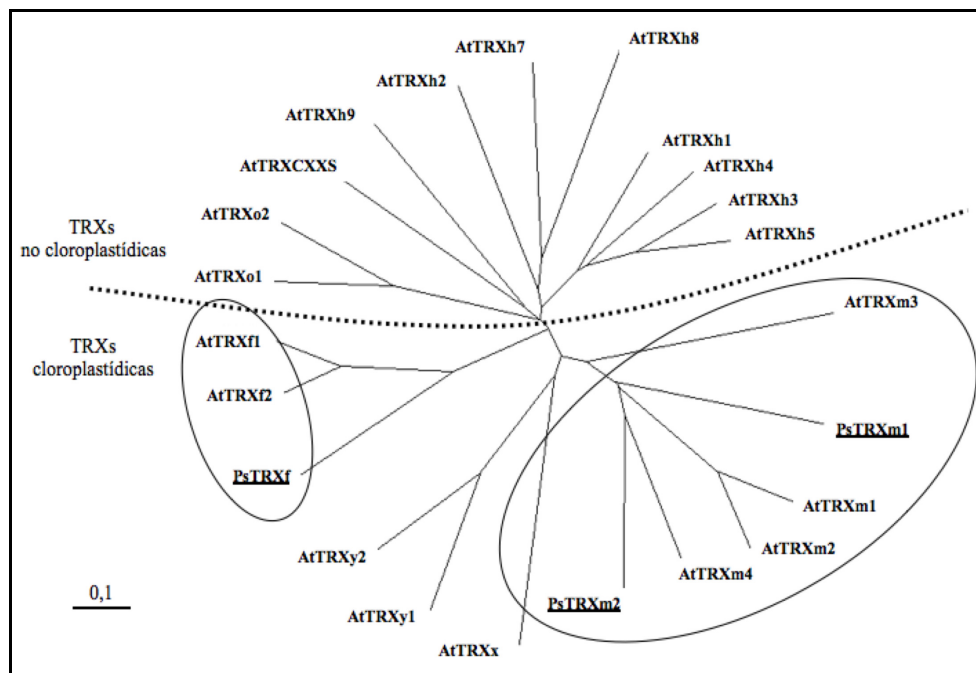


Fig. 21. Árbol filogenético en el que se presentan las TRXs de *A. thaliana* y las tres TRXs cloroplásticas descritas hasta la fecha en *P. sativum*. AtTRXf1 (NP 186922), AtTRXf2 (NP 197144), AtTRXh1 (NP 190672), AtTRXh2 (NP 198811), AtTRXh3 (NP 199112), AtTRXh4 (NP 173403), AtTRXh5 (NP 175128), AtTRXh7 (NP 176182), AtTRXh8 (NP 177146), AtTRXh9 (NP 001078124), AtTRXm1 (NP 849585), AtTRXm2 (NP 192261), AtTRXm3 (NP 179159), AtTRXm4 (NP 188155), AtTRXo1 (NP 001078006), AtTRXo2 (NP 564371), AtTRXx (NP 564566), AtTRXy1 (NP 177802), AtTRXy2 (NP 175021), AtTRXCXXC (NP 172620), PsTrxf (P29450), PsTRXm1 (P48384), PsTRXm2 (CAC69854). Subrayadas se indican las proteínas de guisante.

En las figuras 20A y 20B, se muestran las posiciones de los oligonucleótidos en las secuencias promotoras que nos han permitido obtener los fragmentos delecionados de cada uno de los promotores, mientras que las flechas señalan la dirección de síntesis de la cadena de ADN. Los fragmentos obtenidos se muestran en la figura 22:

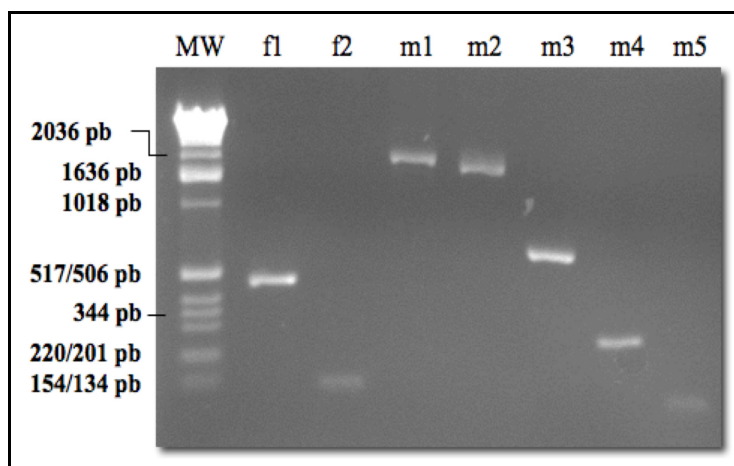


Fig. 22.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los fragmentos de los promotores enteros y deletados. f1 (444 pb), f2 (128 pb), m1 (1996 pb), m2 (1544 pb), m3 (546 pb), m4 (161 pb) y m5 (23 pb).

El programa utilizado en el termociclador para obtener cada uno de los fragmentos mediante PCR fue de 5 min 94 °C; 35 x (1 min 94 °C, 1 min 55 °C, 1 min 72 °C); 5 min 72 °C. Los oligonucleótidos llevaban insertado en los extremos las dianas para las restricciones adecuadas y dirigir la inserción dentro del vector pBI101.

Las secuencias de las endonucleasas seleccionadas han sido para la enzima Sall en el extremo 5' del fragmento de ADN, mientras que en el extremo 3' del fragmento se ha añadido la diana para la enzima de restricción BamHI. Después de la reacción de amplificación específica, se purificaron los distintos fragmentos de ADN del gel de agarosa mediante una extracción fenólica y se subclonaron en el vector pGEM-T®easy. Tanto las construcciones en pGEMT de los promotores como el vector pBI101 se sometieron a digestión en una mezcla que contenía 5 U de Sall y 5 U de BamHI en un volumen final de 20 µl durante 2 horas en un baño a 37 °C.

Los fragmentos correspondientes a las secuencias reguladoras de cada una de las TRXs en estudio y sus respectivas deleciones se insertaron mediante una fusión transcripcional al gen de la β -Glucuronidasa (GUS) o gen chivato en el vector pBI101 linearizado (Fig. 24). Se obtuvieron las siguientes construcciones *PsTRXf1::GUS* (f1::GUS) y *PsTRXf2::GUS* (f2::GUS) con el promotor de *PsTrxf*, y *PsTRXm1::GUS* (m1::GUS), *PsTRXm2::GUS* (m2::GUS), *PsTRXm3::GUS* (m3::GUS), *PsTRXm4::GUS* (m4::GUS) y *PsTRXm5::GUS* (m5::GUS) con el promotor de la *PsTrx m1*, ordenados de mayor a menor tamaño.

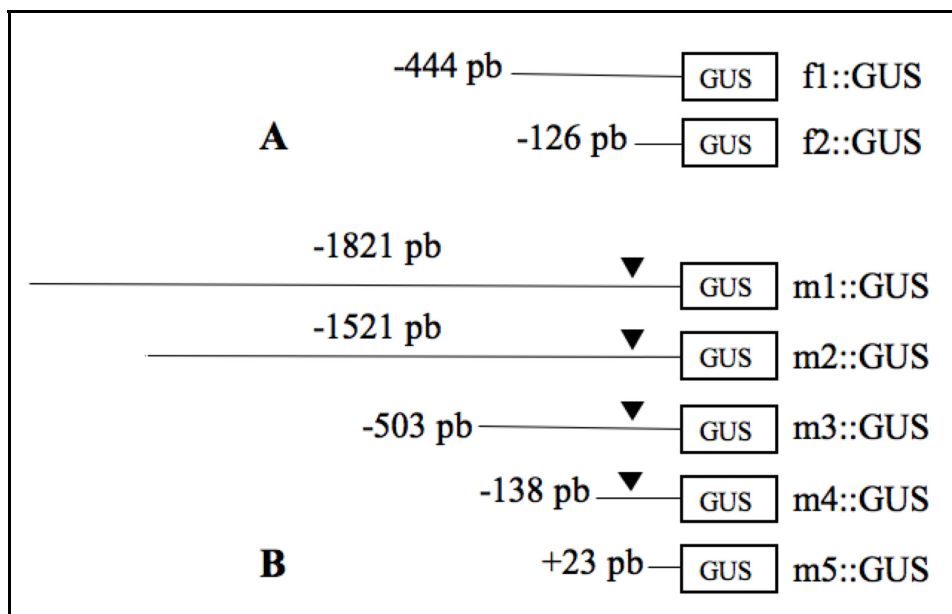


Fig. 24.- Esquema de las construcciones de los diferentes fragmentos de las secuencias reguladoras fusionadas al gen GUS y sus tamaños: A) de *PsTrxf* y B) de *PsTrx m1*. Se indica la longitud de los fragmentos tomando como referencia el ATG del inicio de la traducción en el caso de *PsTrxf*. En el caso de la secuencia reguladora de *PsTrx m1* se ha tomado como referencia el sitio de inicio de la transcripción, marcado con un triángulo invertido negro.

La correcta inserción de los fragmentos en fase con el inicio de la transcripción del gen β -Glucuronidasa dentro del vector pBI101 se verificó mediante la secuenciación de las distintas construcciones.

A.4.- Obtención de las plantas transgénicas con las secuencias reguladoras fusionadas al gen GUS.

Con las construcciones f1::GUS, f2::GUS, m1::GUS, m2::GUS, m3::GUS, m4::GUS y m5::GUS que corresponden a las secuencias de los promotores de las TRXs enteras y truncadas clonados en el vector pBI101, se transformó *A. tumefaciens* por el método de choque térmico. Las bacterias de *A. tumefaciens* con cada una de las construcciones se utilizaron en la transformación de las plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo columbia mediante el procedimiento descrito en “Materiales y Métodos”, sumergiendo las plantas en los distintos cultivos de bacterias.

Las semillas procedentes de las plantas transformadas (F₀) se sometieron a un estudio de segregación para analizar el número de inserciones en el genoma de la planta. Las líneas transgénicas cuyas semillas mostraron un porcentaje de germinación no superior al 75 % en placas de medio MS con kanamicina fueron seleccionadas (generación F₁). Las plantas transgénicas provenientes de estas líneas se traspasaron a tierra hasta desarrollar flores y semillas, las cuales se recolectaron y constituyeron la siguiente generación (F₂). Las semillas F₂ se sembraron en medio MS con kanamicina y a su vez se seleccionaron las líneas cuyo porcentaje de germinación fue del 100 % y que correspondían a las líneas de *Arabidopsis*

thaliana transgénicas homocigotas para cada una de las construcciones y que se han utilizado para realizar los posteriores estudios de caracterización durante esta tesis doctoral. Para comprobar la presencia de cada uno de los fragmentos fusionado al gen de la β -Glucuronidasa, se extrajo el ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas seleccionadas y mediante PCR se ha comprobado que contienen la construcción deseada. De cada una de las construcciones, se han analizado dos líneas independientes para corroborar los datos de expresión que se han obtenido.

Con el fin de confirmar que las líneas transgénicas homocigotas contienen el mismo número de copias de cada una de las inserciones en el genoma de la planta, y por lo tanto, que los resultados de expresión obtenidos para cada una de las líneas transgénicas son comparables entre sí, se ha utilizado la técnica descrita por Ríos y colaboradores (Ríos, G., y cols. 2002) la cual, se basa en una reacción de PCR para comparar el número de inserciones de cada una de las construcciones de las secuencias reguladoras fusionadas al gen GUS. Para ello, se ha aislado ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas mediante el método de extracción con CTAB. Una vez finalizado el proceso, se ha cuantificado la cantidad de ADN en un nanodrop[®] ND-100, y se ha preparado una dilución para cada línea a 40 ng/ μ l. De estas diluciones, se ha utilizado 1 μ l como molde en una reacción de PCR y se ha comparado la intensidad de las bandas obtenidas entre sí.

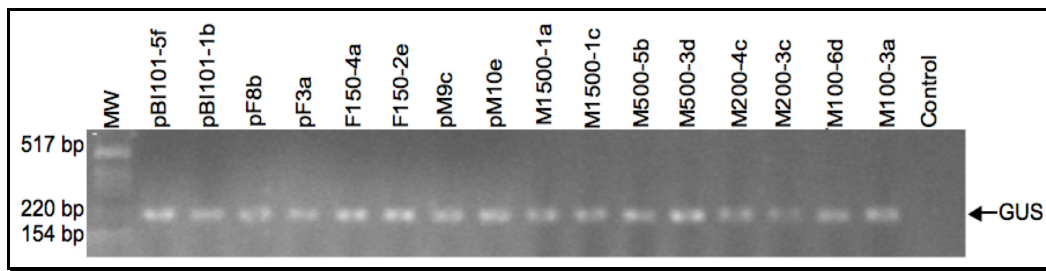


Fig. 24.- PCR sobre 40 ngr ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas utilizadas en los estudios de expresión de esta tesis.

A.5.- Estudios histoquímicos de las plantas de *A. thaliana* transformadas con promotores fusionados al gen GUS.

El estudio histológico de las plantas transgénicas de *A. thaliana* nos ha permitido localizar los tejidos en los que se expresa el gen de la β -Glucuronidasa bajo el control de cada una de las secuencias reguladoras, tanto completas como truncadas.

5.a.- Fusión *PsTrxf::GUS*

En el caso de las plantas transgénicas con la construcción fl::GUS se ha comprobado desde el inicio de la germinación una patente coloración azul en los cotiledones, hipocotilo y anillo meristemático (Fig. 25A). Después de 8-10 días de crecimiento se observa que la coloración se mantiene en toda la parte aérea de la planta, en hojas y primordios (Fig. 25B). Sorprendentemente esta coloración azul aparece también en el meristema apical de las raíces (Fig. 25C). En plantas adultas, la expresión se mantiene en hojas y en zonas de diferenciación de la raíz (probablemente en

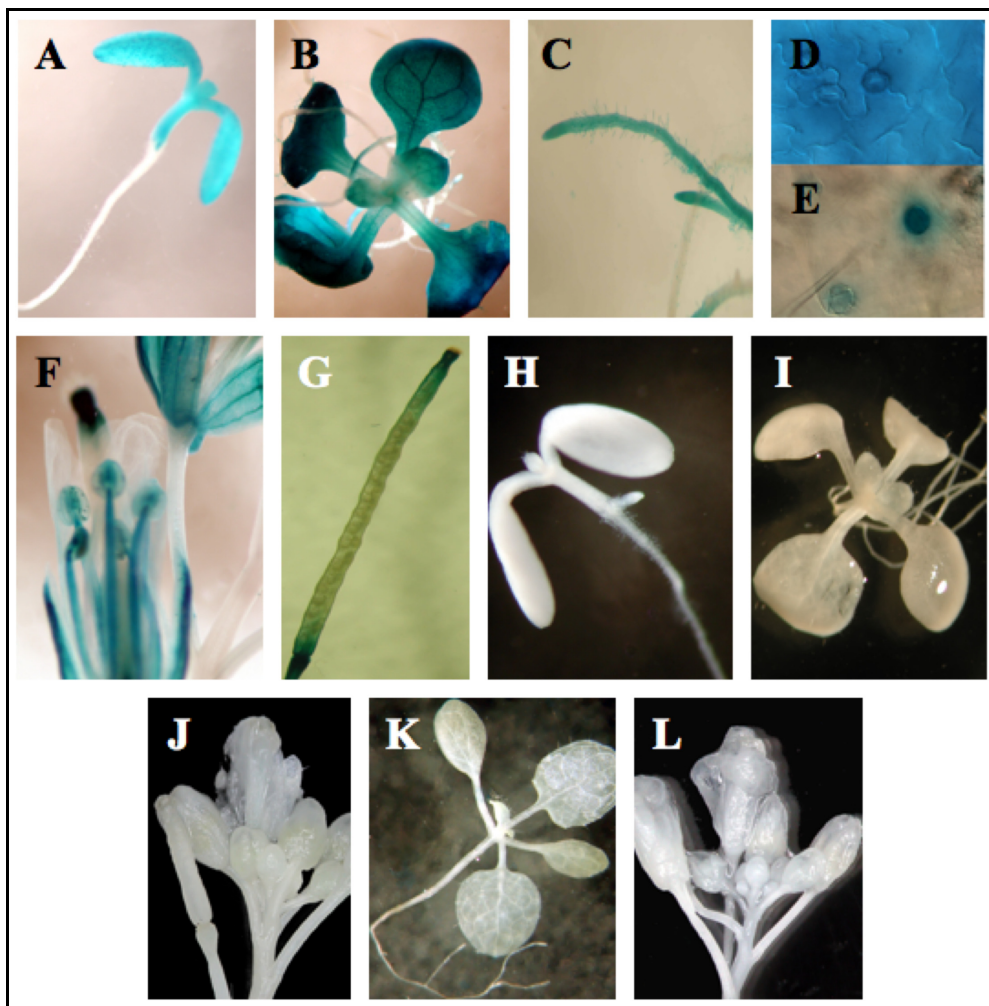


Fig. 25.- Tinción histológica de GUS durante el desarrollo de las líneas transgénicas de *A. thaliana*. En la serie podemos ver el resultado de la coloración de las líneas f1::GUS en A) cotiledones, B) plántula desarrollada, C) raíces, D) y E) estomas y base de los tricomas, F) flores, G) vaina. Coloración GUS en las líneas de plantas transgénicas f2::GUS en H) plántula, I) roseta y J) flor. Coloración GUS en plantas transgénicas que contienen la construcción pBI101::GUS en K) roseta e L) inflorescencias.

el cortex ó epidermis). En un estudio microscópico detallado se observa una señal intensa de coloración GUS en las células guarda de los estomas de las hojas y en la base de los tricomas (Fig. 25D y 25E). Cuando

la planta está totalmente desarrollada, se aprecia la expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora *PsTrxf1::GUS* en flores, en el estilo, estigma y pistilo, así como en las anteras, en los granos de polen y en los extremos de la vaina (silicua)(Fig. 25F y 25G). El tejido vascular de hojas y sépalos mostró igualmente una señal débil pero clara. Las plantas transgénicas que llevan la construcción *PsTrxf2::GUS*, en la cual hemos eliminado 267 pb que llevan los principales elementos reguladores, no muestran la coloración descrita anteriormente ni en los cotiledones ni en planta completa perdiendo totalmente la expresión GUS (Fig. 25H, 25I y 25J). En las plantas transgénicas que contienen la construcción *pBI101::GUS* no se detecta señal alguna en ninguno de los tejidos ni a lo largo del desarrollo de estas plantas (Fig. 25K y 25L).

5.b.- Fusión *PsTrxm::GUS*

En plantas transgénicas de *A. thaliana* que llevan la construcción *PsTrxm1::GUS* se aprecia que hay señal azul desde el principio del desarrollo del embrión en los cotiledones (Fig. 26A). En este caso, no se aprecia coloración azul en el hipocotilo (Fig. 26B). Tras unos días de crecimiento, las plantas muestran una prominente actividad GUS en hojas y en zonas de intensa división celular como son el meristema apical y la región procámbrica (Fig. 26B), así como en la epidermis y el meristema apical de la raíz (Fig. 26C).

En el estadio adulto de la planta, se puede observar expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora de *PsTrxm1::GUS* en flores, en estilo, estigma, estambres y granos de polen (Fig. 26D). Tras dos semanas de desarrollo, la expresión GUS apareció en la intersección de los tallos

primarios y secundarios y en los extremos de las silicuas (Fig. 26E). Las plantas transgénicas de *A. thaliana* con las construcciones m2::GUS y m3::GUS presentan un patrón similar al fragmento completo del promotor, no obstante se comprueba que la coloración GUS se generaliza por toda la parte aérea de la planta incluido el hipocotilo siendo la intensidad en la coloración de las hojas de las líneas transgénicas con las construcciones m2::GUS y m3::GUS mayor que en el caso del promotor completo (Fig. 26F y 26G), mientras que en roseta y en raíces la coloración es semejante a las plantas transgénicas con la construcción m1::GUS (Fig. 26I y 26J). En flores, los fragmentos delecionados m2::GUS, m3::GUS y m4::GUS permiten que aún se mantenga la señal intensa en el estigma y en los extremos de las vainas (silicuas) mientras que se pierde la intensidad de la coloración en los estambres y los granos de polen (Fig. 26H). En el caso de las líneas que contienen la construcción m4::GUS, aunque la expresión GUS

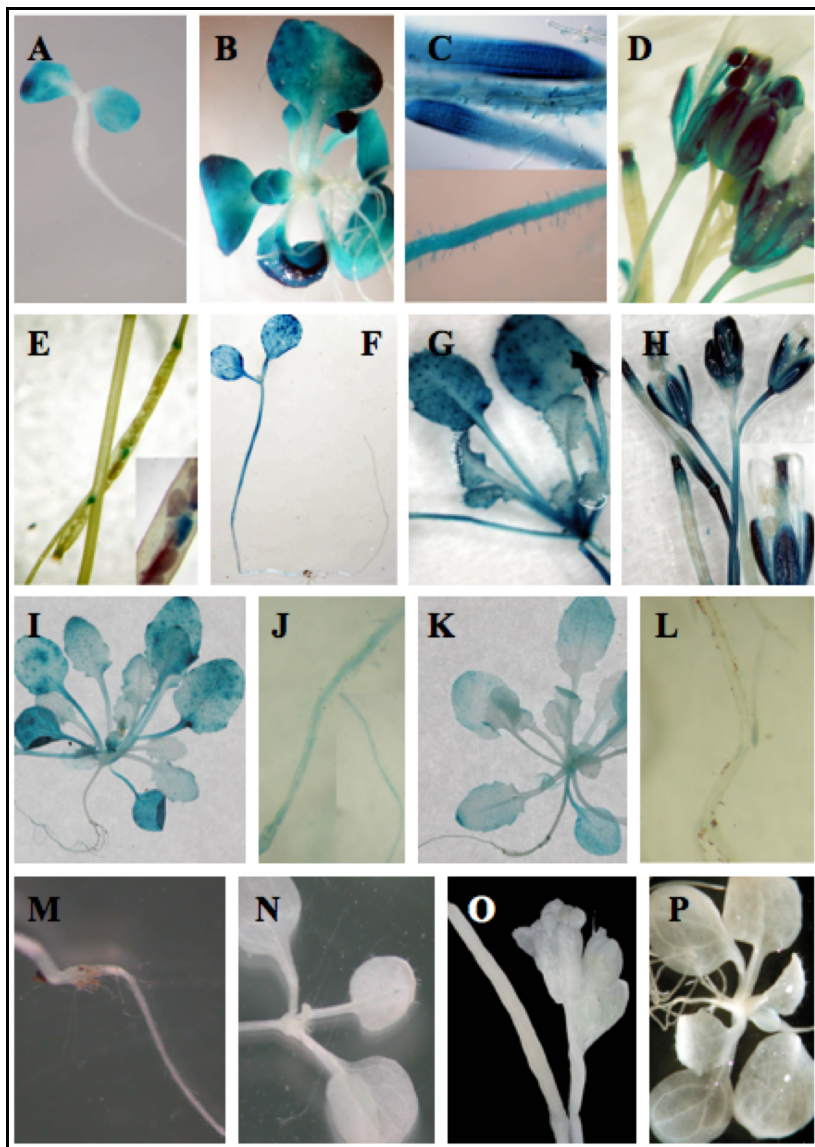


Fig. 26.- Tinción histológica de GUS en el desarrollo de las líneas transgénicas de *A. thaliana* con la En la serie podemos ver el resultado de la coloración de las líneas m1::GUS en A) cotiledones, B) plántulas, C) raíces, D) flores y E) en vaina y semillas; m2::GUS y m3::GUS representados por las imágenes en F) cotiledones, G) plántulas, I) roseta y J) raíces. H) Coloración en flores para las construcciones m2::GUS, m3::GUS, m4::GUS. Tinción GUS en línea m4::GUS K) en plántula L) y en raíces. Finalmente, coloración histoquímica en m5::GUS M) en raíces, N) plántula y O) flores. P) Coloración histoquímica de GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con el vector pBI101 vacío.

sigue estando presente en la parte aérea de la planta, la coloración es menos intensa en hojas y raíces (Fig. 26K y 26L). Finalmente, las plantas transgénicas con la construcción m5::GUS, que contienen la secuencia más corta del promotor con sólo 23 pb contados a partir del ATG de la proteína, no presentan ninguna señal GUS en los tejidos, indicando que este fragmento no lleva los elementos mínimos necesarios para que haya expresión (Fig. 26M, 26N y 26O). En la última foto de la figura se muestra el resultado de tratar para la tinción histoquímica una plántula de *A. thaliana* transformada con el vector pBI101 vacío (Fig. 26P).

Para observar en más detalle la localización de la expresión del gen GUS bajo el control de los promotores de las TRXs cloroplastídicas en hojas, en la figura 27 se muestra una sección transversal de hojas con la presencia de GUS procedentes de plantas de *A. thaliana* con las construcciones *PsTrxf1*::GUS (Fig. 27A y 27B) y *PsTrxm1*::GUS (Fig. 27C y 27D) embebidas en resina. Se observa señal GUS en estomas, en las células del mesófilo y en el tejido vascular además de las traqueidas de las plantas con ambas construcciones.

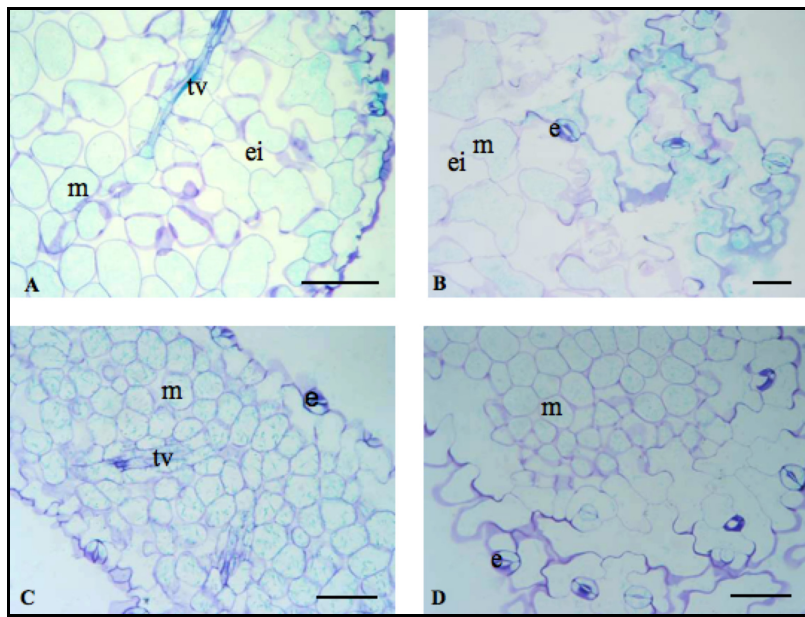


Fig. 27.- Cortes semifinos de hojas de plantas transformadas (A y B) con la construcción fl::GUS (C y D) y con la construcción ml::GUS mostrando la reacción frente a GUS. La barra de tamaño representa 50 μm . Células del mesófilo (m), tejidos vascular (tv), estomas (e) y espacio intercelular (ei).

A.6.- Hibridación in situ de ARNm de PsTrx f y PsTrx ml.

6.a.- Preparación de sondas.

Con objeto de confirmar las nuevas localizaciones de las Trxs cloroplastídicas se llevó a cabo la técnica de hibridación *in situ* en tejidos de guisante, que permite identificar de forma más detallada el lugar en el que se expresan los ARNm correspondientes a los genes de interés. Para ello se subclonaron las secuencias nucleotídicas que codifican cada una de las proteínas TRXs cloroplastídicas *f* y *ml* de guisante. En primer lugar y

mediante una reacción PCR utilizando las parejas de oligonucleótidos TfC/TfbN para el caso de PsTrx *f*, y TmbN/TmbC para PsTrx *m1* se obtuvieron los fragmentos que correspondían a los ADNc de la Trx *f* y *m1* de guisante cuyos tamaños fueron de 565 pb y 535 pb respectivamente. Estos fragmentos se purificaron del gel de agarosa y se subclonaron en el vector pGEM-T®easy para dar lugar a las construcciones que hemos denominado F32 y M40, respectivamente (Fig. 28A y 28B). La correcta clonación de los genes se confirmó por secuenciación haciendo uso de los oligonucleótidos T7/SP6.

En el caso de la secuencia que codifica para PsTrx *f*, el fragmento clonado está en orientación 5' - 3' con respecto a la secuencia T7 del vector de clonación pGEM-T®easy, al contrario de lo que sucede en el caso de la secuencia que codifica para PsTrx *m1*. Para la síntesis de las sondas en sentido y antisentido que han de utilizarse en la técnica de hibridación *in situ*, se han digerido 5 µgr de ADN plasmídico que contiene los ORF de cada gen en función de la orientación con enzimas de restricción diferentes.

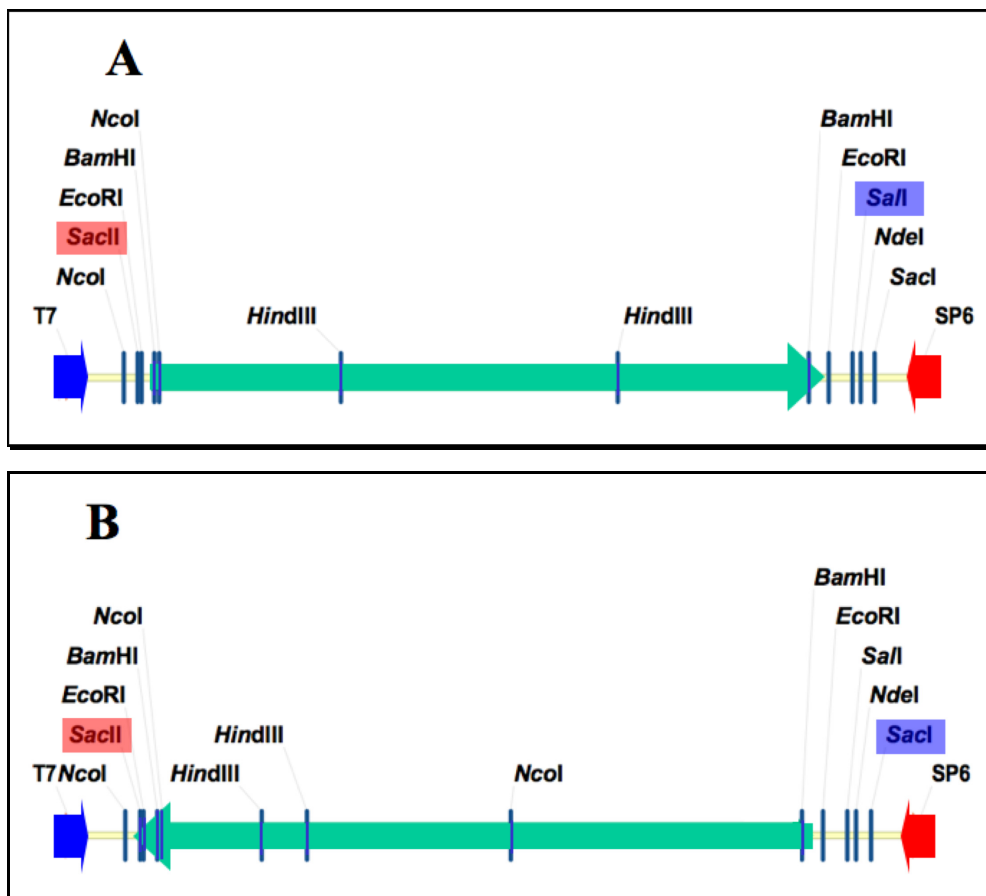


Fig. 28.- Esquema de la inserción de A) PsTrx *f* y B) PsTrx *ml* dentro del vector pGEM-T[®]easy en las construcciones F32 y M40 y la orientación de cada secuencia dentro del vector. Los cuadros señalan las endonucleasas utilizadas para la síntesis de cada sonda y las flechas indican la enzima ARN polimerasa utilizada en cada caso para obtener una sonda en sentido o en antisentido.

La sonda de ARN en antisentido para PsTrx *f* se preparó por digestión de la construcción F32 con la enzima de restricción Sac II (o Ksp I) y se utilizó 40 U de enzima SP6 ARN polimerasa. Mientras que la sonda de ARN en antisentido para PsTrx *ml* se digirió la construcción M40 con la enzima de restricción Sac I como molde para la enzima T7 ARN polimerasa. Para la preparación de las sondas en sentido que se han utilizado

como control negativo, las construcciones F32 y M40 se dirigieron con las enzimas de restricción Sal I y Sac II (o Ksp I) y se utilizaron las enzimas T7 ARN polimerasa y SP6 ARN polimerasa, respectivamente.

Siguiendo estas instrucciones se ha logrado obtener las diferentes sondas para las reacciones de reconocimiento del ARNm de PsTrx *f* y PsTrx *m1*, Fa y Ma, respectivamente. Para el control negativo de la técnica se han obtenido las sondas en sentido Fs y Ms para cada uno de los genes.

Durante la reacción de síntesis de ARN *in vitro* se incorpora a las sondas dUTP marcado con digoxigenina que nos va a permitir localizar la señal de reconocimiento mediante un anticuerpo específico anti-digoxigenina. Los tamaños de las distintas sondas fueron, para PsTrx *f*, fueron Fs de 654 pb y Fa de 655 pb, mientras que en el caso de PsTrx *m1*, Ms de 644 pb y Ma de 640 pb.

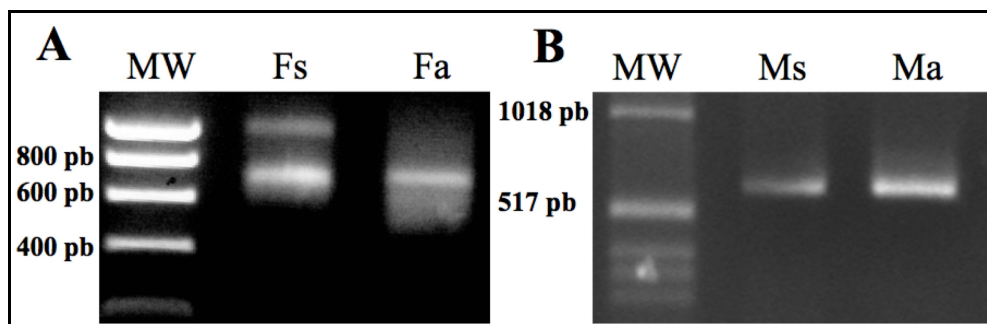


Fig. 29.- Geles de agarosa al 1 % de concentración. Se muestran las bandas que corresponden con las sondas marcadas con digoxigenina, bien en sentido (s) o en antisentido (a) tras el tratamiento con ADNasa. A) Para el caso de PsTrx *f* y B) para el caso de PsTrx *m1*.

Los cortes histológicos de los diferentes tejidos (hojas, raíces, flores, semillas) de la planta de guisante se hicieron con un microtomo de parafina en el laboratorio de la Dra. Cristina Ferrandiz del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas “Primo Yufero” de Valencia, y en el Laboratorio de “Citogenética Molecular y Evolutiva de Mamíferos” dirigido

por el Dr. Rafael Jiménez Medina y el Dr. Miguel Burgos Poyatos en el Departamento de Genética de la Universidad de Granada. La forma en la que se hicieron las secciones, tamaño y procesamiento de las muestras se relata dentro del capítulo de “Materiales y Métodos” de esta tesis.

La preparación de las muestras incluye una serie de lavados que degradan el material vegetal para hacer accesible las sondas y que sean capaces de unirse a sus pares. La hibridación de las sondas se lleva a cabo durante toda la noche en una cámara húmeda que se encuentra a una temperatura de 50 °C. Los restos de sonda que no hayan hibridado se eliminan y se incuban las muestras con un anticuerpo específico de la digoxigenina. Este anticuerpo lleva acoplado la proteína fosfatasa alcalina que da coloración azulada-violeta cuando se añade en la solución de revelado una mezcla de NBT/BCIP.

En ambos casos las sondas en sentido para PsTrx *f* (Fs) como para PsTrx *ml* (Ms) no han originado ninguna señal en los tejidos estudiados. Sin embargo, con las sondas sintetizadas en orientación antisentido se han obtenido varias señales positivas en diferentes tejidos que se describen a continuación.

6.b.- Hibridación *in situ* con las sondas dirigidas hacia PsTrx *f*.

Se ha detectado la presencia de ARN mensajero tanto en las células del parénquima en empalizada como en las células del mesófilo en cortes transversales de las hojas (Fig. 30A). Además, se observa señal en las células del colénquima que rodean el haz vascular central de la hoja que contiene el floema y el xilema (Fig. 30B). No se observa señal en la epidermis de las hojas. En nuestro grupo se había descrito la presencia de

ARN mensajero de PsTrx *f* en la raíz mediante RT-PCR (Pagano, E.A., y cols. 2000), y ahora podemos situar la expresión de PsTrx *f* en las células que se encuentran en el tejido vascular de las raíces, en floema y xilema que forman triarcos (Fig. 30D y 30E) (protoxilema, metaxilema).

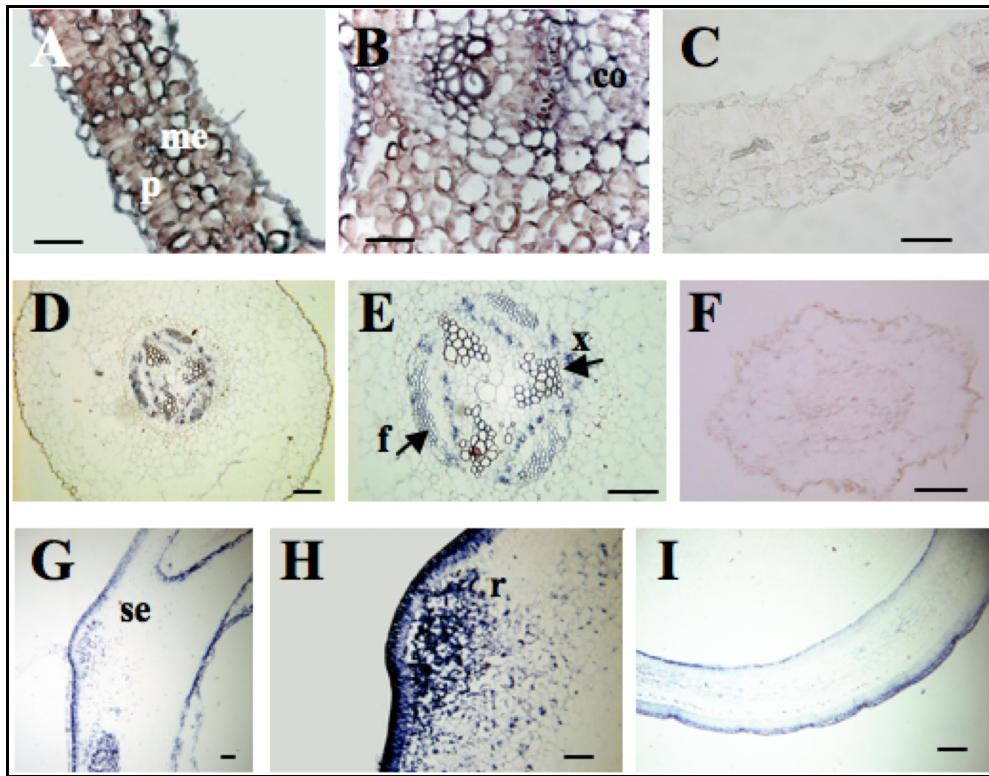


Fig. 30a.- Resultados de la hibridación *in situ* utilizando como sonda el ARNm para PsTrx *f* en diferentes tejidos de guisante: A y B) corte transversal de hoja, D y E) en raíz, G y H) en grano. El resto de las imágenes son el resultado de utilizar la sonda en sentido para PsTrx *f* en diferentes tejidos de guisante C) hojas, F) raíz, I) grano. Las barras indican 100 μ m.

También se ha visualizado una señal de PsTrx *f* en la cubierta de la semilla de guisante o testa y en una región de alta división celular que corresponde con la protuberancia de la radícula en el que se inicia la raíz y el hipocotilo (Fig. 30G y 30H). En óvulos, granos de polen y en el tejido

conectivo de flores se ha comprobado una fuerte señal en respuesta a la hibridación con la sonda Fa (Fig. 30J-30M).

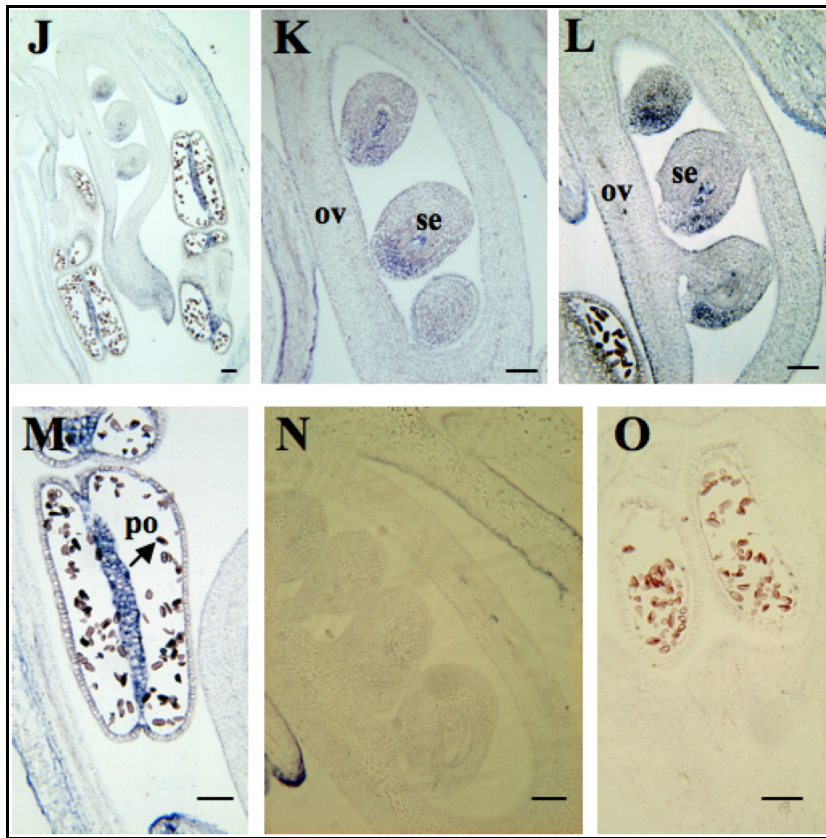


Fig. 30b.- Resultados de la hibridación *in situ* utilizando como sonda el ARNm para *PsTrxf* en diferentes tejidos de guisante: J, K, L y M) diferentes secciones de la flor en desarrollo, y resultado de la hibridación con la sonda Fs en N) embriones y O) sacos polínicos. Colenquima (co); floema (f); xilema, (x); envoltura de la semilla (es); radícula (r); ovario (ov); saco embrionario (se); polen (po).

Las barras indican 100 μ m.

Con más detalle, se puede distinguir que en el óvulo, la señal se localiza en el saco embrionario, en un área que corresponde al tejido del endospermo, dónde después de la polinización se produce un proceso de intensa división celular que necesita un aporte de nutrientes. La segunda área en la que se localiza señal está en la parte externa del óvulo y podría

estar relacionado con el tegumento en desarrollo, que crece cubriendo la nucela (Fig. 30K y 30L). Los experimentos con la sonda Fs (PsTrx *f* en sentido) han confirmado que los resultados son específicos para PsTrx *f* (Fig. 30C, 30F, 30I, 30N y 30O).

6.c.- Hibridación *in situ* con las sondas dirigidas hacia PsTrx *mI*.

En el caso de los experimentos en los que se han utilizado las sondas para PsTrx *mI* el resultado obtenido ha sido muy similar. Así en hojas encontramos señal en las células del mesófilo, pero contrariamente a lo que sucedía en el caso de PsTrx *f* no hay señal en las células del colenquima que rodean el haz vascular central (Fig. 31A y 31B). En raíz se detecta la presencia de ARN mensajero en las células del xilema y más débilmente en el floema. Además se observa que la señal se prolonga en el tejido vascular de las raíces secundarias (Fig 31D). La epidermis de la raíz mostró coloración azul (Fig 31E).

En los órganos reproductores de la planta de guisante también se ha observado señal (Fig. 31G), en los granos de polen (Fig. 31H), en el tapetum, en los óvulos y en el tejido conectivo. Las dos señales que aparecen en los granos de polen parecen estar localizados en la célula generativa y en la célula del “tubo” (tube cell), este último estará posteriormente involucrado en el proceso de formación del tubo polínico para llevar a cabo la polinización. A lo largo del desarrollo de la flor, la señal en los granos de polen desaparece progresivamente, mientras que en el centro del saco embrionario se intensifica la coloración (Fig. 31K, 31L y 31M). El tejido vascular de la flor también muestra señal ante la reacción de hibridación con la sonda Ma (Fig. 31I).

Las señales de hibridación fueron negativas cuando se utilizó la sonda en sentido para PsTrx *m1* en hojas (Fig. 31C), raíces (Fig. 31F) o flores (Fig.31J).

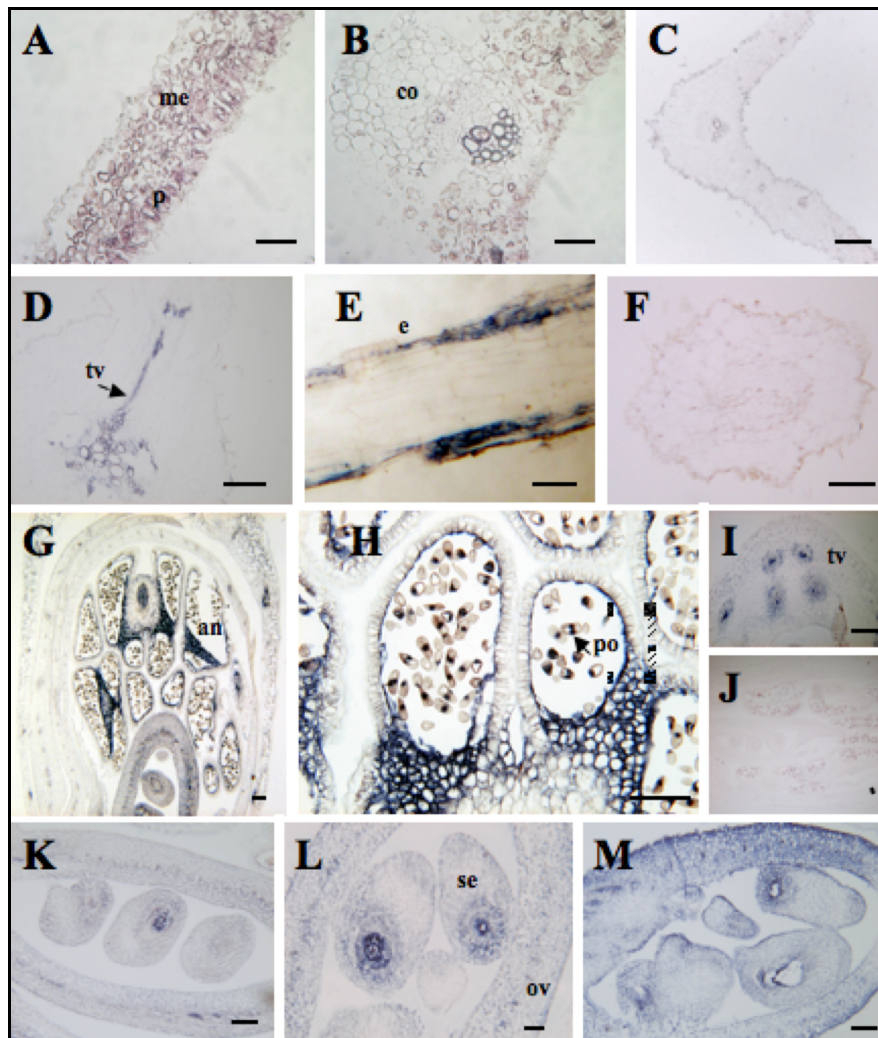


Fig. 31.- Resultados hibridación *in situ* utilizando como sonda Ma para PsTrx *m1* en diferentes tejidos de guisante: A y B) hoja, D y E) raíz, G) inflorescencia, H) sacos polínicos, I) tejido vascular, K, L y M) saco embrionario. C) hoja, F) raíz y J) inflorescencia tras hibridar con el control negativo para PsTrx *m1* Ms. Las barras indican 100 μ m. Anteras (an), colénquima (co), epidermis (e), mesófilo (me), ovario (ov), parénquima (p), polen (po), saco embrionario (se), tejido vascular (tv).

Del análisis histológico con GUS y de los resultados obtenidos por la técnica de hibridación *in situ* podemos destacar en primer lugar que se confirma la localización de ARNm para las Trxs *f* y *m1* cloroplastídicas en tejidos fotosintéticos tales como las hojas, así como en tejidos heterotróficos de raíz. El segundo dato más importante que habría que destacar de este estudio de localización tisular es que el ARNm de las TRXs cloroplastídicas de guisante se encuentran además de en tejidos no fotosintéticos en órganos florales en los que probablemente tengan una función aún no descrita.

A.7.- Estudios de expresión mediante RT-PCR.

Para confirmar los resultados de localización de las tiorredoxinas cloroplastídicas obtenidos en la técnica de hibridación *in situ* se llevó a cabo un análisis de expresión en distintos tejidos de la planta de guisante.

Para ello utilizamos la técnica de RT-PCR con el fin de detectar la presencia de ARNm de PsTrx *f* y PsTrx *m1* en los tejidos de hojas, semillas secas, grano, vaina, flores (estambres, pistilos y polen) y raíces. Asimismo se ha detectado la secuencia nucleotídica que codifica para ferredoxina tiorredoxina reductasa, PsFTR, que es la enzima que permite la reducción de las TRXs a través de la ferredoxina reducida. Esto ha permitido demostrar la presencia de esta proteína en tejidos heterotróficos y confirmar la existencia del sistema FTR/tiorredoxina en otros tejidos no fotosintéticos.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar secuencias del extremo 3' e incluyendo la región no transcrita de PsTrx *f*, PsTrx *m1* y PsFtr.

7.a.- Diseño de los oligonucleótidos para PsTrx *f* y PsTrx *m1*.

A partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas de las Trxs cloroplastídicas de guisante descritas hasta el momento se han elegido regiones específicas para cada una de las secuencias nucleotídicas y lo más cercanas al extremo 3' para aumentar la especificidad de los oligonucleótidos de cada una de las Trxs.

PsTrxm1	ATGGCC-----CTTGAGAGCTGTTTAAGAGTATC-CACACCAAGACCT----CA	45
PsTrxm2	ATGGCTACCGTACAACCTCGAATCCTTCTCCCTTATCCCTCTTCCCAACACCCACGTACA	60
PsTrxf	ATGGCT---CTAAATCTCTGCACCTCCCTAAATGGATC-GGCACCACCGTCTTCG-ATA	55
	***** ** * * * * * * * *	
PsTrxm1	TTG--TCTTCCTC-----CATTGTCTTCACTTCAAGGGAAA--AGCTTGTCTTTCACC	96
PsTrxm2	GTC--GCTTCCTC-----CCT---CTCCTGCCGCCCGATCGC--TGCTAGGTTTCTCCC	108
PsTrxf	GTGCTTCTTCATCGAAGCCATCACTTGCCTTCTTCTTTTCTACTACTTCATTTCTTCTT	115
	* **** * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	TCAAAAAGT---AGGATTCAAGAAAGCTTTGCTGA-ACTCAACA GTTTCACTTCGCTGGT	152
PsTrxm2	TACACCGTCTCAAGTACGACCACTCGCCGCTACTAGTTTGGGAGTCGATTCGCTGCT	168
PsTrxf	CCATTTTAT-----GTTCGAAGAGGGTTGGTCTA----CAGAGTTAAGCTTGAGGAGG	165
	* * * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	----- GTTGCT TTATAGAAAATCACGTTT-----TGTTCATGCTCGTGAAGCTGT	197
PsTrxm2	TCTAGAGTCGTTTCCCTCGCGGAGGAAGA-GTCC-----TGTGCGAGGCTCGAGATACTGC	221
PsTrxf	---AGTATCAGTGTCAAGTGAAGATCCAGCTTGAAACTGCGGGACCCACG-GTGACGGT	221
	* * * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	AAATGAAGTTCAAGTAGTGAAT---GACTCAAGCTGGGATGAACTTGTGATTTGGCAGTGA	254
PsTrxm2	TGTTGAAGTGGCTTCTATTACT---GATGAAATTTGGCAATCCCTTGTAATCGAATCCGA	278
PsTrxf	AGGGAAAGTAACCGAGGTCAACAAGGATACGTTTTGGCCCATCGTTAATGCCGCCGGTGA	281
	**** * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	AACACCTGTGCTTGTAGATTTTTGGGCACCATGGTGTGGTCCATGCAGAATGATAGCGCC	314
PsTrxm2	CACTCCAGTGTGGTTCGAATTTGGGCTCCATGGTGGTCCCTGCCAATGATGCATCC	338
PsTrxf	TAAAACCGTCGTCCTCGAT ATGTTTACCAAATGGTGTGGTCTTGCAAAGTGAATAGCTCC	341
	* * * * * * * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	TATAATTGATGAATTAGCCAAAGAGTATGCTGGAAAAATTAAGTGTACAAGCTCAACAC	374
PsTrxm2	CATAATTGACGAGCTGGCAAAGGAATATGTAGGTAAGTTCAAGTGTACAACTCAATAC	398
PsTrxf	ATTATACGAAGAATTATCTCAGAAGTAT--TTGGATGTTGTCTTTCTAAAGCTTGATTGC	399
	** ** * * * * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	AGATGAATCTCCAACACT--GCAACGAAGTATGGAATCAGAAGCATACTCAACTGTTCTG	432
PsTrxm2	TGATGAGAGTCCTTCAACT--GCTACTCGCTATGGGATTCGAAGTATCCAACCTGTCATC	456
PsTrxf	AACCAAGATAACAAGTCCTTGGCAAAAGAGCTAGGAATTAAGTGGTTCCTCACTTTTAA	459
	* * * * * * * * * * * * * * * *	
PsTrxm1	TTTTTCAAGAATGGAGAGAGAAAAGACAGTGTAATTGGTGCAGTTCCTAA GGCTACTCTG	492
PsTrxm2	TTCTTCAAGGATGGTGAAGAAAGATGCAATTATCGGTTCTGTACCCAAGGCATCATTC	516
PsTrxf	ATTCTGAAAGACAACAAGATTGTAAGAAGTAAGTGGTGTAAATTTGA---TGATTTG	516
	* * * * * * * * * * * * * * * *	

```

PsTrxm1      TCTGAGAAAGTGGAAAAGTATATTTGAtgcatgaactgagaagaaaagtgatactcttat 552
PsTrxm2      ATCACAACTATAGAAAAATTTCTGTGAGgtaacgaacaacaacaacaaaagcttcaac 576
PsTrxf       GTCGCTGCCATTGACA---CTGTTCGGTCTAGTTAGacagttataactattctctttc 573
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PsTrxm1      gacatgcattataaatatcagaaatgaatggaatgggatggaagaa-atgacaatagtgac 611
PsTrxm2      -----TGGAAAGTA-AAGATA----- 590
PsTrxf       ta-----tgtaaaaaatcatggtttgatac 598
              * * * * *

PsTrxm1      atgctgatttcatttatcccattcttttccatgtcattacaaggcaaaggtagttgtatct 671
PsTrxm2      -----tttttcccattagt---cacatctcatcaagccaattatgtcaagttt 635
PsTrxf       cctctgtaagatatttctactgtaattgtgagcttgctgaggggaagatgaggaatatca 658
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PsTrxm1      ttatcatcactata---tgtaagggttatgtttcaatctatggattcaacacatt--GAA 726
PsTrxm2      gaatggtttgtttt---cttaataatcatgaatggttctgtacagt-----tatg--gga 685
PsTrxf       taat-gttggtgtaagctgtaattgattgttccctatgtatagggcaaagttgctcaaaa 717
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PsTrxm1      taatccttgatattttcttt---tgtttttcatcattttgtaaagtttacattgga-TAA 782
PsTrxm2      tgcttccctattgttttttagatgatttatagtcactaatatgaccaatggtgaaatct 745
PsTrxf       taatctgttaccact-----tgatcatggactatctataaagggtggc-tcagattgc 769
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

PsTrxm1      acaaaacttctttcaaaaaa----- 802
PsTrxm2      actagtattttacaaaaaaaaaaaaaa 773
PsTrxf       taaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa----- 791
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. 32.- Alineamiento de las secuencias con ayuda del programa informático *CLUSTAL* de PsTrx *f* (X63537), PsTrx *m1* (X76262) y PsTrx *m2* (AJ316577). En rojo se resalta la pareja de oligonucleótidos utilizados en el caso de PsTrx *m1*, mientras que en azul se indican las secuencia de oligonucleótidos de PsTrx *f*. En minúscula, está la secuencia 3' UTR de cada secuencia.

La adecuación del diseño de los oligos elegidos se verificó con el programa de diseño de oligonucleótidos “*primer design*” disponible en la página web de Invitrogen en la dirección: <http://www.invitrogen.com/content.cfm?pageid=9716>. Las parejas de oligonucleótidos seleccionados por el programa han sido rtTrxFN/rtTrxFC para el caso de PsTrx *f* mientras que la pareja de oligonucleótidos rtTrxmN/rtTrxmC amplifica de forma específica un fragmento de PsTrx *m1*, cuyas secuencias se encuentran descritas en el capítulo de “Material y Métodos” y cuya posición se sitúa en la figura 32. El tamaño de las

secuencias nucleotídicas de las Trxs cloroplastídicas *f* y *m1* que se van a amplificar oscilan unos fragmentos con un tamaño de 365 pb y 375 pb respectivamente.

7.b.- Diseño de los oligonucleótidos para PsFtr.

Al no estar descrita la secuencia nucleotídica de FTR de guisante, se realizó una búsqueda en las bases de datos disponibles de las secuencias nucleotídicas que codifican para el mismo gen en especies de la misma familia de las leguminosas. Se localizaron las secuencias del gen en las especies de *Glicina max* (GB Y15076), *Medicago truncatula* (GB AC157489) y *Lotus japonicus* (GB BG662387). En estos dos últimos casos, las secuencias son fragmentos que pueden pertenecer a la subunidad catalítica de la proteína FTR de cada especie.

Las secuencias nucleotídicas se alinearon gracias al programa informático “*clustal*” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), y el resultado obtenido se muestra a continuación en la figura 33:

MtFtr	CACAGAAACACCATTTTCCCATTTCATAGCAGAAAACGAATTTACCAGCAATGACCTCTC	60
GmFtr	-----ATGACCACCC	10
LjFtr	-----GAATTCGGCACGAGCGGCCATGACCTCCC	29
	***** * *	
MtFtr	AAGCTTCAA CCTTCGCCGTC TCCGTT TCCTCCGCCCTTCCCCTCTCCGTGCGCGTCGCA	120
GmFtr	AAGCTTCCA CCTTCGCCGTCGCCGTT CCCTCCGTGCGCAACCCCTTCCGCCGCCACCGGA	70
LjFtr	AAGCTTGCT CCTTCGCCGTCACCGTT CCCTCCGTTGCCTCCCCTCTCCGGCGCCACCGCA	89
	***** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *	
MtFtr	CCTTCCCCGTTGTTTCGAGCTCAATTGGAACCATCTGATAAATCAGTTGAAATTATGCGGA	180
GmFtr	ATCCCTTCGTTGTTTCGAGCCCAAGCGGAACCTTCAGATAAATCCGTTGAAATTATGAGGA	130
LjFtr	ATCTCCACGTTGTTCCGAGCTCAAGTGAACCATCAGAAAAATCTATTGAAATTATGAGGA	149
	* ***** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *	
MtFtr	AGTTCTCAGAGCAATATGCCCGTAAATCAGGAACGTTCTTTTGTTCGGACAAAGGAGTAA	240
GmFtr	AGTTCTCAGAGCAATACGCCCGTAAAGTCAGGAACATACTTTTGTGTTGACAAGGGGGTCA	190
LjFtr	AGTTCTCAGAGCAATATGCCCGTAAATCAGGAACATACTTTTGTGTTGACAAGAGTGTTA	209
	***** ***** ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *	

```

MtFtr      CTGCTGTTGTTATCAAGGGTCTGGCTGACCATAAAGATTCATTGGGTGCACCACTCTGCC 300
GmFtr      CTTCTGTTGTTATCAAGGGGTTGGCTGACCATAAAGATACGTTGGGTGCACCACTGTGCC 250
LjFtr      CTTCTGTTGTTATCAAGGGGTTGGCTGACCATAAAGATTCATTGGGTGCACCACTGTGTC 269
          ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MtFtr      CTTGCCGGCATTACGACGATAAAGCTGCTGAGGCTGCGCAAGGATTTTGAATTGCCCGT 360
GmFtr      CTTGCCGGCATTACGATGATAAAGCTGCTGAGGTTGCACAAGGATTTTGAATTGCCCGT 310
LjFtr      CTTGCCGGCATTATGATGATAAACCTGCTGAGGCGCAACAGGGATTTTGAATTGCCCGT 329
          ***** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
MtFtr      GTGTTCCCATGAGAGAGAGAAAGGAGTGCCATTGCATGCTTTTCTCACTCCTGATAACG 420
GmFtr      GTGTTCCCATGAGAGAGAGGAAGGAGTGCCACTGCATGCTATTTCTCACACCTGATAACG 370
LjFtr      GTGTTCCAATGAGAGAGAGGAAGGAGTGCCA----- 360
          ***** ***** *****

```

Fig. 33.- Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la subunidad catalítica de Ftr de leguminosas: *Glicina max* (GB Y15076), *Medicago truncatula* (GB AC157489) y *Lotus japonicus* (GB BG662387). En **naranja** se resalta las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para aislar la secuencia de FTR de guisante.

Las regiones que se eligieron para el diseño de los oligonucleótidos destinados a aislar parte de la secuencia nucleotídica que codifica para PsFtr se ha resaltado en naranja en la figura 33.

El aislamiento de un fragmento de la secuencia nucleotídica que codifica para la enzima FTR de guisante se realizó a partir de la amplificación del ADNc utilizando los oligonucleótidos específicos PsFTR-N/PsFTR-C. La extracción de ARNm de hojas de guisante y la síntesis del ADNc se llevó a cabo siguiendo los protocolos descrito en el capítulo “Materiales y Métodos”. El resultado de la PCR fue un único fragmento de 322 pb, que se subclonó en el vector pGEM-T®easy.

La secuencia nucleotídica que se ha obtenido se comparó con la secuencia nucleotídica de *G. max* en el siguiente esquema:

```

GmFtr      ATGACCACCCAAGCTTCCACCTTCGCCGTGCGCGTTCCCTCCGTGCAACCCCTTTCCGC 60
PsFtr      -----CCTTCGCCGTCTCCGTTTCTTCTATCGCATCCCCCTCTCCGG 51
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
GmFtr      CGCCACCGGAATCCCTTCGTTGTTTCGAGCCCAAGCGGAACCTTCAGATAAATCCGTTGAA 120
PsFtr      CGCCGCCGCAACTTCCCGTCTACGCGCTCAAGTGAACCATCTGATAAATCAATTGAA 111
          **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

GmFtr      ATTATGAGGAAGTTCTCAGAGCAATACGCCCGTAAGTCAGGAACATACTTTTGTGTTGAC 180
PsFtr      ATTATGAGGAAGTTCTCAGAGCAATATGCCCGCAAATCAGGAACATACTTTTGTGTTGAC 171
           ***** ** *****

GmFtr      AAGGGGGTCACTTCTGTTGTTATCAAGGGTTGGCTGACCATAAAGATACGTTGGGTGCA 240
PsFtr      AAAGGAGTAACTTCTGTTGTTATCAAGGGTTGGCTGACCATAAAGATTCATGGGTGCA 231
           ** ** * ***** * *****

GmFtr      CCACTGTGCCCTTGCCGGCATTACGATGATAAAGCTGCTGAGGTTGCACAAGGATTTTG 300
PsFtr      CCACTGTGCCCTTGCCGGCATTACGACGATAAAGCTGCCGAGGCTGCACATGGATTTTG 291
           ***** ***** * * * * *

GmFtr      AATTGCCCTTGTGTTCCCATGAGAGAGAGGAAGGAGTGCCACTGCATGCTATTTCTCACA 360
PsFtr      AATTGCCCTTGTGTTCCCATGAGAGAGAGGAAGGAGTGCCA----- 332
           ***** *****

```

Fig. 34.- Alineamiento que compara la secuencia nucleotídica obtenida para Ftr de guisante frente a la secuencia de *Glicina max*.

Como se puede observar en la figura 34, los oligonucleótidos PsFTR-N/PsFTR-C amplificaron de forma específica una secuencia nucleotídica que es semejante a sus homólogas en leguminosas. En lo que respecta a la secuencia aminoacídica, se ha comprobado que la homología corresponde a un 95 % con respecto a la secuencia aminoacídica de GmFTR (Fig. 35).

```

PsFTR      -----FAVSVSSIASPLRNRNFVVRQAQVEPSDKSIEIMRKFSEQYARKSGTYFCVD 53
GmFTR      MTTQASTFAVAVPSVATPFRHRNPFVVRQAQVEPSDKSVEIMRKFSEQYARKSGTYFCVD 60
           ***:*:*:*:*:*:* *****:*****

PsFTR      KGVTSVVIKGLADHKDSLGAFLCPCRHYDDKAAEAHGFWNCVPMRERKEC----- 106
GmFTR      KGVTSVVIKGLADHKDTLGAFLCPCRHYDDKAAEVAQGFWNCVPMRERKECHCMFLT 120
           *****:*****:*:*****

```

Fig. 35.- Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FTR de *Glicina max* y FTR de *Pisum sativum*.

7.c.- Patrón de expresión en tejidos de guisante

Para analizar el patrón de expresión de los diferentes tejidos de guisante, se han utilizado muestras de hojas, tallo y raíces de plántulas de tres semanas de edad después de iniciar la germinación. En el caso de las flores (óvulos, estambres, pistilos y polen) se dejaron crecer las plántulas de

guisante durante 2 meses hasta obtener los botones florales. Se eliminaron los sépalos y pétalos para utilizar solo los órganos sexuales (óvulo, estambres, pistilo y estigma) de la planta. Finalmente, las semillas se tomaron directamente de la caja comercial y se pusieron en agua durante un día antes de macerar. Todo el material vegetal se congeló rápidamente en nitrógeno líquido, salvo en el caso de las semillas. La extracción del ARN y la síntesis de la hebra de ADNc de cada una de las muestras se realizaron siguiendo el protocolo de “Borato Caliente” descrito en el capítulo de “Materiales y Métodos”. Se ha utilizado la pareja de oligonucleótidos PsACT-F/PsACT-R, obteniendo un fragmento de 495 pb perteneciente al gen de β -actina de *Pisum sativum* (X67666), como control de la síntesis de ADNc. A continuación se procedió al análisis de las muestras de los tejidos amplificando los fragmentos de PsTrx *f*, PsTrx *m1* y PsFtr utilizando las parejas de oligonucleótidos específicas descritos anteriormente y el ADNc obtenido anteriormente para cada tejido.

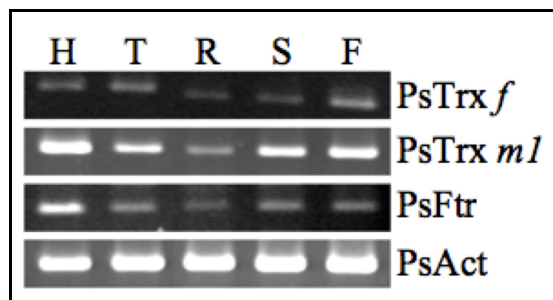


Fig. 36.- Estudio de expresión por RT-PCR en diferentes tejidos de guisante: hojas (H), tallo (T), raíces (R), semilla (S), y flores (F) para los genes PsTrx *f*, PsTrx *m1*, PsFtr y PsAct.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 36 y se observa que hay expresión de ARN de las TRXs en todos los tipos de tejidos, siendo esta mayor en los tejidos fotosintéticos como son hojas, tallos y semillas. Además, se aprecia expresión de ambas tiorredoxinas cloroplastídicas en

raíces y en flores. Hay que indicar que la expresión en raíces es menor que en cualquier tejido, probablemente debido a que es un tejido heterotrófico. En todos los tejidos ensayados se observa la presencia de transcritos para FTR, en este caso de nuevo con menor cantidad en las raíces. Así se ha comprobado que además de la presencia de las TRXs cloroplásticas *f* y *m1* en los tejidos no fotosintéticos, se encuentra, el sistema más utilizado por las plantas para regenerar la actividad catalítica de las TRXs.

A.8.- Estudios de expresión mediante western blotting.

8.a.- Preparación y titulación de los anticuerpos anti-TRX *f* y anti-TRX *m1* de guisante.

Además de confirmar la presencia de la expresión del mensajero de ambas tiorredoxinas cloroplásticas en los distintos tejidos estudiados, es importante poder comprobar igualmente la existencia de la proteína de cada una de las TRXs cloroplásticas en los diferentes tejidos descritos. Para ello, se ha llevado a cabo a una inmunodetección mediante *western blot* de las diferentes TRXs cloroplásticas en diferentes tejidos de guisante.

Para la obtención de anticuerpos policlonales frente a las TRXs *f* y *m1* cloroplásticas de guisante, en primer lugar se han obtenido las proteínas recombinantes correspondientes por sobreexpresión de dichas proteínas en *E. coli*. Los anticuerpos fueron preparados en el Centro de producción y Experimentación Animal de Sevilla gracias a la inoculación de varias dosis de las proteínas purificadas a los conejos.

El título de cada uno de los sueros se determinó preparando diluciones seriadas que iban desde 1:200 hasta 1:10000 tanto del anticuerpo específico frente a cada una de las TRXs como de cada uno de los sueros preinmunes correspondientes.

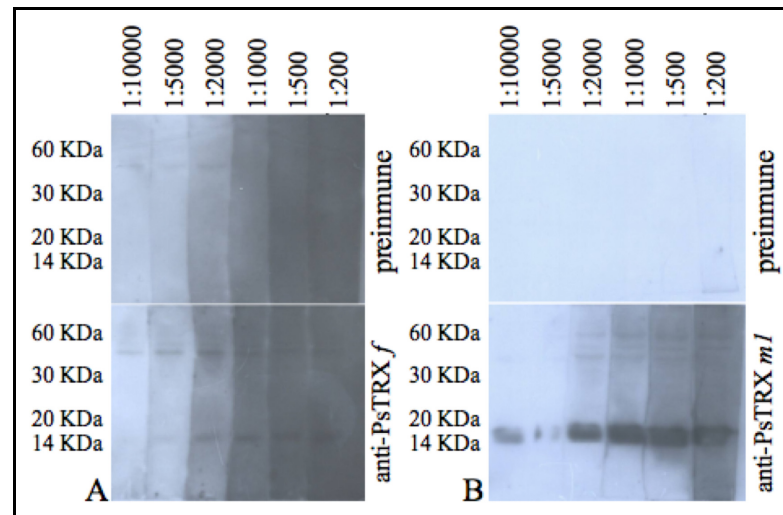


Fig. 37.- Western blot mostrando las diferencias en la detección entre el suero policlonal y el suero preinmune: A) en el caso de la PsTRX *f* y B) en el caso de PsTRX *mI*. En la parte superior de cada dibujo se presenta la dilución utilizada del anticuerpo.

Como se comprueba en la figura 37, los sueros preinmunes no dieron reacción de reconocimiento con las TRXs. Sin embargo, si se puede observar una señal en torno a 50 KDa en la figura 37A que no va a interferir con la señal de las TRXs. En cuanto a los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas han originado una única banda a la altura esperada del tamaño de las TRXs (12-14 kDa). Finalmente se ha definido la dilución de trabajo más adecuada para nuestros estudios a 1:3000 para ambos anticuerpos.

A continuación, se realizó un “dot blot” para comprobar la especificidad de estos anticuerpos frente a otras isoformas de las TRXs y la

sensibilidad de los propios anticuerpos (Fig. 38). Para ello se dispuso en una membrana de nitrocelulosa una serie de gotas con cantidades decrecientes de cada una de las proteínas cloroplastídicas TRX *f* y TRX *m1* purificadas, así como de las TRXs citosólicas TRX *h1* y TRX *h2* procedente de nuestro laboratorio y las proteínas TRX *h3* y TRX *h4* donadas por el laboratorio de la Dra. Montrichard, todas ellas de guisante. Luego se ha enfrentado cada una de las proteínas con los distintos anticuerpos obtenidos contra PsTRX *f* y PsTRX *m1* y se ha comprobado como el anticuerpo frente a TRX *f* es específico para esta isoforma y es capaz de detectar hasta 3,12 ngr de esta proteína y sólo reconoce levemente a PsTrx *h2* y PsTrx *h3* a partir de 100 ngr de éstas proteínas, mientras que en el caso del anticuerpo frente a TRX *m1* es capaz de detectar la proteína con una sensibilidad similar a la anterior, y sólo reconoce a PsTRX *f* en presencia de elevadas cantidades de TRX *f*, así se observa una reacción débil a partir de 50 ngr de proteína.

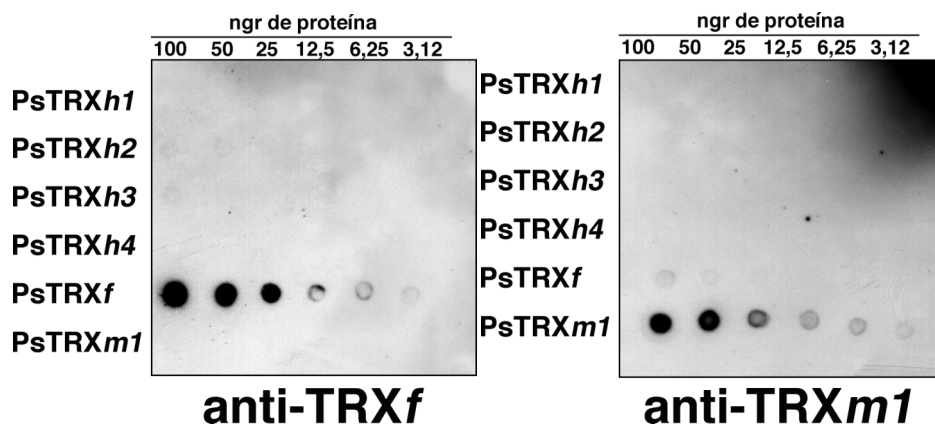


Fig. 38.- Especificidad de cada uno de los anticuerpos de cada TRXs cloroplastídica hacia el resto de las TRXs cloroplastídicas y citosólicas de guisante. La dilución utilizada de cada anticuerpo ha sido 1:3000 para cada anticuerpo.

8.b.- Patrón de expresión en diferentes tejidos de guisante de PsTRX *f* y PsTRX *m1*.

Extractos proteicos de semilla, flores, hojas, raíces y vainas se utilizaron en una electroforesis en gel de acrilamida SDS-PAGE al 15 % y transferidos a dos membranas de nitrocelulosa. Cada una de ellas fue incubada con una solución que contenía cada uno de los anticuerpos policlonales anti-TRX *f* y anti-TRX *m1* a una dilución 1:3000 en TBS.

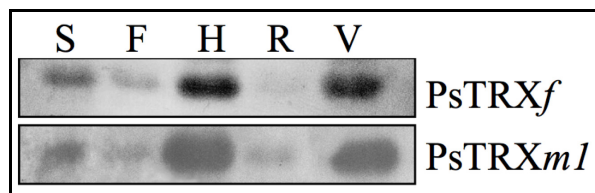


Fig. 39.- Detección de las proteínas PsTRX *f* y PsTRX *m1* en diferentes tejidos de planta de guisante, semilla (S), flor (F), hojas (H), raíces (R) y vaina (V).

Tras el revelado mediante quimioluminiscencia y posterior exposición en la placa fotográfica se observa una mayor cantidad de proteína de TRX *f* y *m1* en hojas y vainas, y en menor cantidad en semillas y flores, existiendo una señal más débil en raíces.

B.- REGULACION POR LUZ.

Para comprobar el papel que la luz ejerce en la expresión de las proteínas TRX *f* y TRX *m1* de guisante en primer lugar se ha optado por estudiar los niveles de transcritos de cada una de las proteínas a lo largo de dos días en las que se han ido recolectando muestras a distintos tiempos. El fotoperiodo durante el primer día fue de 12 h luz/ 12 h oscuridad, manteniéndose la luz continua durante el segundo día.

B.1.- Niveles de expresión de PsTrx f y PsTrx m1.

En trabajos anteriores llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, se ha confirmado que los niveles de expresión de los ARNm de las Trxs están relacionadas con la luz, describiéndose que estos eran mayores durante el periodo de luz que durante la noche (Pagano, E.A., y cols. 2000). Pero no se ha definido si esa relación entre la luz y la expresión de las TRXs cloroplastídicas es directa o está mediada a través de un reloj circadiano como ocurre con numerosos genes relacionados con la fotosíntesis, lo que permite optimizar el proceso de desarrollo de la planta (Dodd, A.N., y cols. 2005).

Así, se decidió estudiar los niveles de transcritos de PsTrx *f* y PsTrx *m1* mediante *Northern Blot* en el que se utilizaron 15 µg de ARN total de cada una de las muestras tomadas cada tres horas durante 2 días consecutivos con un fotoperiodo de 12 horas de luz y otras doce horas de oscuridad el primer día, durante el segundo día, la iluminación fue continua.

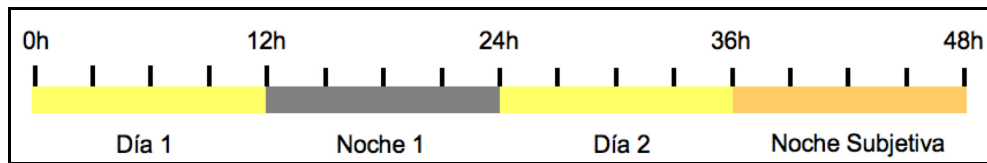


Fig. 40.- Esquema de la toma de muestras en el estudio de expresión por ciclo circadiano de las Trxs cloroplastídicas de guisante.

1.a.- Síntesis de las sondas.

Además de sintetizar las sondas para cada una de las cadenas que codifican para las Trxs cloroplastídicas, se preparó una sonda control a partir del gen PsCab (AY845253), ya que se sabe que es una proteína cuya expresión está bajo el control del ciclo circadiano.

El ARN extraído de hojas de guisante se sometió a una reacción de RT-PCR utilizando los oligos específicos TrxfbN/TrxfbC, TrxmN/TrxmbC y Cab1/Cab2 para obtener los fragmentos de ADNc que corresponde a las regiones que codifican para las proteínas de interés PsTrx *f*, PsTrx *m1* y PsCab. Los fragmentos obtenidos se purificaron del resto de la reacción de PCR mediante una extracción fenólica (Apartado B.8.- de Materiales y Métodos), resultando tres fragmentos de una longitud de 565 pb para el caso de PsTrx *f*, 535 pb para PsTrx *m1*, y de 511 pb para PsCab.

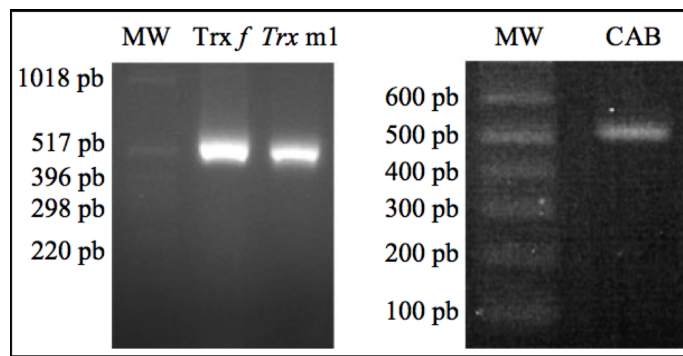


Fig. 41.- Se muestra el resultado de la purificación en gel de agarosa al 1,2 % de los fragmentos de PsTrx *f*, PsTrx *ml* y PsCab, tras amplificación por PCR, que han sido utilizados para la síntesis de las sondas en los experimentos de *Northern Blot*.

Una vez obtenidos los fragmentos que codifican para cada uno de los genes de interés, se marcaron las sondas mezclando 25 ngr de las mismas y 20 μ Ci de dCTP- α^{32} P en un vial de reacción REDIPRIME II (GE Healthcare) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las sondas se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

El resultado de la hibridación mediante la técnica de *Northern Blot* para el caso de PsTrx *f*, PsTrx *ml* y PsCab fue el siguiente:

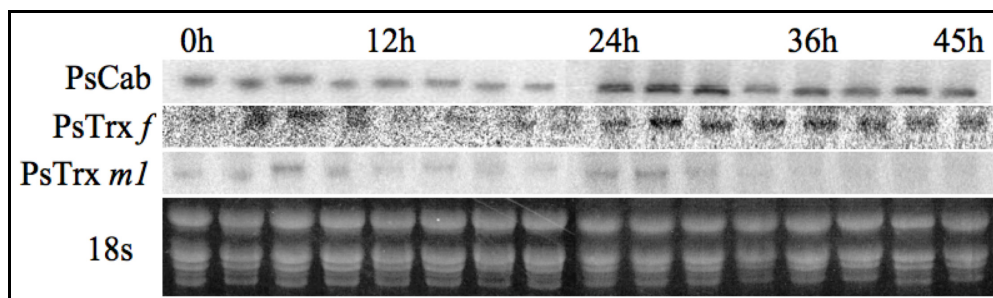


Fig. 42.- Resultado del estudio mediante *Northern Blot* de la expresión de los genes PsTrx *f*, PsTrx *ml* y PsCab a lo largo del experimento. Las bandas de 18s indican la cantidad cargada en el gel de cada muestra.

Las bandas obtenidas en la reacción de *Northern Blot* se cuantificaron y el resultado ha sido el siguiente:

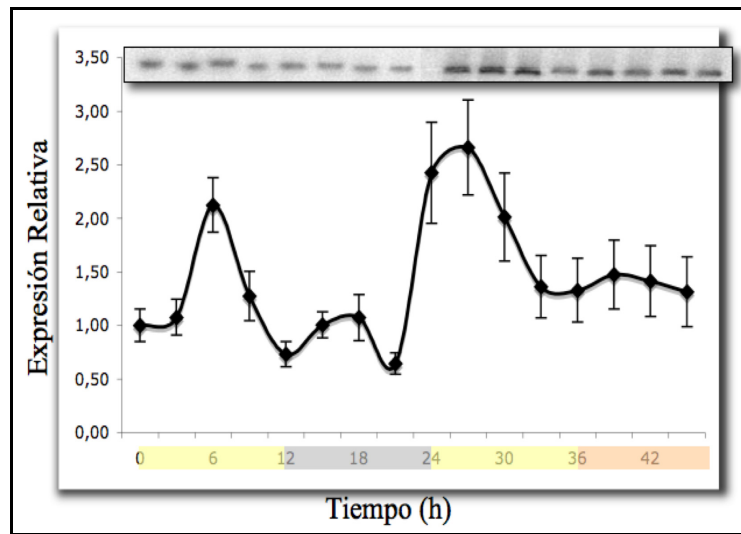


Fig. 43.- Esquema que representa la oscilación a lo largo del experimento del gen PsCab. En la parte superior se indica el resultado del *Northern Blot*, mientras que en la parte inferior se representa con colores las condiciones de iluminación.

Como se puede observar en la figura 43, a lo largo del fotoperiodo el gen *cab* mostró una expresión de su ARN mensajero oscilante, cuyo pico de máxima acumulación se encuentra en la mitad de la fase luminosa para descender en el periodo de oscuridad e iniciar el aumento de nivel al final del mismo periodo de oscuridad para volver a alcanzar un máximo hacia la mitad de la fase luminosa. Durante la noche subjetiva la expresión del gen *cab* decrece. Estos datos indican que *cab*, como ya se había comprobado en otros estudios, está regulado por el reloj circadiano y que los datos que resulten del análisis de la expresión de las Trxs son válidos, al ser *cab* un buen control de la evolución del experimento (Kloppstech, K. 1985; Kellmann, J.W., y cols. 1993).

1.b.- Niveles de expresión de ARNm y proteínas de PsTRX *f* y PsTRX *m1*.

Además de la determinación de los niveles de expresión de los transcritos, se determinó el contenido de proteína a lo largo del fotoperiodo ya que permite determinar posibles modificaciones post-transcripcionales. Para ello se procedió a tomar muestras en las mismas condiciones y en los mismos tiempos que para el estudio de expresión de ARN. Los resultados obtenidos coincidieron con los resultados obtenidos en los estudios mediante *Northern Blot*, en los cuales se alcanza un máximo de expresión en mitad del periodo de luz, y manteniendo la oscilación durante el periodo de noche subjetiva, en mitad de la cual, el nivel de expresión es mínimo.

Como se observa en la figura 44A, la cantidad de ARNm para PsTrx *f* varía a lo largo del periodo de día y noche aumentando durante la primera fase hasta la mitad del periodo de luz con un pico de expresión a las 6 horas, momento en el cual empieza a disminuir hasta un nivel basal durante el periodo de oscuridad. Los niveles de expresión aumentan en el periodo de luz del segundo día del experimento, alcanzando un máximo entre las 30 y 36 horas coincidiendo de nuevo en la mitad de la fase luminosa, a partir de ese momento vuelve a disminuir en la fase de noche subjetiva.

Este patrón oscilatorio se repite cuando se analiza el contenido de proteína TRX *f*. En este caso los máximos se detectan en los periodos de luz a 6 y 36 horas de las fases de luz para llegar a unos niveles mínimos durante la fase oscura o la fase de noche subjetiva.

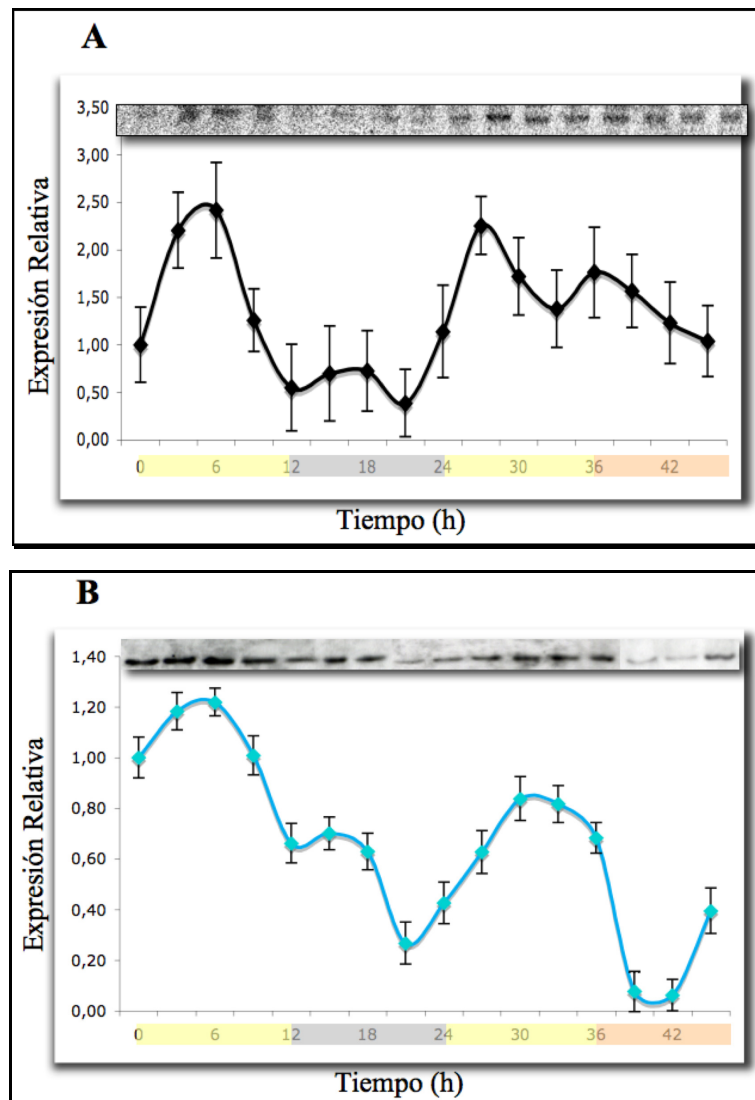


Fig. 44. Figura que representa los niveles A) de transcritos de PsTrx.f y B) de proteína de PsTRX.f durante el experimento de ciclo circadiano. En la parte superior de cada figura se expone la señal obtenida para cada muestra en el experimento de *Northern Blot* y *Western Blot*, respectivamente. En la parte inferior de las figuras, se representa con color las condiciones de iluminación de cada periodo del experimento.

En el estudio de la expresión de PsTrx *m1* se ha comprobado que mantiene la misma respuesta oscilatoria observada en el caso de PsTrx *f*. Alcanza un máximo de expresión durante los periodos de luz, a las seis horas en la primera fase y entre las 28 y 30 horas de la segunda fase de luz, para disminuir y mantener unos niveles bajos durante el periodo de oscuridad y noche subjetiva.

El efecto oscilatorio del contenido de proteína TRX *m1* se mantiene igualmente a lo largo del fotoperiodo establecido, con unos máximos de síntesis de proteína a las 6 horas y 30 horas del periodo de iluminación.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la expresión de ARNm y la síntesis de proteína de ambas PsTrx cloroplastídicas comparten una regulación por luz mantenida por la oscilación del reloj interno de la propia planta de guisante.

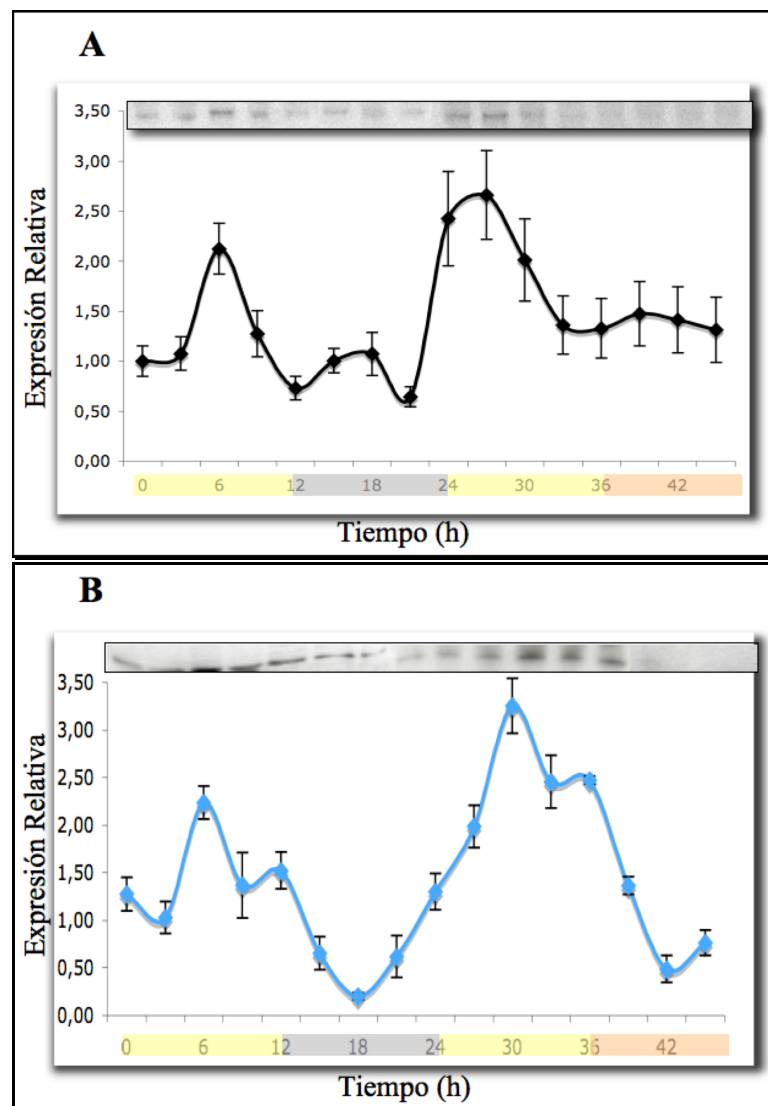


Fig. 45.- Figura que representa los niveles A) de transcritos y B) de proteínas de PsTrx *m1* durante el experimento de ciclo circadiano. En la parte superior de cada esquema se presenta la señal obtenida para cada muestra en el experimento de *Northern Blot* y *Western Blot*, respectivamente. En la parte inferior de los esquemas, se representa con color las condiciones de iluminación de cada punto del experimento.

B.2.- Papel de los elementos cis de las regiones de los promotores implicados en la regulación por luz de PsTrx f y PsTrx m1. Especificidad en la unión del factor de transcripción CCA1 y los elementos reguladores.

2.a.- Estudios *in silico* de las secuencias reguladoras de PsTrx f y PsTrx m1.

Como se ha indicado en el capítulo anterior, las bases de datos de los elementos reguladores han revelado que los que están implicados en la regulación de los genes a través de la luz son los más numerosos en las secuencias promotoras aisladas para ambos genes de Trx. El análisis también identificó un elemento conocido como “Evening Element”, que está implicado en la regulación de la expresión por luz bajo el ciclo circadiano (Harmer, S.L., *y cols.* 2000). La secuencia de este elemento es AGATATT, y se sabe que el factor de transcripción CCA1 se une a él induciendo la expresión de los genes que alcanzan un máximo de expresión hacia el final del periodo de luz.

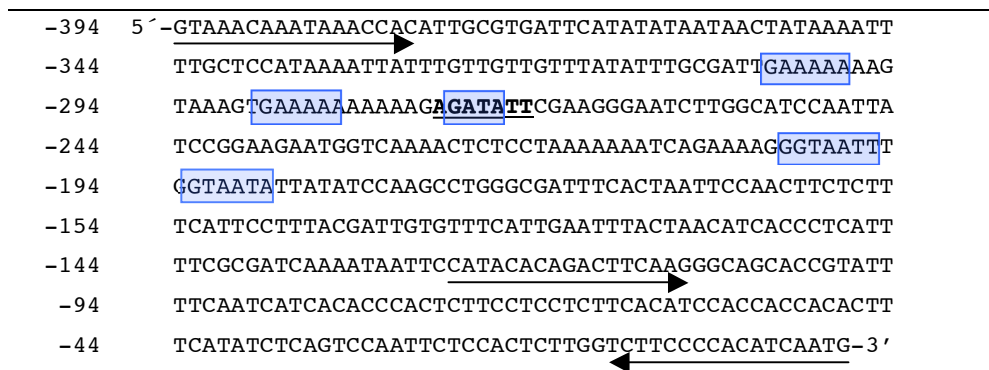
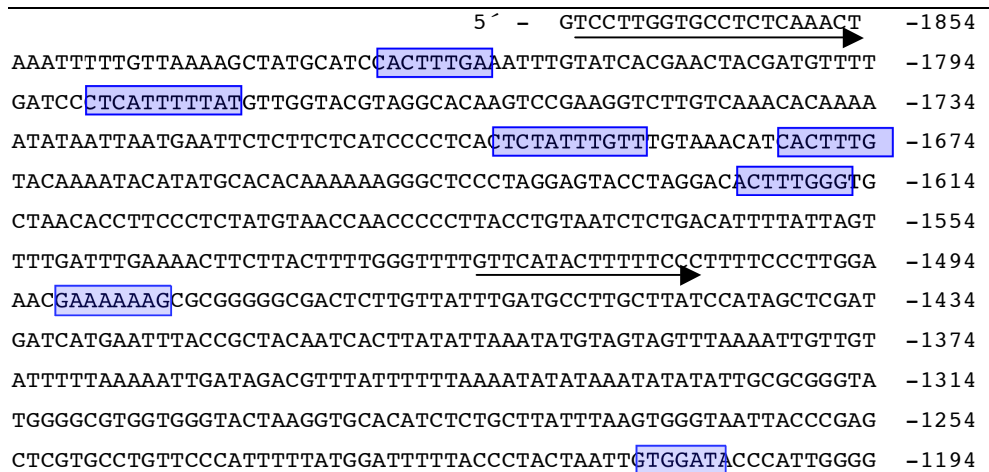


Fig. 46.- Secuencia promotora aislada para PsTrx *f*. Las cajas en color azul resaltan los elementos reguladores relacionados con la luz según la base de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita y subrayado** se resalta el elemento “Evening Element” relacionado con el ciclo circadiano encontrado en el promotor de PsTrx *f*. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en la obtención del fragmento entero y truncado del promotor de PsTrx *f*.

En el promotor de PsTrx *f* el se ha localizado un solo EE la posición -326 pb. Sin embargo, al ser más larga la secuencia reguladora de PsTrx *ml* no ha sido sencillo delimitar las regiones importantes relacionadas por la luz en base a los resultados obtenidos *in silico* ya que en ella se encuentran numerosos elementos relacionados con la expresión con la luz. Los EE se han detectado en la posiciones -823 pb.



ATGAGTCAAACATCATCCTTAGAAGTAAGAAACATAAACACAAATATAAATAGAGAAAT -1134
 TC**CAGATTTT**GTTATTCATATTAAGGGTTTGGATTT**GAAAT**TGGATTACACGCAGAGAG -1074
 TAAAAACCAGACGAAACGTCAACCTTAATCCTCAATTGTCCCAATTTTATACCAATTTAA -1014
 GTAGGAATTACATTTTTATTG**GATA**TAACTAATGTAGCTTAACTATAATCTATTAAGCT -954
 ATTAAGGAGTTACGTGTATAAAAAATCATAAAAAGTTAA**GATA**TGAGAACTTATCAAAT -894
 ATGAGAGACGAATGTGCTTAATTTGAAGGCGTAGAAGTTGATGAAGTATTTGATTTGAAT -834
 GAACATAAGT**GATAT**TGAAAGCA**AGATT****CAAAAA**ATGTTTGATTCAAATGAGCGAGAG -774
 TTTTGCTCTGCTCTTGAGAGAAAGTTAAGAAGTTGGTTTCAAAGTAATGGAATGTGGAGG -714
GAAAGATTGTATATGCACACTCGAATAAATGTGCATAATATTAACATTCGAAGGTTGAA -654
 TCTGGGATTTCCAATCTTTGAACTGATTTTTTTACTTGTATTTGCCGTGTTTGCTAAGAT -594
 GGAGTTTGGTTGTGATTAAAAATGAATTTAAATTTCAATGCTCCGGACTTATTTTTTACTT -534
 CTATTTCCACATGTTTCTG**GATA**GAGTTTGTGTTTAGGGTACATTTCTGATTTTATTTTT -474
AGATTTTAAGAAATATTTTTAAAAATCCGTTATGGTGAATGAGTAATATATGAGGTGCAAT -414
 AAACAATGTTCAATAAAAATCAAGAAATCCTCACCAATTTACTATGTAATAAATTAACAAGAA -354
 CAACATGATCAAACCTTTCAAACCTAGATCCAATAGTTAATGAATTTTAACTAAATAATT -294
 AAATTCAAATAGTCAATAAACTTTTCATTAAGCTCGCATAAAGAGTTTCTAAATTTGATC -234
 TCTATTTTTAAATCTAATTTGTAAAGTTTTATTACACCTCCCTACTAAAATGTGAAACA -174
 AAACCCCCAGAGAAGAGAAGAGGATTTTG**GATAG**TGTGGAGAA**GTACTT**TTTAGTGGG -114
 GACAGAAAGGAGAGAGAGGATTGAAAACCTAAATAACATCCACATGAATCCAAGCCATCT -54
 CATAACCTCACAATCTCAAATAATATCCAGTTACAACACACTTACAATTTCA**T**CATAC ⁺¹
 CCAACAAATTA AAAACCGCCACAACACT**AGA**GCTTATCCACAACAAGTGCTGAAAACCC +7
 TCCCT**TCATTTT**CCCCAAACTATTCAGTAGAGTTACATACAC**AGAAAA**TAAC**ATG** - 3' +112

Fig. 47.- Secuencia promotora aislada para PsTrx *mI* . Las cajas en color azul resaltan los elementos reguladores relacionados con la luz según la base de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita y subrayado** se resaltan los elementos “Evening Element” y CBS (en las posiciones -1131 pb, -809 pb, -710 pb y -473 pb) relacionados con el ciclo circadiano encontrado en el promotor de PsTrx *mI*. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en la obtención del fragmento entero y truncado del promotor de PsTrx *mI*.

2.b.- Selección de plantas transformadas.

Siguiendo las indicaciones descritas anteriormente en esta tesis, se han seleccionado al menos dos líneas transgénicas diferentes de *A. thaliana*

que contienen cada una de los fragmentos de los promotores de distinto tamaño de PsTrx*f* y PsTrx *mI*.

En el apartado anterior de “Resultados” (Ver apartado A.4.-), se ha descrito la selección de estas líneas transgénicas.

2.c.- Estudio de los niveles de expresión de ARNm de GUS.

Con el fin de determinar los elementos responsables del control por la luz de la expresión de PsTrx *f* y de PsTrx *mI*, se han utilizado las líneas transgénicas con las secuencias promotoras completas y delecionadas para delimitar las regiones implicadas en esta regulación. Las plantas de *A. thaliana* se recogieron en la mitad del periodo de luz, es decir a las seis y 20 horas de iniciarse la fase luminosa, a las seis horas de iniciarse el periodo de oscuridad, y a mitad del periodo de noche subjetiva. En estos tiempos se sabe que las proteínas en estudio alcanzan el máximo y el mínimo en los niveles de expresión de ARNm y de proteínas, como se ha podido ver en los experimentos anteriores.

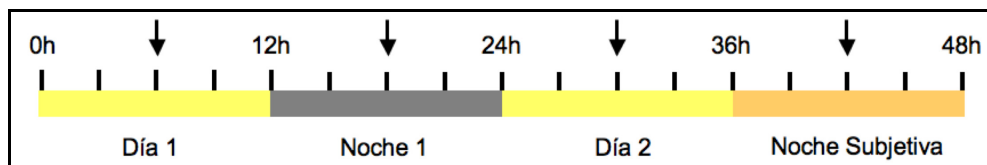


Fig. 48.- El esquema muestra, con flechas, las horas, a lo largo del experimento, en las que se han recolectado las muestras de las plantas transgénicas de *A. thaliana* que contienen las diferentes construcciones de las secuencias de los promotores, enteros o truncadas, fusionados al gen GUS.

Las muestras recolectadas se procesaron macerándolas con nitrógeno líquido y se extrajo el ARN total mediante el método de Borato Caliente. A continuación se sintetizó la hebra de ADNc y se analizó la expresión del gen

β -Glucuronidasa en cada una de las líneas de plantas transgénicas a lo largo del experimento por RT-PCR:

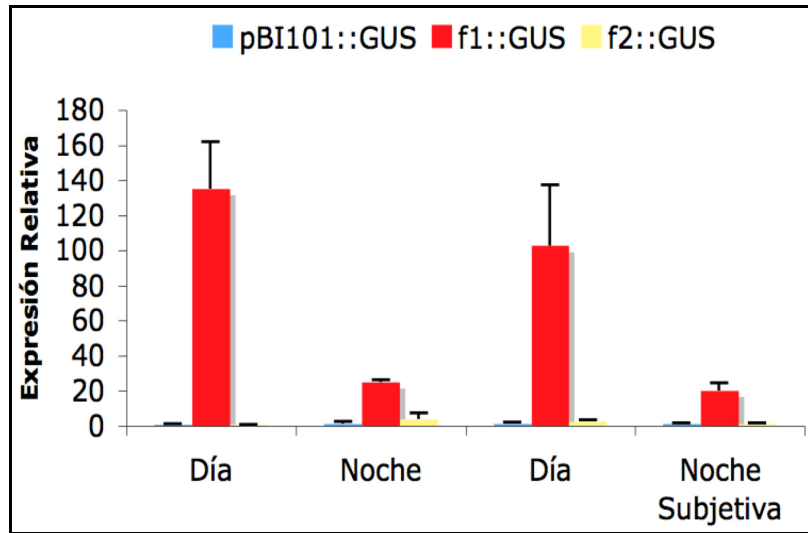


Fig. 49- Cuantificación de la reacción de RT-PCR sobre las diferentes líneas transgénicas en relación a la secuencia promotora de PsTrx *f*.

Como se observa en la figura 49, las plantas transgénicas que contienen la construcción control (sólo el plásmido pBI101::GUS sin secuencia reguladora) han mostrado unos niveles de expresión basales mínimos. Con la construcción PsTrx *f* (f1::GUS) los niveles máximos de expresión alcanzados ocurren en las muestras recolectadas en la mitad de la fase de luz, mientras que en el periodo de oscuridad y de noche subjetiva los niveles decayeron de 5 a 7 veces con respecto a la fase lumínica. Se puede comprobar además, que en el periodo de noche subjetiva la expresión es idéntica al periodo de oscuridad, corroborando la regulación por ciclo circadiano del gen β -glucuronidasa bajo el control de la secuencia reguladora de PsTrx *f* aislada. Esta regulación por luz se pierde en las plantas que llevan la secuencia reguladora delecionada (f2::GUS), y cuyos

niveles de expresión son semejantes durante el día y la noche y similares a los exhibidos por las plantas transgénicas con la construcción pBI101::GUS control.

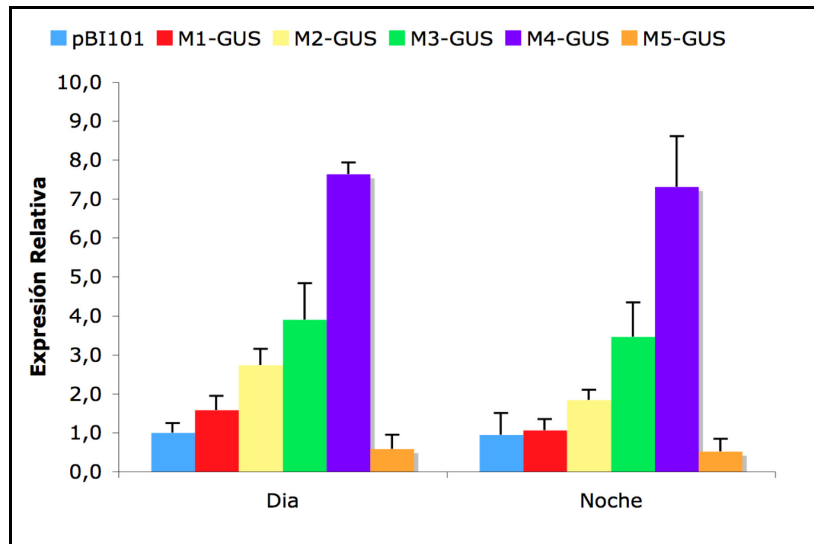


Fig. 50.- Cuantificación de la reacción de RT-PCR sobre las diferentes líneas transgénicas en relación a la secuencia promotora de PsTrx *m1*.

En el estudio de las plantas transgénicas que llevan la secuencia del gen β -glucuronidasa bajo el control de las regiones promotoras de PsTrx *m1* entera o truncada de forma seriada solo se pudieron analizar las muestras recolectadas a las 6h y 18h, correspondientes al periodo de día y de noche respectivamente. Se observa que los niveles de expresión de *m1*::GUS son máximos después de 6 horas de iluminación y decreció un 31% al pasar a la fase de oscuridad. El patrón de expresión fue similar en plantas que llevaban *m2*::GUS, con alta expresión durante la luz que decreció un 33% durante la noche. Las construcciones *m3*::GUS y *m4*::GUS mostraron niveles de expresión casi idénticos durante el día y la noche, con decrecimiento en la transición luz/oscuridad de solo un 10% y 4% respectivamente. La

regulación por luz desapareció prácticamente con m5::GUS cuyo nivel de expresión es comparable al de las plantas con la construcción pBI101::GUS. A excepción de m5::GUS y de forma sorprendente, las delecciones seriadas de los promotores en respuesta a la luz mostraron un aumento progresivo de su expresión a medida que la secuencia se acorta. En plantas con el promotor PsTRXm4::GUS, la expresión de ARNm fue 5 veces más alta que la expresión de ARNm de PsTRXm1::GUS. Similar patrón de expresión ocurre en las muestras tomadas durante el periodo de oscuridad. Este último estudio no se ha podido completar con una segunda fase de 24 horas con luz continua, aunque estos datos muestra como la construcción M5::GUS pierde la regulación por luz, y con ella la regulación por ciclo circadiano.

En conclusión con este estudio, se puede comprobar que la expresión de los transcritos de GUS durante la transición luz/oscuridad y luz/noche subjetiva, tanto las secuencias reguladoras de PsTrx *f* como la secuencia reguladora de PsTrx *m1* parecen estar regulados por la luz así como por el reloj circadiano. En algunos casos se ha podido delimitar las regiones implicadas en dicha regulación por la luz; estas pueden además ejercer un efecto de inducción o de represión según que factores se unan a ellos.

2.d.- Ensayos de unión al factor de transcripción CCA1.

Reacciones de unión LumrF-CCA1.

Mediante los ensayos de retardo, se ha pretendido demostrar la funcionalidad *in vitro* de los elementos relacionados con el ritmo circadiano presentes en ambas secuencias reguladoras, especialmente los “Evening Elements” (ATATT). Para estos ensayos se ha utilizado la proteína

recombinante CCA1 de *A. thaliana* procedente del laboratorio del Dr. Ángel Mérida (Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis de Sevilla).

El factor de transcripción CCA1 forma parte del reloj interno de las plantas que regula los procesos del ciclo circadiano (Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. 1998; Alabadi, D., y cols. 2002) y se puede unir específicamente al sitio Evening Element. Para los ensayos de unión se diseñaron una pareja de oligonucleótidos a partir de la secuencia reguladora de PsTrx *f* que incluye el elemento EE y que se ha señalado en rojo en la figura 51:

```

-394 5´-GTAACAAATAAACACATTGCGTGATTCATATATAATAACTATAAAATT
-344 TTGCTCATAAAATTATTTGTTGTTGTTTATATTTGCGATTGAAAAAAG
-294 TAAAGTGAAAAAAAAGAGATATTTCGAAGGAATCTTGGCATCCAATTA
-244 TCCGGAAGAATGGTCAAACTCTCTAAAAAAATCAGAAAAGGGTAATTT
-194 GGTAATAATTATATCCAAGCCTGGGCGATTTCACTAATTCCAACCTCTCTT
-154 TCATTCTTTACGATTGTGTTTCATTGAATTTACTAACATCACCCCTCATT
-144 TTCGCGATCAAATAATTCCATACACAGACTTCAAGGGCAGCACCGTATT
-94 TTCAATCATCACACCCACTCTTCCTCTTTCACATCCACCACCACACTT
-44 TCATATCTCAGTCCAATTCTCCACTCTTGGTCTTCCCCACATCAATG

```

Fig. 51- Figura que muestra la secuencia del LumrF, enmarcada en rojo, sintetizada a partir de los oligonucleótidos LumFa/LumFs y escogida para llevar a cabo el análisis de unión *in vitro* con el factor CCA1. La región contiene un elemento "GT1Consensus", una caja GATA y un elemento "Evening Element" marcado en **negrita** y subrayado.

Las reacciones de unión se prepararon incubando 50 ng de proteína CCA1 en las condiciones descritas en el capítulo de "Materiales y Métodos" e incrementando la cantidad de competidores específico, sonda no marcada radioactivamente, desde 100 ng a 1 µg, o la cantidad de competidor inespecífico poli dI/dC en un rango de 1 µg hasta 5 µg. Los resultados obtenidos en la reacción de unión entre la secuencia LumrF con el factor de transcripción CCA1 se presentan en la figura 52:

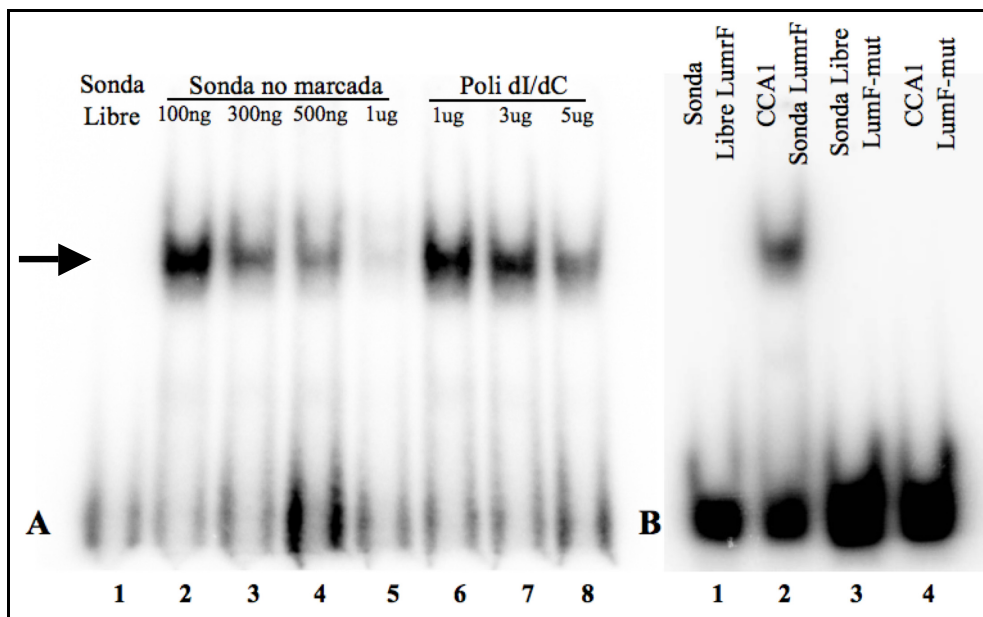


Fig. 52- Se muestra el resultado del experimento de unión utilizando el fragmento LumrF con el factor CCA1 A): Calle1: Sonda libre, Calles 2-5: con sonda no marcada radioactivamente, Calles 6-8: con competidores inespecifico poli dI/dC. B) Sonda mutada, Calle 1: Sonda LumrF sin CCA1, Calle 2: Sonda LumrF + CCA1, Calle 3: Sonda LumrF-mut sin CCA1, Calle 4: Sonda LumrF-mut + CCA1.

Un retraso en el gel del oligo marcado y CCA1 indica que existe una unión específica entre el factor de transcripción CCA1 y la secuencia del promotor de la *Trx f* sintetizada con los oligonucleótidos LumrFa/LumrFs (fragmento entre -343 y -312) (Fig. 53). La adición de un competidor inespecífico de la unión, poli dI/dC, no es suficiente para que la señal de la unión desaparezca. Además, al añadir sonda fría como competidor específico se comprueba que la señal disminuye proporcionalmente al aumento de la cantidad de competidor (sonda no marcada). Estos resultados demuestran el reconocimiento específico del factor de transcripción CCA1 por la región del promotor de *PsTrx f* elegido en el experimento.

En una segunda serie de experimentos, se ha pretendido localizar, en el fragmento LumrF, los posibles nucleótidos específicos que participan en

la unión a la proteína CCA1. Para ello se ha sintetizado el fragmento LumF-mut a partir de los oligonucleótidos LumGa/LumGs en los que se sustituyó la secuencia -agatatt- original por -agCtatt- perteneciente al “Evening Element” (Fig. 53). Se comprueba que al mutar una base de la secuencia EE de LumrF desaparece la señal de unión entre CCA1 y LumrF (Fig. 52), indicando que el nucleótido “a/t” es esencial en el reconocimiento y unión entre CCA1 y “Evening Element” en la secuencia reguladora de *PsTrx f* de guisante:

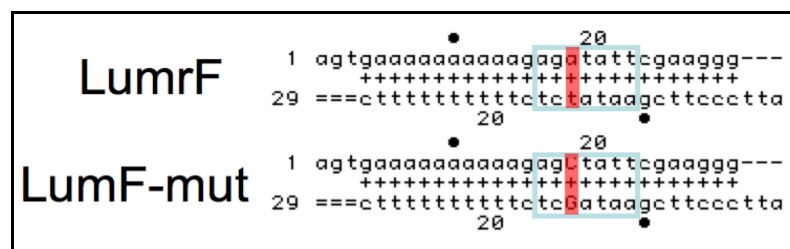


Fig. 53.-Figura que muestra las sondas utilizadas en las reacciones de unión con CCA1. LumrF se ha obtenido a partir de la hibridación de los oligonucleótidos LumrFa/LumrFs, mientras que LumF-mut se ha obtenido con los oligonucleótidos LumGa/LumGs. Los cuadros en color azul representan los nucleótidos que forman parte de EE, mientras que en color rojo se ha señalado la mutación en EE relevante para la unión.

Reacciones de unión Lum2M-CCA1.

Al igual que en el caso de la secuencia reguladora de *PsTrx f*, se ha pretendido identificar la región de unión del factor CCA1 a la secuencia reguladora de *PsTrx ml*. Para ello se ha seleccionado una región dentro de la secuencia promotora, entre -833 y -793, con varios elementos implicados en la regulación por luz próximos entre sí, incluyendo el *Evening Element* tal y como se muestra en la figura 54:

5' -AGAGACGAATGTGCTTAATTTGAAGGCGTAGAAGTTGATGAAGTATTTGATTGAAT -834
GAACATAAGT**AGATATTGAAAGCAAGATTGAAAAA**ATGTTGATTCAAATGAGCGAGAG -774
TTTTGCTCTGCTCTTGAGAGAAGTTAAGAAGTTGGTTTCAAAGTAATGGAATGTGG-3' -714

Fig. 54.- Figura que representa parte de la secuencia reguladora aislada para PsTrx *m1*. En ella se ha señalado los elementos “GATAbbox” y “GT1Consensus” regulados por la luz, además, según las bases de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita** y subrayada está la secuencia de EE y CBS. En rojo se muestra la secuencia de ADN LumM, sintetizada con los oligonucleótidos Lum2Ma/Lum2Ms, para llevar a cabo la reacción, *in vitro*, de unión al factor CCA1.

Las reacciones de unión se prepararon del mismo modo descrito para el caso del fragmento LumrF incubando 50 ng de proteína CCA1 en las condiciones descritas en el capítulo de “Materiales y Métodos” (Apartado C.5.-) y incrementando la cantidad de competidores específico, sonda no marcada radioactivamente, desde 100 a 300 ng, o la cantidad de competidor inespecífico poli dI/dC en un rango entre 1 µg hasta 5 µg. Los resultados obtenidos en la reacción de unión entre la secuencia Lum2M con el factor de transcripción CCA1 se presenta en la figura 55:

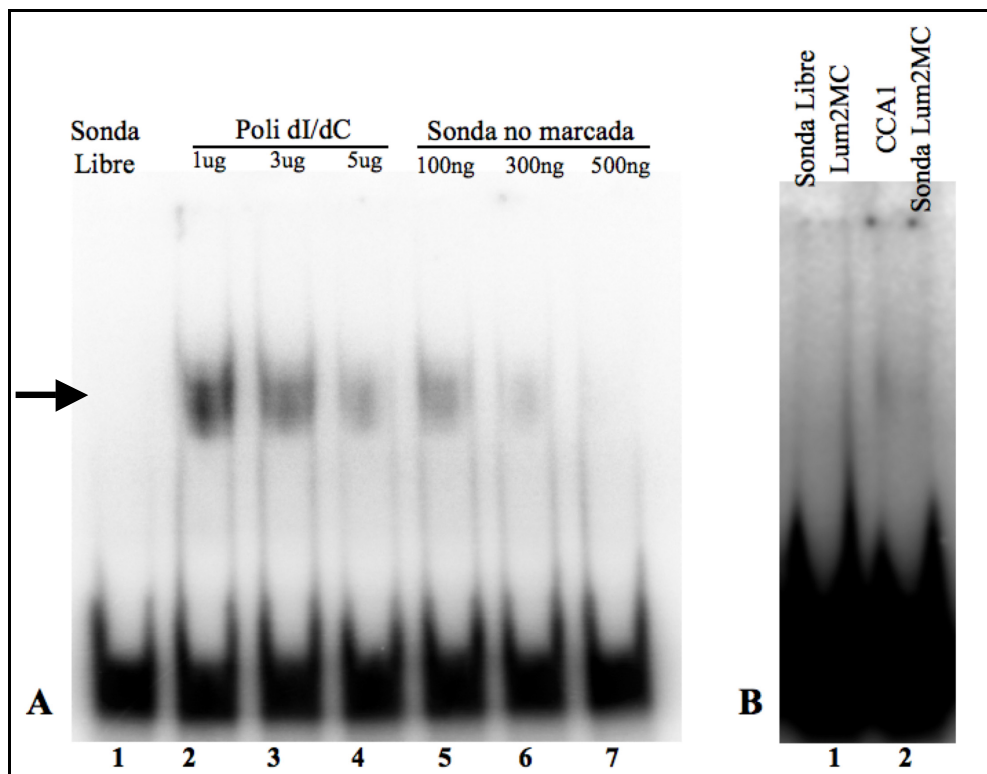


Fig. 55.- Se muestra el resultado del experimento de unión A) utilizando el fragmento Lum2M con el factor CCA1; Calle 1: Sonda libre, Calles 2-4: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda no marcada radioactivamente. B) Sonda mutada, Calle 1: Sonda Lum2MC sin CCA1, Calle 2: Sonda Lum2MC + CCA1.

Podemos observar que existe una unión entre el factor CCA1 y la sonda Lum2M. La especificidad se demuestra en las reacciones de unión correspondiente a las calles 5-7 de la figura 55 en las que la sonda no marcada radioactivamente es capaz de desplazar la unión de CCA1 de la sonda Lum2M marcada. Por otra parte, es necesario añadir al menos 5 μ g de competidor poli dI/dC para desplazar la unión CCA1/Lum2M.

Un segundo análisis de la secuencia promotora de PsTrx *m1* ha localizado un EE que podría también estar implicado en la regulación por

ritmo circadiano. Este elemento se encuentra en la posición -823 pb desde el inicio de la transcripción. La sustitución del nucleótido “a” por una “c” en la secuencia del “Evening Element” (Fig. 56) del oligo Lum2M ha provocado una disminución en la señal de unión a CCA1 (Fig. 55). La pérdida de intensidad en la señal de unión indica que el nucleótido “a” es importante para la unión a CCA1, pero la no desaparición completa de la señal sugiere que esta sustitución no es suficiente para que se pierda la capacidad de unión, y que probablemente sea necesario en la especificidad de unión la intervención de alguna base adicional del motivo EE o de algún motivo próximo a este. Serán necesarias la preparación de nuevos mutantes para identificar los nucleótidos del EE de la secuencia promotora de la Trx *ml* que intervengan en la unión con el factor de transcripción CCA1.

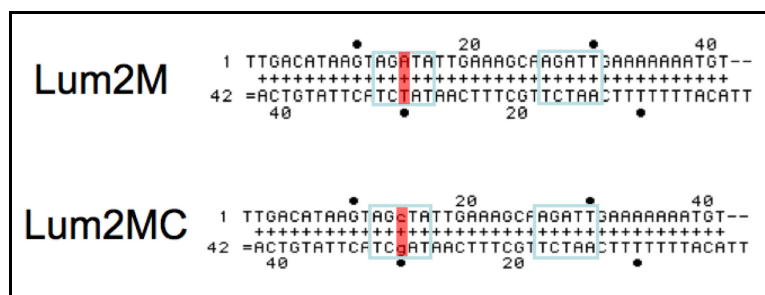


Fig. 56.- Figura que muestra las sondas utilizadas en las reacciones de unión con CCA1. Lum2M se ha obtenido a partir de la hibridación de los oligonucleótidos Lum2Ma/Lum2Ms, mientras que Lum2MC se ha obtenido con los oligonucleótidos Lum2MCa/Lum2MCs. Los cuadros en color azul representan los nucleótidos que forman parte de EE y CBS, mientras que en color rojo se ha señalado la mutación en EE relevante para la unión.

C.- Regulación por azúcares.

C.1.- Estudios de expresión de PsTrx *f* y *m1* dependientes de azúcares.

En este apartado se analiza la regulación por azúcares de la expresión de las TRXs cloroplásticas *f* y *m1* de guisante. Para ello se han desarrollado varios experimentos con planta completa o con hoja de guisante que se han tratado con distintos azúcares (sacarosa, glucosa y fructosa), a diferentes diluciones y bajo distintas condiciones de iluminación.

Se inició el estudio determinando en primer lugar la actividad fotosintética cuando las plantas de guisante eran tratadas con los azúcares a lo largo de un día (12 horas luz /12 horas oscuridad), con el fin de comprobar el efecto que los azúcares ejercía sobre la velocidad de asimilación de CO₂. Posteriormente, se cuantifico el contenido de azúcares. Finalmente, se determinaron los niveles de expresión de los ARN mensajeros de la Trx *f* y de la Trx *m1* en respuesta a los tratamientos con los azúcares.

1.a.- Determinación de la actividad fotosintética.

Tras la fase de noche, plántulas de guisante cultivadas en vermiculita bajo un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad durante dos semanas fueron introducidas en tubos de vidrio que contenían diferentes soluciones

de azúcares (glucosa, sacarosa, fructosa y sorbitol) a una concentración de 0,1 M. Se hicieron medidas de la actividad fotosintética de las hojas apicales de las plántulas de guisante a las 2h, 4h, 8h de la fase luminosa y a las 2 horas después de iniciarse la fase de oscuridad. Para ello se utilizó un equipo analizador de infrarrojos IRGA (Licor 6400) y a una intensidad de luz de 1000 PAR y un concentración de CO₂ de 400 ppm.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 57:

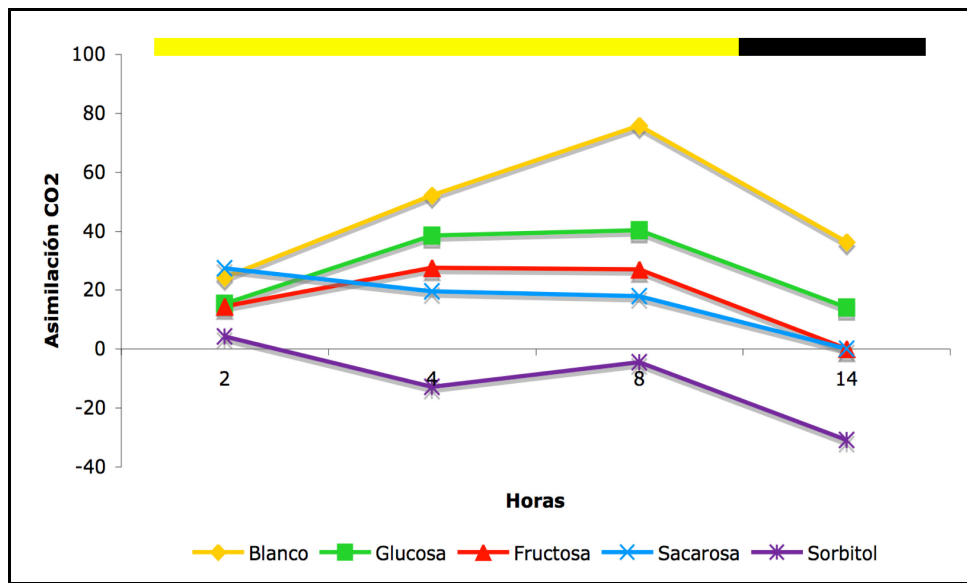


Fig. 57.- Gráfica que muestra el resultado de las mediciones de la actividad fotosintética a 1000 PAR a lo largo del experimento tratando las plantas de guisante con diferentes soluciones de azúcares a una concentración 0,1 M.

La tasa fotosintética medida justo antes de iniciar el tratamiento de luz y azúcares reveló unos valores negativos (Datos no mostrados). Al iniciar el periodo de iluminación, la fotosíntesis aumento rápidamente hasta las 2 primeras horas de iluminación en respuesta a todos los tratamientos.

La actividad fotosintética de las plantas mantenidas en agua, glucosa y fructosa incremento aun más a tiempos de iluminación de 4h y 8h, y

decreció al iniciar el periodo de oscuridad. Las plantas conservadas en agua son las que tienen mayor actividad fotosintética a lo largo de todo el periodo con un máximo que se alcanza a las 8 horas. Este aumento fue un 145% con respecto al obtenido a las 2h de iluminación, y posteriormente disminuyó un 70% en la oscuridad.

Las plantas que han sido tratadas con las diferentes soluciones de azúcares muestran una menor actividad fotosintética en relación a las plantas control, llegando en el caso de las plantas tratadas con sorbitol, a valores negativos cuando las mediciones se realizan sobre las muestras tomadas tras tres de iniciarse el tratamiento, indicando que las plantas están haciendo fotorespiración.

La glucosa y la fructosa mostraron un incremento progresivo de su actividad fotosintética entre las 2 horas hasta las 8 horas de iluminación. El máximo de actividad se alcanzó a las 8h de luz, representando un incremento de 262% y 190% sobre el detectado a las 2 horas con glucosa y fructosa respectivamente. Sin embargo, los valores obtenidos están por debajo de los del control. En todos los casos, la fotosíntesis de las plantas disminuyó drásticamente en la oscuridad. A partir de las dos horas de tratamiento con sacarosa, la fotosíntesis de las plantas tratadas con sacarosa decreció de forma continua hasta el inicio de la noche. Consecuentemente, la sacarosa parece inhibir la fijación de CO₂ de las plantas tras 2 horas de luz, e inducir en la fase de oscuridad la fotorespiración.

Las plantas sometidas a tratamiento con sorbitol fueron incapaces de fijar CO₂, realizando únicamente fotorespiración desde el inicio del tratamiento.

1.b.- Determinación del contenido de azúcares.

El contenido de azúcares solubles se determinó en las mismas plántulas de guisante tratadas con distintos azúcares mediante la extracción alcohólica descrita en el apartado C.6.b.- de “Materiales y Métodos”.

Contenido de glucosa.

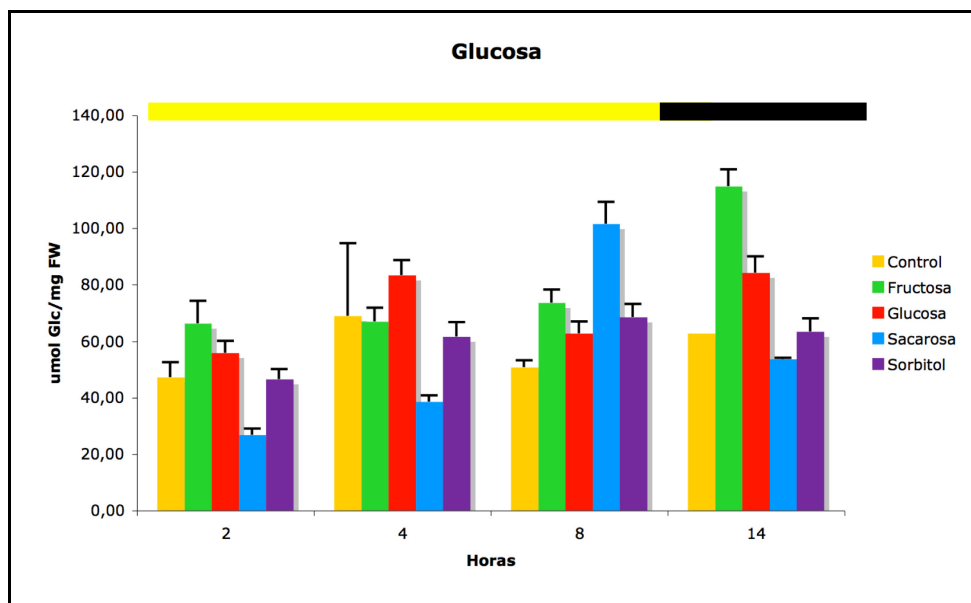


Fig. 58.- Esquema en el que se muestra el contenido de glucosa en las hojas a lo largo del experimento con cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

Los resultados que muestra la figura 58 muestran que el contenido de la glucosa oscila en función del tratamiento al que se ha sometido las plantas de guisante. Así, se observa que a medida que va aumentando el tiempo de tratamiento en glucosa, el contenido de este monosacárido va aumentando progresivamente, aún en el periodo de oscuridad. Cuando las plántulas de guisante son tratadas con la solución de fructosa, se observa un aumento del

70 % en el contenido de glucosa con respecto a las plántulas control en este mismo tiempo, aunque a partir de este punto, el contenido de glucosa se mantiene semejante en relación con las plantas control. En cuanto al tratamiento con sacarosa, se observa que contribuye al aumento intracelular de glucosa en el último punto del experimento hasta duplicar el contenido en glucosa. El sorbitol afecta al contenido en glucosa en el primer punto y último en el que aumenta el contenido de glucosa un 86 % a $t=2$ h y un 153 % a $t=14$ h. Sin embargo, a $t=4$ h, el contenido de glucosa en las plantas tratadas es un 40 % menor en relación con las hojas control.

Contenido de fructosa.

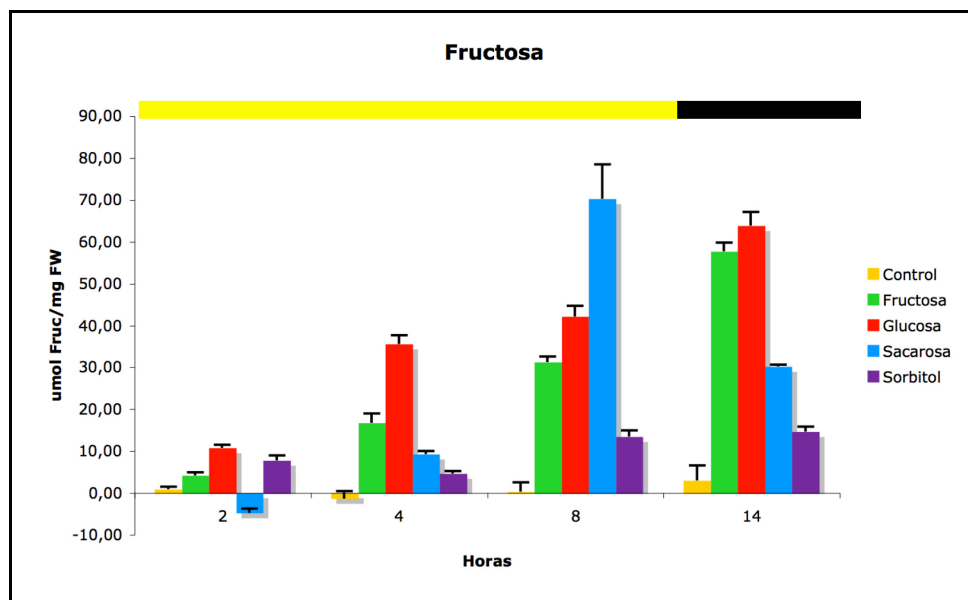


Fig. 59.- Esquema en el que se muestra el contenido de fructosa en las hojas a lo largo del experimento con cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

El esquema de la figura 59 muestra que el contenido de fructosa en las plantas control tratadas con tampón MES, son muy bajos a lo largo de las 14 horas de tratamiento, alcanzando un máximo en el contenido de éste azúcar a las ocho horas de iniciarse la fase luminosa, y disminuyendo en la fase oscura, manteniendo una oscilación semejante al que presenta el contenido de glucosa. Aunque el efecto de la fructosa en el contenido intracelular de la hoja es lento, se observa que aumenta a las 4 horas de iluminación y se mantiene el contenido de fructosa a lo largo de todo el experimento. La glucosa ejerce un efecto muy rápido en el contenido de fructosa, con un incremento rápido y constante desde las primeras dos horas de luz a partir de las cuatro horas de tratamiento hasta el final del experimento, incluso tras 2 horas en oscuridad. En el caso de las hojas tratadas con la solución 0,1M de sacarosa, el efecto es más lento que en el caso de la glucosa, pero tras ocho horas de tratamiento el contenido de fructosa es casi cuatro veces mayor que en las hojas control; en la fase de oscuridad se mantiene constante. En todos los casos, los tratamientos con sacarosa, fructosa y sacarosa aumentan considerablemente el contenido intracelular de fructosa a partir de las cuatro horas de iniciarse los tratamientos.

El sorbitol muestra niveles superiores, en comparación con el contenido en plántulas control, en los tiempos $t=2h$ y $t=14h$ de 9 y 6 veces más, respectivamente, mientras que $t=8h$, el sorbitol provoca una disminución en la concentración de fructosa del 50 %.

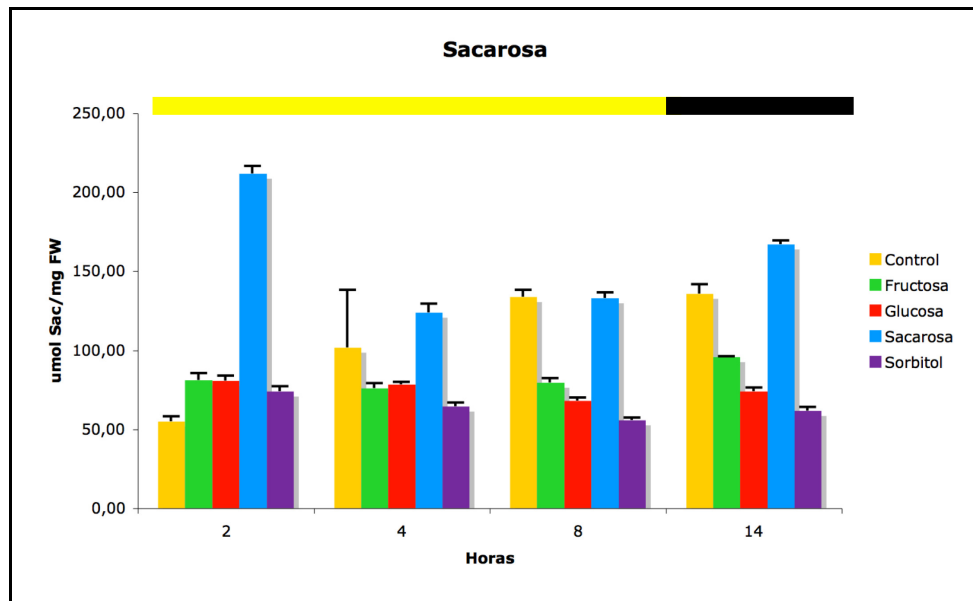
Contenido de sacarosa.

Fig. 60.- Esquema en el que se muestra el contenido de sacarosa en las hojas a lo largo del experimento en cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

La figura 60 muestra la variación en el contenido de sacarosa en las hojas de guisante bajo los diferentes tratamientos. El contenido de sacarosa aumenta de forma progresiva a partir de las cuatro horas de tratamiento, llegando a superar en 2,5 veces la concentración de sacarosa en las hojas control en $t=8$ y 2 veces más en $t=14$. La fructosa modifica el contenido en sacarosa en el punto medido tras dos horas en oscuridad reduciéndolo a la mitad.

El sorbitol reduce el contenido de sacarosa a la mitad en $t=4h$, mientras que en el resto de los puntos, no modifica la concentración de sacarosa de un modo significativo.

El contenido de sacarosa aumentó en las plantas control y tratadas con glucosa en la última medida, tras dos horas de oscuridad sugiriendo el inicio de la degradación del almidón.

	Control	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Sorbitol
2 Horas	0,39	1,01	0,57	0,51	1,03
4 Horas	0,46	1,02	0,91	0,36	0,59
8 Horas	0,94	1,22	1,36	0,48	0,87
14 Horas	0,32	1,21	1,37	0,41	1,36

Tabla 4.- Relación hexosas/sacarosa en las hojas de guisante en cada punto del experimento según cada tratamiento.

En la tabla 4 se muestra la relación entre la cantidad de hexosas, glucosa y fructosa, en relación a la cantidad de sacarosa según el tiempo de tratamiento y la solución azucarada con la que han sido tratadas. Como se observa, a lo largo del periodo de luz, la relación va creciendo en las plantas control como corresponde a un metabolismo normal en el que el contenido en hexosas aumenta y se acumulan para suplir las necesidades metabólicas de los tejidos sumidero durante la fase de oscuridad en los tejidos “sumidero” (Gerhardt, R., y cols. 1987). Este hecho se confirma al comprobarse que tras dos horas en oscuridad la relación en las hojas control cae a niveles semejantes a los obtenidos en $t=2$.

En el caso de la glucosa, el efecto en la relación hexosas/sacarosa aumenta desde las primeras horas de tratamiento y se mantiene a lo largo del experimento e incluso durante las dos primeras horas en oscuridad. Con la fructosa se obtiene el mismo efecto pero de un modo más lenta, y mientras en el caso de las plantas tratadas con glucosa en las dos primeras horas el

ratio aumenta 2,5 veces, en el caso de la fructosa sólo aumenta 1,5 veces. Sin embargo, la relación es comparable entre ambos tratamientos en el punto de $t=14h$. La relación que se ha obtenido con sacarosa, si bien es mayor que el ratio de las plantas control en $t=2$, se mantiene a lo largo del experimento y no aumenta como en los casos de las plántulas tratadas con glucosa o fructosa.

Los datos más interesantes es que las hojas tratadas con la solución de glucosa aumenta el contenido de hexosas desde los primeros instantes del tratamiento alcanzando un aumento del 70 % en relación con las hojas control. Sin embargo, la tendencia en las hojas tratadas con fructosa es diferente al caso anterior, dado que si bien el aumento en la cantidad de hexosas a las dos horas del tratamiento es del 42 %, con respecto a las hojas control, a lo largo del experimento la relación va disminuyendo hasta ser superior en las hojas control un 13 % frente las hojas crecidas en la solución de fructosa. En el caso de las hojas cultivadas en la solución de sacarosa, los efectos resaltan a las ocho horas de tratamiento alcanzando valores de casi el doble en la relación hexosas/sacarosa en relación al contenido en hojas control. El tratamiento con sorbitol ha modificado la relación entre hexosas/sacarosa aumentando en las primeras y últimas horas del experimento, mientras que durante el periodo que comprende desde los dos puntos intermedios del experimento esta relación ha disminuido hasta la mitad con respecto a las hojas control.

Hay que resaltar que a pesar de aportar fructosa a la planta de guisante, la relación hexosa/sacarosa disminuye. El efecto contrario se ha obtenido al tratar las plantas de guisante con sacarosa que ha aumentado el ratio hexosa/sacarosa indicando la hidrólisis de la sacarosa asimilada por las hojas. En el caso del sorbitol, el aumento del contenido de sacarosa en

relación al de hexosas puede ser indicativo de la respuesta de la hoja frente a los efectos osmóticos de esta solución.

1.c.- Modificación en la expresión de los ARNm de las TRXs cloroplastídicas.

La extracción de ARN total de cada una de las muestras y la síntesis de la cadena de ADNc se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el capítulo de “Materiales y Métodos” y posteriormente se analizaron las distintas muestras mediante reacción de RT-PCR para determinar los niveles de expresión de mensajero de ambas Trxs cloroplastídicas.

Se ha utilizado como control de carga la señal obtenida de la amplificación del fragmento correspondiente al gen de la β -actina (X68649) de guisante con la pareja de oligonucleótidos PsAct-F/PsACT-R. Para la detección de los fragmentos de ADNc correspondientes a PsTrx *f* y PsTrx *mI* se han utilizado las parejas de oligonucleótidos rtTrxfC/rtTrxfN y rtTrxmC/rtTrxmN, respectivamente.

La recogida de muestras se realizó al mismo tiempo que la realizada para analizar el contenido de azúcares y la determinación de la actividad fotosintética de las plantas.

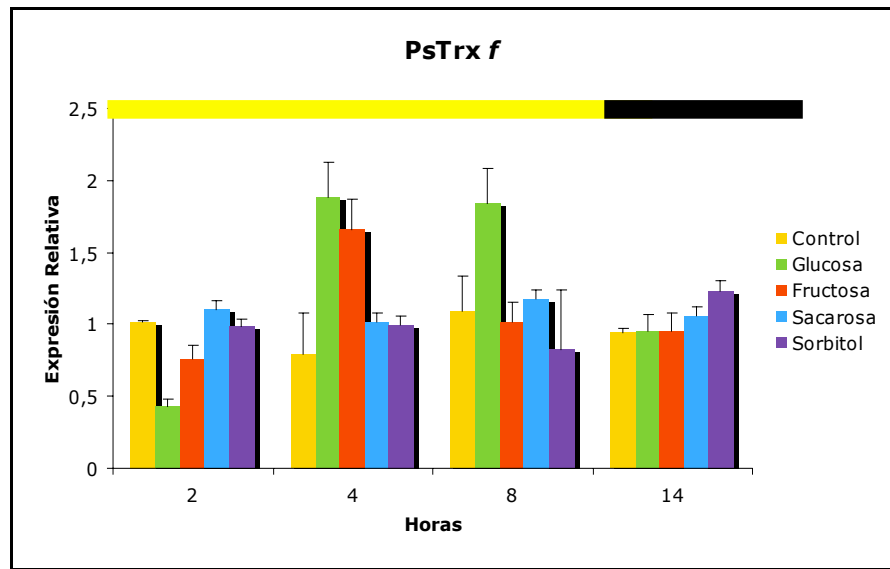
Expresión de PsTrx *f* por luz y azúcares.

Fig. 61.- Nivel de expresión de ARNm de PsTrx *f* a lo largo del experimento bajo los diferentes tratamientos de azúcares.

La figura 61 muestra que el nivel de transcritos de Trx *f* sube ligeramente cuando las plantas están en solución control, alcanzando un máximo de expresión a las 8h y decrece en el periodo de oscuridad. Un comportamiento similar se observa cuando las plantas están tratadas con sacarosa sin variaciones notables, aunque con un ligero aumento a las 8 horas de tratamiento. A las 2 horas de tratamiento con glucosa, el contenido de ARNm de la Trx *f* fue la mitad del nivel encontrado en plantas control. Sin embargo, tras 4 horas de tratamiento con glucosa y fructosa, los transcritos de Trx *f* incrementaron de 4 y 2 veces la expresión detectada a las 2 horas respectivamente. Este nivel de expresión se mantiene hasta las ocho horas de tratamiento en glucosa, decayendo en el periodo de oscuridad. Con fructosa, tras un máximo de expresión a las 4 horas, decrece rápidamente y se mantiene en los mismos niveles en la fase de oscuridad.

Los tratamientos tanto con sacarosa como con sorbitol, no parecen afectar la expresión de la PsTrx *f* al no detectar cambios significativos. Tras dos horas en oscuridad, no se aprecia ningún efecto de los azúcares en la expresión de PsTrx *f*. Por ello podemos sugerir que el papel de la luz es necesario para el incremento de la expresión de PsTrx *f* cuando las plantas son tratadas con los azúcares.

Expresión de PsTrx *m1* por luz y azúcares.

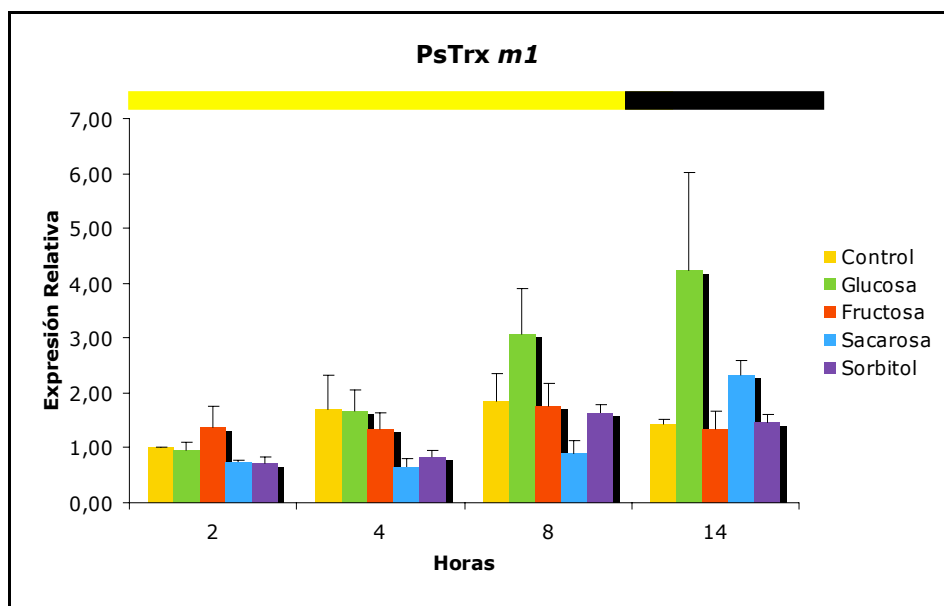


Fig. 62.- Nivel de expresión de ARNm de PsTrx *m1* a lo largo del experimento bajo los diferentes tratamientos de azúcares.

En las plantas control se detecta un ligero incremento de la expresión de ARNm de la Trx *m* llegando al máximo a las 8 horas de luz y decreciendo un poco a las dos horas de oscuridad (Fig. 62). Un comportamiento similar se observa cuando las plantas son tratadas con fructosa. El tratamiento con glucosa 0,1 M induce un fuerte aumento en la

expresión que se hace notable a las ocho horas de iniciarse el tratamiento, hecho que se acentúa de forma sorprendente a las 14 horas del tratamiento, siendo 3 y 4 veces el valor obtenido con plantas control respectivamente. Sin embargo, la sacarosa es capaz de reprimir la expresión de PsTrx *m1* a lo largo del periodo de luz, pero tras dos horas en oscuridad ejerce el efecto contrario al que ocurre en el periodo de luz, aumentando el doble el contenido de transcritos de PsTrx *m1*. Este hecho puede indicar que tanto la luz como la sacarosa no participarían de una activación de forma sinérgica en la regulación de PsTrx *m1*.

D.- Estudio de la expresión de las Trxs cloroplastídicas en oscuridad.

Dado que en general la expresión de ambas tiorredoxinas no parece alterarse por la presencia de los distintos azúcares en la oscuridad, nuestro interés nos condujo a comprobar si la inducción observada en el experimento anterior por parte de los azúcares se debía a una activación independiente de la luz ó sinérgica con las hexosas, especialmente glucosa. Así, se planteó un segundo experimento en el que los tratamientos con los azúcares solubles se llevó a cabo en oscuridad al final del periodo de noche de la planta, momento en el que el contenido de almidón de reserva intracelular son bajos, al igual que el resto de azúcares solubles: glucosa, fructosa y sacarosa. Igualmente se seleccionó la sacarosa y la glucosa como azúcares de tratamiento al observar que eran los que producían un cambio en la expresión de las TRXs cloroplastídicas. Asimismo se fijó la duración de los tratamientos en 4 horas.

En este experimento, además se ha pretendido estudiar el grado de sensibilidad en la respuesta por parte de las TRXs a los azúcares. Para ello se han tratado las plantas con glucosa y sacarosa a unas concentraciones de 10 mM y 100 mM. Además de utilizar manitol a 100 mM como control osmótico del experimento, se ha utilizado DTT a una concentración de 5 mM para ver la relación que puede existir entre la regulación de las TRXs por parte de los azúcares y el estado redox del cloroplasto. Así, tras 24 horas en oscuridad, hojas de las plántulas de guisante se embebieron en las diferentes soluciones de azúcares (MES, sacarosa, glucosa, manitol y DTT) durante un periodo de 4 horas, a través del peciolo, tras el cual se congelaron las muestras hasta su análisis.

1.a.- Determinación del contenido de clorofila.

Dado que este experimento se ha desarrollado en oscuridad, analizando la incorporación de los azúcares a través del peciolo de la planta de guisante, hemos decidido verificar el estado del aparato fotosintético en las hojas determinando el contenido en clorofila a y clorofila b. Esta información permite examinar si la incorporación de azúcares reprime la síntesis de enzimas de codificación nuclear que participan en el proceso fotosintético.

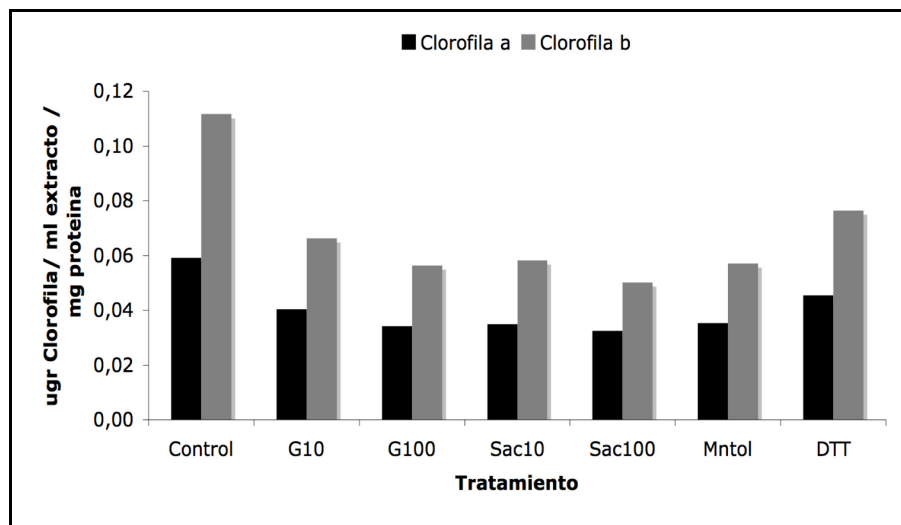


Fig. 63.- Cuantificación de clorofila a y clorofila b en las hojas de guisante en cada uno de los tratamientos.

En la figura 63 se muestra que el contenido en clorofilas disminuyen en todos los tratamientos de azúcares entre un 30 % y un 40 % en la concentración de clorofila a, mientras que en el caso de la clorofila b hay una disminución entre el 40 % y un 60%. Las hojas tratadas con DTT la disminución es menor que en el caso del resto de los tratamientos y sólo es de un 20 % en el caso de la clorofila a y de un 30 % en el caso de la clorofila b. Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos en el experimento anterior en el cual, al actividad fotosintética de las plantas disminuyen en presencia de un aumento en el contenido de azúcares solubles en las células vegetales. Este hecho está en concordancia con los estudios previos que han descrito la represión en la expresión de los genes que participan en la fijación del carbono y la fotosíntesis como la subunidad grande y pequeña de la rubisco (RbcL/RbcS) (Koch, K.E. 1996; Yu, S.M. 1999; Ho, S., y cols. 2001).

1.b.- Contenido de azúcares.

Se determinó el contenido de los azúcares solubles de las hojas tratadas y control para verificar el efecto que las diferentes soluciones de azúcares ejercen en la síntesis de azúcares en la hoja de guisante.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Determinación de glucosa.

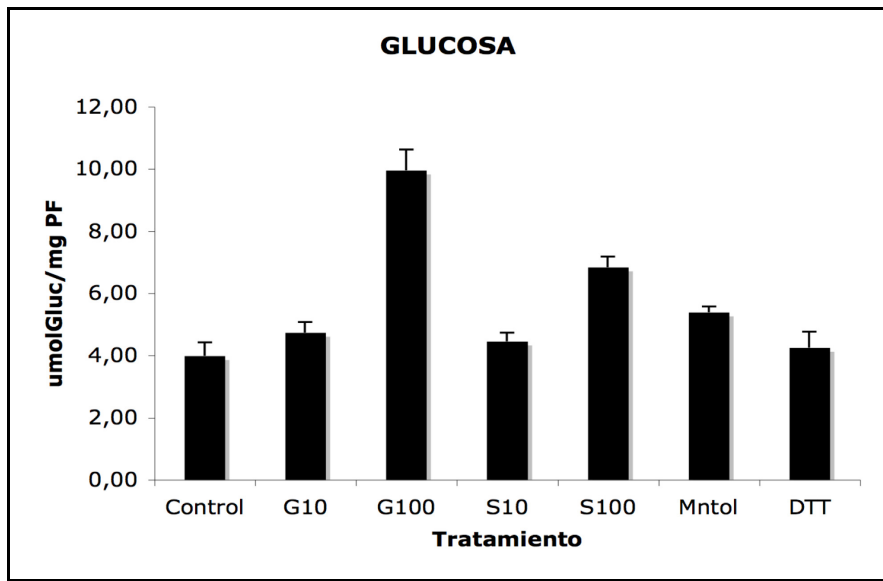


Fig 64.- Niveles de glucosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT.

Se observa en la figura 64 que el contenido en glucosa aumenta a medida que aumenta la concentración de la solución de glucosa con respecto al control. Así el tratamiento con glucosa 10 mM induce un leve aumento del 20 % en el contenido de glucosa, mientras que al tratar las plántulas de guisante con la solución de glucosa 100 mM aumenta el contenido en 2,5 veces. Sólo el tratamiento de sacarosa a una concentración de 100 mM es capaz de aumentar el contenido de glucosa en las hojas de guisante un 70 %.

El manitol también aumenta el contenido de glucosa un 35 % con respecto el contenido en las hojas tratadas con la solución control. El DTT, al igual que la solución de sacarosa 10 mM no han modificado sustancialmente el contenido de glucosa en las hojas de guisante.

Determinación de fructosa.

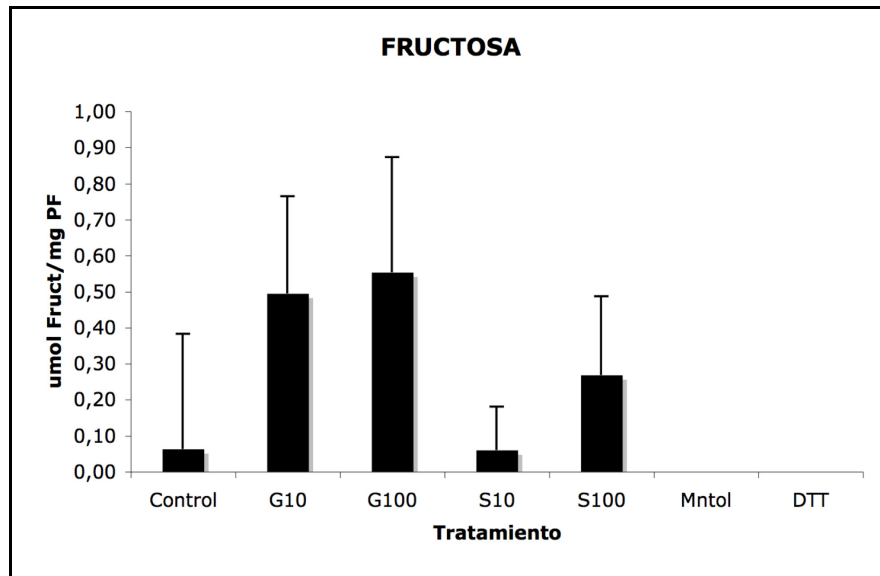


Fig. 65.- Niveles de fructosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT.

En cuanto al contenido de fructosa, la figura 65 nos muestra que las hojas tratadas con la soluciones de glucosa aumentan el contenido de fructosa de manera muy importante entre 8 y 9 veces más con respecto las hojas control. Las hojas sumergidas en la solución de sacarosa 10 mM no modifica el contenido de fructosa mientras que la solución de sacarosa 100 mM aumenta el contenido de monosacárido 4 veces con respecto las hojas control. En el caso de las soluciones de manitol y DTT no se ha detectado fructosa, y dado la baja concentración determinada para las hojas control, se

puede considerar que ambos tratamientos no modificarían el contenido de fructosa.

Determinación de sacarosa.

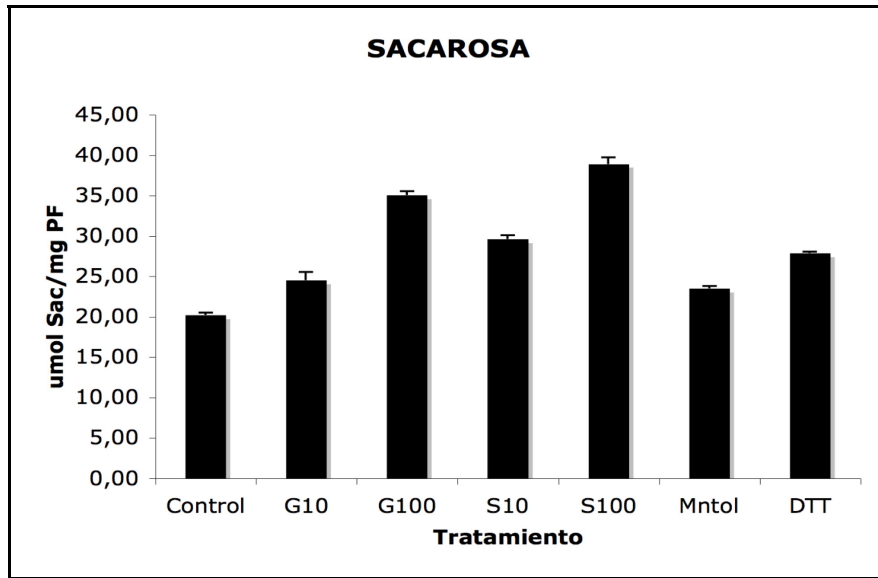


Fig. 66.- Niveles de sacarosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT.

La figura 66 muestra como esta vez los tratamientos con sacarosa son capaces de modificar de forma significativa y han aumentado el contenido intracelular entre un 46 % y un 90 %. En el mismo sentido, las soluciones de glucosa han aumentado la cantidad de sacarosa entre un 20 % y un 73 %. El contenido de sacarosa no se ha visto alterado por el manitol, mientras que el tratamiento con DTT ha incrementado un 37 % la cantidad de sacarosa presente en las hojas de guisante en relación con las hojas control.

Estos datos confirman que los tratamientos han modificado el contenido tanto de monosacáridos y disacáridos bien por el propio tratamiento de glucosa y sacarosa *per se*, como por efectos debidos a las

propias del manitol y DTT que van a conducir en alteraciones en la expresión de la células vegetales (Kolbe, A., y cols. 2006).

	Control	G10	G100	Sac10	Sac100	Mntol	DTT
Ratio HX/Sac	0,20	0,21	0,30	0,15	0,18	0,23	0,15

Tabla 5.- Relación hexosas/sacarosa en las hojas de guisante en los diferentes tratamientos.

Al comparar los resultados de la tabla 5, se observa que la solución de glucosa 10 mM no ha modificado en 4 horas de tratamiento con respecto el control, mientras que la solución concentrada de glucosa ha cambiado la proporción en un 50 % a favor de las hexosas. Al contrario sucede con las soluciones de sacarosa, así la solución diluida de éste disacárido presenta la mayor diferencia con respecto las hojas control en la relación hexosas/sacarosa. El manitol aumenta un 15 % la relación entre los azúcares, mientras que el tratamiento con DTT disminuye la cantidad de hexosas a favor de sacarosa en un 25 % con respecto al contenido de cada azúcar en las hojas tratadas con la solución MES.

1.c.- Medidas de niveles de ARNm.

Se determinaron los niveles de expresión de ARNm de las TRXs cloroplastídicas mediante RT-PCR semicuantitativa en hojas de guisante tratadas con cada una de las soluciones glucosa 10 y 100 mM y sacarosa 10 y 100 mM, además de en hojas tratadas con manitol y DTT.

Expresión de PsTrx *f* por azúcares.

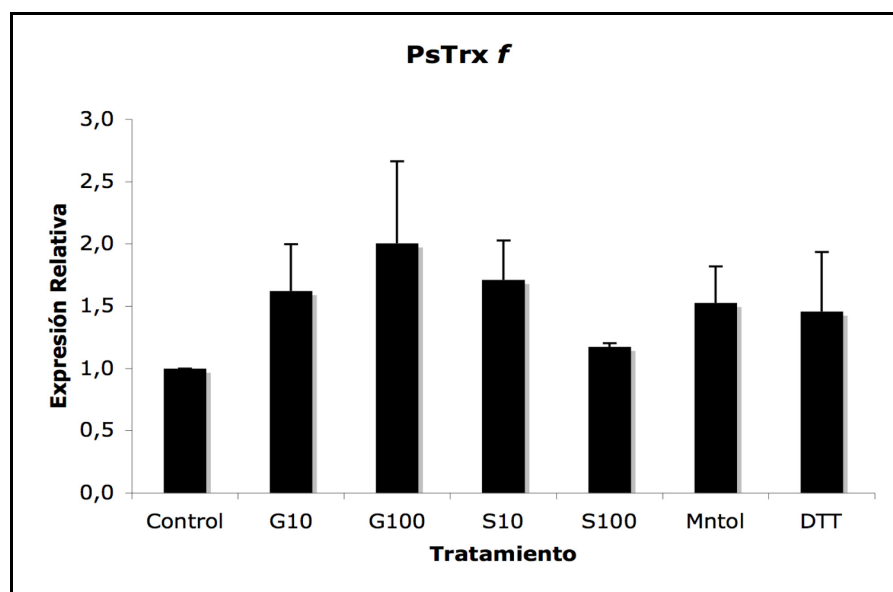


Fig. 67.- Niveles de expresión de ARNm de PsTrx *f* con los diferentes tratamientos de azúcares.

El nivel de transcritos de PsTrx *f* aumenta un 50 % en presencia de glucosa 10 mM con respecto a las hojas control y hasta 2 veces más cuando la concentración es de 100 mM (Fig. 67). Igualmente, se observa que en solución de 10 mM de sacarosa el nivel de transcritos de ARNm de PsTrx *f* aumenta en torno el doble con respecto a las hojas control. Sin embargo, el incremento es menor cuando las hojas de guisante se han tratado con sacarosa 100 mM. Las soluciones de manitol y DTT inducen un aumento de la expresión de ARNm para PsTrx *f* de un 50 % y un 40 % con respecto al control (Fig.67) lo que respondería al efecto que se ha observado en la modificaciones en los contenidos de azúcares en la hoja de guisante.

Expresión de PsTrx *m1* por azúcares

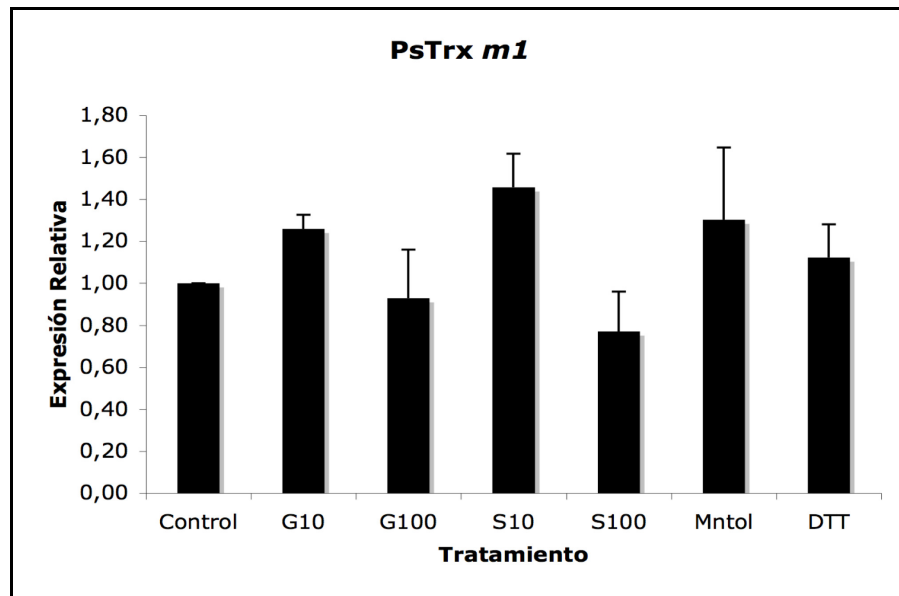


Fig. 68.- Niveles de expresión de PsTrx *m1* en los diferentes tratamientos de azúcares.

La figura 68 presenta los datos obtenidos por la técnica de RT-PCR semicuantitativa en el estudio de la expresión a nivel de ARNm de PsTrx *m1*. Se puede observar que las soluciones diluidas de glucosa y sacarosa incrementan la expresión de PsTrx *m1* levemente entre un 20 % y un 45 % con respecto a las hojas control. Sin embargo, la solución de glucosa 100 mM no altera el nivel de expresión mientras que la solución de sacarosa disminuye la cantidad de transcritos un 23%. En este estudio, la solución de manitol aumenta el contenido de ARNm de PsTrx *m1* al igual que en el caso anterior, mientras que la solución de DTT no altera el contenido de PsTrx *m1*.

1.d.- Medidas de Proteínas TRX *f* y TRX *m*.

Con objeto de valorar el efecto de los azúcares sobre la síntesis de las proteínas PsTRX *f* y PsTRX *m1* y compararlo con el contenido de los transcritos se determinó el contenido de las proteínas utilizando anticuerpos específicos.

Expresión de PsTRX *f* por azúcares.

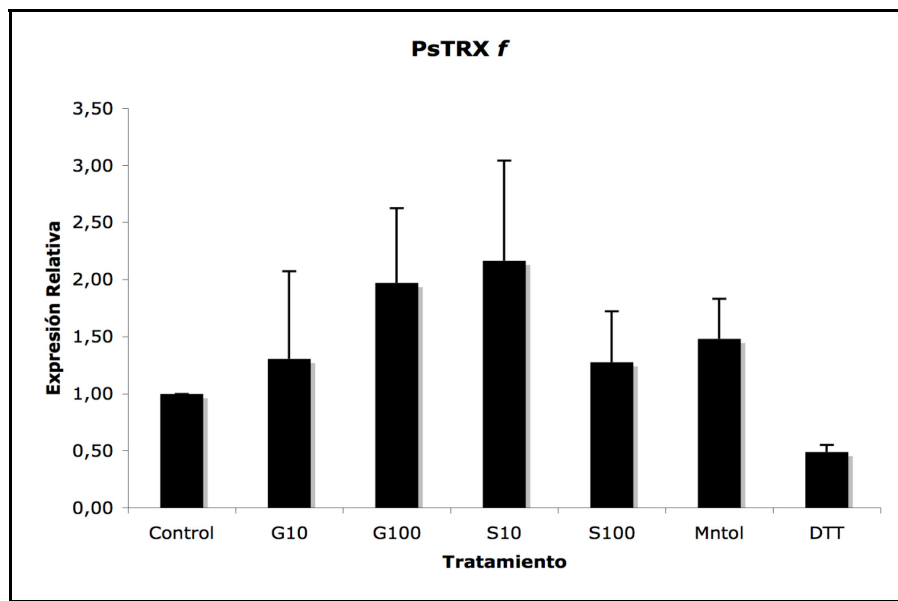


Fig. 69.- Contenido de proteína de PsTRX *f* determinado mediante *western blot* en plántulas de guisante tratadas con las disoluciones de azúcar y DTT.

Como muestra la figura 69, los azúcares modifican de forma significativa el contenido de la proteína TRX *f* aunque la concentración a la que estos azúcares estén presentes también modulan esa expresión. La solución de glucosa 10 mM es capaz de inducir la síntesis de proteína PsTRX *f* un 30 % mientras que la solución concentrada de glucosa es capaz de aumentar el contenido de proteína en un 97 %. En el caso de las

disoluciones de sacarosa, hay un aumento en la cantidad de proteína PsTRX *f* en un 216 %, sin embargo, la solución concentrada de sacarosa sólo incrementa el contenido de PsTRX *f* un 20 % con respecto las hojas control. La solución de manitol se comporta igual que las soluciones de glucosa y aumenta un 50 % la cantidad de proteína en los extractos. En sentido contrario sucede en las hojas tratadas con DTT en las cuales se manifiesta una marcada reducción de proteína.

Estos resultados se corresponden con los obtenidos en el estudio de los niveles de ARNm para PsTrx *f* en las mismas condiciones, salvo en el caso del tratamiento con DTT lo que puede indicarnos una regulación post-traducciona en condiciones reductoras.

Expresión de PsTRX *m1* por azúcares.

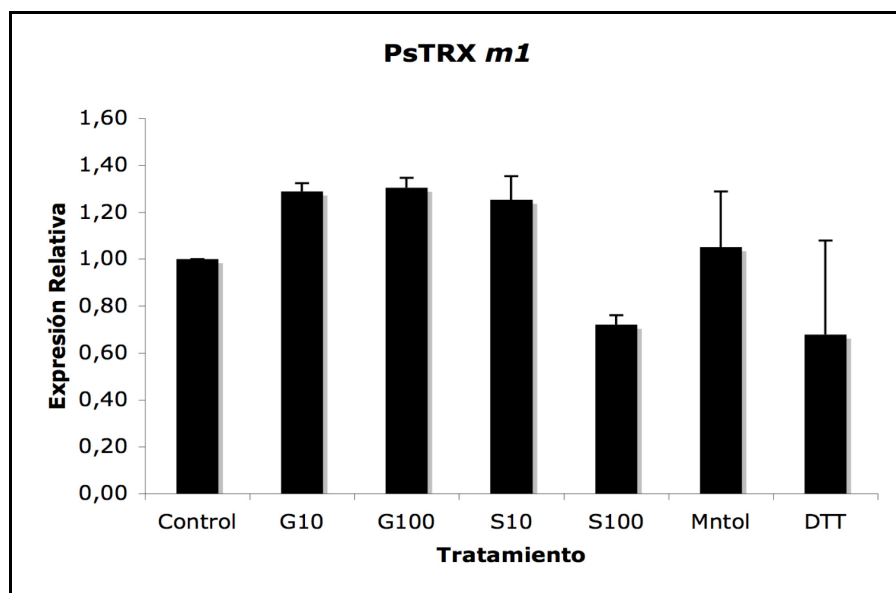


Fig. 70.- Contenido de proteína de PsTRX *m1* determinado mediante *western blot* en plántulas de guisante en cada uno de las disoluciones de azúcar y DTT.

La figura 70 muestra como los tratamientos con glucosa han aumentado sólo un 30 % el contenido de PsTRX *ml* en los extractos de proteínas de hojas de guisante con respecto las hojas tratadas con la solución control. Además un aumento en la concentración de la solución de glucosa, y por lo tanto un aumento en el contenido de glucosa, no implica un aumento en el contenido de proteína. En el caso de las hojas tratadas con sacarosa, el aumento de PsTRX *ml* se ha observado en las hojas tratadas con la solución 10 mM de sacarosa, mientras que la solución concentrada de sacarosa ha provocado una disminución en la cantidad de proteína en un 30 %. Ha sucedido igual en el contenido de esta proteína en las hojas tratadas con la solución con DTT. Por último, el manitol no ha causado ningún cambio en el contenido de PsTRX *ml* en los extractos de hojas.

E.-Ensayos de EMSA:

1.a.- Clonación del ADNc de DOF7.

Las proteínas DOF1 y DOF2 son factores de transcripción cuyo papel regulador del metabolismo del carbono es conocido (Yanagisawa, S. 2000), por lo que iniciamos el aislamiento de una secuencia ortóloga en guisante. Se ha descrito la presencia de proteínas DOF en el genoma de guisante, (Seki, H., *y cols.* 2002) y Nakamura y colaboradores han secuenciado al menos siete genes que codifican para siete proteínas del tipo DOF (Nakamura, N., *y cols.* 2003) para guisante. Elegimos la proteína DOF7 de guisante por tener mayor homología con las proteínas DOF implicadas en el

metabolismo del carbono como son las proteínas DAG1 (Papi, M., *y cols.* 2000; Gualberti, G., *y cols.* 2002).

La secuencia de DOF7 se obtuvo mediante una reacción de PCR a partir de ADNc obtenido por retrotranscripción de ARN total de hojas de guisante. La reacción de PCR ha constado de dos reacciones secuenciales en las que se han utilizado las parejas de oligonucleótidos DOF-1N/DOF-1C en la primera reacción de PCR, mientras que en la segunda se han utilizado la pareja de oligonucleótidos DOF-EcoRI/DOF-NcoI para amplificar el fragmento a partir de una dilución 1:100 de la primera PCR. En la segunda reacción de PCR se obtuvo un único fragmento de 740 pb que fue clonado en el vector pGEM-T® easy.

La secuenciación confirmó que el fragmento clonado correspondía con DOF7. Este se aisló a partir de 2 µg vector pGEM-T® easy por una digestión doble con las endonucleasas EcoRI y NcoI en un volumen final de 20 µl e incubando a 37 °C durante 2 horas. En las mismas condiciones se realizó la digestión del vector de expresión pET-28b. Ambos fragmentos, el vector pET28b linearizado y el fragmento que corresponde al ADNc de DOF7, se purificaron del gel de agarosa mediante una extracción fenólica.

Tras verificar que los dos fragmentos estaban puros, se sometieron a una reacción de ligación en una proporción 3:1 (inserto:vector) en un volumen de 10 µl y se incubó a 14 °C durante toda una noche. El producto de la ligación se utilizó en la transformación de un vial de células BL21 competentes mediante la técnica de “choque térmico”. El producto de ligación también se secuenció para confirmar la inserción del fragmento de ADNc de DOF7 con la pauta de lectura correcta para su expresión dentro del vector pET-28b. En la figura 70 se muestra la secuencia de la proteína obtenida:

MDTTQWPQEIMVKPLATNTSEKKPRPEKQQAVN <u>CPRCNSINTKFCYNNY</u>	50
SLTQPRYFCKT <u>CRRYWTQGG</u> SI <u>RNI</u> PVGGGTRKNNKVISSSNLVSNTK	100
NLVPSILVTSSQNQKHHEQGQDLNLDFTSVSSHSFSALELLTGITASTTR	150
GFHSFMPVQLQGDSNTSNIGFPLQDFKQVPMNFCLDGIGNGYGNRVL	200
FPFEDLKQDLQNNNKGDQQGYTTGFWNGMLGGGYNGN <u>pnsssvdklaaa</u>	250
<u>ldhhhhh</u>	258

Fig. 71.- Figura que muestra la secuencia de DOF7-(His)₆-tag. En mayúscula se indica la secuencia de aminoácidos de DOF7. En **rojo** se muestran los aminoácidos del dominio Z-DOF implicados en la unión al ADN (Shimofurutani, N., y cols. 1998). En *cursiva* y subrayado se muestra la extensión resultante de la fusión de DOF7 en el vector pET28b. En **azul** se resalta la cola de histidina utilizada en la purificación de la proteína recombinante y en la detección mediante *western blot*.

1.b.- Expresión de la proteína recombinante DOF7

Para la sobreexpresión de la proteína recombinante, se preparó un precultivo de 200 ml de medio LB en el que crecieron las bacterias BL21 con la construcción pET-28b-DOF7 a una temperatura de 37 °C y en agitación. Al día siguiente, se inocularon tres litros de medio de cultivo líquido a partir de 50 ml del precultivo anterior. Cuando la densidad óptica del cultivo medida a 600 nm alcanzó 0,4, el cultivo se llevó a una cámara cuya temperatura era de 28 °C hasta que la densidad óptica fue de 0,6 DO medida a la misma longitud de onda. En este momento se añadió IPTG hasta una concentración 0,4 mM para iniciar la inducción de la expresión de la proteína DOF7. A las cuatro horas de iniciarse la inducción, se detuvo el crecimiento de las células y se inició el proceso de lisis y purificación del factor de expresión DOF7.

1.c.- Purificación del factor de transcripción DOF7.

Una vez lisadas las células del cultivo mediante una prensa de French a 1000 PSI de presión, se ha proseguido con la purificación como se indica en el capítulo de “Materiales y Métodos”. El resultado de la purificación parcial o enriquecimiento del factor de expresión DOF7 se muestra en la figura 71 siguiente:

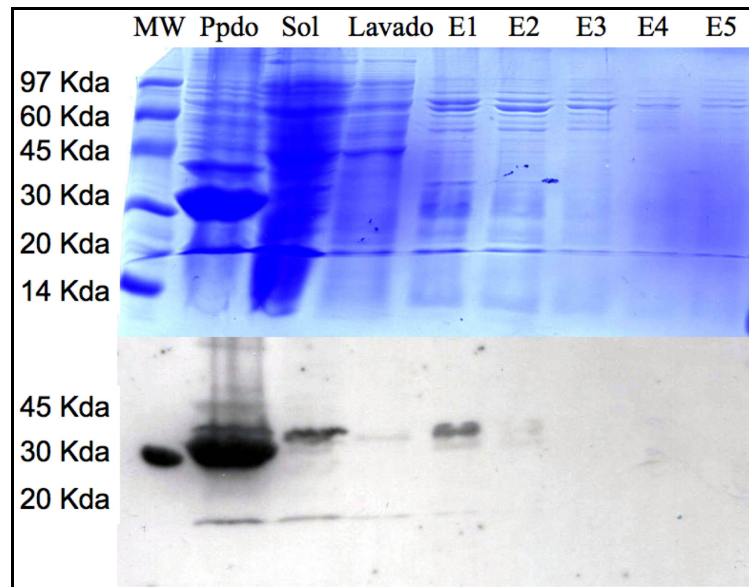


Fig. 72.- Gel de acrilamida en los que se muestra la purificación del fragmento DOF7 tras la expresión en *E. coli*. En la parte superior, la tinción con *Coomassie* de los extractos de cada una de las etapas de la purificación. En la parte inferior se muestra el resultado de la detección por *western blot* utilizando un anticuerpo frente His-tag o cola de histidina. Mw: Peso Molecular, Ppdo: Precipitado, Sol: Soluble, Lav: Lavado, E1-E5: Eluciones 1 a 5.

Se puede observar que la mayor cantidad del factor de transcripción DOF7 se encuentra en la fracción no soluble del extracto tras el lisado de las células de *E. coli*, probablemente se encuentre en los cuerpos de inclusión. No obstante una parte importante del extracto soluble contiene el factor de expresión que ha podido ser recuperado al pasarlo por la columna de

afinidad obteniendo un extracto enriquecido en el factor de transcripción DOF7 (E1, Fig.72). Esta fracción ha sido utilizada para los ensayos EMSA de unión a sondas de ADN marcadas radioactivamente.

1.d.- Reacciones de unión EMSA.

Para llevar a cabo las reacciones de unión se ha utilizado la primera fracción enriquecida en el factor DOF7 y diferentes parejas de oligonucleótidos específicos e idénticos a regiones de las secuencias promotoras tanto de PsTrx *f* como PsTrx *m1* que contienen el sitio AAAG cuya regulación está bajo el control de la proteína DOF (Yanagisawa, S. and Schmidt, R.J. 1999).

Los oligonucleótidos LumrFa/LumrFs (fragmento entre -343 y -312) que han sido utilizados para la reacción de unión *in vitro* frente al factor CCA1, contienen el sitio de unión -AAAG- (Fig. 73), por lo que decidimos emplearlos en el estudio de interacción con DOF7. Se ha utilizado el fragmento Lum2FD , obtenido a partir de los oligonucleótidos Lum2FDs/Lum2FDa, para estudiar los oligonucleótidos implicados en la unión DOF7/LumrF.

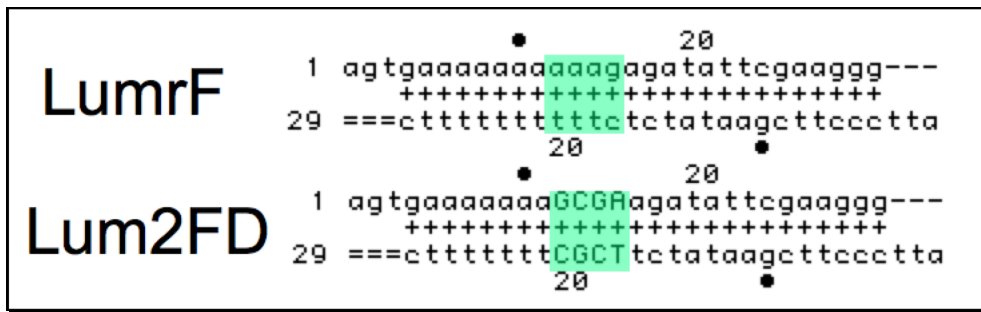


Fig. 73.- Fragmentos de ADN LumrF y Lum2FD de la secuencia reguladora de PsTrx *f* utilizadas como sonda en la reacción de unión con el factor DOF7. En verde se resalta el sitio de reconocimiento de las proteínas DOF.

Tras proceder con el experimento de unión entre el fragmento LumrF y el factor de expresión DOF de igual modo al seguido en los experimentos de unión entre LumrF/CCA1, el resultado obtenido fue el siguiente:

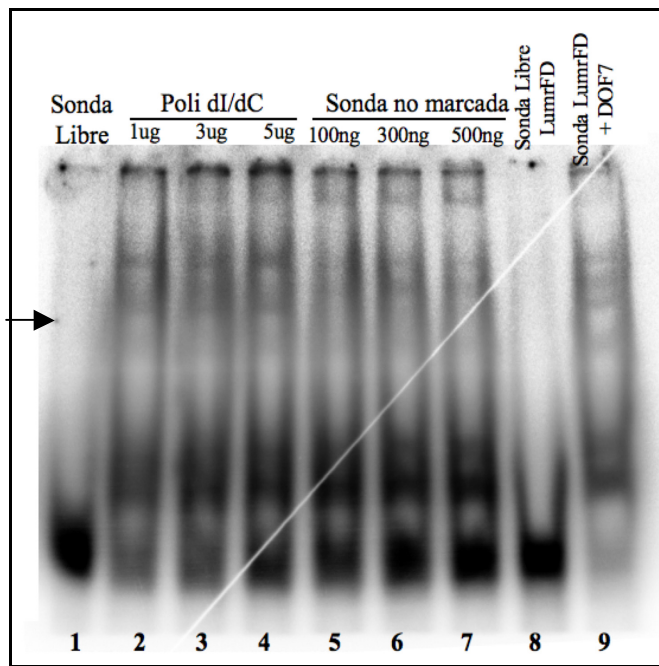


Fig. 74.- Reacción de unión entre el fragmento LumrF con el factor DOF7: Calle 1: Sonda libre, Calles 2-5: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda específica no marcada radioactivamente. Sonda mutada, Calle 8: Sonda Lum2FD libre, Calle 9: Sonda Lum2FD + DOF7.

En la figura 74 observamos que la proteína DOF7 es capaz de unirse a la sonda marcada radioactivamente lo que se resalta en la marca de retardo que provoca en la sonda. En los experimentos de unión inespecífica en los que se añaden cantidades crecientes de competidor inespecífico (poli dI/dC), la señal que corresponde con la unión entre la sonda y el factor de transcripción se mantiene, mientras que cuando se añaden cantidades crecientes de la sonda competidora no marcada radioactivamente (LumrF), la señal disminuye progresivamente, indicando que existe una unión específica entre el factor de transcripción DOF7 y la secuencia -AAAG- que es desplazada por la sonda no marcada. En el estudio de unión entre DOF7/Lum2FD se aprecia una leve señal en comparación con la unión DOF7/LumrF lo que implicaría que en la unión proteína/ADN estarían implicados regiones próximas al motivo DOF presente en la secuencia LumrF.

En el caso de la secuencia reguladora de PsTrx *m1* se ha utilizado el fragmento Lum2M (obtenido a partir de los oligonucleótidos Lum2Ma/Lum2Ms) que contiene un elemento DOF y que se encuentra en la posición -833 y -793 pb desde el sitio de inicio de la transcripción y el fragmento Lum2MD, obtenido a partir de los oligonucleótidos Lum2MDs/Lum2MDa (Fig. 75):

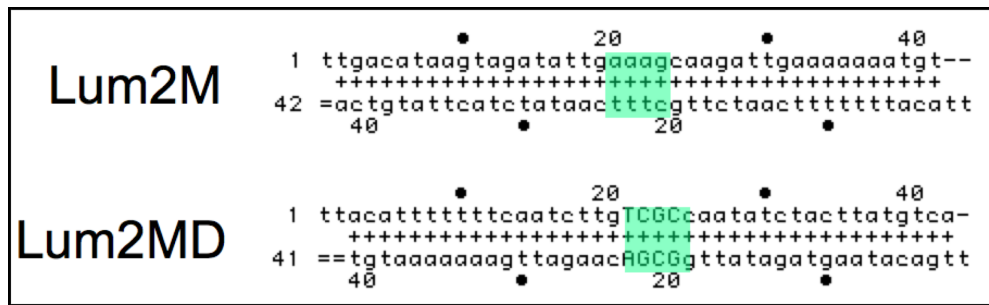


Fig. 75.- Fragmentos de ADN Lum2M y Lum2MD de la secuencia reguladora de PsTrx *m1* utilizadas como sonda en la reacción de unión con el factor DOF7. En verde se resalta el sitio de reconocimiento de las proteínas DOF.

Las reacciones de unión se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas para Lum2M/DOF7, y el resultado se muestra en la siguiente figura 76:

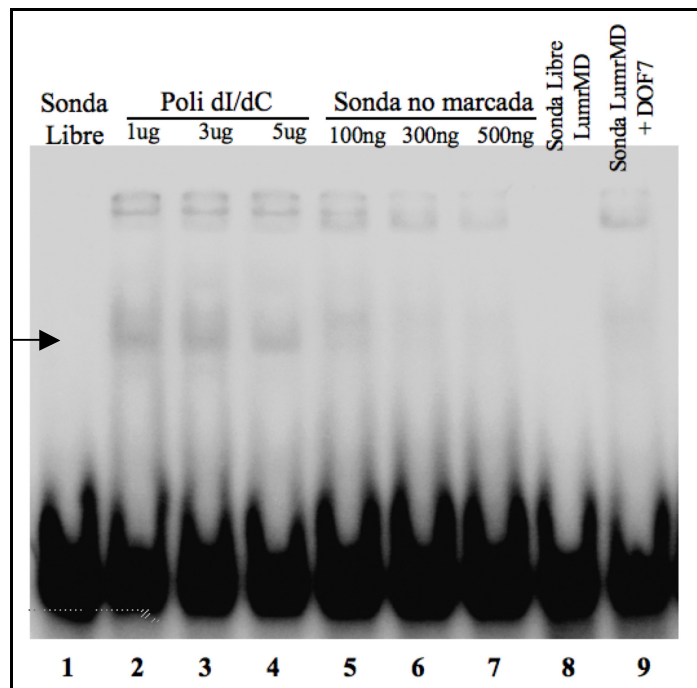


Fig. 76.- Reacción de unión entre el fragmento Lum2M con el factor DOF7: Calle 1: Sonda libre, Calles 2-5: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda específica no marcada radioactivamente. Sonda mutada, Calle 8: Sonda Lum2MD libre, Calle 9: Sonda Lum2MD + DOF7.

La proteína DOF7 es capaz de reconocer el sitio de unión DOF en el fragmento Lum2M ya que en las reacciones de unión en presencia de poli dI/dC se mantiene la señal de retardo que, sin embargo, desaparece en presencia de sonda Lum2M no marcada radioactivamente (Fig. 76), aunque en la interacción entre la proteína y la región de ADN en este caso desaparece la señal al utilizar la sonda mutada en el motivo DOF.

Estos datos indican que el reconocimiento del sitio de unión DOF por parte del factor de transcripción DOF7 es específico y por lo tanto, en la secuencia reguladora de PsTrx *m1*, como en el caso de PsTrx *f*, es posible la unión de este tipo de factor de transcripción a cada secuencia promotora lo que implicaría la regulación de la expresión de las TRXs cloroplastídicas *f* y *m1* de guisante por parte de estas proteínas. Este resultado, además, involucrarían a las TRXs en multitud de procesos metabólicos en los que los factores DOF están implicados (Chen, W., *y cols.* 1996; Vicente-Carbajosa, J., *y cols.* 1997; Papi, M., *y cols.* 2000; Gualberti, G., *y cols.* 2002).

V.- DISCUSIÓN

A.- Localización de PsTRX *f* y PsTRX *m1* en tejidos no fotosintéticos.

A.1.- PrTrxf1::GUS muestra señal en tejido no heterotrófico.

Desde que se descubrió la presencia de TRXs cloroplastídicas en tejidos no fotosintéticos, se han hecho numerosos esfuerzos en la búsqueda de proteínas diana con objeto de asignar una función específica a cada proteína. Con el fin de entender mejor el papel potencial de las tiorredoxinas cloroplastídicas, nos hemos centrado en primer lugar en el análisis de la distribución espacial y temporal de estas proteínas mediante la fusión de las secuencias reguladoras de PsTRX *f* y PsTRX *m1* al gen GUS (β -Glucuronidasa) e insertar esta construcción en plantas de *A. thaliana* con el objetivo de perseguir la localización y estudiar el patrón de la expresión de GUS bajo el control de cada una de las secuencias reguladoras de las TRXs *f* y *m1*. Los resultados obtenidos han dado información acerca de nuevos lugares en los que estas proteínas actúan, lo que implica, probablemente, nuevos papeles metabólicos tanto para PsTRX *f* como para PsTRX *m1*.

Durante la germinación de semillas de plantas transgénicas con la construcción *PrTrxf1::GUS*, el patrón de expresión de GUS mostró que PsTRX *f* se localiza en regiones de una intensa división celular además de confirmar estudios previos en los que encontraron ARNm de PsTrx *f* en raíces (Pagano, E.A., y cols. 2000). Este resultado sugiere que PsTrx *f* podría estar implicada en la proliferación celular. A medida que las plantas transgénicas de *A. thaliana* crecían, se observó una disminución de la expresión de GUS paralela al inicio del proceso de senescencia de la planta.

Por el contrario, Laloi y colaboradores (Laloi, C., y cols. 2004) han encontrado que *AtTRX h5* se sobreexpresa en hojas viejas, estos autores relacionan la actividad de esta enzima con la senescencia más que con el proceso de división celular. Igualmente, hemos detectado expresión de GUS bajo el control de la secuencia reguladora de *PsTrx f* en las células guarda de los estomas. Entre las numerosas enzimas con un papel relevante dentro de estas células se encuentra la enzima ADP-glucosa-pirofosforilasa (AGPasa) que es regulada vía redox a través de la *TRX f* (Ballicora, M.A., y cols. 2000). Además de estos resultados, sorprendentemente se ha detectado señal de la construcción *PrTrxf1::GUS* en estigma y granos de polen en los tejidos florales de las plantas transgénicas. Las tiorredoxinas citosólicas han sido aisladas de polen y se ha descrito que forman parte de los procesos de auto-incompatibilidad en el proceso de reconocimiento polen-pistilo en *Brassica oleracea* (Bower, M.S., y cols. 1996; Cabrillac, D., y cols. 2001), sin embargo el papel de *AtTRX h* en el polen es aun poco conocido en *Arabidopsis thaliana*, especie en la que no sucede el proceso de autoincompatibilidad. Algunos autores han mostrado que la respuesta alérgica a los granos de polen de la hierba está relacionada a las tiorredoxinas tipo *h*, formando parte, así, de la familia de alergenos que podrían contribuir a los síntomas del asma del panadero (Weichel, M., y cols. 2006).

Contrariamente a las TRXs *h*, ningún estudio previo relaciona la TRXs cloroplastídicas con las alergias. Por otra parte, a excepción de la presencia de la TRX cloroplastídica *AtTRX y1* (Collin, V., y cols. 2004) y *AtTRX m3* (Mestres-Ortega, D. and Meyer, Y. 1999) descritas en el botón floral, ningún estudio anterior ha relatado la existencia de *TRX f* en los órganos reproductores.

En el análisis de la secuencia reguladora de PsTrx *f* aislada se han identificado tres elementos reguladores específicos de raíz ROOTMOTIFTAPOX1 (ATATT) (Elmayan, T. and Tepfer, M. 1995), y al menos, otros cinco motivos relacionados con la regulación por luz que son importantes para la expresión durante el desarrollo normal de la planta. Todos estos elementos se han encontrado en la región comprendida entre -444 pb y -150 pb desde el inicio de la traducción de la proteína. De acuerdo con el papel regulador de estos elementos, los resultados de la tinción histoquímica de la actividad GUS desaparece en las plantas transgénicas de *A. thaliana* cuando la construcción delecionada de 149 pb del promotor de PsTrx *f*.

Al igual que ocurre con la construcción *PrTrxf1::GUS*, en las plántulas y plantas *A. thaliana* de 15 días, la construcción *PrTrxm1::GUS*, conduce a una elevada actividad GUS en regiones con una alta actividad de división celular como son los cotiledones y el meristemo apical de la hoja. En la planta completamente desarrollada, la actividad GUS decae a medida que la senescencia aparece en la planta, no obstante, la tinción GUS se vuelve más intensa en el meristemo apical de las raíces, en los extremos de las silicuas y en las flores, en los granos de polen y en las semillas..

A.2.- *PrTrxm1::GUS* muestra señal en tejidos heterotróficos.

Al igual que PsTRX *f*, la actividad de PsTRX *m1* podría estar directamente relacionada con los procesos de regulación redox que tienen lugar en los tejidos con células en procesos de división celular. Deleciones seriadas en 5' del fragmento de la secuencia reguladora de PsTrx *m1*

muestra que la construcción *PsTrxm4::GUS*, con la región de 259 pb próxima al codón de inicio, es suficiente para conferir el mismo patrón de expresión espacial que las plantas transgénicas de *A. thaliana* que contienen la construcción *PsTrxm1::GUS*. Por otra parte, las plantas transgénicas con la construcción *PsTRXm5::GUS*, con 97 bp de la secuencia reguladora y que contiene la posible caja TATA box y dos elementos dependientes de luz, muestran una señal GUS ampliamente reprimido en las plantas transgénicas.

En contraste a los resultados obtenidos con las plantas transgénicas que llevan la construcción *PrTrxm1::GUS*, las plantas que contienen las construcciones *PrTrxm2::GUS* y *PrTrxm3::GUS* (que carecen de las regiones, -1874 hasta -1521, y -1874 hasta -503, respectivamente) presentan coloración en el hipocotilo y en los cotiledones, indicando la existencia de algún elemento regulador en la región comprendida entre -1874 y -503 de la secuencia promotora que reprime la expresión del gen GUS en el hipocotilo. Este hecho revela un mecanismo de control en la expresión de PsTRX *m1* dependiente del tejido. La eliminación de esta región induce un aumento en la expresión de GUS en plantas con las construcciones *PrTrxm2::GUS* y *PrTrxm3::GUS* en comparación con las plantas de *A. thaliana* con *PrTrxm1::GUS*. Ambos resultados indicarían que la región entre -1874 y -503 contiene elementos reguladores positivos y negativos que coordinarían la expresión específica de tejido como los niveles de expresión de PsTrx *m1*. Cuando se elimina la región promotora entre -503 y -138, obteniendo la construcción *PrTrxm4::GUS*, la expresión de GUS se detectó en el hipocotilo y los cotiledones junto con un aumento en la intensidad en la expresión de GUS.

A.3.- Las TRXs cloroplastídicas de guisante pueden participar de otros procesos metabólicos no relacionados con el metabolismo del carbono.

Es probable que las TRXs cloroplastídicas estén reguladas no sólo por la luz sino por otros factores nutricionales u hormonales que pueden influenciar el patrón de expresión de ambas proteínas cloroplastídicas. Estos factores podrían explicar porqué la expresión de ambas proteínas no se perdió completamente por efecto de la luz. Dado que las TRXs cloroplastídicas regulan la actividad de enzimas que participan en el metabolismo de fijación del carbono, es probable que los azúcares sean un factor esencial que controlan la transcripción de PsTrx *f* como de PsTrx *m1*. Un análisis de las construcciones de los promotores fusionados al gen GUS ha revelado que los factores ambientales y el control específico del tejido en la expresión de los genes de las TRXs necesitan de una compleja integración de varios elementos reguladores con sus correspondientes factores de transcripción.

Ambas tiorredoxinas, PsTRX *f* y PsTRX *m1*, se han encontrado en tejidos heterotróficos, y al igual que otras TRXs citosólicas, las TRXs cloroplastídicas podrían estar involucradas en la regulación redox de la proliferación celular durante el desarrollo de la planta, como se ha observado en tabaco con la proteína TRX *h1* (Brugidou, C., y cols. 1993; Reichheld, J.P., y cols. 1999) aunque aun no se ha establecido un papel específico en este proceso fisiológico. Sin embargo, recientemente, un número creciente de proteínas dianas relacionadas con una regulación redox vía TRX han sido identificadas, lo que esta ayudado a esclarecer sus

funciones dentro del cloroplasto (Motohashi, K., y cols. 2001; Balmer, Y., y cols. 2003; Motohashi, K., y cols. 2003). Entre las proteínas diana aisladas, se han descrito proteínas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, en el ciclo de las plantas C4, en el proceso de traducción, en la biosíntesis de ácidos grasos, y el mecanismo de defensa frente a estrés mediado por peroxirredoxina tipo 2-Cys. Las proteínas que podrían estar implicadas con la expresión específica de las TRXs *f* y *m1* en regiones con alta división celular han sido agrupadas junto a proteínas involucradas en el plegamiento y ensamblaje (relacionadas con las proteínas HSP-70), en la división del cloroplasto, tal como la proteína FtsZ, una proteína estructural semejante a la tubulina cuya aglomeración está relacionada con la división celular en bacterias (Lowe, J. and Amos, L.a. 1998), en la división del cloroplasto de plantas (Fujiwara, M. and Yoshida, S. 2001), y con proteínas que juegan un papel en la replicación y transcripción del ADN (ADN helicasa dependiente de ATP) (Balmer, Y., y cols. 2003).

A.4.- Expresión de las TRXs cloroplastídicas en los haces vasculares de raíces.

El hecho de encontrar una presencia significativa de TRXs cloroplastídicas en raíces y flores, nos llevó a estudiar en mayor detalle el patrón de expresión en estos tejidos. Así, los experimentos de hibridación *in situ* pudimos comprobar, como se esperaba, la existencia de transcritos de PsTrx *f* y PsTrx *m1* en las células del mesófilo de las hojas y alrededor de los tejidos vasculares. Estos mismos experimentos también confirmaron que tanto PsTrx *f* como PsTrx *m1* están en las raíces, expresándose de forma

intensa en torno al xilema y floema. Debido a que los nutrientes, iones, lípidos, hormonas y otras sustancias resultantes de diversos metabolismos son transportadas a través de estos conductos, es difícil identificar *a priori* una proteína diana específica para las TRXs cloroplastídicas en estos tejidos. No obstante, el papel de las TRXs parece que estaría relacionado con el complejo sistema de transporte existente en los tejidos vasculares, dónde estas proteínas podrían estar implicadas en la regulación redox de algunos transportadores de membrana. Apoyando esta hipótesis, y gracias al uso de técnicas de proteómica, se ha encontrado que el transportador ADP-glucosa de plastidios (proteína Brittle-1) ha sido identificada como posible proteína diana de TRX *m* en espinaca (Balmer, Y., y cols. 2006a).

A.5.- *Expresión de las TRXs cloroplastídicas en plastidios.*

La expresión de las tiorredoxinas durante el desarrollo de los granos de polen y de los embriones parece responder tanto a un requerimiento de desarrollo como al estatus nutricional. Dentro del grano de polen, PsTrx *m1* fue detectado en forma de dos señales, probablemente situadas en las células vegetativas y generativas de los granos de polen. Estas células, llevan varias organelas, el retículo endoplasmático y los plastidios que contienen almidón, que es posteriormente utilizado para la formación del tubo polínico y para la síntesis de macromoléculas tales como los lípidos, proteínas y vitaminas. Sin embargo, la función exacta de las tiorredoxinas en los órganos florales todavía no está clara, aunque parece evidente que las tiorredoxinas cloroplastídicas están implicadas en la regulación redox de algunos de los procesos relacionados con la maduración del grano de polen

y del óvulo, la fertilización y la formación y desarrollo del embrión. El hecho de que ambas tiorredoxinas participen en el desarrollo del embrión sugiere que están probablemente relacionadas con el proceso de división celular que tiene lugar durante la formación de la semilla. En este sentido, Montrichard y colaboradores (Montrichard, F., y cols. 2003) han mostraron un patrón de expresión diferente de las tiorredoxinas citosólicas PsTRX *h3* y PsTRX *h4* en plántulas y en semillas de *Arabidopsis* sugiriendo que estas proteínas están directamente relacionadas con la germinación. Al igual que ocurre con otros subtipos de las TRXs *h*, las TRXs cloroplastídicas podrían tener un papel en la activación de enzimas implicadas en la movilización de proteínas de reserva durante el crecimiento de las plántulas así como en el metabolismo del carbono.

Con objeto de confirmar las nuevas localizaciones de las TRXs, se llevó a cabo un estudio inmunológico usando anticuerpos policlonales frente a PsTRX *f* y PsTRX *m1*. Mediante esta técnica se detectó proteína de ambas en hojas, raíces, vainas, semillas y flores, dónde la cantidad de proteína se corresponde con los niveles de expresión de ARNm en cada uno de los tejidos (Fig. 36 y Fig. 37). Recientemente, la TRX *m1* fue detectada con anticuerpos anti-TRX *m* de espinaca en los amiloplastos del endospermo de semillas de trigo (Balmer, Y., y cols. 2006a).

La pregunta que se plantea radica en saber si el papel de las TRXs cloroplastídicas expresadas en los órganos reproductores y en raíces es similar al de las proteínas que participan en la regulación de enzimas del ciclo de Calvin en los tejidos verdes o en la movilización de proteínas de reserva durante la germinación de la semilla (Kobrehel, K., y cols. 1992; Besse, I., y cols. 1996; Wong, J.H., y cols. 2002; Marx, C., y cols. 2003) o si la señal de TRX que hemos observado está involucrada en el control de

auto-incompatibilidad en el reconocimiento polen-pistilo (Bower, M.S., *y cols.* 1996; Cabrillac, D., *y cols.* 2001), como ha sido observado para la TRX *h*. Aunque nuestros resultados son insuficientes para explicar el papel concreto de las TRXs cloroplastídicas en raíces y flores, no obstante ofrecen una interesante información de cuales podrían ser las posibles funciones de estas proteínas. En relación con el papel de las TRXs en los plastidios de tejidos heterotróficos durante el metabolismo del carbono, estudios previos mostraron bajos niveles de transcritos de ARNm y proteínas de FBPasa y malato deshidrogenasa en semillas y raíces, aunque no se detectó actividad enzimática alguna en dichos órganos (Pagano, E.A., *y cols.* 2000). Sin embargo, el hecho de que las raíces, granos de polen, las semillas y los ovarios contengan plastidios y amiloplastos, dónde almacenan almidón y otros compuestos de reserva, sugiere que el papel de las TRX *f* y TRX *ml* en raíces y en los órganos florales podría estar enfocado en la regulación de enzimas involucradas en el metabolismo del almidón y carbohidratos solubles así como en la regulación de los haces vasculares de las raíces y en la germinación y maduración de la semilla en las flores. Apoyando esta hipótesis sobre el papel de las TRX plastídicas en tejidos no fotosintéticos están los trabajos obtenidos a partir del tubérculo de patata, dónde la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa es activada en mayor medida por la enzima TRX *f* y por TRX *m* de espinaca como mecanismo de regulación en la síntesis de almidón en respuesta al contenido de carbono de la planta (Ballicora, M.A., *y cols.* 2000). Además, Sparla y colaboradores (Sparla, F., *y cols.* 2006) han encontrado transcritos de β -amilasa en hojas, raíces, flores, polen y semillas, una enzima regulada por tiorredoxina. Todos estos datos sugieren que la regulación redox por parte de las tiorredoxinas no es un mecanismo exclusivo de los tejidos fotosintéticos, sino que es un sistema

que se puede desarrollar en los plastidios de toda la plantas, regulando procesos de casi todas las etapas del desarrollo (Tiessen, A., *y cols.* 2002; Tiessen, A., *y cols.* 2003; Geigenberger, P., *y cols.* 2005). En los órganos no fotosintéticos, la tiorredoxinas podrían no ser reducidas por la luz a través del sistema ferredoxina/FTR, como sucede en los cloroplastos, pero en estudios que han usado técnicas actuales y mejorados, Balmer y colaboradores ha identificado un sistema completo de ferredoxina/tiorredoxina en los amiloplastos del endosperma de trigo que incluye a la ferredoxina, ferredoxina-NADP reductasa y ferredoxina-tiorredoxina-reductasa (FTR). Como mecanismo de regulación, estos autores, sugieren que la luz podría ser reconocida como una señal tiol en el cloroplasto, dónde permite la síntesis de azúcares durante el proceso de la fotosíntesis. Balmer y colaboradores, proponen además que los azúcares sintetizados son transportados a los órganos sumidero, como por ejemplo las semillas, dónde son hidrolizados por las enzimas glucosa-6P deshidrogenasa y 6-fosfogluconato deshidrogenasa para generar el poder reductor en forma de NADPH, una señal tiol para reducir los grupos tioles de la ferredoxina a través de acción de la enzima ferredoxina-NADP reductasa en el amiloplasto (Balmer, Y., *y cols.* 2006a). Así, las reacciones que tienen lugar en el amiloplasto podrían estar, indirectamente controladas por la fotosíntesis y el metabolismo del ciclo de Calvin.

Debido a que las raíces y los órganos florales también contienen amiloplastos y almidón, nosotros proponemos que estos órganos podrían estar también equipados con un sistema ferredoxina/FTR/tiorredoxina completo. Hemos detectado la presencia de transcritos ARNm de PsFTR junto con PsTRX *f* y PsTRX *m1* en hojas, tallos, raíces, flores y semillas, y sugerimos que en tejidos no fotosintéticos, la FTR es probablemente la

enzima que reduce las TRXs plastídicas. Sin embargo, será necesario identificar otros componentes del sistema ferredoxina-tiorredoxina en raíces y flores antes de confirmar el mecanismo de reducción de las TRXs en los plastidios de los tejidos heterotróficos de plantas.

En relación con las funciones de las TRXs plastídicas, la identificación de potenciales proteínas diana en los amiloplastos del endospermo de trigo ha ayudado a determinar las posibles funciones de las proteínas disulfuro en los órganos heterotróficos. Estas proteínas están clasificadas en función del proceso en los que están implicados (Balmer, Y., y cols. 2006b). De las 289 proteínas aisladas, se han encontrado proteínas implicadas en el metabolismo de los carbohidratos y del almidón, en la biosíntesis de lípidos y aminoácidos, en el metabolismo de los aminoácidos y en el plegamiento y ensamblaje de las proteínas. Además de la enzima AGPasa, otras proteínas diana han sido bioquímicamente relacionadas a las TRXs, como es el caso de la enzima acetil-CoA carboxilasa (Sasaki, Y., y cols. 1997), ciclofilinas (Motohashi, K., y cols. 2003), peroxirredoxina BAS1 (König, J., y cols. 2003), proteína-disulfuro isomerasa (Danon, a. and Mayfield, S.P. 1994; Kim, J. and Mayfield, S.P. 2002) y tiosulfato sulfotransferasa (Ray, W.K., y cols. 2000). En los tejidos no fotosintéticos, las tiorredoxinas cloroplastídicas aparecen estar relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos y los lípidos, con la biosíntesis de aminoácidos, y en la replicación y transcripción del ADN, en el plegamiento de las proteínas y en la movilización de las proteínas de reserva, en vez de en la fotosíntesis.

En conclusión, este trabajo muestra evidencias sólidas de que las enzima PsTRX *f* y PsTRX *m1* se localizan en raíces, tejidos vasculares, semillas, granos de polen, embriones y órganos reproductores, además de en

hojas, y parece que participan en casi todas las fases del desarrollo de las plantas. Además, nuestros resultados sugieren que las tioredoxinas cloroplásticas *f* y *m1* están implicadas en la división celular y en la reproducción de las plantas.

B.- Regulación de PsTRX f y PsTRX m1 por luz.

B.1.- Efecto de la luz en la expresión de PsTRX f y PsTRX m1.

La luz es capaz de inducir una respuesta en los diferentes procesos del desarrollo de la planta tales como la germinación de las semillas (Casal, J.J. and Sánchez, R.A. 1998), el movimiento de los cloroplastos junto con la apertura y cierre de los estomas (Briggs, W.R. and Christie, J.M. 2002; Kasahara, M., y cols. 2002), el fototropismo (Liscum, E. and Stowe-Evans, E.L. 2000), el gravitropismo (Myers, a.B., y cols. 1994), la fotomorfogénesis (Nemhauser, J. and Chory, J. 2002), la huida de la sombra (Smith, H. and Whitelam, G.C. 1997), el ciclo circadiano (Devlin, P.F. 2002) y la inducción de la floración (Guo, H.W., y cols. 1998).

El efecto indirecto de la luz mejor descrito es la activación de la fotosíntesis que produce la energía necesaria para que ocurran la mayoría de los procesos metabólicos y de desarrollo. La asimilación del CO₂ a través del ciclo de Calvin sufrirá modificaciones que son dependientes de la luz a través de la activación de la expresión de genes que conducen a cambios de los metabolitos intermediarios del metabolismo carbonado. En general el

fitocromo es el fotorreceptor implicado en la regulación transcripcional del metabolismo del carbono. El sistema ferredoxina-tiorredoxina es uno de los mecanismos dependientes de la luz mas interesantes que ocurren durante la fotosíntesis. Este sistema es capaz de llevar equivalentes de reducción desde la ferredoxina reducida por la cadena de transporte electrónica durante la fotosíntesis, hasta las enzimas fotomoduladas del ciclo de Calvin y procesos afines, convirtiéndolas en sus formas reducidas y activas (Buchanan, B.B. 1980).

El estudio de las TRXs cloroplásticas *f* y *m1* en plantas de guisante mostró que son sensibles a la luz, observándose un aumento continuo de la expresión de sus genes, alcanzando un máximo hacia la mitad de la fase luminosa del fotoperiodo, para descender hasta una cantidad de ARNm mínima en la mitad de la fase de oscuridad. Sus proteínas correspondientes siguieron un patrón similar, por lo que se pudo deducir que la expresión génica y la biosíntesis de ambas TRXs es inducida por la luz. Asimismo, estudios anteriores realizados en nuestro grupo detectaron que plántulas de espinacas crecidas en la oscuridad e iluminadas durante 3h y 36h, mostraron un aumento de la TRX *f* de 3 y 10 veces el nivel de expresión obtenido en la oscuridad, respectivamente (Carrasco y col., 1992).

Además de la luz, el reloj circadiano puede controlar numerosos procesos de desarrollo a través del ciclo de vida de la planta. Algunos de estos procesos ocurren diariamente y son controlados por el reloj circadiano. Otros ocurren anualmente y son controlados por cambios en el fotoperiodo que son detectados por el sistema circadiano (Fakir et al., 2007). En algunas especies de plantas el sistema circadiano regula la germinación de las semillas (Densmore, 1997; Zhong y col., 1998) en las primeras etapas del desarrollo. En *Arabidopsis* y tomate tras la germinación, el sistema

circadiano regula la elongación de los hipocotilos y el crecimiento es mayor de noche y mínimo en la mañana (Dowson-Day, M.J. and Millar, A.J. 1999). La formación de los cotiledones, el movimiento de las hojas, la diferenciación celular y la huida de la sombra son respuestas que están bajo la regulación del reloj circadiano (Webb, 2003; Salter y col., 2003). Especialmente interesante es el ritmo circadiano observado en la apertura de los estomas (Briggs, W.R. and Christie, J.M. 2002). Por ejemplo, en *Arabidopsis*, la conductancia estomática es mayor durante el día que durante la noche (Somers, D.E., y cols. 1998), mientras que las plantas CAM (Crassulacean Acid Metabolism) la apertura de los estomas tiene una fase opuesta (Timan y col., 1992).

En otro sentido, la transición de la fase de desarrollo vegetativo a la reproductiva a través de fotoperiodo ha sido el proceso regulado por el reloj circadiano mejor caracterizado. También lo han sido la fotosíntesis y el metabolismo carbonado que son dos de los numerosos procesos celulares importantes que ocurren en un tiempo fijo del día. Los genes *Lhca* y *Lhcb* (ó genes *CAB*), que codifican los polipéptidos que se unen a la clorofila *a/b* del fotosistema I y II, la pequeña subunidad de la rubisco (RUBISCO) y la rubisco activasa (RCA) que participan en la fijación del carbono están controlados por el reloj interno de la planta (Pilgrim, M.L. and McClung, C.R. 1993; Harmer, S.L., y cols. 2000; Schaffer, R., y cols. 2001). Los ritmos de expresión de los genes fotosintéticos se correlacionan con los ritmos circadianos observados en la apertura de los estomas y la asimilación del CO₂ (Salome, P.A., y cols. 2002). Las modificaciones posttranscripcionales de los componentes fotosintéticos tal como la proteína D1 de la planta de lenteja (*Spirodela oligorrhiza*) pueden ser regulados por el sistema circadiano (Booij y col., 2002). Otros genes que codifican proteínas

implicadas en la fotorespiración, el metabolismo y transporte de los azúcares están también bajo el control circadiano (McClung, C.R., *y cols.* 2000). Aún más complejo es saber que distintos órganos pueden mantener la expresión rítmica de genes con diferentes fases, además algunos genes tienen ciclos con periodos variados en diferentes células (Thain, S.C., *y cols.* 2000; Thain, S.C., *y cols.* 2002).

Los análisis desarrollados por Harmer y sus colaboradores utilizando microarrays de oligonucleótidos de alta densidad para examinar la expresión génica de *Arabidopsis thaliana*, desvelaron que el 6% de más de 8000 genes en el array exhibieron cambios circadianos en el contenido de los ARN mensajeros, y cuyos picos de expresión se encuentran a diferentes tiempos del reloj de 24 horas. Estos genes se pueden dividir en 6 grupos basados en la hora a la que se observa el pico de expresión (Harmer, S.L., *y cols.* 2000). Los transcritos muestran picos de abundancia en todas las fases día y noche del ciclo circadiano, sugiriendo que los factores de transcripción utilizan una red compleja para generar esta variedad de fases. Entre los genes regulados por el reloj circadiano se han descrito al menos 22 genes implicados en la captación de la luz y la transferencia electrónica; al igual que genes que codifican los fotorreceptores fitocromo, criptocromo y fototropina; pigmentos fotoprotectores; y enzimas implicadas en la modificación de los lípidos (Rikin, A., *y cols.* 1993). También se detectaron genes implicados en la fotosíntesis, metabolismo del carbono, producción y transporte de azúcares y enzimas que participan en la regulación del metabolismo carbonado de plantas superiores (Goddjin y van Dun, 1999). La coordinación de los metabolismos del carbono, nitrógeno y azufre están mediados por el reloj y presentan, en general, un máximo de expresión cerca del final de la noche subjetiva. El hecho de que distintos genes presenten los

máximos niveles de expresión cerca del final de la noche subjetiva sugiere que el reloj podría estar jugando un papel importante destinando los azúcares asimilados hacia procesos diferentes ó para ser almacenados en el cloroplasto. El reloj circadiano juega un papel en la distribución del carbono fijado hacia en función de las necesidades metabólicas, transporte y almacenamiento y parece que la regulación circadiana del metabolismo de los azúcares puede proporcionar un mecanismo para la homeostasis del carbono (Chatterton, N.J. and Silvius, J.E. 1979).

El hecho de que en *Arabidopsis thaliana*, alrededor del 20 % de sus genes están bajo la regulación del ciclo circadiano incluidos numerosos pertenecientes al metabolismo carbonado (Harmer, S.L., y cols. 2000; Jiao, Y., y cols. 2005; Edwards, K.D., y cols. 2006), nos llevó a preguntarnos si las Trxs cloroplastídicas eran inducidas por la luz de forma directa o bien lo eran a través de un reloj interno de la propia planta. Las TRXs cloroplastídicas activan varias enzimas del ciclo de Calvin durante el metabolismo del carbono, y muy probablemente estén implicadas en la regulación del metabolismo del nitrógeno, biosíntesis de lípidos, en procesos de división celular, reproducción y transporte, todos susceptibles de estar controlados a través del sistema circadiano.

En plantas de guisante mantenidas en luz continua durante 24 horas, se comprobó que los niveles de expresión del gen CAB mantiene la periodicidad al igual que ocurre con numerosos genes regulados por el ciclo circadiano (Tavladoraki, P., y cols. 1989; Millar, A.J. and Kay, S.A. 1991; Kellmann, J.W., y cols. 1993) alcanzando el máximo en la mitad del periodo de luz. En plantas de haba o tabaco el máximo de expresión del gen CAB puede aparecer en las primeras 4 horas del periodo de luz (Tavladoraki, P., y cols. 1989; Wehmeyer, B., y cols. 1990). En hojas de guisante sometidas al

mismo tratamiento de luz continua durante 24 horas, los niveles de ARNm como de proteína de PsTrx *f* y PsTrx *m1* oscilaron manteniendo la ritmicidad, y mostraron un pico máximo de su expresión hacia la mitad del periodo de luz (6 horas). Durante la noche subjetiva, la expresión disminuye, indicando que ambas Trxs responden a un control interno rítmico. La regulación de la expresión de estos dos genes por el reloj circadiano esta en consonancia con la descrita para genes implicados en la fotosíntesis como la subunidad pequeña de la rubisco (Pilgrim, M.L. and McClung, C.R. 1993), la proteína Lhc a/b (CAB) (Tavladoraki, P., y cols. 1989; Millar, A.J. and Kay, S.A. 1991; Kellmann, J.W., y cols. 1993). Además, estos resultados, se ven reforzados por los datos obtenidos por Harmer y colaboradores (Harmer, S.L., y cols. 2000) en su estudio de respuesta de genes de *Arabidopsis* al ritmo circadiano en el que describen que la expresión del ARN mensajero de AtTrx *f2* (AAD 35004), de AtTrx-Like5 (AAD 35003) y AtTrx-Like1 (AAC 14032) mantienen un ritmo oscilatorio de expresión idéntico al que se ha descrito para ambas TRxs cloroplastídicas *f* y *m* de guisante en esta Tesis Doctoral.

Otros estudios complementarios han descrito que la expresión de Trx *m* de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrTrx *m*) sigue un ritmo sinusoidal a lo largo de un periodo de luz/oscuridad que se mantiene durante otro periodo con luz continua. El uso del DCMU y DBMIB, inhibidores de la cadena transportadora de electrones, afectó negativamente la expresión de CrTrx *m* aunque no logró la inhibición completa de la expresión de dicho gen lo que sugiere que existen varias rutas de transducción de la señal de luz implicadas en la regulación de la expresión de CrTRX *m*, sin embargo dado que ambos inhibidores afectan por igual a la expresión de la proteína, el estado redox de las plastoquinonas no estaría implicado en dicha regulación

(Lemaire, S.D., *y cols.* 2002) como sucede en el caso de otros genes de expresión nuclear (Escoubas, J.M., *y cols.* 1995; Karpinski, S., *y cols.* 1997).

Los máximos de acumulación de ARNm de las tiorredoxinas cloroplastídicas PsTrxs *f* y PsTrx *ml* de hojas de guisante en las primeras horas del periodo de luz, sugieren que estarían participando activamente en el inicio del metabolismo carbonado en el ciclo de Calvin al igual que ocurre con genes que codifican para proteínas del aparato fotosintético PONER LAS QUE PARTICIPAN ADEMÁS DEL METABOLISMO DEL CARBONO (Harmer, S.L., *y cols.* 2000).

Este tipo de regulación por parte de las TRXs cloroplastídicas, concuerda con la regulación de sus proteínas diana más conocidas, la FBPasa cloroplastídica, SBPasa, PRKasa y MDH-NADP que son enzimas cuya expresión y actividad metabólica están relacionadas con la de la luz (Johnson, H.S. and Hatch, M.D. 1970; Chueca, A., *y cols.* 1984; Raines, C.A., *y cols.* 1988; Khayat, E., *y cols.* 1993). La actividad de estas enzimas dará origen a la síntesis del almidón en el cloroplasto y sacarosa en el citosol cuya cantidad van aumentando a lo largo del periodo de luz, para disminuir en los tejidos fuente durante el periodo de oscuridad (Gerhardt, R., *y cols.* 1987). Además, se sabe que el gen GBSSI de distintas plantas, responsable de la biosíntesis de la amilosa del almidón transitorio en hojas, es también regulado por el reloj circadiano (Merida, A., *y cols.* 1999; Dian, W., *y cols.* 2003; Tenorio, G., *y cols.* 2003). La síntesis de estas proteínas deben estar coordinadas con la fotosíntesis de la que obtienen los precursores y la energía necesarias para la síntesis de los azúcares. Nassoury y colaboradores (Nassoury, N., *y cols.* 2001) muestran en estudio llevado a cabo en el alga marina *Dinoflagellate*, que la fijación de CO₂ por Rubisco y la liberación de O₂ siguen un ritmo circadiano con un desfase de 6 horas

ente ellas. Estos autores proponen que la distribución rítmica de la Rubisco dentro de la célula está casualmente relacionada con el ritmo de fijación del carbono y sugieren varios mecanismos implicando la captación de la enzima que podría afectar el incremento de la eficiencia de la fijación del carbono.

Todos estos datos indican la incidencia directa de la luz sobre varios procesos que van desde la captación de la luz y la transformación química de ésta en poder reductor y energía hasta la síntesis de azúcares. En este último proceso, las Trxs cloroplastídicas juegan un papel fundamental modulando la actividad de varias enzimas cloroplastídicas implicadas en el metabolismo del carbono a lo largo del periodo día/noche. De esta forma se puede sugerir que el reloj circadiano endógeno puede regular la síntesis de sacarosa y almidón en hojas de forma coordinada con la actividad fotosintética.

Habría igualmente que destacar la relación de las TRXs cloroplastídicas con otros procesos metabólicos relacionados con la luz, así, durante la síntesis de lípidos existe una interacción de la Trx *f* con la enzima acetilCoA carboxilasa (Sakai, T., *y cols.* 2001; Balmer, Y., *y cols.* 2004) que es la enzima que regula la velocidad de síntesis de los ácidos grasos en animales, levaduras *E. coli* y en plantas (Wakil, S.J., *y cols.* 1983). que es regulada por la luz (Sauer, A. and Heise, K.P. 1983). Las TRXs también son capaces de regular la actividad de la enzima glutamina sintetasa (Balmer, Y., *y cols.* 2004), enzima clave del metabolismo del nitrógeno. Esto indicaría, que la luz es capaz de modular la actividad de las enzimas acetil CoA carboxilasa y glutamina sintetasa a través de la regulación de la expresión de las TRXs cloroplastídicas, y por lo tanto regular la síntesis de ácidos grasos y la asimilación del amonio y síntesis de aminoácidos.

Las TRXs pueden convertirse en unos de los instrumentos por medio del cual la luz regula y sincroniza las diferentes rutas anabólicas de la síntesis de glúcidos, ácidos grasos y proteínas en plantas. Así, en condiciones normales, las TRXs cloroplastídicas PsTRX *f* y PsTRX *m1* responden de forma positiva a la luz, ambas presentan unos niveles de expresión que se sincronizan con respecto al reloj interno de la planta de guisante. Esto indicaría que PsTRX *f* y PsTRX *m1* forman parte de la maquinaria básica de asimilación del carbono en el ciclo de Calvin, regulan la ruta principal de síntesis de ácidos grasos y asimilación de amonio favoreciendo el desarrollo y el crecimiento de la planta y finalmente contribuyendo al proceso de aclimatación y adaptación del metabolismo de la planta a los cambios estacionales (Yanovsky, M.J. and Kay, S.A. 2002).

B.2.- Funcionalidad de los elementos reguladores presentes en los promotores de PsTrx *f* y PsTrx *m1*.

La regulación en la expresión por la luz de ambas TRXs *f* y *m1* se puede explicar por mecanismos transcripcionales ya que se han encontrado en su secuencia varios elementos *cis* regulados por la luz.

El análisis y comparación de los promotores de PsTRX *f* y PsTRX *m1* con los elementos reguladores presentes en las bases de datos PLACE y PlantCARE (Higo, K., y cols. 1999; Rombauts, S., y cols. 1999) ha destacado un grupo de elementos, GATA, GT1CONSENSUS e Ibox (Fig. 20A y 20B) (Lam, E. and Chua, N.H. 1989; Gilmartin, P.M., y cols. 1990), descritos en el capítulo de resultados y que están relacionados con la regulación por luz. Esta información apoya los datos de inducción por la luz

de la expresión génica y biosíntesis de las proteínas TRXs *f* y *m1*, ambas implicadas en el metabolismo del carbono, proceso igualmente dependiente de la luz (Jacquot, J.P., y cols. 1976; Schürmann, P., y cols. 1976; Jacquot, J.P., y cols. 1978). Además, cabe la posibilidad de que las TRXs cloroplastídicas formen parte del 20 % del genoma de plantas regulado por la iluminación (Harmer, S.L., y cols. 2000; Jiao, Y., y cols. 2005; Edwards, K.D., y cols. 2006).

El análisis filogenético realizado a partir de las secuencias proteicas de las TRXs cloroplastídicas de *Arabidopsis thaliana* y *Pisum sativum* hasta ahora conocidas, indica que están relacionadas entre sí. Las distintas isoformas (*f*, *m*, *x* e *y*) forman distintos grupos y su funcionalidad se asemeja. Sin embargo, en *Arabidopsis thaliana*, las proteínas de un mismo tipo se han diversificado y su especificidad esta siendo estudiada. Por otra parte, el estudio comparativo entre las secuencias reguladoras de las TRX *f* y *m1* de ambas especies han mostrado varios elementos *cis* similares, siendo los más importantes identificados, los elementos implicados en el control de la expresión tisular, los elementos implicados en la regulación por luz y los relacionados con el metabolismo del carbono. La proximidad filogenética entre las TRXs cloroplastídicas de ambas especies de plantas tanto a nivel proteico como de las secuencias promotoras entre las isoformas de las distintas especies de plantas sugiere que no deben ocurrir incompatibilidades entre las dos especies durante la expresión heteróloga y confirman la funcionalidad de las secuencias reguladoras de Trx *f* y Trx *m1* de guisante fusionados al gen GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Este hecho queda demostrado con los resultados de localización tisular obtenidos en los estudios histoquímicos de expresión de GUS bajo el control de los promotores la TRX *f* y *m1* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* que

concuerdan con los resultados obtenidos por hibridación *in situ* en tejidos de guisante .

En este sentido, los estudios de expresión de GUS en las plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que contienen las construcciones preparadas con el promotor entero o con delecciones seriadas del mismo han revelado la participación directa tanto de elementos positivos como negativos en el proceso de activación e inhibición por luz de la expresión del gen GUS, a lo largo de un fotoperiodo de 12h luz/12h oscuridad.

Los niveles de expresión GUS bajo el control de PrTrxf1, en plantas de *Arabidopsis thaliana* con la construcción f1::GUS, oscilan de forma idéntica a como lo hacen los transcritos del gen PsTrx *f* en hojas de guisante, siendo el nivel máximo de expresión de GUS en mitad del periodo de luz (6 horas) durante el día, perdiéndose durante el periodo de oscuridad y manteniéndose dicha oscilación durante el segundo día y durante la noche subjetiva (luz continua). En plantas transgénicas de *A. thaliana* que expresan la construcción PrTrxf2::GUS se observa una drástica reducción de la expresión hasta niveles basales comparables a las plantas transgénicas con la construcción pB1101::GUS. Esto indica que los elementos relacionados con la luz (GATABOX y GT1CONSENSUS y Evening Element) eliminados son esenciales para dirigir la expresión GUS dependiente de la luz y de los osciladores internos de *Arabidopsis thaliana*.

Las plantas transgénicas que contienen las diferentes construcciones con las secuencias reguladoras, bien entera o truncadas, de PsTrx *m1* fusionadas al gen GUS han mostrado un comportamiento diferente al descrito con el promotor de la PsTrx *f*. Probablemente, debido a la diferencia de tamaño y a la distribución de los diferentes elementos *cis* relacionados con la expresión por luz o a una mayor complejidad en la

regulación por parte de la luz. La construcción *PrTrxm1::GUS* mantiene unos niveles inferiores a los mostrados por las plantas transgénicas con la construcción *PrTrxf1::GUS*, indicando que existe una diferencia de amplitud en la oscilación durante el fotoperiodo. Pero al igual que las plantas de esta construcción, mantiene la oscilación debida a la transición luz/oscuridad, con un máximo de acumulación de ARNm a las 6 horas del periodo de luz. Este mismo patrón de expresión se observa en las plantas transgénicas con la construcción *PrTrxm2::GUS*, no obstante tanto en el periodo de luz como en el periodo de oscuridad, los niveles de transcritos de GUS son mayores que con la construcción *PrTrxm1::GUS*. Sorprendentemente, a medida que se disminuye el tamaño de la secuencia promotora en las construcciones *PrTrxm3::GUS* y *PrTrxm4::GUS* los niveles de expresión aumentan de forma significativa, así mismo se pierde la oscilación en los periodos luz/oscuridad, con *PrTrxm5::GUS* se pierde totalmente la expresión.

Aunque se esperaba que con la eliminación de elementos reguladores relacionados con la luz se produjeran unos niveles de expresión menores de GUS en las plantas transgénicas que portaran construcciones con regiones promotoras más cortas cuando eran sometidas a iluminación, las delecciones seriadas de los fragmentos 5' del promotor de PsTRX *m1* llevó a un incremento de los niveles de ARNm de GUS dependientes de la luz. Así, en el caso hemos comprobado que las plantas de *A. thaliana* con la construcción *PrTrxm4::GUS* presentan unos niveles de ARNm de GUS hasta cinco veces mayores que las plantas con la construcción *PrTrxm1::GUS*, mientras que las plantas con la construcción *PrTrxm2::GUS* presentan unos niveles de transcritos de GUS doble con respecto a las plantas transgénicas con la construcción *PrTrxm1::GUS*. Aún más interesante es el

hecho que a medida que se va a acortando la secuencia reguladora fusionada al gen GUS, los niveles de transcritos para este gen no muestra pérdida de expresión en la transición luz/oscuridad. Así pues, la pérdida de la regulación por luz en las diferentes deleciones de la región reguladora de PsTRX *mI* sugiere que el fragmento entre -1521 pb y -138 pb, que contienen ocho elementos reguladores relacionados con la luz, son necesarios para oscilación de la expresión de dicha proteína en los procesos de transición en las fase luz/oscuridad.

Esto es indicativo de que todos los elementos relacionados con la expresión por luz encontrados en la secuencia reguladora de PsTrx *mI* son necesarios, en su totalidad, para mantener la inducción de la expresión del gen y la respuesta ajustada durante los periodos de día/noche. El incremento paralelo de la expresión al reducir el tamaño de los promotores indicaría igualmente la presencia de elementos *cis* reguladores negativos y positivos que adecuarían la respuesta modulada durante la iluminación.

Mientras que en el caso del promotor de PsTrx *f* las regiones relacionadas con la expresión por luz localizadas por comparación con los elementos que se encuentran en la base de datos PLACE y PlantCARE se encuentran en una región de 100 pb próximos entre sí, y varios de ellos en tandem, en la secuencia promotora de PsTrx *mI*, los elementos implicados en la regulación por luz de PsTrx *mI* se encuentran situados de forma dispersa a lo largo de toda la secuencia.

El elemento GT1CONSENSUS está presente en genes regulados por la luz en un amplio rango de especies de plantas tales como *Nicotiana tabacum*, *Spinacia oleracea*, *Avena sativa*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* y también *Pisum sativum* (Zhou, D.X. 1999), mientras que los elementos GATABOX están presentes en los genes CAB (LhcII) cuya

expresión está relacionada con la luz y con el reloj interno de las plantas (Anderson, S.L., *y cols.* 1994; Jeong, M.J. and Shih, M.C. 2003). Ambos elementos no son suficientes para inducir por si solos la expresión de los genes por la luz aunque si necesarios ya que la combinación entre los diferentes elementos relacionados con luz, LRE (Light Responsive Element) serían los responsables de la respuesta a la luz (Puente, P., *y cols.* 1996; Chattopadhyay, S., *y cols.* 1998). ESTE PÁRRAFO IRÍA MEJOR EN EL APARTADO DE COMENTAR LOS ELEMENTOS REGULADORES

Varios estudios han demostrado que es necesaria la interacción combinada entre los distintos elementos de luz (LREs) para una respuesta correcta de los promotores a la luz (Degenhardt, J. and Tobin, E.M. 1996; Puente, P., *y cols.* 1996; Feldbrugge, M., *y cols.* 1997). Los promotores que contienen estos múltiples elementos de luz no sólo tienen la habilidad de conferir una actividad intensa de expresión en plantas crecidas a la luz en relación a las que lo hacen en la oscuridad, sino también son capaces de responder a los pulsos de luz mediados por el fitocromo como ocurre en la especificidad de tejido y el desarrollo del cloroplasto. Aunque existen promotores con un sólo elemento de luz, tal como G box o motivo GATA, que pueden responder a luz continua de alta intensidad y a la diferenciación cloroplastídica, son incapaces de responder a la luz de baja intensidad mediada por el fitocromo, y su función depende del contexto del promotor (Puente, P., *y cols.* 1996). Se han realizado numerosos progresos en el análisis de la actuación de los múltiples elementos de luz, de la señalización de los componentes y a distintos niveles de la transducción de la señal, sin embargo aun queda mucho por desvelar acerca del entendimiento del proceso de transducción de la señal que se une a la fotopercepción y a la regulación de la transcripción. La contribución combinada de los elementos

de luz GATA, Gbox ó GT1 presentes en las secuencias reguladoras de TRXs *f* y *m1* de guisante sugieren que la expresión en respuesta a la luz se hará adecuadamente durante los periodos de luz/oscuridad. Es probable que participen elementos reguladores adicionales durante el proceso oscilatorio y que permite que se mantenga incluso en luz continua.

B.3.- El factor de transcripción CCA1 interactúa in vitro con elementos presentes en los promotores de PsTRX f y PsTRX m1.

Los factores de transcripción CCA1 y LHY (Late Elongated Hypocoty) pertenecen a la familia Myb y forman parte esencial en el modelo de regulación del ciclo circadiano propuesto para las plantas (Wang, Z.Y. and Tobin, E.M. 1998; Green, R.M. and Tobin, E.M. 1999; Alabadi, D., y cols. 2001). El modelo de circuito de retroalimentación negativa del oscilador central de *Arabidopsis* incluye la expresión de CCA1 y LHY que son activados por la luz mediante PIF3. CCA1 y LHY suprimen directamente la expresión de TOC1, que a su vez es el activador de los mismos. CCA1 y LHY también activan genes con expresión por la mañana reconociendo en sus promotores los sitios de unión a CCA1 (CCA1 Binding Site, CBS), y reprimen los genes de expresión por la tarde al interactuar con los elementos EE (Evening Element). Cuando los niveles de proteínas de CCA1 y LHY decaen, los de TOC1 incrementan, interactuando TOC1 con PIF3 y comenzando un nuevo ciclo.

Harmer y sus colaboradores encontraron que cinco genes responsables del tiempo de floración, incluidos los factores Myb CCA1 y LHY1, eran

regulados de forma circadiana. El factor CCA1, se une en la secuencia reguladora de TOC1 (Timing of CAB Expresión 1) al sitio CBS -AAAAATCT- o al amanecer a una región Evening Element (EE) -AAATATCT-, cuyas secuencias solo difieren en un nucleótido. Tanto CCA1 como EE son conocidos elementos del reloj circadiano (Wang, Z.Y., *y cols.* 1997; Harmer, S.L., *y cols.* 2000; Alabadi, D., *y cols.* 2001) y se sabe que varias posiciones de estos elementos son sensibles a las mutaciones o cambios resultando en una pérdida de la ritmicidad. De esta forma CCA1 y EE regulan la expresión de genes que van a alcanzar su máximo de expresión hacia el inicio o el final del periodo de luz dependiendo de la unión del factor de transcripción CCA1 al elemento CBS o EE (Wang, Z.Y., *y cols.* 1997; Michael, T.P. and McClung, C.R. 2002). CCA1 es capaz de unirse indistintamente a ambos elementos aunque el nucleótido de diferencia entre EE y CBS es suficiente para diferenciar de forma específica en que momento del día ocurre la transcripción en el gen CATALASA3. Sin embargo es necesaria una información adicional que se encuentra alrededor del sitio específico de unión del promotor para una completa regulación circadiana del CBS (Michael, T.P. and McClung, C.R. 2002).

CCA1 puede también inducir los “Morning Elements” (ME) que tienen un pico de expresión al amanecer, mientras que reprime los EE cuyo pico se sitúa al atardecer. Parece que cuando CCA1 se une al amanecer al motivo EE de TOC1, se produce una represión de éste. Los niveles de transcrito de TOC1 aumentan al final del día y se cree que directa o indirectamente incrementan la expresión de CCA1 y LHY. Los sitios CBS, EE y ME estarían compitiendo por la unión con CCA1. A pesar de la numerosa información que se tiene, esta sigue siendo insuficiente para establecer un modelo detallado del proceso, aunque si permiten sugerir que

estos factores actúan conjuntamente en un complejo circuito de retroalimentación negativa del oscilador central dependientes entre si para controlar los ritmos en *Arabidopsis* (Salome, P.A. and McClung, C.R. 2004).

El análisis bioinformático de las regiones reguladoras, han identificado un elemento EE en la posición -275 y -823 en PsTrx *f* y PsTrx *m1* respectivamente; en ambas secuencias reguladoras la secuencia de EE se encuentra en antisentido. EE puede ser uno de los elementos responsables de la regulación de la expresión de PsTrx *f* y PsTrx *m1* bajo el ciclo circadiano y aunque no es imprescindible, el EE se ha encontrado en secuencias reguladoras de genes que responden al control del ciclo circadiano (Harmer, S.L., *y cols.* 2000; Xu, Y. and Johnson, C.H. 2001; Michael, T.P. and McClung, C.R. 2002). Asimismo, en la regulación de los genes cuya expresión oscila regulado por el reloj circadiano a través del factor CCA1 estarían igualmente implicadas las secuencias reguladoras que flanquean la caja EE (Michael, T.P. and McClung, C.R. 2002; Muñoz, E., *y cols.* 2002).

En las secuencias promotoras de las Trxs cloroplastídicas *f* y *m1*, EE está flanqueado por dos elementos relacionados con la expresión por luz, GATABOX y GT1CONSENSUS (Lam, E. and Chua, N.H. 1989; Anderson, S.L., *y cols.* 1994; Zhou, D.X. 1999). Este hecho favorece que la región promotora de -353 hasta -317 de la secuencia reguladora de PsTrx *f*, que contiene varios elementos de luz, sean en su conjunto responsable de la regulación que la luz ejerce en los niveles de transcritos de ARNm de este gen y de su proteína. La situación es similar para el PsTrx *m1*, y el elemento EE se encuentra entre un elemento GATABOX en posición -822 y un elemento GT1CONSENSUS en -798. La presencia de varios LRE próximos

entre si puede ser indicativo de que estas regiones la respuesta, al menos en parte, la expresión de ambos genes por la luz, y su regulación por el reloj circadiano (Puente, P., *y cols.* 1996; Chattopadhyay, S., *y cols.* 1998).

La secuencia EE encontrada en la secuencia reguladora de PsTrx *f* conserva siete nucleótidos (marcados en negrita) de los nueve nucleótidos que se han descrito -AAAATATCT- para dicho elemento regulador en Arabidopsis por Harmer y colaboradores. Sin embargo se ha comprobado que estos siete nucleótidos son la parte central de EE y son suficientes para la unión con el factor CCA1 (Xu, Y. and Johnson, C.H. 2001; Rawat, R., *y cols.* 2005). Igualmente, el elemento EE presente en la secuencia reguladora aislada de PsTrx *m1*, contiene una secuencia que mantiene los siete nucleótidos centrales de EE. En el caso de la especie de guisante la secuencia consenso que se describe en este trabajo es -ATATCT-, y conserva el elemento central y más importante en la interacción del factor CCA1 en la regulación por ciclo circadiano con la secuencia EE (Xu, Y. and Johnson, C.H. 2001) y que es completamente funcional en la proteína ZGT de tabaco (*Nicotiana tabacum*).

Por otra parte, en la secuencia reguladora de PsTrx *m1*, se han localizado 4 elementos CBS en las posiciones -1131, -809, -710 junto a un elemento GATABOX, un elemento GT1CONSENSUS y un EE, y finalmente otro elemento CBS en la posición -473. La presencia en las secuencias promotoras de Trx *f* y *m1* de guisante de varios elementos relacionados con la luz, junto con EE, apoya en parte los resultados de la expresión inducida por la luz de los ARNm de ambas proteínas cloroplastídicas bajo la regulación del reloj circadiano.

Se han llevado a cabo experimentos de unión *in vitro* para confirmar la funcionalidad de las regiones LumF y LumM de la secuencia reguladora

de PsTrx *f* y PsTrx *m1*, que contienen dos elementos reguladores por luz (GATABOX y GT1CONSENSUS) en tandem junto con un EE. Hemos podido comprobar que existe una unión entre el factor de transcripción CCA1 y las secuencias LumF y LumM. Esto indicaría que efectivamente CCA1 se uniría directamente al motivo EE in vitro (Alabadi, D., *y cols.* 2001). Además la especificidad en la unión se comprobó mediante estudios de competición con sondas LumF/Lum M no marcado radioactivamente. Al igual que ocurre con otros genes, CCA1 se une a EE que se encuentra en la región promotora de las Trxs *f* y *m1*. Cuando se sustituyó en la secuencia de los oligonucleótido LumF/LumM una base nucleotídica, la interacción específica entre LumF/LumM y CCA1 desaparece, pudiendo concluir que el nucleótido “T*” en la secuencia EE -AATAT*CT- es clave en la unión de este elemento con el factor de transcripción CCA1 en guisante. Harmer y Kay (Harmer, S.L. and Kay, S.A. 2005) observaron que se perdía la unión de CCA1 a una secuencia alterada en las 4 últimas bases del motivo EE del promotor PRR9. Asimismo, al hacer el rastreo de mutagenesis de dicho fragmento sugirieron que tanto factores negativos como positivos regulaban los EE, y que los factores negativos eran probablemente los factores Myb CCA1 y LHY (Alabadi, D., *y cols.* 2001) ya que la expresión génica mediada por EE era antifásica a la de CCA1 y LHY, y se reducía cuando cualquiera de estos genes estaba sobreexpresado. También mostraron al utilizar extractos nucleares de Arabidopsis, que otros factores además de CCA1 y LHY se unían al EE y podían jugar un papel en su regulación. Varios estudios sugieren que las plantas utilizan un mecanismo similar al empleado por moscas y mamíferos, para la regulación la expresión de sus genes a través del EE (Harmer, S.L. and Kay, S.A. 2005). Utilizarían tanto factores negativos como positivos para formar el circuito de

retroalimentación secundaria que aumenta la precisión y la estabilidad del primer lazo de retroalimentación que dirige la función del reloj. Además, estos autores han mostrado que el EE es necesario y suficiente para conferir los ritmos durante la fase de noche, inciden igualmente en que las secuencias próximas pueden modular su función, afectando la ritmicidad, la fase, la amplitud y el nivel de expresión. Algunos datos sugieren que otros motivos del promotor podrían modificar la actividad del EE para producir fases diferentes. Sin embargo, el análisis de promotores que contienen EE no ha revelado ninguna secuencia consenso a parte del EE, por lo que tanto la identidad del activador putativo como otras importantes secuencias para la unión permanecen desconocidas.

Los picos de acumulación de ARNm obtenidos tanto para la Trx *f* como la Trx *m1* se encuentran en la mitad del periodo de luz en lugar de hacia el atardecer, indicando que posiblemente otros elementos reguladores de los promotores y dependientes de la luz estarían interviniendo en una regulación más ajustada de las Trxs cloroplastídicas para que su expresión génica sea máxima en mitad del periodo de luz. Podríamos sugerir que los EE, junto con los demás elementos de luz (LRE) que se encuentran en las secuencias estarían formando parte de un circuito secundario dentro de la red de oscilación ajustando los niveles de expresión a las necesidades de la célula.

En conclusión, se puede observar como ambas tiorredoxinas cloroplastídicas son reguladas por la luz bajo el control del reloj circadiano, con el objetivo de aumentar el rendimiento durante la asimilación de carbono durante la fotosíntesis en la planta mediante la regulación de enzimas claves del metabolismo del ciclo de Calvin sincronizando esta regulación en función de los periodos de luz y oscuridad. Parece que la

regulación de la expresión dependiente del reloj de las Trxs se haría a través de los EE. Sin embargo, este motivo junto con los dependientes de la luz no son suficientes para explicar la regulación de estos genes, y serían necesarios estudios adicionales para identificar nuevos elementos que permiten el funcionamiento periódico de los genes dependientes del reloj.

C.- Regulación de PsTrx f y PsTrx ml por azúcares solubles.

C.1.- Efecto sobre la actividad fotosintética.

La fotosíntesis es el proceso por el cual las plantas asimilan dióxido de carbono como aporte de energía y fuente de esqueletos carbonados en los procesos anabólicos de la planta. En los estudios en los que se ha pretendido relacionar la acumulación de azúcares con los niveles de transcritos de ARNm de PsTrx *f* y PsTrx *ml*, se ha determinado cómo este efecto modifica la actividad fotosintética de las plantas de guisante y se ha podido comprobar como un aumento de la cantidad los azúcares no estructurales disminuyendo la capacidad de la planta por asimilar el carbono a favor de la respiración confirmando resultados previos (Avelange, M.H., y cols. 1990). Este efecto puede ser debido a la capacidad que tienen los azúcares de controlar la expresión de genes que participan en la fotosíntesis (Koch, K.E. 1996; Yu, S.M. 1999; Ho, S., y cols. 2001), entre los que destaca la represión en la expresión de la subunidad pequeña de la RUBISCO (Sinha, A.K., y cols. 2002; Araya, T., y cols. 2006) lo que sería la causa de la

disminución en la velocidad de captación de CO₂ por parte de la planta de guisante. Además, la determinación del contenido de clorofila en las hojas de guisante bajo las diferentes soluciones ha mostrado que la cantidad de clorofilas han disminuido independientemente del tratamiento bajo el que se han tratado las plantas lo que contribuiría al efecto de los azúcares solubles en la disminución en el rendimiento de asimilación de CO₂ por parte de las hojas de guisante como resultado de los elevado niveles de azúcares intracelulares (Koch, K.E. 1996; Yu, S.M. 1999; Ho, S., y cols. 2001), acompañado al mismo tiempo por un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas que están involucradas en la ruta de síntesis de polisacáridos, almacenamiento de proteínas además de proteínas que participan en el sistema de defensa y respiración. Además los azúcares están implicados en la inducción de la senescencia de las hojas que coincide con un descenso en el contenido de la clorofila y de la actividad fotosintética (Jiang, C.Z., y cols. 1993; Bleecker, A.B. and Patterson, S.E. 1997; Quirino, B.F., y cols. 2000; Pourtau, N., y cols. 2006). La correlación entre la expresión de la hexoquinasa (HXK) y el proceso de senescencia en hojas son indicativos de un papel importante de la señalización por azúcares dependiente de HXK durante la senescencia de la hoja (Dai, N., y cols. 1999; Xiao, W., y cols. 2000; Moore, B., y cols. 2003).

C.2.- Modificación del contenido de azúcares solubles.

El tratamiento de las plantas de guisante con las diferentes soluciones se ha descrito que es una manera de aumentar el contenido intracelular de azúcares solubles (Avelange, M.H., y cols. 1990). La determinación del

contenido de azúcares nos ha confirmado que las plántulas de guisante, tratadas en las diferentes soluciones azucaradas, han logrado incorporar los diferentes azúcares tanto a través de la raíz como a través del peciolo, lo que se observa en el aumento del contenido intracelular de azúcares en hojas. Cuando las plantas de guisante han sido tratadas con la solución de glucosa y fructosa, el contenido intracelular de ambos se ha visto aumentado. En el experimento en el que se ha aportado los diferentes azúcares con la planta de guisante completa, además de confirmarse el aporte entre los diferentes azúcares, se ha comprobado como parte de la glucosa incorporada es metabolizada y transformada en fructosa y en sacarosa. En el mismo sentido, el aporte de sacarosa incrementa el contenido en sacarosa de las células vegetales además de aumentar el contenido de glucosa y fructosa celular lo que implica que la sacarosa es metabolizada e hidrolizada en fructosa y glucosa.

Tanto los tratamientos con las soluciones de sorbitol y de manitol han modificado el contenido de los azúcares en las hojas tratadas en respuesta al metabolismo tras la asimilación de ambas sustancias. El sorbitol es sintetizado en los tejidos “fuente” a partir de la reducción de la glucosa-6-fosfato a sorbitol-6-fosfato por la enzima aldolasa-6-fosfato reductasa (EC 1.1.1.200) también denominada sorbitol-6-fosfato deshidrogenada (S6PDH) y transportada desde las hojas al fluoema con la sacarosa (Bielecki, R.L. and Redgwell, R.J. 1985). Además se ha descrito la existencia de transportadores para el sorbitol y el manitol (Noiraud, N., y cols. 2001; Watari, J., y cols. 2004; Zhang, L.Y., y cols. 2004) en el apoplasto y fluoema de manzana, cerezo y apio. La modificación en la cantidad de azúcares solubles en hoja es lo que causaría la modificación en los niveles de expresión de las TRXs durante el periodo de oscuridad como

sucede con manitol y sorbitol en otros experimentos (Iida, M., *y cols.* 2004; Teo, G., *y cols.* 2006). La causa de que el contenido de sacarosa sea menor en el tratamiento con sorbitol pues este azúcar favorece la síntesis de almidón en las hojas de manzano (Cheng, L., *y cols.* 2005).

El efecto de DTT en el contenido de azúcares puede ser debido a la activación de la enzima AGPasa de guisante que se ha comprobado su papel regulador sobre esta enzima favoreciendo la síntesis de almidón, del cual la sacarosa es sustrato, aunque este efecto en la síntesis de sacarosa/almidón no se debe a fenómenos distintos como la respiración (Tiessen, A., *y cols.* 2003). Sin embargo, aunque es capaz de modificar el estado redox de proteínas dianas de las TRXs en el estroma del cloroplasto, no se ha verificado cambios significativos en el contenido de los azúcares más relevantes como son glucosa, sacarosa y fructosa (Kolbe, A., *y cols.* 2006).

C.3.- Efecto de los azúcares sobre los niveles de TRXs f y ml.

La adicción de azúcares en plantas de guisante ha logrado modificar el contenido de azúcares en las células vegetales lo que ha conducido a una regulación en la expresión de genes que participan en rutas tales activando la expresión de genes que participan en la síntesis de polisacáridos, almacenamiento de proteínas además de genes asociados a la respiración u la defensa frente a agentes oxidantes, pero también tienen efectos contrarios en las rutas metabólicas que participan en la fotosíntesis, en la movilización de moléculas reserva como la degradación del almidón, lípidos y proteínas (Krapp, A., *y cols.* 1993; Graham, I.A., *y cols.* 1994; Koch, K.E. 1996; Pego, J.V., *y cols.* 2000; Rolland, F., *y cols.* 2002).

En los estudios de expresión de ambas TRXs bajo los efectos de las soluciones con azúcar junto con la luz han mostrado que la glucosa es el azúcar que es capaz de estimular la expresión de ambas de TRXs a partir de las cuatro horas de tratamiento en luz para el caso de la Trx *f*, mientras que en el caso de la Trx *m1* este efecto se ve a partir de las ocho horas de iniciarse el tratamiento.

Al comparar los efectos en la regulación de la TRX *f* y *m1* por parte de glucosa y sacarosa podemos sospechar que la regulación que la glucosa ejerce en la expresión de las tiorredoxinas cloroplastídicas estaría implicado rutas de señalización diferentes, quizás mediante un transportador de glucosa que difiere de los efectos que la glucosa procedente de la hidrólisis de la sacarosa. Ese hecho explicaría que las hojas tratadas con sacarosa no tengan los mismos efectos sobre la expresión de TRX *f* y TRX *m1*, y explicaría como a las cuatro horas de tratamiento en las hojas de guisante, la glucosa activa la expresión de Trx *f*, mientras que la sacarosa no la afecta. Otro fenómeno que puede explicar el distinto efecto de glucosa y sacarosa en la regulación es que la relación NADPH/NADP⁺ se incrementa en presencia de glucosa y no por sacarosa lo que muestra otra vía de señalización distinta entre ambos azúcares (Tiessen, A., y cols. 2003; Kolbe, A., y cols. 2005).

Las pocas diferencias que existen entre los niveles de transcritos de Trx *f* y *m1* con respecto a los niveles de expresión de las proteínas, se puede concluir que la expresión de ambas proteínas por parte de los azúcares solubles se debe a nivel de transcripción lo que relacionaría este tipo de regulación directamente con el papel de estas proteínas en la regulación entre los tejidos “fuente” y “sumidero” y genes que codifican para proteínas implicadas en la generación mediante “*feedback*” por producto final

(Rolland, F., *y cols.* 2006). La regulación positiva para estas proteínas ha sido descrita en estudios de hibridación en “*arrays*” (Kolbe, A., *y cols.* 2006).

Dada la relación entre los tejidos fuente y sumidero (raíces y flores) a través de los azúcares, la regulación positiva de las TRXs cloroplastídicas por parte de los azúcares y la presencia de éstas proteínas en los haces vasculares podría ser una respuesta a la movilización de los azúcares desde los tejidos “fuente” a los tejidos “sumidero” (Corbesier, L., *y cols.* 1998).

Una posible explicación de la regulación positiva de las TRXs por parte de los azúcares puede ser la relación que la glucosa tiene con la defensa frente a estrés oxidativo (Couée, I., *y cols.* 2006) dado que aumenta los equivalentes de poder reductor en forma de NADH o NADPH a través de la ruta de la glicolisis y la ruta del ciclo Oxidativo de las Pentosas Fosfato, respectivamente (Averill-Bates, D.A. and Przybytkowski, E. 1994; Zhang, Y.M., *y cols.* 2000; Ryu, J.Y., *y cols.* 2004). Así, la glucosa se ha demostrado que aumenta las defensas celulares frente a la citotoxicidad por peróxido de hidrógeno en células animales (Averill-Bates, D.A. and Przybytkowski, E. 1994). Además, la glucosa es el precursor de carotenoides en la oscuridad (Pallett, K.E. and Young, A.J. 1993) y ascorbato (Foyer, C. 1993; Smirnoff, N., *y cols.* 2001), y de aminoácidos como son cisteína, ácido glutámico y glicina que son los aminoácidos que forman el glutathione (Noctor, G. and Foyer, C.H. 1998). Todos estos elementos forman parte en la defensa frente a agentes oxidantes a través del ciclo de ascorbato y glutathione implicados en la homeostasis redox y la detoxificación de peróxido y protección frente al oxígeno singlete. Así, el aumento observado en la cantidad de transcritos y proteína de PsTrx *f* y PsTrx *ml* podría apoyar este fenómeno frente a estrés dado que es conocido

la regulación de las TRXs con proteínas protectoras como son la 2-cis peroxiredoxina, proxiredoxina tipo Q y la enzima superóxido dismutasa (Motohashi, K., y cols. 2001; Balmer, Y., y cols. 2003; Maeda, K., y cols. 2004; Wong, J.H., y cols. 2004; Lemaire, S.D., y cols. 2005). Además se sabe que las TRXs son capaces de restaurar el fenotipo mutante de levaduras EMY63, que carecen de la expresión de sus propias TRXs (Verdoucq, L., y cols. 1999), y hacen posible que crezcan en medios de cultivo en presencia de agentes oxidantes como terc-butil hidroperóxido y peróxido de hidrógeno (Traverso, J.A., y cols. 2007).

C.4.- El factor de transcripción DOF7 interactúa in vitro con elementos presentes en los promotores de PsTRX f y PsTRX ml.

Las proteínas tipo DOF son factores de transcripción que son reguladores transcripcionales con un papel relevante en el crecimiento y desarrollo en las plantas. Es una proteína de unión a ADN a través de un dominio de unión denominado DOF de 52 aminoácidos en los que cuatro cisteínas están conservados en un grupo 2Cys/2Cys formando un enlace dedos de zinc donde las cisteínas se coordinan con en la unión al ADN (Yanagisawa, S. 1995). En su estructura, se distinguen dos partes, el extremo amino, la parte más conservada entre todos los elementos de esta familia y es el sitio de unión al ADN a través de los dedos de zinc, mientras que el extremo carboxilo se presenta el dominio de regulación transcripcional y dónde se encuentra la mayor variabilidad entre las proteínas DOF (Yanagisawa, S. 2002). Esta proteína ha sido descrita en

plantas superiores como son tabaco (*Nicotiana tabacum*) (De Paolis, A., y cols. 1996; Baumann, K., y cols. 1999), patata (*Solanum tuberosum*) (Plesch, G., y cols. 2001), cebada (*Hordeum vulgare*) y trigo (*Triticum aestivum*) (Mena, M., y cols. 1998), arroz (*Oryza sativa*) (Washio, K. 2001) y *Arabidopsis thaliana* (Zhang, B., y cols. 1995). Además de estar presentes en la mayoría de las plantas superiores, regulan una gran variedad de procesos metabólicos que va desde la germinación, hasta la defensa de la planta frente a un estrés oxidativo (Chen, W., y cols. 1996; Vicente-Carbajosa, J., y cols. 1997; Papi, M., y cols. 2000; Gualberti, G., y cols. 2002). En maíz (*Zea mays*) se describieron estos factores por primera vez (Yanagisawa, S. 1995) y se han relacionado con la regulación específica de tejido y luz, describiéndose cómo ZmDOF1 es capaz de aumentar la expresión de un gen mientras que ZmDOF2 elimina el efecto positivo de la primera proteína en protoplastos del mesófilo (Yanagisawa, S. and Sheen, J. 1998). Además, estos dos factores tienen la capacidad de unirse a las secuencias reguladoras de genes que participan en el metabolismo del carbono (Yanagisawa, S. 2000). Es este el motivo que ha justificado el interés de relacionar el papel de estas proteínas en la regulación de la expresión de las TRX cloroplastídicas de guisante con estas proteínas, pues en las secuencias reguladoras de ambas proteínas se encuentran varios sitios de unión DOFCORE -AAAG- que son las regiones del ADN reconocidas por las proteínas DOF (Yanagisawa, S. and Schmidt, R.J. 1999). Estos datos muestran que es un factor ampliamente presente en plantas superiores, y en guisante se han descrito hasta 7 proteínas diferentes dentro de la familia DOF (Nakamura, N., y cols. 2003). Así hemos decidido estudiar la interacción de un factor DOF de guisante con las regiones promotoras

aisladas de ambas TRXs para verificar la existencia *in vitro* de la interacción entre proteína-factor de transcripción.

Aunque el dominio de unión entre todos los factores DOF se conserva entre las 7 proteínas de la familia DOF de guisante, de entre los siete factores de transcripción, se ha expresado y trabajado con DOF7 dado que es la proteína que filogenéticamente más se aproxima a los factores DOF de otras especies que se han descrito que participan en el desarrollo de las plantas regulando genes implicados en el metabolismo del carbono y en el proceso de germinación de la semillas como son DAG1 y AtDOF4.1 (Papi, M., *y cols.* 2000; Gualberti, G., *y cols.* 2002) (Fig. 77).

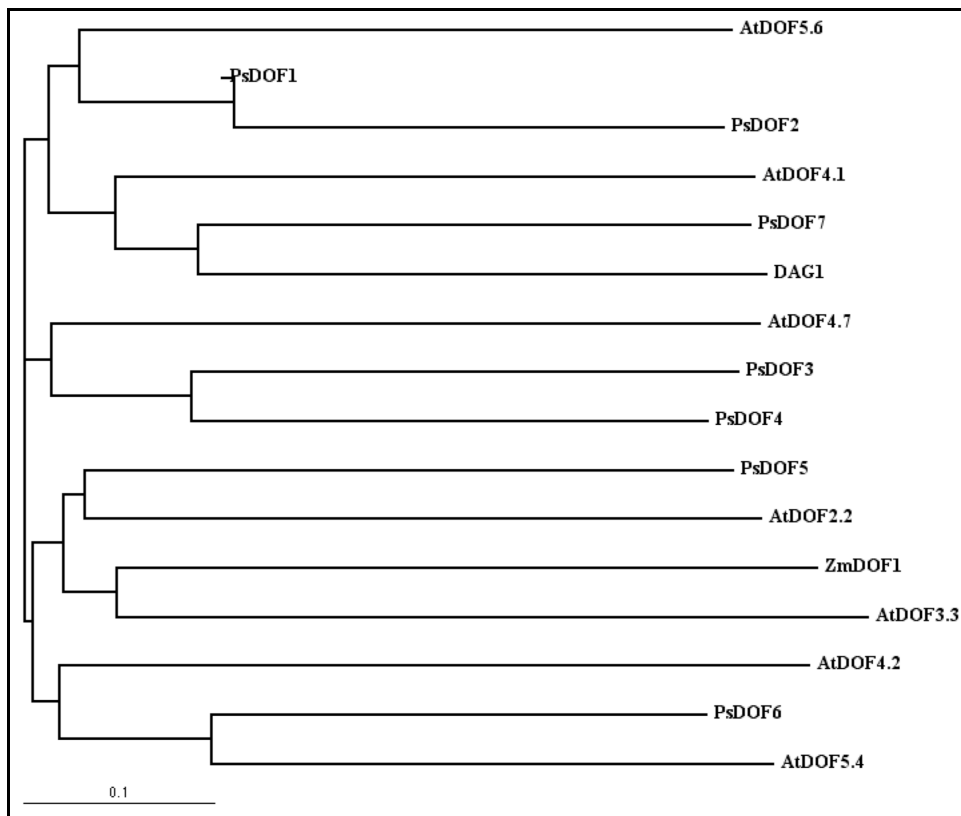


Fig. 77.- Árbol filogenético de los factores de transcripción DOF agrupados según funcionalidad (Yanagisawa, S. 2002).

Una vez que se ha obtenido un extracto de con DOF7, se ha realizado los estudios de unión con los fragmentos LumF y LumM con el factor de transcripción se ha verificado que la unión es específica ya que al añadir a la mezcla de unión cada una de las sondas no marcadas radioactivamente, la señal que se obtiene con sonda marcada va desapareciendo lo que nos indica que la unión entre la proteína DOF7 con la secuencias LumF y LumM. Este experimento nos muestra que los factores DOF de guisante son capaces de reconocer las secuencias DOFCORE -AAAG- que están presentes en las secuencias promotoras de PsTrx *f* y PsTrx *m1* lo que puede significar que la gran diversidad en las funciones de los familia DOF se puede traspasar a las TRXs participando en procesos tan diversos como la transmisión de la señal lumínica e interacción con fotorreceptores, respuesta a hormonas, defensa frente a estreses y el desarrollo de las semillas y la germinación (Mena, M., *y cols.* 1998; Baumann, K., *y cols.* 1999; Kang, H.G. and Singh, K.B. 2000; Yanagisawa, S. 2000; Washio, K. 2001; Martinez, M., *y cols.* 2005; Ward, J.M., *y cols.* 2005).

VI.- CONCLUSIONES

CONCLUSIONES.

- 1- La Trx *f* y *m* de guisante han sido localizados en hojas, tallo, vaina, semilla y en tejidos no fotosintéticos, raíces y órganos reproductores. Las TRXs *f* y *m1* junto con la FTR formarían parte del mecanismo activador de enzimas en estos tejidos heterotróficos.
- 2- Se ha aislado las secuencias reguladoras de la Trx *f* y *m1* de guisante. La expresión del gen GUS fusionado a estas secuencias en plantas de Arabidopsis ha confirmado las localizaciones tisulares. Deleciones seriadas de los promotores han revelado elementos negativos y motivos que regularían la expresión de las Trxs por la luz.
- 3- La expresión de los genes de la Trx *f* y *m1* y la síntesis de sus proteínas presentan un ritmo oscilatorio, mostrando que están reguladas por la luz a través del reloj circadiano.
- 4- El factor de transcripción CCA1 componente del oscilador central del reloj regula la expresión oscilatoria a través de su unión al motivo “Evening Element” que se encuentra en la secuencia reguladora de las Trxs *f* y *m1*.
- 5- El aporte de azúcares solubles exógenos disminuyen el contenido de clorofila a y b e inhiben en parte la actividad fotosintética de plantas de guisante.

- 6- De todos los azúcares solubles ensayados la glucosa es el azúcar que induce mayoritariamente la expresión de las Trxs *f* y *m1* a nivel transcripcional, utilizando rutas de señalización distintas a la de sacarosa. Las Trxs estarían activando proteínas de la ruta de la síntesis de almidón dentro del cloroplasto en respuesta a un exceso de glucosa.
- 7- El factor de transcripción DOF7 al unirse al sitio AAAG de las secuencias reguladoras de las Trxs *f* y *m1* estaría regulando la expresión durante el metabolismo carbonado.
-

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K.** (1997) "Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression" *Plant Cell*. 10 **9**: 1859-1868
- Ahuatzi, D., Herrero, P., de la Cera, T. and Moreno, F.** (2004) "The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is Mig1-dependent" *J Biol Chem*. 14 **279**: 14440-14446
- Alabadi, D., Oyama, T., Yanovsky, M. J., Harmon, F. G., Mas, P. and Kay, S. A.** (2001) "Reciprocal regulation between TOC1 and LHY/CCA1 within the *Arabidopsis* circadian clock" *Science*. 5531 **293**: 880-883
- Alabadi, D., Yanovsky, M. J., Mas, P., Harmer, S. L. and Kay, S. A.** (2002) "Critical role for CCA1 and LHY in maintaining circadian rhythmicity in *Arabidopsis*" *Curr Biol*. 9 **12**: 757-761
- Allada, R., Emery, P., Takahashi, J. S. and Rosbash, M.** (2001) "Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks" *Annu Rev Neurosci*. 24: 1091-1119
- Allen, R. D., Bernier, F., Lessard, P. a. and Beachy, R. N.** (1989) "Nuclear Factors Interact with a Soybean Beta-Conglycinin Enhancer" *Plant Cell*. 6 **1**: 623-631
- Anderson, S. L., Teakle, G. R., Martino-Catt, S. J. and Kay, S. A.** (1994) "Circadian clock- and phytochrome-regulated transcription is conferred by a 78 bp cis-acting domain of the *Arabidopsis* CAB2 promoter" *Plant J*. 4 **6**: 457-470
- Araya, T., Noguchi, K. and Terashima, I.** (2006) "Effects of carbohydrate accumulation on photosynthesis differ between sink and source leaves of *Phaseolus vulgaris* L" *Plant Cell Physiol*. 5 **47**: 644-652
- Atanassova, R., Leterrier, M., Gaillard, C., Agasse, A., Sagot, E., Coutos-Thevenot, P. and Delrot, S.** (2003) "Sugar-regulated expression of a putative hexose transport gene in grape" *Plant Physiol*. 1 **131**: 326-334
- Avelange, M. H., Sarrey, F. and Rebille, F.** (1990) "Effects of Glucose Feeding on Respiration and Photosynthesis in Photoautotrophic *Dianthus-Caryophyllus* Cells - Mass-Spectrometric Determination of Gas-Exchange" *Plant Physiology*. 3 **94**: 1157-1162
- Averill-Bates, D. A. and Przybytkowski, E.** (1994) "The role of glucose in cellular defences against cytotoxicity of hydrogen peroxide in Chinese hamster ovary cells" *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1 **312**: 52-58
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. and Iturriaga, G.** (2004a) "The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling" *Plant Physiology*. 3 **136**: 3649-3659
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M. and Iturriaga, G.** (2004b) "The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress

signaling" *Plant Physiol.* 3 **136**: 3649-3659

Baier, M. and Dietz, K. J. (1999) "Protective function of chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic Arabidopsis" *Plant Physiol.* 4 **119**: 1407-1414

Baier, M., Noctor, G., Foyer, C. H. and Dietz, K. J. (2000) "Antisense suppression of 2-cysteine peroxiredoxin in Arabidopsis specifically enhances the activities and expression of enzymes associated with ascorbate metabolism but not glutathione metabolism" *Plant Physiol.* 2 **124**: 823-832

Ballicora, M. A., Frueauf, J. B., Fu, Y. B., Schürmann, P. and Preiss, J. (2000) "Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin" *Journal of Biological Chemistry.* 2 **275**: 1315-1320

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schurmann, P. and Buchanan, B. B. (2003a) "Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 **100**: 370-375

Balmer, Y., Koller, A., del Val, G., Manieri, W., Schürmann, P. and Buchanan, B. B. (2003b) "Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 **100**: 370-375

Balmer, Y., Koller, A., Val, G. D., Schurmann, P. and Buchanan, B. B. (2004) "Proteomics uncovers proteins interacting electrostatically with thioredoxin in chloroplasts" *Photosynthesis Research.* 3 **79**: 275-280

Balmer, Y., Vensel, W. H., Cai, N., Manieri, W., Schürmann, P.,

Hurkman, W. J. and Buchanan, B. B. (2006a) "A complete ferredoxin/thioredoxin system regulates fundamental processes in amyloplasts" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 8 **103**: 2988-2993

Balmer, Y., Vensel, W. H., DuPont, F. M., Buchanan, B. B. and Hurkman, W. J. (2006b) "Proteome of amyloplasts isolated from developing wheat endosperm presents evidence of broad metabolic capability" *Journal of Experimental Botany.* 7 **57**: 1591-1602

Balmer, Y., Vensel, W. H., Hurkman, W. J. and Buchanan, B. B. (2006c) "Thioredoxin target proteins in chloroplast thylakoid membranes" *Antioxidants & Redox Signaling.* 9-10 **8**: 1829-1834

Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J. M. and Frommer, W. B. (2000) "SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements" *Plant Cell.* 7 **12**: 1153-1164

Basset, G., Raymond, P., Malek, L. and Brouquisse, R. (2002) "Changes in the expression and the enzymic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. evidence for an in vivo oxidation of the proteasome" *Plant Physiol.* 3 **128**: 1149-1162

Bate, N. and Twell, D. (1998) "Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements" *Plant Mol Biol.* 5 **37**: 859-869

Baumann, K., De Paolis, A., Costantino, P. and Gualberti, G. (1999) "The DNA binding site of the Dof

protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin-regulated expression of the rolB oncogene in plants" *Plant Cell*. 3 **11**: 323-334

Berndt, C., Lillig, C. H. and Holmgren, A. (2007) "Thiol-based mechanisms of the thioredoxin and glutaredoxin systems: implications for diseases in the cardiovascular system" *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 3 **292**: H1227-1236

Besse, I., Wong, J. H., Kobrehel, K. and Buchanan, B. B. (1996) "Thiocalsin: A thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 8 **93**: 3169-3175

Biaglow, J. E. and Miller, R. A. (2005) "The thioredoxin reductase/thioredoxin system: novel redox targets for cancer therapy" *Cancer Biol Ther*. 1 **4**: 6-13

Bielecki, R. L. and Redgwell, R. J. (1985) "Sorbitol versus sucrose as photosynthesis and translocation products in developing apricot leaves." *Aust J Plant Physiol*. **12**: 657-668

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA" *Nucleic Acids Res*. 6 **7**: 1513-1523

Bjornstedt, M., Hamberg, M., Kumar, S., Xue, J. and Holmgren, a. (1995) "Human Thioredoxin Reductase Directly Reduces Lipid Hydroperoxides by NADPH and Selenocystine Strongly Stimulates the Reaction Via Catalytically Generated Selenols" *Journal of Biological Chemistry*. 20 **270**: 11761-11764

Bleecker, A. B. and Patterson, S. E. (1997) "Last exit: Senescence, abscission, and meristem arrest in Arabidopsis" *Plant Cell*. 7 **9**: 1169-1179

Blázquez, M. a., Lagunas, R., Gancedo, C. and Gancedo, J. M. (1993) "Trehalose-6-Phosphate, a New Regulator of Yeast Glycolysis That Inhibits Hexokinases" *Febs Letters*. 1-2 **329**: 51-54

Bläsing, O. E., Gibon, Y., Gunther, M., Hohne, M., Morcuende, R., Osuna, D., Thimm, O., Usadel, B., Scheible, W. R. and Stitt, M. (2005) "Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in Arabidopsis" *Plant Cell*. 12 **17**: 3257-3281

Bognar, L. K., Hall, A., Adam, E., Thain, S. C., Nagy, F. and Millar, A. J. (1999) "The circadian clock controls the expression pattern of the circadian input photoreceptor, phytochrome B" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 25 **96**: 14652-14657

Boniface, J. J. and Reichert, L. E., Jr. (1990) "Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones" *Science*. 4938 **247**: 61-64

Borisjuk, L., Rolletschek, H., Wobus, U. and Weber, H. (2003) "Differentiation of legume cotyledons as related to metabolic gradients and assimilate transport into seeds" *J Exp Bot*. 382 **54**: 503-512

Bower, M. S., Matias, D. D., FernandesCarvalho, E., Mazzurco, M., Gu, T. S., 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*. 9 **8**: 1641-1650

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

Brandes, H. K., Larimer, F. W. and Hartman, F. C. (1996) "The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f" *J Biol Chem*. **7** **271**: 3333-3335

Brehelin, C., Meyer, E. H., de Souris, J. P., Bonnard, G. and Meyer, Y. (2003) "Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein

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*. **6** **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 Physiol*. **3** **132**: 1335-1343

Brown, S. A. and Schibler, U. (1999) "The ins and outs of circadian timekeeping" *Curr Opin Genet Dev*. **5** **9**: 588-594

Brugidou, C., Marty, I., Chartier, Y. and Meyer, Y. (1993) "The

localization, and activity" *Plant Physiol*. **4** **132**: 2045-2057

Briggs, W. R. and Huala, E. (1999) "Blue-light photoreceptors in higher plants" *Annu Rev Cell Dev Biol*. **15**: 33-62

Briggs, W. R. and Christie, J. M. (2002a) "Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors" *Trends in Plant Science*. **5** **7**: 204-210

Briggs, W. R. and Christie, J. M. (2002b) "Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors" *Trends Plant Sci*. **5** **7**: 204-210

Broin, M., Cuine, S., Peltier, G. and Rey, P. (2000) "Involvement of CDSP 32, a drought-induced thioredoxin, in the response to oxidative stress in potato plants" *FEBS Lett*. **2-3** **467**: 245-248
Nicotiana-Tabacum Genome Encodes 2 Cytoplasmic Thioredoxin Genes Which Are Differently Expressed" *Molecular & General Genetics*. **1-2** **238**: 285-293

Bryk, R., Griffin, P. and Nathan, C. (2000) "Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins" *Nature*. **6801** **407**: 211-215

Bryk, R., Lima, C. D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Nathan, C. (2002) "Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein" *Science*. **5557** **295**: 1073-1077

Buchanan, B. B., Crawford, N. a. and Wolosiuk, R. a. (1978) "Ferredoxin-Thioredoxin System Functions with Effectors in Activation of Nadp Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase of Barley Seedlings" *Plant Science Letters*. **3-4** **12**: 257-264

- Buchanan, B. B.** (1980) "Role of Light in the Regulation of Chloroplast Enzymes" Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. **31**: 341-374
- Buchanan, B. B., Schurmann, P., Decottignies, P. and Lozano, R. M.** (1994a) "Thioredoxin - a Multifunctional Regulatory Protein with a Bright Future in Technology and Medicine" Archives of Biochemistry and Biophysics. **2 314**: 257-260
- Buchanan, B. B., Schürmann, P., Decottignies, P. and Lozano, R. M.** (1994b) "Thioredoxin - a Multifunctional Regulatory Protein with a Bright Future in Technology and Medicine" Archives of Biochemistry and Biophysics. **2 314**: 257-260
- Cabib, E. and Leloir, L. F.** (1958) "Biosynthesis of Trehalose Phosphate" Journal of Biological Chemistry. **1 231**: 259-275
- 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. **6825 410**: 220-223
- Cai, H., Wang, C. C. and Tsou, C. L.** (1994) "Chaperone-like activity of protein disulfide isomerase in the refolding of a protein with no disulfide bonds" J Biol Chem. **40 269**: 24550-24552
- 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. **1 302**: 135-154
- Carre, I. A. and Kay, S. A.** (1995) "Multiple DNA-Protein Complexes at a Circadian-Regulated Promoter Element" Plant Cell. **12 7**: 2039-2051
- Casagrande, S., Bonetto, V., Fratelli, M., Gianazza, E., Eberini, I., Massignan, T., Salmona, M., Chang, G., Holmgren, A. and Ghezzi, P.** (2002) "Glutathionylation of human thioredoxin: A possible crosstalk between the glutathione and thioredoxin systems" Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **15 99**: 9745-9749
- Casal, J. J. and Sánchez, R. A.** (1998) "Phytochromes and seed germination" Seed Science Research. **3 8**: 317-329
- Cashmore, A. R., Jarillo, J. A., Wu, Y. J. and Liu, D.** (1999) "Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals" Science. **5415 284**: 760-765
- Cha, M. K., Kim, H. K. and Kim, I. H.** (1995) "Thioredoxin-Linked Thiol Peroxidase from Periplasmic Space of Escherichia-Coli" Journal of Biological Chemistry. **48 270**: 28635-28641
- Chae, H. Z., Chung, S. J. and Rhee, S. G.** (1994a) "Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast" J Biol Chem. **44 269**: 27670-27678
- Chae, H. Z., Uhm, T. B. and Rhee, S. G.** (1994b) "Dimerization of thiol-specific antioxidant and the essential role of cysteine 47" Proc Natl Acad Sci U S A. **15 91**: 7022-7026
- Chan, M. T. and Yu, S. M.** (1998) "The 3' untranslated region of a rice alpha-amylase gene mediates sugar-

dependent abundance of mRNA" *Plant J.* 5 **15**: 685-695

Chatterton, N. J. and Silvius, J. E. (1979) "Photosynthate Partitioning into Starch in Soybean Leaves: I. Effects of Photoperiod versus Photosynthetic Period Duration" *Plant Physiol.* 5 **64**: 749-753

Chattopadhyay, S., Puente, P., Deng, X. W. and Wei, N. (1998) "Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in Arabidopsis" *Plant J.* 1 **15**: 69-77

Chen, J. G., Willard, F. S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S. A., Jones, A. M. and Siderovski, D. P. (2003) "A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation" *Science.* 5640 **301**: 1728-1731

Chen, J. G. and Jones, A. M. (2004) "AtRGS1 function in Arabidopsis thaliana" *Methods Enzymol.* **389**: 338-350

Chen, W., Chao, G. and Singh, K. B. (1996) "The promoter of a H₂O₂-inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites" *Plant J.* 6 **10**: 955-966

Cheng, L., Zhou, R., Reidel, E. J., Sharkey, T. D. and Dandekar, A. M. (2005) "Antisense inhibition of sorbitol synthesis leads to up-regulation of starch synthesis without altering CO₂ assimilation in apple leaves" *Planta.* 5 **220**: 767-776

Cheng, N. H. and Hirschi, K. D. (2003) "Cloning and characterization of

CXIP1, a novel PICOT domain-containing Arabidopsis protein that associates with CAX1" *J Biol Chem.* 8 **278**: 6503-6509

Cheng, W. H., Taliercio, E. W. and Chourey, P. S. (1999) "Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (Incw1) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 18 **96**: 10512-10517

Cheong, N. E., Choi, Y. O., Lee, K. O., Kim, W. Y., Jung, B. G., Chi, Y. H., Jeong, J. S., Kim, K., Cho, M. J. and Lee, S. Y. (1999) "Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2Cys-peroxiredoxin in Chinese cabbage" *Plant Mol Biol.* 5 **40**: 825-834

Chiadmi, M., Navaza, A., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J. P. and Cherfils, J. (1999) "Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase" *Embo Journal.* 23 **18**: 6809-6815

Choi, Y. O., Cheong, N. E., Lee, K. O., Jung, B. G., Hong, C. H., Jeong, J. H., Chi, Y. H., Kim, K., Cho, M. J. and Lee, S. Y. (1999) "Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of Chinese cabbage and its comparison to 2Cys-peroxiredoxin isolated from the same plant" *Biochem Biophys Res Commun.* 3 **258**: 768-771

Chow, L. P., Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Tsugita, A., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A. L. and Schurmann, P. (1995) "Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase catalytic subunit and identification of thiol groups constituting a redox-active

disulfide and a [4Fe-4S] cluster" *Eur J Biochem.* 1 **231**: 149-156

Chueca, A., Lazaro, J. J. and Gorge, J. L. (1984) "Light-Induced Nuclear Synthesis of Spinach Chloroplast Fructose-1,6-bisphosphatase" *Plant Physiol.* 3 **75**: 539-541

Cohen, G., Argaman, a., Schreiber, R., Mislovati, M. and Aharonowitz, Y. (1994) "The Thioredoxin System of *Penicillium-Chrysogenum* and Its Possible Role in Penicillin Biosynthesis" *Journal of Bacteriology.* 4 **176**: 973-984

Collin, V., Issakidis-Bourguet, E., Marchand, C., Hirasawa, M., Lancelin, J. M., Knaff, D. B. and Miginiac-Maslow, M. (2003) "The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity" *J Biol Chem.* 26 **278**: 23747-23752

Collin, V., Lamkemeyer, P., Miginiac-Maslow, M., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Dietz, K. J. and Issakidis-Bourguet, E. (2004) "Characterization of plastidial thioredoxins from *Arabidopsis* belonging to the new γ -type" *Plant Physiol.* 4 **136**: 4088-4095

Corbesier, L., Lejeune, P. and Bernier, G. (1998) "The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant" *Planta.* 1 **206**: 131-137

Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G. and El Amrani, A. (2006) "Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants" *J Exp Bot.* 3 **57**: 449-459

Covington, M. F., Panda, S., Liu, X. L., Strayer, C. A., Wagner, D. R. and Kay, S. A. (2001) "ELF3 modulates resetting of the circadian clock in *Arabidopsis*" *Plant Cell.* 6 **13**: 1305-1315

Crevillén, P., Ventriglia, T., Pinto, F., Orea, A., Mérida, A. and Romero, J. M. (2005) "Differential pattern of expression and sugar regulation of *Arabidopsis thaliana* ADP-glucose pyrophosphorylase-encoding genes" *J Biol Chem.* 9 **280**: 8143-8149

Dai, N., Schaffer, A., Petreikov, M., Shahak, Y., Giller, Y., Ratner, K., Levine, A. and Granot, D. (1999) "Overexpression of *Arabidopsis* hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence" *Plant Cell.* 7 **11**: 1253-1266

Dai, S., Saarinen, M., Ramaswamy, S., Meyer, Y., Jacquot, J. P. and Eklund, H. (1996) "Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution" *Journal of Molecular Biology.* 5 **264**: 1044-1057

Danon, a. and Mayfield, S. P. (1994) "Light-Regulated Translation of Chloroplast Messenger-Rnas through Redox Potential" *Science.* 5191 **266**: 1717-1719

Darby, N. J., Kemmink, J. and Creighton, T. E. (1996) "Identifying and characterizing a structural domain of protein disulfide isomerase" *Biochemistry.* 32 **35**: 10517-10528

De Paolis, A., Sabatini, S., De Pascalis, L., Costantino, P. and Capone, I. (1996) "A rolB regulatory factor belongs to a new class of single

zinc finger plant proteins" *Plant J.* 2 **10**: 215-223

De Pascalis, A. R., Schurmann, P. and Bosshard, H. R. (1994) "Comparison of the binding sites of plant ferredoxin for two ferredoxin-dependent enzymes" *FEBS Lett.* 3 **337**: 217-220

Degenhardt, J. and Tobin, E. M. (1996) "A DNA binding activity for one of two closely defined phytochrome regulatory elements in an Lhcb promoter is more abundant in etiolated than in green plants" *Plant Cell.* 1 **8**: 31-41

Dentin, R., Pegorier, J. P., Benhamed, F., Foufelle, F., Ferre, P., Fauveau, V., Magnuson, M. A., Girard, J. and Postic, C. (2004) "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression" *J Biol Chem.* 19 **279**: 20314-20326

Devic, M., Albert, S., Delseny, M. and Roscoe, T. J. (1997) "Efficient PCR walking on plant genomic DNA" *Plant Physiology and Biochemistry.* 4 **35**: 331-339

Devlin, P. F. (2002) "Signs of the time: environmental input to the circadian clock" *Journal of Experimental Botany.* 374 **53**: 1535-1550

Dian, W., Jiang, H., Chen, Q., Liu, F. and Wu, P. (2003) "Cloning and characterization of the granule-bound starch synthase II gene in rice: gene expression is regulated by the nitrogen level, sugar and circadian rhythm" *Planta.* 2 **218**: 261-268

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

Dixon, D. P., Fordham-Skelton, A. P. and Edwards, R. (2005) "Redox regulation of a soybean tyrosine-specific protein phosphatase" *Biochemistry.* 21 **44**: 7696-7703

Dodd, A. N., Salathia, N., Hall, A., Kevei, E., Toth, R., Nagy, F., Hibberd, J. M., Millar, A. J. and Webb, A. A. (2005) "Plant circadian clocks increase photosynthesis, growth, survival, and competitive advantage" *Science.* 5734 **309**: 630-633

Dowson-Day, M. J. and Millar, A. J. (1999) "Circadian dysfunction causes aberrant hypocotyl elongation patterns in Arabidopsis" *Plant J.* 1 **17**: 63-71

Doyle, M. R., Davis, S. J., Bastow, R. M., McWatters, H. G., Kozma-Bognar, L., Nagy, F., Millar, A. J. and Amasino, R. M. (2002) "The ELF4 gene controls circadian rhythms and flowering time in Arabidopsis thaliana" *Nature.* 6902 **419**: 74-77

Droux, M., Miginiac-Maslow, M., Jacquot, J. P., Gadat, P., Crawford, N. A., Kosower, N. S. and Buchanan, B. B. (1987) "Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation" *Arch Biochem Biophys.* 1 **256**: 372-380

Eastmond, P. J., van Dijken, A. J. H., Spielman, M., Kerr, A., Tissier, A. F., Dickinson, H. G., Jones, J. D. G., Smeekens, S. C. and Graham, I. A. (2002) "Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for Arabidopsis embryo maturation" *Plant Journal.* 2 **29**: 225-235

- Ederly, I.** (1999) "Role of posttranscriptional regulation in circadian clocks: lessons from *Drosophila*" *Chronobiol Int.* 4 **16**: 377-414
- Edman, J. C., Ellis, L., Blacher, R. W., Roth, R. A. and Rutter, W. J.** (1985) "Sequence of protein disulphide isomerase and implications of its relationship to thioredoxin" *Nature.* 6034 **317**: 267-270
- Edwards, K. D., Anderson, P. E., Hall, A., Salathia, N. S., Locke, J. C., Lynn, J. R., Straume, M., Smith, J. Q. and Millar, A. J.** (2006) "FLOWERING LOCUS C mediates natural variation in the high-temperature response of the *Arabidopsis* circadian clock" *Plant Cell.* 3 **18**: 639-650
- 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 Journal.* 7 **3**: 1443-1449
- Eklund, H., Gleason, F. K. and Holmgren, A.** (1991) "Structural and functional relations among thioredoxins of different species" *Proteins.* 1 **11**: 13-28
- Ellerstrom, M., Stalberg, K., Ezcurra, I. and Rask, L.** (1996) "Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription" *Plant Mol Biol.* 6 **32**: 1019-1027
- Elmayan, T. and Tepfer, M.** (1995) "Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter" *Transgenic Res.* 6 **4**: 388-396
- Entian, K. D.** (1980) "Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast" *Mol Gen Genet.* 3 **178**: 633-637
- Eriksson, M. E. and Millar, A. J.** (2003) "The circadian clock. A plant's best friend in a spinning world" *Plant Physiol.* 2 **132**: 732-738
- Escoubas, J. M., Lomas, M., Laroche, J. and Falkowski, P. G.** (1995) "Light-Intensity Regulation of Cab Gene-Transcription Is Signaled by the Redox State of the Plastoquinone Pool" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 22 **92**: 10237-10241
- Falkenstein, E., von Schaewen, A. and Scheibe, R.** (1994) "Full-length cDNA sequences for both ferredoxin-thioredoxin reductase subunits from spinach (*Spinacia oleracea* L.)" *Biochim Biophys Acta.* 2 **1185**: 252-254
- Feldbrugge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. and Weisshaar, B.** (1997) "PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit" *Plant J.* 5 **11**: 1079-1093
- Fernie, A. R. and Willmitzer, L.** (2001) "Molecular and biochemical triggers of potato tuber development" *Plant Physiol.* 4 **127**: 1459-1465
- 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" Archives of Biochemistry and Biophysics. 2 **266**: 496-507

Fowler, S., Lee, K., Onouchi, H., Samach, A., Richardson, K., Morris, B., Coupland, G. and Putterill, J. (1999) "GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates photoperiodic flowering in Arabidopsis and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains" Embo Journal. 17 **18**: 4679-4688

Foyer, C. (1993) "Ascorbic Acid" In: Alscher RG, Hess JI, eds. Antioxidants in higher plants. Boca Raton, FL: CRC Press. 31-58

Frand, A. R., Cuozzo, J. W. and Kaiser, C. A. (2000) "Pathways for protein disulphide bond formation" Trends Cell Biol. 5 **10**: 203-210

Frand, A. R. and Kaiser, C. A. (2000) "Two pairs of conserved cysteines are required for the oxidative activity of Ero1p in protein disulfide bond formation in the endoplasmic reticulum" Mol Biol Cell. 9 **11**: 2833-2843

Friso, G., Giacomelli, L., Ytterberg, A. J., Peltier, J. B., Rudella, A., Sun, Q. and Wijk, K. J. (2004) "In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of Arabidopsis thaliana chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database" Plant Cell. 2 **16**: 478-499

Fu, Y. B., Ballicora, M. A., Leykam, J. F. and Preiss, J. (1998) "Mechanism of reductive activation of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase" Journal of Biological Chemistry. 39 **273**: 25045-25052

Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. (2001) "Dark-inducible genes from Arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars" Physiol Plant. 3 **111**: 345-352

Fujiwara, M. and Yoshida, S. (2001) "Chloroplast targeting of chloroplast division FtsZ2 proteins in Arabidopsis" Biochemical and Biophysical Research Communications. 2 **287**: 462-467

Gagne, J. M., Smalle, J., Gingerich, D. J., Walker, J. M., Yoo, S. D., Yanagisawa, S. and Vierstra, R. D. (2004) "Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation" Proc Natl Acad Sci U S A. 17 **101**: 6803-6808

Geigenberger, P., Kolbe, A. and Tiessen, A. (2005) "Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars" J Exp Bot. 416 **56**: 1469-1479

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. 3 **555**: 443-448

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. (2004) "A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase" Proc Natl Acad Sci U S A. 40 **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. M., Dizengremel, P., Meyer, Y. and Jacquot, J. P.** (2005) "A specific form of thioredoxin h occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase (vol 101, pg 14545, 2004)" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10 **102**: 3886-3886
- Genovesiotaverne, J. C., Jetzer, Y., Sauder, U., Hohenester, E., Huguet, C., Jansonius, J. N., Gardetsalvi, L. and Schurmann, P.** (1991) "Crystallization and Preliminary-X-Ray Diffraction Studies of the Spinach-Chloroplast Thioredoxin-F" *Journal of Molecular Biology*. 3 **222**: 459-461
- Gerhardt, R., Stitt, M. and Heldt, H. W.** (1987) "Subcellular Metabolite Levels in Spinach Leaves: Regulation of Sucrose Synthesis during Diurnal Alterations in Photosynthetic Partitioning" *Plant Physiol*. 2 **83**: 399-407
- Gibson, S. I.** (2005) "Control of plant development and gene expression by sugar signaling" *Curr Opin Plant Biol*. 1 **8**: 93-102
- Gilmartin, P. M., Sarokin, L., Memelink, J. and Chua, N. H.** (1990) "Molecular light switches for plant genes" *Plant Cell*. 5 **2**: 369-378
- Glinski, M. and Weckwerth, W.** (2005) "Differential multisite phosphorylation of the trehalose-6-phosphate synthase gene family in *Arabidopsis thaliana* - A mass spectrometry-based process for multiparallel peptide library phosphorylation analysis" *Molecular & Cellular Proteomics*. 10 **4**: 1614-1625
- González, P. and Baldeste, A.** (1970) "Involvement of Thioredoxin System in Reduction of Methionine Sulfoxide and Sulfate" *Journal of Biological Chemistry*. 9 **245**: 2371-&
- Graham, I. A., Denby, K. J. and Leaver, C. J.** (1994) "Carbon Catabolite Repression Regulates Glyoxylate Cycle Gene-Expression in Cucumber" *Plant Cell*. 5 **6**: 761-772
- Green, R. M. and Tobin, E. M.** (1999) "Loss of the circadian clock-associated protein 1 in *Arabidopsis* results in altered clock-regulated gene expression" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 **96**: 4176-4179
- Grierson, C., Du, J. S., de Torres Zabala, M., Beggs, K., Smith, C., Holdsworth, M. and Bevan, M.** (1994) "Separate cis sequences and trans factors direct metabolic and developmental regulation of a potato tuber storage protein gene" *Plant J*. 6 **5**: 815-826
- Gualberti, G., Papi, M., Bellucci, L., Ricci, I., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P. and Vittorioso, P.** (2002) "Mutations in the Dof zinc finger genes DAG2 and DAG1 influence with opposite effects the germination of *Arabidopsis* seeds" *Plant Cell*. 6 **14**: 1253-1263
- Guo, H. W., Yang, W. Y., Mockler, T. C. and Lin, C. T.** (1998) "Regulations of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors" *Science*. 5355 **279**: 1360-1363
- Gustavsson, N., Kokke, B. P., Harndahl, U., Silow, M., Bechtold, U., Poghosyan, Z., Murphy, D., Boelens,**

W. C. and Sundby, C. (2002) "A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein" *Plant Journal*. 5 **29**: 545-553

Halford, N. G., Hey, S., Jhurreca, D., Laurie, S., McKibbin, R. S., Paul, M. and Zhang, Y. (2003) "Metabolic signalling and carbon partitioning: role of Snf1-related (SnRK1) protein kinase" *J Exp Bot*. 382 **54**: 467-475

Hall, A., Kozma-Bognar, L., Bastow, R. M., Nagy, F. and Millar, A. J. (2002) "Distinct regulation of CAB and PHYB gene expression by similar circadian clocks" *Plant J*. 4 **32**: 529-537

Halliday, K. J., Bolle, C., Chua, N. H. and Whitelam, G. C. (1999) "Overexpression of rice phytochrome A partially complements phytochrome B deficiency in *Arabidopsis*" *Planta*. 3 **207**: 401-409

Hanahan, D. (1983) "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids" *J Mol Biol*. 4 **166**: 557-580

Hardie, D. G., Carling, D. and Carlson, M. (1998) "The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell?" *Annu Rev Biochem*. **67**: 821-855

Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J. A. and Kay, S. A. (2000) "Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock" *Science*. 5499 **290**: 2110-2113

Harmer, S. L. and Kay, S. A. (2005) "Positive and negative factors

confer phase-specific circadian regulation of transcription in *Arabidopsis*" *Plant Cell*. 7 **17**: 1926-1940

Hartman, H., Wu, M., Buchanan, B. B. and Gerhart, J. C. (1993) "Spinach thioredoxin m inhibits DNA synthesis in fertilized *Xenopus* eggs" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 **90**: 2271-2275

Haslekas, C., Stacy, R. A., Nygaard, V., Cullanez-Macia, F. A. and Aalen, R. B. (1998) "The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy" *Plant Mol Biol*. 6 **36**: 833-845

Haslekas, C., Grini, P. E., Nordgard, S. H., Thorstensen, T., Viken, M. K., Nygaard, V. and Aalen, R. B. (2003a) "ABI3 mediates expression of the peroxiredoxin antioxidant AtPER1 gene and induction by oxidative stress" *Plant Mol Biol*. 3 **53**: 313-326

Haslekas, C., Viken, M. K., Grini, P. E., Nygaard, V., Nordgard, S. H., Meza, T. J. and Aalen, R. B. (2003b) "Seed l-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress" *Plant Physiol*. 3 **133**: 1148-1157

Hazen, S. P., Schultz, T. F., Pruneda-Paz, J. L., Borevitz, J. O., Ecker, J. R. and Kay, S. A. (2005) "LUX ARRHYTHMO encodes a Myb domain protein essential for circadian rhythms" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 29 **102**: 10387-10392

Hewitt, E. J. (1966) "Sand and water culture methods used in the study of

plant nutrition." CABI.Farnham Royal, UK. 547

Hicks, G. R., Hironaka, C. M., Dauvillee, D., Funke, R. P., D'Hulst, C., Waffenschmidt, S. and Ball, S. G. (2001) "When simpler is better. Unicellular green algae for discovering new genes and functions in carbohydrate metabolism" *Plant Physiol.* 4 **127**: 1334-1338

Hicks, K. A., Millar, A. J., Carre, I. A., Somers, D. E., Straume, M., Meeks-Wagner, D. R. and Kay, S. A. (1996) "Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant" *Science.* 5288 **274**: 790-792

Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. and Korenaga, T. (1999) "Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999" *Nucleic Acids Research.* 1 **27**: 297-300

Ho, S., Chao, Y., Tong, W. and Yu, S. (2001) "Sugar coordinately and differentially regulates growth- and stress-related gene expression via a complex signal transduction network and multiple control mechanisms" *Plant Physiol.* 2 **125**: 877-890

Hogg, P. J. (2003) "Disulfide bonds as switches for protein function" *Trends Biochem Sci.* 4 **28**: 210-214

Holmgren, A. (1968) "Thioredoxin.6. Amino Acid Sequence of Protein from Escherichia Coli B" *European Journal of Biochemistry.* 4 **6**: 475-&

Horling, F., Konig, J. and Dietz, K. J. (2002) "Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of Arabidopsis thaliana: its expression and

activity in comparison with other peroxiredoxins" *Plant Physiology and Biochemistry.* 6-8 **40**: 491-499

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 Physiol.* 1 **131**: 317-325

Huppe, H. C., de Lamotte-Guery, F., Jacquot, J. P. and Buchanan, B. B. (1990) "The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga, Chlamydomonas reinhardtii: identification and characterization of thioredoxins and ferredoxin-thioredoxin reductase components" *Planta.* **180**: 341-351

Huppe, H. C., Picaud, a., Buchanan, B. B. and Miginiacmaslow, M. (1991) "Identification of an NADp Thioredoxin System in Chlamydomonas-Reinhardtii" *Planta.* 1 **186**: 115-121

Huq, E., Tepperman, J. M. and Quail, P. H. (2000) "GIGANTEA is a nuclear protein involved in phytochrome signaling in Arabidopsis" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 **97**: 9789-9794

Iida, M., Bantog, N. A., Yamada, K., Shiratake, K. and Yamaki, S. (2004) "Sorbitol- and other sugar-induced expressions of the NAD+-dependent sorbitol deshydrogenase gene in japanese pear fruit." *Journal of the American Society for Horticulture Science.* **129**: 870-875

Imaizumi, T., Tran, H. G., Swartz, T. E., Briggs, W. R. and Kay, S. A. (2003) "FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in Arabidopsis" *Nature.* 6964 **426**: 302-306

Ishiguro, S. and Nakamura, K. (1992) "The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots" *Plant Mol Biol.* 1 **18**: 97-108

Iturriaga, G., Gaff, D. F. and Zentella, R. (2000) "New desiccation-tolerant plants, including a grass, in the central highlands of Mexico, accumulate trehalose" *Australian Journal of Botany.* 2 **48**: 153-158

Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Gardet-Salvi, L., Schürmann, P. and Tsugita, A. (1994) "Amino acid sequence of spinach ferredoxin:thioredoxin reductase variable subunit" *Eur J Biochem.* 2 **223**: 465-471

Iwata, S., Matsuda, M., Sugie, K., Maeda, Y., Kawabe, T., Nakamura, H., Masutani, H., Hori, T. and Yodoi, J. (1995) "Signal transduction via Fc receptors; involvement of tyrosine kinase and redox regulation by ADF" *Adv Exp Med Biol.* 371A: 659-662

Izawa, T., Foster, R., Nakajima, M., Shimamoto, K. and Chua, N. H. (1994) "The rice bZIP transcriptional activator RITA-1 is highly expressed during seed development" *Plant Cell.* 9 **6**: 1277-1287

Jacquot, J. P., Vidal, J. and Gadal, P. (1976) "Identification of a Protein Factor Involved in Dithiothreitol Activation of Nadp Malate-Dehydrogenase from French Bean-Leaves" *Febs Letters.* 2 **71**: 223-227

Jacquot, J. P., Vidal, J., Gadal, P. and Schürmann, P. (1978) "Evidence for Existence of Several Enzyme-

Specific Thioredoxins in Plants" *Febs Letters.* 2 **96**: 243-246

Jacquot, J. P., Rivera-Madrid, R., Marinho, P., Kollarova, M., Le Marechal, P., Miginiac-Maslow, M. and Meyer, Y. (1994) "Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli" *Journal of Molecular Biology.* 4 **235**: 1357-1363

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" *Biochem Pharmacol.* 5-6 **64**: 1065-1069

Jang, J. C., Leon, P., Zhou, L. and Sheen, J. (1997) "Hexokinase as a sugar sensor in higher plants" *Plant Cell.* 1 **9**: 5-19

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.* 9 **2**: 853-868

Jeong, M. J. and Shih, M. C. (2003) "Interaction of a GATA factor with cis-acting elements involved in light regulation of nuclear genes encoding chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis" *Biochem Biophys Res Commun.* 2 **300**: 555-562

Jiang, C. Z., Rodermeil, S. R. and Shibles, R. M. (1993) "Photosynthesis, Rubisco Activity and Amount, and Their Regulation by Transcription in Senescing Soybean Leaves" *Plant Physiology.* 1 **101**: 105-112

- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E. and Deng, X. W.** (2005) "Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and Arabidopsis" *Plant Cell*. 12 **17**: 3239-3256
- Johnson, H. S. and Hatch, M. D.** (1970) "Properties and regulation of leaf nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-malate dehydrogenase and 'malic' enzyme in plants with the C4-dicarboxylic acid pathway of photosynthesis" *Biochem J.* 2 **119**: 273-280
- Johnson, T. C., Cao, R. Q., Kung, J. E. and Buchanan, B. B.** (1987) "Thioredoxin and Nadp-Thioredoxin Reductase from Cultured Carrot Cells" *Planta*. 3 **171**: 321-331
- Kalume, D. E., Molina, H. and Pandey, A.** (2003) "Tackling the phosphoproteome: tools and strategies" *Curr Opin Chem Biol.* 1 **7**: 64-69
- Kandlbinder, A., Finkemeier, I., Wormuth, D., Hanitzsch, M. and Dietz, K. J.** (2004) "The antioxidant status of photosynthesizing leaves under nutrient deficiency: redox regulation, gene expression and antioxidant activity in Arabidopsis thaliana" *Physiol Plant.* 1 **120**: 63-73
- Kang, H. G. and Singh, K. B.** (2000) "Characterization of salicylic acid-responsive, arabidopsis Dof domain proteins: overexpression of OBP3 leads to growth defects" *Plant J.* 4 **21**: 329-339
- Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. and Mullineaux, P. M.** (1997) "Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress" *Plant Cell.* 4 **9**: 627-640
- Kasahara, M., Swartz, T. E., Olney, M. A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J. M., Nagatani, A. and Briggs, W. R.** (2002) "Photochemical properties of the flavin mononucleotide-binding domains of the phototropins from Arabidopsis, rice, and Chlamydomonas reinhardtii" *Plant Physiol.* 2 **129**: 762-773
- Katti, S. K., Lemaster, D. M. and Eklund, H.** (1990) "Crystal-Structure of Thioredoxin from Escherichia-Coli at 1.68 Å Resolution" *Journal of Molecular Biology.* 1 **212**: 167-184
- Kellmann, J. W., Merforth, N., Wiese, M., Pichersky, E. and Piechulla, B.** (1993) "Concerted circadian oscillations in transcript levels of nineteen Lha/b (cab) genes in Lycopersicon esculentum (tomato)" *Mol Gen Genet.* 3 **237**: 439-448
- Kendrick, R. E.** (1994) "Phytochrome - Physiological-Aspects (Photocontrol of Hypocotyl Growth, the Long and the Short of It)" *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology.* 1 **23**: 91-92
- Khayat, E., Harn, C. and Daie, J.** (1993) "Purification and Light-Dependent Molecular Modulation of the Cytosolic Fructose-1,6-Bisphosphatase in Sugarbeet Leaves" *Plant Physiol.* 1 **101**: 57-64
- Kim, J. and Mayfield, S. P.** (2002) "The active site of the thioredoxin-like domain of chloroplast protein disulfide isomerase, RB60, catalyzes the redox-regulated binding of chloroplast poly(A)-

binding protein, RB47, to the 5' untranslated region of psbA mRNA" *Plant and Cell Physiology*. 10 **43**: 1238-1243

Kim, J., Yi, H., Choi, G., Shin, B., Song, P. S. and Choi, G. (2003) "Functional characterization of phytochrome interacting factor 3 in phytochrome-mediated light signal transduction" *Plant Cell*. 10 **15**: 2399-2407

Kloppstech, K. (1985) "Diurnal and circadian rhythmicity in the expression of light-induced plant nuclear messenger RNAs." *Planta*. **165**: 502-506

Kobrehel, K., Wong, J. H., Balogh, a., Kiss, F., Yee, B. C. and Buchanan, B. B. (1992) "Specific Reduction of Wheat Storage Proteins by Thioredoxin-H" *Plant Physiology*. 3 **99**: 919-924

Koch, K. (2004) "Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development" *Curr Opin Plant Biol*. 3 **7**: 235-246

Koch, K. E. (1996) "Carbohydrate-Modulated Gene Expression In Plants" *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **47**: 509-540

Kolbe, A., Tiessen, A., Schluempmann, H., Paul, M., Ulrich, S. and Geigenberger, P. (2005) "Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 31 **102**: 11118-11123

Kolbe, A., Oliver, S. N., Fernie, A. R., Stitt, M., van Dongen, J. T. and Geigenberger, P. (2006) "Combined transcript and metabolite profiling of

Arabidopsis leaves reveals fundamental effects of the thiol-disulfide status on plant metabolism" *Plant Physiol*. 2 **141**: 412-422

Kong, W., Shiota, S., Shi, Y., Nakayama, H. and Nakayama, K. (2000) "A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin comigratory protein (Bcp)" *Biochem J. Pt 1* **351**: 107-114

Konrad, A., Banze, M. and Follmann, F. (1996) "Mitochondria of plant leaves contain two thioredoxins. Completion of the thioredoxin profile of higher plants" *Journal of Plant Physiology*. 3-4 **149**: 317-321

Koornneef, M. and Karssen, C. M. (1994) "Seed dormancy and germination, in:" Meyerowitz, E.M., Somerville, C.R.: (Eds), *Arabidopsis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.: 313-334

Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C. and Stitt, M. (1993) "Regulation of the Expression of Rbcs and Other Photosynthetic Genes by Carbohydrates - a Mechanism for the Sink Regulation of Photosynthesis" *Plant Journal*. 6 **3**: 817-828

Krimm, I., Goyer, A., Issakidis-Bourguet, E., Miginiac-Maslow, M. and Lancelin, J. M. (1999) "Direct NMR observation of the thioredoxin-mediated reduction of the chloroplast NADP-malate dehydrogenase provides a structural basis for the relief of autoinhibition" *J Biol Chem*. 49 **274**: 34539-34542

Kuno, N., Moller, S. G., Shinomura, T., Xu, X., Chua, N. H. and Furuya, M. (2003) "The novel

- MYB protein EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE1 is a component of a slave circadian oscillator in Arabidopsis" *Plant Cell*. 10 **15**: 2476-2488
- König, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schürmann, P. and Dietz, K. J.** (2002) "The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 **99**: 5738-5743
- König, J., Lotte, K., Plessow, R., Brockhinke, A., Baier, M. and Dietz, K. J.** (2003) "Reaction mechanism of plant 2-Cys peroxiredoxin. Role of the C terminus and the quaternary structure" *J Biol Chem*. 27 **278**: 24409-24420
- Laemmli, U. K.** (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4" *Nature*. 5259 **227**: 680-685
- 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" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 24 **98**: 14144-14149
- 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 Physiology*. 3 **134**: 1006-1016
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J. W., Frommer, W. B. and Ward, J. M.** (1999) "The dual function of sugar carriers. Transport and sugar sensing" *Plant Cell*. 4 **11**: 707-726
- Lam, E. and Chua, N. H.** (1989) "ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in Cab promoters" *Plant Cell*. 12 **1**: 1147-1156
- Lancelin, J. M., Stein, M. and Jacquot, J. P.** (1993) "Secondary Structure and Protein-Folding of Recombinant Chloroplastic Thioredoxin Ch2 from the Green-Alga *Chlamydomonas-Reinhardtii* as Determined by H-1-Nmr" *Journal of Biochemistry*. 3 **114**: 421-431
- 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*. 3 **41**: 334-349
- Laurent, T. C., Moore, E. C. and Reichard, P.** (1964) "Enzymatic Synthesis Of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation And Characterization Of Thioredoxin, The Hydrogen Donor From *Escherichia Coli B*" *J Biol Chem*. **239**: 3436-3444
- Lee, E. J., Koizumi, N. and Sano, H.** (2004) "Identification of genes that are up-regulated in concert during sugar depletion in Arabidopsis" *Plant Cell and Environment*. 3 **27**: 337-345
- Lee, K., Lee, J., Kim, Y., Bae, D., Kang, K. Y., Yoon, S. C. and Lim, D.** (2004) "Defining the plant disulfide proteome" *Electrophoresis*. 3 **25**: 532-541
- Lee, K. O., Jang, H. H., Jung, B. G., Chi, Y. H., Lee, J. Y., Choi, Y. O.,**

Lee, J. R., Lim, C. O., Cho, M. J. and Lee, S. Y. (2000) "Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity" *FEBS Lett.* 2 **486**: 103-106

Lee, S. P., Hwang, Y. S., Kim, Y. J., Kwon, K. S., Kim, H. J., Kim, K. and Chae, H. Z. (2001) "Cyclophilin a binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity" *J Biol Chem.* 276: 29826-29832

Lemaire, S. D., Miginiac-Maslow, M. and Jacquot, J. P. (2002) "Plant thioredoxin gene expression: Control by light, circadian clock, and heavy metals" *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Pt a, Selenoproteins and Thioredoxin.* **347**: 412-421

Lemaire, S. D., Collin, V., Keryer, E., Quesada, A. and Miginiac-Maslow, M. (2003) "Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of *Chlamydomonas reinhardtii*" *FEBS Lett.* 1-3 **543**: 87-92

Lemaire, S. D. (2004) "The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organisms" *Photosynthesis Research.* 3 **79**: 305-318

Lemaire, S. D., Guillon, B., Le Marechal, P., Keryer, E., Miginiac-Maslow, M. and Decottignies, P. (2004) "New thioredoxin targets in the unicellular photosynthetic eukaryote *Chlamydomonas reinhardtii*" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 **101**: 7475-7480

Lemaire, S. D. and Miginiac-Maslow, M. (2004) "The thioredoxin superfamily in *Chlamydomonas reinhardtii*" *Photosynth Res.* 3 **82**: 203-220

Lemaire, S. D., Quesada, A., Merchan, F., Corral, J. M., Igeno, M. I., Keryer, E., Issakidis-Bourguet, E., Hirasawa, M., Knaff, D. B. and Miginiac-Maslow, M. (2005) "NADP-malate dehydrogenase from unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. A first step toward redox regulation?" *Plant Physiol.* 2 **137**: 514-521

Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N. and Meierhoff, K. (2001) "HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex in *Arabidopsis*" *Plant Cell.* 11 **13**: 2539-2551

Lepiniec, L., Hodges, M., Gadal, P. and Cretin, C. (1992) "Isolation, characterization and nucleotide sequence of a full-length pea cDNA encoding thioredoxin-f" *Plant Mol Biol.* 5 **18**: 1023-1025

Lichtenthaler, H. K. (1897) "Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes." *Methods Enzymol. Plant Cell Membranes.* **148**: 350-380

Lin, C. and Shalitin, D. (2003) "Cryptochrome structure and signal transduction" *Annu Rev Plant Biol.* **54**: 469-496

Liscum, E. and Stowe-Evans, E. L. (2000) "Phototropism: A "simple" physiological response modulated by multiple interacting photosensory-response pathways" *Photochemistry and Photobiology.* 3 **72**: 273-282

Liscum, E. (2002) "Phototropism: mechanisms and outcomes, in: *The Arabidopsis Book*" American Society of Plant Biologists

(<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>).

Liu, X. L., Covington, M. F., Fankhauser, C., Chory, J. and Wagner, D. R. (2001) "ELF3 encodes a circadian clock-regulated nuclear protein that functions in an Arabidopsis PHYB signal transduction pathway" *Plant Cell*. 6 **13**: 1293-1304

Loreti, E., Alpi, A. and Perata, P. (2000) "Glucose and disaccharide-sensing mechanisms modulate the expression of alpha-amylase in barley embryos" *Plant Physiol*. 3 **123**: 939-948

Lowe, J. and Amos, L. a. (1998) "Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ" *Nature*. 6663 **391**: 203-206

Lu, C. A., Ho, T. H., Ho, S. L. and Yu, S. M. (2002) "Three novel MYB proteins with one DNA binding repeat mediate sugar and hormone regulation of alpha-amylase gene expression" *Plant Cell*. 8 **14**: 1963-1980

Lubbers, M. and Andreesen, J. R. (1993) "Components of Glycine Reductase from Eubacterium-Acidaminophilum - Cloning, Sequencing and Identification of the Genes for Thioredoxin Reductase, Thioredoxin and Selenoprotein P(a)" *European Journal of Biochemistry*. 2 **217**: 791-798

Lunn, J. E., Feil, R., Hendriks, J. H., Gibon, Y., Morcuende, R., Osuna, D., Scheible, W. R., Carillo, P., Hajirezaei, M. R. and Stitt, M. (2006) "Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in Arabidopsis thaliana" *Biochem J*. 1 **397**: 139-148

López-Jaramillo, J., Chueca, A., Sahrawy, M., Hermoso, R., Lázaro, J. J., Prado, F. E. and López Gorgé, J. (1994) "Cloning and sequencing of a pea cDNA fragment coding for thioredoxin m" *Plant Physiol*. 3 **105**: 1021-1022

López-Jaramillo, J., Chueca, A., Jacquot, J. P., Hermoso, R., Lázaro, J. J., Sahrawy, M. and López Gorgé, J. (1997) "High-yield expression of pea thioredoxin m and assessment of its efficiency in chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activation" *Plant Physiol*. 4 **114**: 1169-1175

Ma, L., Li, J., Qu, L., Hager, J., Chen, Z., Zhao, H. and Deng, X. W. (2001) "Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways" *Plant Cell*. 12 **13**: 2589-2607

Maeda, K., Finnie, C. and Svensson, B. (2004) "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. Pt 2* **378**: 497-507

Makino, S., Kiba, T., Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Ueguchi, C., Sugiyama, T. and Mizuno, T. (2000) "Genes encoding pseudo-response regulators: insight into His-to-Asp phosphorelay and circadian rhythm in Arabidopsis thaliana" *Plant Cell Physiol*. 6 **41**: 791-803

Makino, S., Matsushika, A., Kojima, M., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2002) "The APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythms of Arabidopsis thaliana: I.

Characterization with APRR1-overexpressing plants" *Plant Cell Physiol.* 1 **43**: 58-69

Marc-Martin, S., Spielmann, A., Stutz, E. and Schürmann, P. (1993) "Cloning and sequencing of a corn (*Zea mays*) nuclear gene coding for the chloroplast specific catalytic subunit of ferredoxin-thioredoxin reductase" *Biochim Biophys Acta.* 1 **1183**: 207-209

Marchand, C., Le Marechal, P., Meyer, Y., Miginiac-Maslow, M., Issakidis-Bourguet, E. and Decottignies, P. (2004) "New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis" *Proteomics.* 9 **4**: 2696-2706

Marcus, F., Chamberlain, S. H., Chu, C., Masiarz, F. R., Shin, S., Yee, B. C. and Buchanan, B. B. (1991) "Plant thioredoxin h: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments" *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1 **287**: 195-198

Martinez, M., Rubio-Somoza, I., Fuentes, R., Lara, P., Carbonero, P. and Diaz, I. (2005) "The barley cystatin gene (*Icy*) is regulated by DOF transcription factors in aleurone cells upon germination" *J Exp Bot.* 412 **56**: 547-556

Marx, C., Wong, J. H. and Buchanan, B. B. (2003) "Thioredoxin and germinating barley: targets and protein redox changes" *Planta.* 3 **216**: 454-460

Mas, P., Alabadi, D., Yanovsky, M. J., Oyama, T. and Kay, S. A. (2003) "Dual role of TOC1 in the control of circadian and photomorphogenic

responses in *Arabidopsis*" *Plant Cell.* 1 **15**: 223-236

Matsushika, A., Makino, S., Kojima, M. and Mizuno, T. (2000) "Circadian waves of expression of the APRR1/TOC1 family of pseudo-response regulators in *Arabidopsis thaliana*: insight into the plant circadian clock" *Plant Cell Physiol.* 9 **41**: 1002-1012

McClung, C. R., Hsu, M., Painter, J. E., Gagne, J. M., Karlsberg, S. D. and Salome, P. A. (2000) "Integrated temporal regulation of the photorespiratory pathway. Circadian regulation of two *Arabidopsis* genes encoding serine hydroxymethyltransferase" *Plant Physiol.* 1 **123**: 381-392

McWatters, H. G., Bastow, R. M., Hall, A. and Millar, A. J. (2000) "The ELF3 zeitnehmer regulates light signalling to the circadian clock" *Nature.* 6813 **408**: 716-720

Mena, M., Vicente-Carbajosa, J., Schmidt, R. J. and Carbonero, P. (1998) "An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamin-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm" *Plant J.* 1 **16**: 53-62

Merida, A., Rodriguez-Galan, J. M., Vincent, C. and Romero, J. M. (1999) "Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated" *Plant Physiol.* 2 **120**: 401-410

Mestres-Ortega, D. and Meyer, Y. (1999) "The *Arabidopsis thaliana* genome encodes at least four

- thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin" *Gene*. 2 **240**: 307-316
- Meyer, Y., Vignols, F. and Reichheld, J. P.** (2002) "Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position" *Methods Enzymol.* **347**: 394-402
- Michael, T. P. and McClung, C. R.** (2002) "Phase-specific circadian clock regulatory elements in Arabidopsis" *Plant Physiol.* 2 **130**: 627-638
- Michael, T. P. and McClung, C. R.** (2003) "Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in Arabidopsis" *Plant Physiol.* 2 **132**: 629-639
- Michael, T. P., Salome, P. A. and McClung, C. R.** (2003) "Two Arabidopsis circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11 **100**: 6878-6883
- Milla, M. A. R., Maurer, A., Huete, A. R. and Gustafson, J. P.** (2003) "Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways" *Plant Journal.* 5 **36**: 602-615
- Millar, A. J. and Kay, S. A.** (1991) "Circadian Control of cab Gene Transcription and mRNA Accumulation in Arabidopsis" *Plant Cell.* 5 **3**: 541-550
- Mittard, V., Morelle, N., Brutscher, B., Simorre, J. P., Marion, D., Stein, M., Jacquot, J. P., Lirsac, P. N. and Lancelin, J. M.** (1995) "H-1,C-13,N-15-Nmr Resonance Assignments of Oxidized Thioredoxin-H from the Eukaryotic Green-Alga *Chlamydomonas-Reinhardtii* Using New Methods Based on 2-Dimensional Triple-Resonance Nmr-Spectroscopy and Computer-Assisted Backbone Assignment" *European Journal of Biochemistry.* 2 **229**: 473-485
- Mittard, V., Blackledge, M. J., Stein, M., Jacquot, J. P., Marion, D. and Lancelin, J. M.** (1997) "NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga *Chlamydomonas reinhardtii*" *European Journal of Biochemistry.* 1-2 **243**: 374-383
- Mizoguchi, T., Wheatley, K., Hanzawa, Y., Wright, L., Mizoguchi, M., Song, H. R., Carre, I. A. and Coupland, G.** (2002) "LHY and CCA1 are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in Arabidopsis" *Dev Cell.* 5 **2**: 629-641
- Montgomery, B. L. and Lagarias, J. C.** (2002) "Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light" *Trends Plant Sci.* 8 **7**: 357-366
- 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 Physiology.* 3 **132**: 1707-1715
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Liu, Y. X., Hwang, I., Jones, T. and Sheen, J.** (2003) "Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling" *Science.* 5617 **300**: 332-336
- Moorhead, G., Douglas, P., Cotelle, V., Harthill, J., Morrice, N., Meek, S., Deiting, U., Stitt, M., Scarabel, M., Aitken, A. and MacKintosh, C.** (1999)

"Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins" *Plant Journal*. 1 **18**: 1-12

Moreno, F., Ahuatz, D., Riera, A., Palomino, C. A. and Herrero, P. (2005) "Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway" *Biochem Soc Trans. Pt 1* **33**: 265-268

Morikami, A., Matsunaga, R., Tanaka, Y., Suzuki, S., Mano, S. and Nakamura, K. (2005) "Two cis-acting regulatory elements are involved in the sucrose-inducible expression of the sporamin gene promoter from sweet potato in transgenic tobacco" *Mol Genet Genomics*. 6 **272**: 690-699

Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T. and Hisabori, T. (2001a) "Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 20 **98**: 11224-11229

Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M. T. and Hisabori, T. (2001b) "Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 **98**: 11224-11229

Motohashi, K., Koyama, F., Nakanishi, Y., Ueoka-Nakanishi, H. and Hisabori, T. (2003) "Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin - Thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity" *Journal of Biological Chemistry*. 34 **278**: 31848-31852

Mowla, S. B., Thomson, J. A., Farrant, J. M. and Mundree, S. G. (2002) "A novel stress-inducible antioxidant enzyme identified from the

resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker" *Planta*. 5 **215**: 716-726

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*. 14 **266**: 9194-9202

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures" *Physiologia Plantarum*. 3 **15**: 473-&

Muñoz, E., Brewer, M. and Baler, R. (2002) "Circadian Transcription. Thinking outside the E-Box" *J Biol Chem*. 39 **277**: 36009-36017

Myers, a. B., Firn, R. D. and Digby, J. (1994) "Gravitropic Sign Reversal - a Fundamental Feature of the Gravitropic Perception or Response Mechanisms in Some Plant Organs" *Journal of Experimental Botany*. 270 **45**: 77-83

Nakamura, N., Marutani, M., Sanematsu, S., Toyoda, K., Inagaki, Y.-S., Shiraishi, T. and Ichinose, Y. (2003) "Phylogenetic classification of Dof-type transcription Factors in pea" *Plant Biotechnol*. 3 **20**: 247-253

Nassoury, N., Fritz, L. and Morse, D. (2001) "Circadian changes in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase distribution inside individual chloroplasts can account for the rhythm in dinoflagellate carbon fixation" *Plant Cell*. 4 **13**: 923-934

Natsuyama, S., Noda, Y., Yamashita, M., Nagahama, Y. and Mori, T. (1993) "Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective

p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block" *Biochim Biophys Acta.* 1-2 **1176**: 90-94

Nemhauser, J. and Chory, J. (2002) "Photomorphogenesis, in: The Arabidopsis Book" American Society of Plant Biologists (<http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>).

Ni, M., Tepperman, J. M. and Quail, P. H. (1998) "PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein" *Cell.* **5 95**: 657-667

Niehaus, A., Gisselmann, G. and Schwenn, J. D. (1992) "Primary Structure of the Synechococcus Pcc-7942 Paps Reductase Gene" *Plant Molecular Biology.* **6 20**: 1179-1183

Noctor, G. and Foyer, C. H. (1998) "ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control" *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**: 249-279

Noiraud, N., Maurousset, L. and Lemoine, R. (2001) "Identification of a mannitol transporter, AgMaT1, in celery phloem" *Plant Cell.* **3 13**: 695-705

Ohba, H., Harano, T. and Omura, T. (1981) "Biosynthesis and turnover of a microsomal protein disulfide isomerase in rat liver" *J Biochem (Tokyo).* **3 89**: 901-907

Olsson, T., Thelander, M. and Ronne, H. (2003) "A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*" *J Biol Chem.* **45 278**: 44439-44447

Ozcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wolfl, S. and Johnston, M. (1996) "Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **22 93**: 12428-12432

Pagano, E. A., Chueca, A. and López-Gorgé, J. (2000) "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.* **348 51**: 1299-1307

Pallett, K. E. and Young, A. J. (1993) "Carotenoids" In: Alscher RG, Hess JI, eds. *Antioxidants in higher plants.* Boca Raton, FL: CRC Press. 91-110

Papi, M., Sabatini, S., Bouchez, D., Camilleri, C., Costantino, P. and Vittorioso, P. (2000) "Identification and disruption of an Arabidopsis zinc finger gene controlling seed germination" *Genes Dev.* **1 14**: 28-33

Park, D. H., Somers, D. E., Kim, Y. S., Choy, Y. H., Lim, H. K., Soh, M. S., Kim, H. J., Kay, S. A. and Nam, H. G. (1999) "Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the Arabidopsis GIGANTEA gene" *Science.* **5433 285**: 1579-1582

Patel, J. M., Zhang, J. and Block, E. R. (1996) "Nitric oxide-induced inhibition of lung endothelial cell nitric oxide synthase via interaction with allosteric thiols: role of thioredoxin in regulation of catalytic activity" *Am J Respir Cell Mol Biol.* **3 15**: 410-419

Pego, J. V., Kortstee, A. J., Huijser, C. and Smeekens, S. C. (2000)

"Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression" *J Exp Bot.* **51 Spec No:** 407-416

Pego, J. V. and Smeekens, S. C. (2000) "Plant fructokinases: a sweet family get-together" *Trends Plant Sci.* **12** 5: 531-536

Peltier, J. B., Emanuelsson, O., Kalume, D. E., Ytterberg, J., Friso, G., Rudella, A., Liberles, D. A., Soderberg, L., Roepstorff, P., von Heijne, G. and van Wijk, K. J. (2002) "Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of Arabidopsis determined by experimentation and genome-wide prediction" *Plant Cell.* **14**: 211-236

Perfus-Barbeoch, L., Jones, A. M. and Assmann, S. M. (2004) "Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants" *Curr Opin Plant Biol.* **6** 7: 719-731

Pilgrim, M. L. and McClung, C. R. (1993) "Differential Involvement of the Circadian Clock in the Expression of Genes Required for Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase Synthesis, Assembly, and Activation in Arabidopsis thaliana" *Plant Physiol.* **2** **103**: 553-564

Planchais, S., Samland, A. K. and Murray, J. A. (2004) "Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism" *Plant J.* **4** **38**: 616-625

Plesch, G., Ehrhardt, T. and Mueller-Roeber, B. (2001) "Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription

factors in guard cell-specific gene expression" *Plant J.* **4** **28**: 455-464

Pollard, M. G., Travers, K. J. and Weissman, J. S. (1998) "Ero1p: a novel and ubiquitous protein with an essential role in oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum" *Mol Cell.* **2** **1**: 171-182

Poole, L. B. (1996) "Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium. 2. Cystine disulfides involved in catalysis of peroxide reduction" *Biochemistry.* **1** **35**: 65-75

Pourtau, N., Jennings, R., Pelzer, E., Pallas, J. and Wingler, A. (2006) "Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis" *Planta.* **3** **224**: 556-568

Price, J., Laxmi, A., St Martin, S. K. and Jang, J. C. (2004) "Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis" *Plant Cell.* **8** **16**: 2128-2150

Primm, T. P., Walker, K. W. and Gilbert, H. F. (1996) "Facilitated protein aggregation. Effects of calcium on the chaperone and anti-chaperone activity of protein disulfide-isomerase" *J Biol Chem.* **52** **271**: 33664-33669

Puente, P., Wei, N. and Deng, X. W. (1996) "Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in Arabidopsis" *Embo Journal.* **14** **15**: 3732-3743

Quail, P. H., Boylan, M. T., Parks, B. M., Short, T. W., Xu, Y. and Wagner, D. (1995) "Phytochromes:

- photosensory perception and signal transduction" *Science*. 5211 **268**: 675-680
- Quail, P. H.** (2002a) "Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms?" *Curr Opin Cell Biol.* **2** **14**: 180-188
- Quail, P. H.** (2002b) "Phytochrome photosensory signalling networks" *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2** **3**: 85-93
- Quan, H., Fan, G. and Wang, C. C.** (1995) "Independence of the chaperone activity of protein disulfide isomerase from its thioredoxin-like active site" *J Biol Chem.* **270**: 17078-17080
- Quirino, B. F., Noh, Y. S., Himelblau, E. and Amasino, R. M.** (2000) "Molecular aspects of leaf senescence" *Trends in Plant Science.* **7** **5**: 278-282
- Raines, C. A., Lloyd, J. C., Longstaff, M., Bradley, D. and Dyer, T.** (1988) "Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene" *Nucleic Acids Res.* **16** **16**: 7931-7942
- Ramon, M., Rolland, F., Thevelein, J. M., Van Dijck, P. and Leyman, B.** (2007) "ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on Arabidopsis growth and starch breakdown" *Plant Mol Biol.* **2** **63**: 195-206
- Rascher, U., Hutt, M. T., Siebke, K., Osmond, B., Beck, F. and Luttge, U.** (2001) "Spatiotemporal variation of metabolism in a plant circadian rhythm: the biological clock as an assembly of coupled individual oscillators" *Proc Natl Acad Sci U S A.* **20** **98**: 11801-11805
- Rawat, R., Xu, Z. F., Yao, K. M. and Chye, M. L.** (2005) "Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase" *Plant Mol Biol.* **5** **57**: 629-643
- Ray, W. K., Zeng, G., Potters, M. B., Mansuri, A. M. and Larson, T. J.** (2000) "Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin" *Journal of Bacteriology.* **8** **182**: 2277-2284
- Reichheld, J. P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M. and Inze, D.** (1999) "Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress" *Plant Journal.* **6** **17**: 647-656
- Reichheld, J. P., Meyer, E., Khafif, M., Bonnard, G. and Meyer, Y.** (2005) "AtNTRB is the major mitochondrial thioredoxin reductase in *Arabidopsis thaliana*" *FEBS Lett.* **2** **579**: 337-342
- Reichheld, J. P., Khafif, M., Riondet, C., Droux, M., Bonnard, G. and Meyer, Y.** (2007) "Inactivation of Thioredoxin Reductases Reveals a Complex Interplay between Thioredoxin and Glutathione Pathways in Arabidopsis Development" *Plant Cell.* **6** **19**: 1851-1865
- Rikin, A., Dillwith, J. W. and Bergman, D. K.** (1993) "Correlation between the Circadian Rhythm of Resistance to Extreme Temperatures and Changes in Fatty Acid Composition in Cotton Seedlings" *Plant Physiol.* **1** **101**: 31-36
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. and Murray, J. A.** (2000)

"Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression" *Mol Cell Biol.* 13 **20**: 4513-4521

Rivas, S., Rougon-Cardoso, A., Smoker, M., Schauser, L., Yoshioka, H. and Jones, J. D. (2004) "CITRX thioredoxin interacts with the tomato Cf-9 resistance protein and negatively regulates defence" *Embo Journal.* 10 **23**: 2156-2165

Roesler, K. R. and Rao, A. G. (2000) "A single disulfide bond restores thermodynamic and proteolytic stability to an extensively mutated protein" *Protein Sci.* 9 **9**: 1642-1650

Rogers, H. J., Bate, N., Combe, J., Sullivan, J., Sweetman, J., Swan, C., Lonsdale, D. M. and Twell, D. (2001) "Functional analysis of cis-regulatory elements within the promoter of the tobacco late pollen gene *g10*" *Plant Mol Biol.* 5 **45**: 577-585

Roitsch, T. (1999) "Source-sink regulation by sugar and stress" *Curr Opin Plant Biol.* 3 **2**: 198-206

Roitsch, T. and González, M. C. (2004) "Function and regulation of plant invertases: sweet sensations" *Trends Plant Sci.* 12 **9**: 606-613

Rolland, F., Moore, B. and Sheen, J. (2002a) "Sugar sensing and signaling in plants" *Plant Cell.* 14 **Suppl**: S185-205

Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J. M. (2002b) "Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast" *FEMS Yeast Res.* 2 **2**: 183-201

Rolland, F., Baena-Gonzalez, E. and Sheen, J. (2006) "Sugar sensing and

signaling in plants: conserved and novel mechanisms" *Annu Rev Plant Biol.* 57: 675-709

Rombauts, S., Dehais, P., Van Montagu, M. and Rouze, P. (1999) "PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database" *Nucleic Acids Research.* 1 **27**: 295-296

Rook, F., Gerrits, N., Kortstee, A., van Kampen, M., Borrias, M., Weisbeek, P. and Smeeckens, S. (1998) "Sucrose-specific signalling represses translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP transcription factor gene" *Plant J.* 2 **15**: 253-263

Rouhier, N., Gelhaye, E., Sautiere, P. E., Brun, A., Laurent, P., Tagu, D., Gerard, J., de Fay, E., Meyer, Y. and Jacquot, J. P. (2001) "Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor" *Plant Physiol.* 3 **127**: 1299-1309

Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P. (2002a) "Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis" *FEBS Lett.* 1-3 **511**: 145-149

Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P. (2002b) "Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism" *J Biol Chem.* 16 **277**: 13609-13614

Rouhier, N. and Jacquot, J. P. (2002) "Plant peroxiredoxins: alternative hydroperoxide scavenging enzymes" *Photosynthesis Research.* 3 **74**: 259-268

Rouhier, N., Gelhaye, E., Gualberto, J. M., Jordy, M. N., De Fay, E., Hirasawa, M., Duplessis, S.,

- Lemaire, S. D., Frey, P., Martin, F., Manieri, W., Knaff, D. B. and Jacquot, J. P.** (2004a) "Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense" *Plant Physiol.* 3 **134**: 1027-1038
- Rouhier, N., Gelhaye, E. and Jacquot, J. P.** (2004b) "Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems" *Cell Mol Life Sci.* 11 **61**: 1266-1277
- Russel, M. and Model, P.** (1985) "Thioredoxin Is Required for Filamentous Phage Assembly" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1 **82**: 29-33
- Ryu, J. Y., Song, J. Y., Lee, J. M., Jeong, S. W., Chow, W. S., Choi, S. B., Pogson, B. J. and Park, Y. I.** (2004) "Glucose-induced expression of carotenoid biosynthesis genes in the dark is mediated by cytosolic ph in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803" *J Biol Chem.* 24 **279**: 25320-25325
- Ríos, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jasik, J., Winter, J., Ferrando, A., Farras, R., Panicot, M., Henriques, R., Mariaux, J. B., Oberschall, A., Molnar, G., Berendzen, K., Shukla, V., Lafos, M., Koncz, Z., Redei, G. P., Schell, J. and Koncz, C.** (2002) "Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes" *Plant J.* 2 **32**: 243-253
- Saarinen, M., Gleason, F. K. and Eklund, H.** (1995) "Crystal-Structure of Thioredoxin-2 from *Anabaena*" *Structure.* 10 **3**: 1097-1108
- Sadanandom, A., Piffanelli, P., Knott, T., Robinson, C., Sharpe, A., Lydiate, D., Murphy, D. and Fairbairn, D. J.** (1996) "Identification of a peptide methionine sulphoxide reductase gene in an oleosin promoter from *Brassica napus*" *Plant Journal.* 2 **10**: 235-242
- 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.* 4 **42**: 422-431
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. and Okada, K.** (2001) "Arabidopsis *nph1* and *nph11*: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 **98**: 6969-6974
- Salamon, Z., Tollin, G., Hirasawa, M., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A. L., Knaff, D. B. and Schurmann, P.** (1995) "The oxidation-reduction properties of spinach thioredoxins f and m and of ferredoxin:thioredoxin reductase" *Biochim Biophys Acta.* 3 **1230**: 114-118
- Salome, P. A., Michael, T. P., Kearns, E. V., Fett-Neto, A. G., Sharrock, R. A. and McClung, C. R.** (2002) "The out of phase 1 mutant defines a role for PHYB in circadian phase control in *Arabidopsis*" *Plant Physiol.* 4 **129**: 1674-1685
- Salome, P. A. and McClung, C. R.** (2004) "The *Arabidopsis thaliana* clock" *J Biol Rhythms.* 5 **19**: 425-435
- Salz, H. K., Flickinger, T. W., Mittendorf, E., Pellicena-Palle, A.,**

Petschek, J. P. and Albrecht, E. B. (1994) "The Drosophila maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development" *Genetics*. 3 **136**: 1075-1086

Santa-Coloma, T. A., Grasso, P. and Reichert, L. E., Jr. (1991) "Sulfhydryl groups are involved in the interaction of FSH with its receptor" *Biochem Biophys Res Commun*. 3 **176**: 1256-1261

Santangelo, G. M. (2006) "Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*" *Microbiol Mol Biol Rev*. 1 **70**: 253-282

Sasaki, Y., Kozaki, A. and Hatano, M. (1997) "Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 **94**: 11096-11101

Sauer, A. and Heise, K. P. (1983) "On the Light Dependence of Fatty Acid Synthesis in Spinach Chloroplasts" *Plant Physiol*. 1 **73**: 11-15

Schaffer, R., Ramsay, N., Samach, A., Corden, S., Putterill, J., Carre, I. A. and Coupland, G. (1998) "The late elongated hypocotyl mutation of *Arabidopsis* disrupts circadian rhythms and the photoperiodic control of flowering" *Cell*. 7 **93**: 1219-1229

Schaffer, R., Landgraf, J., Accerbi, M., Simon, V., Larson, M. and Wisman, E. (2001) "Microarray analysis of diurnal and circadian-regulated genes in *Arabidopsis*" *Plant Cell*. 1 **13**: 113-123

Scheibe, R. (1991) "Redox-Modulation of Chloroplast Enzymes: A Common Principle for Individual Control" *Plant Physiol*. 1 **96**: 1-3

Scheible, W. R., Morcuende, R., Czechowski, T., Fritz, C., Osuna, D., Palacios-Rojas, N., Schindelasch, D., Thimm, O., Udvardi, M. K. and Stitt, M. (2004) "Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen" *Plant Physiology*. 1 **136**: 2483-2499

Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W. and Schulze-Osthoff, K. (1994) "Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 **91**: 1672-1676

Schluepmann, H., Pellny, T., van Dijken, A., Smeekens, S. and Paul, M. (2003) "Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 11 **100**: 6849-6854

Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbles, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004a) "Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation" *Plant Physiology*. 2 **135**: 879-890

Schluepmann, H., van Dijken, A., Aghdasi, M., Wobbles, B., Paul, M. and Smeekens, S. (2004b) "Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation" *Plant Physiol*. 2 **135**: 879-890

Schürmann, P., Wolosiuk, R. a., Breazeale, V. D. and Buchanan, B. B.

- (1976) "2 Proteins Function in Regulation of Photosynthetic Co₂ Assimilation in Chloroplasts" *Nature*. 5574 **263**: 257-258
- Schürmann, P. and Jacquot, J. P.** (2000) "Plant Thioredoxin Systems Revisited" *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **51**: 371-400
- Seki, H., N. Nakamura, M. Marutani, T. Okabe, S. Sanematsu, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi, and T. Y. and Ichinose, Y.** (2002) "Molecular cloning of cDNA for a novel pea Dof protein, PsDof1, and its DNA binding activity to the promoter of *PsDof1* gene" *Plant Biotechnology*. **4** **19**: 251-260
- Serrato, A. J., Perez-Ruiz, J. M. and Cejudo, F. J.** (2002) "Cloning of thioredoxin h reductase and characterization of the thioredoxin reductase-thioredoxin h system from wheat" *Biochem J. Pt 2* **367**: 491-497
- Serrato, A. J. and Cejudo, F. J.** (2003) "Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress" *Planta*. **3** **217**: 392-399
- Serrato, A. J., Perez-Ruiz, J. M., Spinola, M. C. and Cejudo, F. J.** (2004) "A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*" *J Biol Chem*. **42** **279**: 43821-43827
- Shi, J. and Bhattacharyya, M. K.** (1996) "A novel plasma membrane-bound thioredoxin from soybean" *Plant Mol Biol*. **4** **32**: 653-662
- Shimofurutani, N., Kisu, Y., Suzuki, M. and Esaka, M.** (1998) "Functional analyses of the Dof domain, a zinc finger DNA-binding domain, in a pumpkin DNA-binding protein AOBP" *FEBS Lett*. **3** **430**: 251-256
- Shirsat, A., Wilford, N., Croy, R. and Boulter, D.** (1989) "Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco" *Mol Gen Genet*. **2** **215**: 326-331
- Sinha, A. K., Hofmann, M. G., Romer, U., Kockenberger, W., Elling, L. and Roitsch, T.** (2002) "Metabolizable and non-metabolizable sugars activate different signal transduction pathways in tomato" *Plant Physiol*. **4** **128**: 1480-1489
- Smalle, J. and Vierstra, R. D.** (2004) "The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway" *Annu Rev Plant Biol*. **55**: 555-590
- Smeekens, S.** (2000) "Sugar-Induced Signal Transduction In Plants" *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **51**: 49-81
- Smirnoff, N., Conklin, P. L. and Loewus, F. A.** (2001) "BIOSYNTHESIS OF ASCORBIC ACID IN PLANTS: A Renaissance" *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. **52**: 437-467
- Smith, A. M., Zeeman, S. C. and Smith, S. M.** (2005) "Starch degradation" *Annu Rev Plant Biol*. **56**: 73-98
- Smith, H. and Whitelam, G. C.** (1997) "The shade avoidance syndrome: Multiple responses mediated by multiple phytochromes" *Plant Cell and Environment*. **6** **20**: 840-844

- Smith, H. B.** (2000) "Photoreceptors in signal transduction. Pathways of enlightenment" *Plant Cell*. 1 **12**: 1-3
- Somers, D. E., Devlin, P. F. and Kay, S. A.** (1998a) "Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock" *Science*. 5393 **282**: 1488-1490
- Somers, D. E., Webb, A. A., Pearson, M. and Kay, S. A.** (1998b) "The short-period mutant, *toc1-1*, alters circadian clock regulation of multiple outputs throughout development in Arabidopsis thaliana" *Development*. 3 **125**: 485-494
- Sparla, F., Costa, A., Lo Schiavo, F., Pupillo, P. and Trost, P.** (2006) "Redox regulation of a novel plastid-targeted beta-amylase of Arabidopsis" *Plant Physiol*. 3 **141**: 840-850
- Stacy, R. A., Nordeng, T. W., Culianez-Macia, F. A. and Aalen, R. B.** (1999) "The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells" *Plant J*. 1 **19**: 1-8
- Strayer, C., Oyama, T., Schultz, T. F., Raman, R., Somers, D. E., Mas, P., Panda, S., Kreps, J. A. and Kay, S. A.** (2000) "Cloning of the Arabidopsis clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog" *Science*. 5480 **289**: 768-771
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A.** (1986) "Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes" *Journal of Molecular Biology*. 1 **189**: 113-130
- Szekeres, M., Droux, M. and Buchanan, B. B.** (1991) "The ferredoxin-thioredoxin reductase variable subunit gene from *Anacystis nidulans*" *J Bacteriol*. 5 **173**: 1821-1823
- Tabor, S., Huber, H. E. and Richardson, C. C.** (1987) "Escherichia-Coli Thioredoxin Confers Processivity on the DNA-Polymerase-Activity of the Gene-5 Protein of Bacteriophage-T7" *Journal of Biological Chemistry*. 33 **262**: 16212-16223
- Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K., Yokota, T., Wakasugi, H. and et al.** (1989) "ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction" *Embo Journal*. 3 **8**: 757-764
- Takahashi, N. and Creighton, T. E.** (1996) "On the reactivity and ionization of the active site cysteine residues of *Escherichia coli* thioredoxin" *Biochemistry*. 25 **35**: 8342-8353
- Tavladoraki, P., Kloppstech, K. and Argyroudiakoyunoglou, J.** (1989) "Circadian-Rhythm in the Expression of the Messenger-Rna Coding for the Apoprotein of the Light-Harvesting Complex of Photosystem-Ii - Phytochrome Control and Persistent Far Red Reversibility" *Plant Physiology*. 2 **90**: 665-672
- Tenorio, G., Orea, A., Romero, J. M. and Merida, A.** (2003) "Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in Arabidopsis leaves during the day/night cycle" *Plant Mol Biol*. 6 **51**: 949-958
- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S. L., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., DeJong, T. M. and Dandekar, A. M.** (2006) "Silencing leaf sorbitol

- synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 49 **103**: 18842-18847
- Tepfer, M. and Casse-Delbart, F.** (1987) "Agrobacterium rhizogenes as a vector for transforming higher plants" *Microbiol Sci.* 1 **4**: 24-28
- Thain, S. C., Hall, A. and Millar, A. J.** (2000) "Functional independence of circadian clocks that regulate plant gene expression" *Curr Biol.* 16 **10**: 951-956
- Thain, S. C., Murtas, G., Lynn, J. R., McGrath, R. B. and Millar, A. J.** (2002) "The circadian clock that controls gene expression in Arabidopsis is tissue specific" *Plant Physiol.* 1 **130**: 102-110
- Thimm, O., Blasing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Kruger, P., Selbig, J., Muller, L. A., Rhee, S. Y. and Stitt, M.** (2004) "MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes" *Plant Journal.* 6 **37**: 914-939
- Tiessen, A., Hendriks, J. H., Stitt, M., Branscheid, A., Gibon, Y., Farre, E. M. and Geigenberger, P.** (2002) "Starch synthesis in potato tubers is regulated by post-translational redox modification of ADP-glucose pyrophosphorylase: a novel regulatory mechanism linking starch synthesis to the sucrose supply" *Plant Cell.* 9 **14**: 2191-2213
- Tiessen, A., Prescha, K., Branscheid, A., Palacios, N., McKibbin, R., Halford, N. G. and Geigenberger, P.** (2003) "Evidence that SNF1-related kinase and hexokinase are involved in separate sugar-signalling pathways modulating post-translational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in potato tubers" *Plant J.* 4 **35**: 490-500
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P. H.** (2003) "The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family" *Plant Cell.* 8 **15**: 1749-1770
- Toroser, D., Plaut, Z. and Huber, S. C.** (2000) "Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate" *Plant Physiol.* 1 **123**: 403-412
- Toth, R., Kevei, E., Hall, A., Millar, A. J., Nagy, F. and Kozma-Bognar, L.** (2001) "Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in Arabidopsis" *Plant Physiol.* 4 **127**: 1607-1616
- Traverso, J. A., Vignols, F., Cazalis, R., Pulido, A., Sahrawy, M., Cejudo, F. J., Meyer, Y. and Chueca, A.** (2007) "PsTRXh1 and PsTRXh2 are both pea h-type thioredoxins with antagonistic behavior in redox imbalances" *Plant Physiology.* 1 **143**: 300-311
- van Dijken, A. J. H., Schlupe, H. and Smeekens, S. C. M.** (2004) "Arabidopsis trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering" *Plant Physiology.* 2 **135**: 969-977
- Van Langendonck, A. and Vanden Driessche, T.** (1992) "Isolation and characterization of different forms of thioredoxins from the green alga *Acetabularia mediterranea*: identification of an NADP/thioredoxin system in the extrachloroplastic fraction" *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1 **292**: 156-164

Vaughn, M. W., Harrington, G. N. and Bush, D. R. (2002) "Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 **99**: 10876-10880

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.* 28 **274**: 19714-19722

Vicente-Carbajosa, J., Moose, S. P., Parsons, R. L. and Schmidt, R. J. (1997) "A maize zinc-finger protein binds the prolamin box in zein gene promoters and interacts with the basic leucine zipper transcriptional activator Opaque2" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 14 **94**: 7685-7690

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" *J Biol Chem.* 7 **278**: 4516-4523

Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., Mitsui, A., Maeda, M., Yodoi, J. and Tursz, T. (1990) "Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotropic virus type I- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 **87**: 8282-8286

Wakil, S. J., Stoops, J. K. and Joshi, V. C. (1983) "Fatty acid synthesis and its regulation" *Annu Rev Biochem.* 52: 537-579

Wan, C. Y. and Wilkins, T. A. (1994) "A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.)" *Anal Biochem.* 1 **223**: 7-12

Wang, Z. Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M. S. and Tobin, E. M. (1997) "A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene" *Plant Cell.* 4 **9**: 491-507

Wang, Z. Y. and Tobin, E. M. (1998) "Constitutive expression of the CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1) gene disrupts circadian rhythms and suppresses its own expression" *Cell.* 7 **93**: 1207-1217

Ward, J. M., Cufu, C. A., Denzel, M. A. and Neff, M. M. (2005) "The Dof transcription factor OBP3 modulates phytochrome and cryptochrome signaling in Arabidopsis" *Plant Cell.* 2 **17**: 475-485

Washio, K. (2001) "Identification of Dof proteins with implication in the gibberellin-regulated expression of a peptidase gene following the germination of rice grains" *Biochim Biophys Acta.* 1 **1520**: 54-62

Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T. and Shiratake, K. (2004) "Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves" *Plant Cell Physiol.* 8 **45**: 1032-1041

Webb, M. A., Cavaletto, J. M., Klanrit, P. and Thompson, G. A. (2001) "Orthologs in Arabidopsis thaliana of the Hsp70 interacting protein Hip" *Cell Stress Chaperones.* 3 **6**: 247-255

- Weber, A. P., Schwacke, R. and Flugge, U. I.** (2005) "Solute transporters of the plastid envelope membrane" *Annu Rev Plant Biol.* **56**: 133-164
- Weber, H., Borisjuk, L. and Wobus, U.** (2005) "Molecular physiology of legume seed development" *Annu Rev Plant Biol.* **56**: 253-279
- Wehmeyer, B., Cashmore, a. R. and Schafer, E.** (1990) "Photocontrol of the Expression of Genes Encoding Chlorophyll-a/B Binding-Proteins and Small Subunit of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase in Etiolated Seedlings of *Lycopersicon-Esculentum* (L) and *Nicotiana-Tabacum* (L)" *Plant Physiology.* **3** **93**: 990-997
- Weichel, M., Glaser, A. G., Ballmer-Weber, B. K., Schmid-Grendelmeier, P. and Cramer, R.** (2006) "Wheat and maize thioredoxins: A novel cross-reactive cereal allergen family related to baker's asthma" *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* **3** **117**: 676-681
- Wenderoth, I., Scheibe, R. and von Schaewen, A.** (1997) "Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase" *J Biol Chem.* **43** **272**: 26985-26990
- Wiese, A., Elzinga, N., Wobbes, B. and Smeekens, S.** (2004) "A conserved upstream open reading frame mediates sucrose-induced repression of translation" *Plant Cell.* **7** **16**: 1717-1729
- Wilson, J. E.** (2003) "Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function" *J Exp Biol. Pt 12* **206**: 2049-2057
- Woelfle, M. A., Yan, O. Y., Phanvijhitsiri, K. and Johnson, C. H.** (2004) "The adaptive value of circadian clocks: An experimental assessment in cyanobacteria" *Current Biology.* **16** **14**: 1481-1486
- Wollman, E. E., d'Auriol, L., Rimsky, L., Shaw, A., Jacquot, J. P., Wingfield, P., Graber, P., Dessarps, F., Robin, P., Galibert, F. and et al.** (1988) "Cloning and expression of a cDNA for human thioredoxin" *J Biol Chem.* **30** **263**: 15506-15512
- Wolosiuk, R. a., Crawford, N. a., Yee, B. C. and Buchanan, B. B.** (1979) "Isolation of 3 Thioredoxins from Spinach Leaves" *Journal of Biological Chemistry.* **5** **254**: 1627-1632
- 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.* **25** **99**: 16325-16330
- 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.* **11** **65**: 1629-1640
- Wood, Z. A., Schroder, E., Robin Harris, J. and Poole, L. B.** (2003) "Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins" *Trends Biochem Sci.* **1** **28**: 32-40
- Wynn, R., Cocco, M. J. and Richards, F. M.** (1995) "Mixed

Disulfide Intermediates during the Reduction of Disulfides by Escherichia-Coli Thioredoxin" *Biochemistry*. 37 **34**: 11807-11813

Xiao, W., Sheen, J. and Jang, J. C. (2000) "The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development" *Plant Mol Biol*. 4 **44**: 451-461

Xing, S., Rosso, M. G. and Zachgo, S. (2005) "ROXY1, a member of the plant glutaredoxin family, is required for petal development in *Arabidopsis thaliana*" *Development*. 7 **132**: 1555-1565

Xu, Y. and Johnson, C. H. (2001) "A clock- and light-regulated gene that links the circadian oscillator to LHCb gene expression" *Plant Cell*. 6 **13**: 1411-1425

Yakir, E., Hilman, D., Harir, Y. and Green, R. M. (2007) "Regulation of output from the plant circadian clock" *Febs J*. 2 **274**: 335-345

Yamamoto, Y., Sato, E., Shimizu, T., Nakamich, N., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Nagatani, A., Yamashino, T. and Mizuno, T. (2003) "Comparative genetic studies on the APRR5 and APRR7 genes belonging to the APRR1/TOC1 quintet implicated in circadian rhythm, control of flowering time, and early photomorphogenesis" *Plant Cell Physiol*. 11 **44**: 1119-1130

Yanagisawa, S. and Izui, K. (1993) "Molecular cloning of two DNA-binding proteins of maize that are structurally different but interact with the same sequence motif" *J Biol Chem*. 21 **268**: 16028-16036

Yanagisawa, S. (1995) "A novel DNA-binding domain that may form a single zinc finger motif" *Nucleic Acids Res*. 17 **23**: 3403-3410

Yanagisawa, S. (1996) "A novel multigene family that the gene for a maize DNA-binding protein, MNB1a belongs to: isolation of genomic clones from this family and some aspects of its molecular evolution" *Biochem Mol Biol Int*. 4 **38**: 665-673

Yanagisawa, S. and Sheen, J. (1998) "Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression" *Plant Cell*. 1 **10**: 75-89

Yanagisawa, S. and Schmidt, R. J. (1999) "Diversity and similarity among recognition sequences of Dof transcription factors" *Plant J*. 2 **17**: 209-214

Yanagisawa, S. (2000) "Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize" *Plant J*. 3 **21**: 281-288

Yanagisawa, S. (2002) "The Dof family of plant transcription factors" *Trends Plant Sci*. 12 **7**: 555-560

Yanagisawa, S., Yoo, S. D. and Sheen, J. (2003) "Differential regulation of EIN3 stability by glucose and ethylene signalling in plants" *Nature*. 6957 **425**: 521-525

Yano, H., Kuroda, S. and Buchanan, B. B. (2002) "Disulfide proteome in the analysis of protein function and structure" *Proteomics*. 9 **2**: 1090-1096

- Yanovsky, M. J. and Kay, S. A.** (2001) "Signaling networks in the plant circadian system" *Curr Opin Plant Biol.* 5 4: 429-435
- Yanovsky, M. J. and Kay, S. A.** (2002) "Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis" *Nature.* 6904 419: 308-312
- Yanovsky, M. J. and Kay, S. A.** (2003) "Living by the calendar: how plants know when to flower" *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4 4: 265-275
- Young, M. W. and Kay, S. A.** (2001) "Time zones: a comparative genetics of circadian clocks" *Nat Rev Genet.* 9 2: 702-715
- Yu, S. M.** (1999) "Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation" *Plant Physiol.* 3 121: 687-693
- Zhang, B., Chen, W., Foley, R. C., Buttner, M. and Singh, K. B.** (1995) "Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences" *Plant Cell.* 12 7: 2241-2252
- Zhang, L. Y., Peng, Y. B., Pelleschi-Travier, S., Fan, Y., Lu, Y. F., Lu, Y. M., Gao, X. P., Shen, Y. Y., Delrot, S. and Zhang, D. P.** (2004) "Evidence for apoplasmic phloem unloading in developing apple fruit" *Plant Physiol.* 1 135: 574-586
- Zhang, Y. M., Wong, T. Y., Chen, L. Y., Lin, C. S. and Liu, J. K.** (2000) "Induction of a futile Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Deinococcus radiodurans* by Mn: possible role of the pentose phosphate pathway in cell survival" *Appl Environ Microbiol.* 1 66: 105-112
- Zhou, D. X.** (1999) "Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors" *Trends Plant Sci.* 6 4: 210-214
- Zhou, L., Jang, J. C., Jones, T. L. and Sheen, J.** (1998) "Glucose and ethylene signal transduction crosstalk revealed by an Arabidopsis glucose-insensitive mutant" *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 95: 10294-10299
- Zourelidou, M., de Torres-Zabala, M., Smith, C. and Bevan, M. W.** (2002) "Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression" *Plant J.* 4 30: 489-497

VIII.- APÉNDICES

Abreviaturas.

A. tumefaciens :

Agrobacterium tumefaciens

ABA : Ácido abscísico

ADN : Ácido

dexosirribonucleico

ADNc : ADN complementario

ADP : Adenosina 5` difosfato

AGPasa : ADP glucosa

pirofosforilasa

AMPc : Adenosín 3'-5'-

monofosfato cíclico

ARN : Ácido ribonucleico

ARNt : ARN de transferencia

ATP : Adenosina trifosfato

BAP : 6-Bencilaminopurina

BCIP : 5-bromo-4-cloro-3-

indol fosfato

BSA : Albúmina de suero

bovino (Siglas del inglés)

CBS : CCA1 Binding Site

(Siglas del Inglés)

cm² : Centímetros cuadrados

cpm : Cuentas por minuto

c.s.p. : Cantidad Suficiente

Para

CTAB : Bromuro de

hexadecil-trimeti-amonio

DAPI : 4',6-Diamidino-2-fenil

indol diclorhidrato

DBMIB : 2,5-dibromo-3-metil-

6-isopropil-*p*-benzoquinona

DCMU : 3-(3,4-diclorofenil)-

1,1-dimetil urea

ddH₂O : Agua destilada

DEPC : Dietilpirocarbonato

DMSO : Dimetilsulfóxido

DNAsa : Deoxiribonucleasa de

moléculas de ADN

DO : Densidad óptica

DTT : Ditioneitol

E. coli : Escherichia coli

EE : Evening Element (Siglas del inglés)

EGTA : Ácido etilen glicol-bis(2-aminoetilen)-N,N,N,N'-tetraacético

EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay, siglas del inglés

EST : Expressed Sequence Tags (Siglas del inglés)

EtOH : Etanol

FAD :

FBPasa : Enzima fructosa-1,6-bifosfatasa

FTR : Enzima ferredoxina-tiorredoxina-reductasa

6-dGlc : 6 deoxy-glucosa

gr : Gramos

GUS : β-Glucuronidasa

GAPDH : Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFP : Green Protein Fluorescent (Siglas del inglés)

GK : Glucoquinasa (del inglés glucokinase)

GRX : Glutarredoxina

h : Hora

HEPES : Ácido 4-(2-hidroxyetil)piperacina-1-etanosulfónico

HXK : Hexoquinasa (del inglés hexokinase)

IgG : Inmunoglobulina G
INV : Invertasa
IPTG : Isopropil tiogalactósido
J : Julios
KAc : Acetato potásico
KDa : Kilodaltons
Kmc : Kanamicina
l : Litro
LB (medio)/LBA : Medio Laurie-Bertoni líquido/sólido
LRE : Light Responsive Element, del inglés
M : Molar
mA : Miliamperios
Mgr : Miligramos
min. : Minutos
ml : Mililitros
mm : Milímetros
MES : Ácido morfolino 2-N-etanosulfónico
MOPS : Ácido (3-Morfolino) propan-sulfónico
MS (medio)/ : Medio Murashige and Skoog
MTHF : Metilen-tetrahidrofolato
mV : Milivoltios
MW : Molecular weight, del inglés.
NADP⁺ : Nicotinamida adenina dinucleotido difosfato, forma oxidada
NADPH : Nicotinamida adenina dinucleotido difosfato, forma reducida
NADP-MDH : Enzima NADP malato deshidrogenasa
NBT : Nitroblue tetrazolium, del inglés
µg : Microgramos
µCi : Microcurios
nm : nanometros
ng : nanogramos
ORF : Open Reading Frame (Siglas del inglés)
Pa : Pascales
PAPS : 3'-fosfoadenosil-5'-fosfosulfato
PAR : Photosynthetically Active Radiation (Siglas del inglés)
Pb : Pares de bases
PCR : Reacción en cadena de la polimerasa (En inglés)
PDI : Protein-disulfuro oxidasa
PF : Peso fresco
PGI : Fosfoglucoisomerasa
PMSF : Fenil metil sulfonil fluoruro
Prx : Peroxirredoxina
PSI : Unidad de presión del sistema inglés equivalente a 144 lb_f/cm²
PVP : Polivinilpirrolidona
PVPP : Polivinilpolipirrolidona
RE : Retículo Endoplasmático
RNAsa : Ribonucleasa
rpm : Revoluciones por minuto
RRasa : Ribonucleótido reductasa
RT-PCR : Reacción retritranscripción seguida de una PCR
ROS : Reactive Oxygen Species (Siglas del inglés)
SDS : Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE : SDS- Poly-
Acrylamide Gel Electrophoresis
(Siglas del inglés)

seg : Segundos

SUS : Sacarosa sintasa

T6P : Trehalosa-6-fosfato

T^a : Temperatura

TCA : Ácido Tricarboxílico
(Siglas del inglés)

Tm : Temperature melting
(Siglas del inglés)

Trx /Trxs : Tiorredoxina
/Tiorredoxinas

U : Unidad (de actividad
enzimática)

UTR : Untranslated region
(Siglas del inglés)

UV : Ultravioleta

V : Voltios

X-GlcA : Ácido 5-Bromo-4-
cloro-3-indol-β-D-Glucurónico

Indice Tablas.

Tabla 1. pág. 70

Composición de las disoluciones que forman la solución nutritiva de guisante.

Tabla 2. pág. 70

Relación de cada una de las disoluciones en la solución de riego para guisante.

Tabla 3. pág. 71

Composición de la solución nutritiva para *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 4. pág. 79

Composición medios LB y MYA para *E. coli* y *A. tumefaciens*.

Tabla 5. pág. 82

Nombres y secuencias de los oligonucleótidos relacionados con PsTrx *m1*.

Tabla 6. pág. 83

Nombres y secuencias de los oligonucleótidos relacionados con PsTrx *f*. En negrita e itálica se representa la secuencias diana de las enzimas de restricción y los nucleótidos mutados para los experimentos de retardo.

Tabla 7. pág. 84

Nombre y secuencias de los oligonucleótidos generales. En negrita e itálica se representa la secuencias diana de las enzimas de restricción.

Tabla 8. pág. 103

Composición del tampón de extracción de proteínas.

Tabla 9. pág. 109

Composición tampón de coloración GUS.

Tabla 10. pág. 194

Relación hexosas/sacarosa en las hojas de guisante en cada punto del experimento según cada tratamiento.

Tabla 11. pág. 205

Relación hexosas/sacarosa en las hojas de guisante en los diferentes tratamientos

Fig. 1. pág 16

Árbol filogenético de las diferentes clases de TRXs presentes en *Arabidopsis thaliana* agrupadas en citosólicas, cloroplastídicas y mitocondriales. Los números de accesos de las proteínas son: EcTRX A: AP 004016, HsTRX: NP 003320, AtTRX CXXC: NP 172620 AtTRX *fl*: NP 186922, AtTRX *f2*: NP 197144, AtTRX *h1*: NP 190672, AtTRX *h2*: NP 198811, AtTRX *h3*: NP 199112, AtTRX *h4*: NP 173403, AtTRX *h5*: NP 175128, AtTRX *h7*: NP 176182, AtTRX *h8*: NP 177146, AtTRX *h9*: NP 001078124, AtTRX *m1*: NP 849585, AtTRX *m2*: NP 192261, AtTRX *m3*: NP 188155, AtTRX *m4*: NP 188155, AtTRX *o1*: NP 001078006, AtTRX *o2*: NP 564371, AtTRX *x*: NP 564566, AtTRX *y1*: NP 177802, AtTRX *y2*: NP 175021.

Fig.2. pág 19

Estructura terciaria de la TRX reducida de *E. Coli* (1XOB) (Jeng, M.F., y cols. 1994). Se han señalado los elementos secundarios típicos de este tipo de plegamiento y la situación del centro activo.

Fig.3. pág 21

Esquema del mecanismo de reacción de las TRXs. Los productos finales son la TRX en estado oxidado, mientras que la reducción de la proteína diana conduce hacia la modificación del centro activo o a un cambio conformacional.

Fig.4. pág 27

Esquema de los sistemas de reducción de TRXs en plantas.

Fig.5. pág 33

Longitudes de ondas percibidas por las diferentes familias de fotorreceptores descritos en plantas.

Fig. 6. pág 45

Esquema de los elementos que participan en la regulación del reloj circadiano. A) En la parte superior se encuentran los elementos que participan de la transmisión de la señal luminosa hacia la parte central, B) en la que se encuentra el reloj que va a originar C) la ritmicidad de los diferentes procesos de la célula. En naranja, se representan los procesos de represión a nivel transcripcional de la expresión de los diferentes genes implicados.

Fig. 7. pág 49

Modelo simplificado de los principales flujos de carbono en las células fotosintéticas y la formación de moléculas señal generadas por la fotosíntesis, el transporte y la hidrólisis de compuestos carbonados tanto durante la noche (parte izquierda del esquema) como durante el día (parte derecha del esquema). SPS: sacarosa fosfato sintasa, SPP: sacarosa fosfato fosfatasa, AGPasa: ADP-glucosa pirofosforilasa, UGPasa: UDP-glucosa pirofosforilasa, INV: invertasa, SUS: sacarosa sintasa.

Fig. 8. pág 50

Generación y transporte de azúcares señal en células “sumidero”. SUS: sacarosa sintasa, C-INV: invertasa citosólica, V-INV: invertasa vacuolar, PC-INV: invertasa de la pared celular.

Fig. 9. pág 59

Esquema de los elementos implicados en la señalización de azúcares en las células vegetales. Glc: glucosa, G6P: glucosa-6-fosfato, HXK: hexoquinasa, Sac: sacarosa, TPS: trehalosa fosfato sintasa, TPP: trehalosa fosfato fosfatasa, T6P: trehalosa-6-fosfato, Tre: trehalosa.

Fig. 10. pág 80

Mapa sitio clonaje del vector pGEM[®]-easy

Fig.11. pág 81

Mapa sitio clonaje del vector pBI101.

Fig.12. pág 82

Esquema del sitio de clonaje del vector de expresión pET28b

Fig.13. pág 83

Esquema de la situación de los oligonucleótidos para amplificar los diferentes fragmentos del promotor y la secuencia nucleotídica de PsTrx *m1*. Las flechas indican la disposición y orientación del oligonucleótido. En azul se muestra la región de la secuencia reguladora que ha sido utilizado en los estudios de unión con los factores de transcripción CCA1 y DOF7

Fig.14. pág 84

Esquema de la situación de los oligonucleótidos para amplificar los diferentes fragmentos del promotor y la secuencia nucleotídica de PsTrx *f*. Las flechas indican la disposición y orientación del oligonucleótido. En azul se muestra la región de la secuencia reguladora que ha sido utilizado en los estudios de unión con los factores de transcripción CCA1 y DOF7

Fig. 15. pág113

Esquema del ensayo enzimático en la medida de azúcares solubles.

Fig. 16. pág114

Esquema de la medición de azúcares.

Fig. 17. pág 125

Secuencia del adaptador. Las flechas indican las secuencias y la orientación de los oligonucleótidos AP-1 y AP-2.

Fig. 18. pág 126

PCR-Walking sobre los diferentes bancos genómicos. A) 1ª PCR para cada uno de los genes con las parejas de oligonucleótidos AP1/F1 (para PsTrx *f*) y AP1/M1 (para PsTrx *m1*). B) Segunda reacción de PCR a partir de una dilución 1:100 de la 1ª PCR con la pareja de oligonucleótidos AP2/F2 (para PsTrx *f*). C) Segunda reacción de PCR a partir de una dilución 1:100 de la 1ª PCR con la pareja de oligonucleótidos AP2/M2 (para PsTrx *m1*).

Fig. 19. pág 129

Secuencias reguladoras en 5' corriente arriba obtenidas por PCR-Walking para PsTrx *f* y PsTrx *m1*. En negrita se indica el codón que codifica para la metionina, el primer aminoácido de la proteína. Entre paréntesis está el número de acceso a la base de datos de *Gene bank* en el que se ha depositado cada una de las secuencias reguladoras.

Pág. 320

Fig. 20. pág 131

Esquema de las secuencias reguladoras aisladas por PCR-Walking de PsTrx *f* y PsTrx *m1*. Los cuadros señalan los principales elementos reguladores identificados en las bases de datos PLACE y PlantCARE. Las flechas indican la localización y orientación de los oligonucleótidos utilizados para obtener los diferentes fragmentos de los promotores, enteros y truncados. En la secuencia reguladora de PsTrx *m1* se indica con “+1” el sitio de inicio de la transcripción.

Fig. 21. pág 135

Árbol filogenético en el que se presentan las TRXs de *A. thaliana* y las tres TRXs cloroplastídicas descritas hasta la fecha en *P. sativum*. AtTRX*f1* (NP 186922), AtTRX*f2* (NP 197144), AtTRX*h1* (NP 190672), AtTRX*h2* (NP 198811), AtTRX*h3* (NP 199112), AtTRX*h4* (NP 173403), AtTRX*h5* (NP 175128), AtTRX*h7* (NP 176182), AtTRX*h8* (NP 177146), AtTRX*h9* (NP 001078124), AtTRX*m1* (NP 849585), AtTRX*m2* (NP 192261), AtTRX*m3* (NP 179159), AtTRX*m4* NP (188155), AtTRX*o1* (NP 001078006), AtTRX*o2* (NP 564371), AtTRX*x* (NP 564566), AtTRX*y1* (NP 177802), AtTRX*y2* NP (175021), AtTRXCXXC (NP 172620), PsTrx*f* (P29450), PsTRX*m1* (P48384), PsTRX*m2* (CAC69854). Subrayadas se indican las proteínas de guisante.

Fig. 22. pág 136

Electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % de los productos de PCR obtenidos para cada uno de los fragmentos de los promotores enteros y delecionados. f1 (444 pb), f2 (128 pb), m1 (1996 pb), m2 (1544 pb), m3 (546 pb), m4 (161 pb) y m5 (23 pb).

Fig. 23. Pág 137

Esquema de las construcciones de los diferentes fragmentos de las secuencias reguladoras fusionadas al gen GUS y sus tamaños: A) de PsTrx *f* y B) de PsTrx *m1*. Se indica la longitud de los fragmentos tomando como referencia el ATG del inicio de la traducción en el caso de PsTrx *f*. En el caso de la secuencia reguladora de PsTrx *m1* se ha tomado como referencia el sitio de inicio de la transcripción, marcado con un triángulo invertido negro.

Fig. 24. pág 140

PCR sobre 40 ngr ADN genómico de cada una de las líneas transgénicas utilizadas en los estudios de expresión de esta tesis.

Fig. 25. pág 141

Tinción histológica de GUS durante el desarrollo de las líneas transgénicas de *A. thaliana*. En la serie podemos ver el resultado de la coloración de las líneas f1::GUS en A) cotiledones, B) plántula desarrollada, C) raíces, D) y E) estomas y base de los tricomas, F) flores, G) vaina. Coloración GUS en las líneas de plantas transgénicas f2::GUS en H) plántula, I) roseta y J) flor. Coloración GUS en plantas transgénicas que contienen la construcción pBI101::GUS en K) roseta e L) inflorescencias.

Fig. 26. pág 144

Tinción histológica de GUS en el desarrollo de las líneas transgénicas de *A. thaliana* con la En la serie podemos ver el resultado de la coloración de las líneas m1::GUS en A) cotiledones, B) plántulas, C) raíces, D) flores y E) en vaina y semillas; m2::GUS y m3::GUS representados por las imágenes en F) cotiledones, G) plántulas, I) roseta y J) raíces. H) Coloración en flores para las construcciones m2::GUS, m3::GUS, m4::GUS. Tinción GUS en línea m4::GUS K) en plántula L)

y en raíces. Finalmente, coloración histoquímica en m5::GUS M) en raíces, N) plántula y O) flores. P) Coloración histoquímica de GUS en plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con el vector pBI101 vacío.

Fig. 27. pág 146

Cortes semifinos de hojas de plantas transformadas (A y B) con la construcción fl::GUS (C y D) y con la construcción m1::GUS mostrando la reacción frente a GUS. La barra de tamaño representa 50 μ m. Células del mesófilo (m), tejidos vascular (tv), estomas (e) y espacio intercelular (ei).

Fig. 28. pág 148

Esquema de la inserción de A) PsTrx *f* y B) PsTrx *m1* dentro del vector pGEM-T® easy en las construcciones F32 y M40 y la orientación de cada secuencia dentro del vector. Los cuadros señalan las endonucleasas utilizadas para la síntesis de cada sonda y las flechas indican la enzima ARN polimerasa utilizada en cada caso para obtener una sonda en sentido o en antisentido.

Fig. 29. pág 149

Geles de agarosa al 1 % de concentración. Se muestran las bandas que corresponden con las sondas marcadas con digoxigenina, bien en sentido (s) o en antisentido (a) tras el tratamiento con ADNasa. A) Para el caso de PsTrx *f* y B) para el caso de PsTrx *m1*.

Fig. 30a. pág 151

Resultados de la hibridación *in situ* utilizando como sonda el ARNm para PsTrx *f* en diferentes tejidos de guisante: A y B) corte transversal de hoja, D y E) en raíz, G

y H) en grano. El resto de las imágenes son el resultado de utilizar la sonda en sentido para PsTrx *f* en diferentes tejidos de guisante C) hojas, F) raíz, I) grano. Las barras indican 100 μm .

Fig. 30b. pág 152

Resultados de la hibridación *in situ* utilizando como sonda el ARNm para PsTrx *f* en diferentes tejidos de guisante: J, K, L y M) diferentes secciones de la flor en desarrollo, y resultado de la hibridación con la sonda Fs en N) embriones y O) sacos polínicos. Colenquima (co); floema (f); xilema, (x); envoltura de la semilla (es); radícula (r); ovario (ov); saco embrionario (se); polen (po). Las barras indican 100 μm .

Fig. 31. pág 154

Resultados hibridación *in situ* utilizando como sonda Ma para PsTrx *m1* en diferentes tejidos de guisante: A y B) hoja, D y E) raíz, G) inflorescencia, H) sacos polínicos, I) tejido vascular, K, L y M) saco embrionario. C) hoja, F) raíz y J) inflorescencia tras hibridar con el control negativo para PsTrx *m1* Ms. Las barras indican 100 μm . Anteras (an), colénquima (co), epidermis (e), mesófilo (me), ovario (ov), parénquima (p), polen (po), saco embrionario (se), tejido vascular (tv).

Fig. 32. pág 157

Alineamiento de las secuencias con ayuda del programa informático *CLUSTAL* de PsTrx *f* (X63537), PsTrx *m1* (X76262) y PsTrx *m2* (AJ316577). En **rojo** se resalta la pareja de oligonucleótidos utilizados en el caso de PsTrx *m1*, mientras que en **azul** se indican las secuencia de oligonucleótidos de PsTrx *f*. En minúscula, está la secuencia 3'UTR de cada secuencia.

Fig. 33. pág 159

Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la subunidad catalítica de Ftr de leguminosas: *Glicina max* (GB Y15076), *Medicago truncatula* (GB AC157489) y *Lotus japonicus* (GB BG662387). En **naranja** se resalta las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos utilizados para aislar la secuencia de FTR de guisante.

Fig. 34. pág 160

Alineamiento que compara la secuencia nucleotídica obtenida para Ftr de guisante frente a la secuencia de *Glicina max*.

Fig. 35. pág 160

Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de FTR de *Glicina max* y FTR de *Pisum sativum*.

Fig. 36. pág 161

Estudio de expresión por RT-PCR en diferentes tejidos de guisante: hojas (H), tallo (T), raíces (R), semilla (S), y flores (F) para los genes PsTrx *f*, PsTrx *ml*, PsFtr y PsAct.

Fig. 37. pág 163

Western blot mostrando las diferencias en la detección entre el suero policlonal y el suero preinmune: A) en el caso de la PsTRX *f* y B) en el caso de PsTRX *ml*. En la parte superior de cada dibujo se presenta la dilución utilizada del anticuerpo.

Fig. 38. pág 164

Especificidad de cada uno de los anticuerpos de cada TRXs cloroplastídica hacia el resto de las TRXs cloroplastídicas y citosólicas de guisante. La dilución utilizada de cada anticuerpo ha sido 1:3000 para cada anticuerpo.

Fig. 39. pág 165

Detección de las proteínas PsTRX *f* y PsTRX *m1* en diferentes tejidos de planta de guisante, semilla (S), flor (F), hojas (H), raíces (R) y vaina (V).

Fig. 40. pág 167

Esquema de la toma de muestras en el estudio de expresión por ciclo circadiano de las Trxs cloroplastídicas de guisante.

Fig. 41. pág 168

Se muestra el resultado de la purificación en gel de agarosa al 1,2 % de los fragmentos de PsTrx *f*, PsTrx *m1* y PsCab, tras amplificación por PCR, que han sido utilizados para la síntesis de las sondas en los experimentos de *Northern Blot*.

Fig. 42. pág 168

Resultado del estudio mediante *Northern Blot* de la expresión de los genes PsTrx *f*, PsTrx *m1* y PsCab a lo largo del experimento. Las bandas de 18s indican la cantidad cargada en el gel de cada muestra.

Fig. 43. pág 169

Esquema que representa la oscilación a lo largo del experimento del gen PsCab. En la parte superior se indica el resultado del *Northern Blot*, mientras que en la parte inferior se representa con colores las condiciones de iluminación

Fig. 44. pág 171

Figura que representa los niveles A) de transcritos de PsTrx *f* y B) de proteína de PsTRX *f* durante el experimento de ciclo circadiano. En la parte superior de cada figura se expone la señal obtenida para cada muestra en el experimento de *Northern Blot* y *Western Blot*, respectivamente. En la parte inferior de las figuras, se representa con color las condiciones de iluminación de cada periodo del experimento.

Fig. 45. pág 173

Figura que representa los niveles A) de transcritos y B) de proteínas de PsTrx *m1* durante el experimento de ciclo circadiano. En la parte superior de cada esquema se presenta la señal obtenida para cada muestra en el experimento de *Northern Blot* y *Western Blot*, respectivamente. En la parte inferior de los esquemas, se representa con color las condiciones de iluminación de cada punto del experimento.

Fig. 46. pág 175

Secuencia promotora aislada para PsTrx *f*. Las cajas en color azul resaltan los elementos reguladores relacionados con la luz según la base de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita y subrayado** se resalta el elemento “Evening Element” relacionado con el ciclo circadiano encontrado en el promotor de PsTrx *f*. Las

flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en la obtención del fragmento entero y truncado del promotor de PsTrx *f*.

Fig. 47. pág 176

Secuencia promotora aislada para PsTrx *m1*. Las cajas en color azul resaltan los elementos reguladores relacionados con la luz según la base de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita y subrayado** se resaltan los elementos “Evening Element” y CBS (en las posiciones -1131 pb, -809 pb, -710 pb y -473 pb) relacionados con el ciclo circadiano encontrado en el promotor de PsTrx *m1*. Las flechas indican la posición de los oligonucleótidos utilizados en la obtención del fragmento entero y truncado del promotor de PsTrx *m1*.

Fig. 48. pág 177

El esquema muestra, con flechas, las horas, a lo largo del experimento, en las que se han recolectado las muestras de las plantas transgénicas de *A. thaliana* que contienen las diferentes construcciones de las secuencias de los promotores, enteros o truncadas, fusionados al gen GUS.

Fig. 49. pág 178

Cuantificación de la reacción de RT-PCR sobre las diferentes líneas transgénicas en relación a la secuencia promotora de PsTrx *f*.

Pág. 328

Fig. 50. pág 179

Cuantificación de la reacción de RT-PCR sobre las diferentes líneas transgénicas en relación a la secuencia promotora de PsTrx *m1*.

Fig. 51. pág 181

Figura que muestra la secuencia del LumrF, enmarcada en rojo, sintetizada a partir de los oligonucleótidos LumFa/LumFs y escogida para llevar a cabo el análisis de unión *in vitro* con el factor CCA1. La región contiene un elemento “GT1Consensus”, una caja GATA y un elemento “Evening Element” marcado en **negrita** y subrayado.

Fig. 52. pág 182

Se muestra el resultado del experimento de unión utilizando el fragmento LumrF con el factor CCA1 A): Calle1: Sonda libre, Calles 2-5: con sonda no marcada radioactivamente, Calles 6-8: con competidores inespecífico poli dI/dC. B) Sonda mutada, Calle 1: Sonda LumrF sin CCA1, Calle 2: Sonda LumrF + CCA1, Calle 3: Sonda LumrF-mut sin CCA1, Calle 4: Sonda LumF-mut + CCA1.

Fig. 53. pág 183

Figura que muestra las sondas utilizadas en las reacciones de unión con CCA1. LumrF se ha obtenido a partir de la hibridación de los oligonucleótidos LumrFa/LumrFs, mientras que LumF-mut se ha obtenido con los oligonucleótidos LumGa/LumGs. Los cuadros en color azul representan los nucleótidos que forman parte de EE, mientras que en color rojo se ha señalado la mutación en EE relevante para la unión.

Fig. 54. pág 184

Figura que representa parte de la secuencia reguladora aislada para PsTrx *m1*. En ella se ha señalado los elementos “GATAbbox” y “GT1Consensus” regulados por la luz, además, según las bases de datos PLACE y PlantCARE. En **negrita** y subrayada está la secuencia de EE y CBS. En rojo se muestra la secuencia de ADN LumM, sintetizada con los oligonucleótidos Lum2Ma/Lum2Ms, para llevar a cabo la reacción, *in vitro*, de unión al factor CCA1.

Fig. 55. pág 185

Se muestra el resultado del experimento de unión A) utilizando el fragmento Lum2M con el factor CCA1; Calle 1: Sonda libre, Calles 2-4: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda no marcada radioactivamente. B) Sonda mutada, Calle 1: Sonda Lum2MC sin CCA1, Calle 2: Sonda Lum2MC + CCA1.

Fig. 56. pág 186

Figura que muestra las sondas utilizadas en las reacciones de unión con CCA1. Lum2M se ha obtenido a partir de la hibridación de los oligonucleótidos Lum2Ma/Lum2Ms, mientras que Lum2MC se ha obtenido con los oligonucleótidos Lum2MCa/Lum2MCs. Los cuadros en color azul representan los nucleótidos que forman parte de EE y CBS, mientras que en color rojo se ha señalado la mutación en EE relevante para la unión.

Fig. 57. pág 188

Gráfica que muestra el resultado de las mediciones de la actividad fotosintética a 1000 PAR a lo largo del experimento tratando las plantas de guisante con diferentes soluciones de azúcares a una concentración 0,1 M.

Fig. 58. pág 190

Esquema en el que se muestra el contenido de glucosa en las hojas a lo largo del experimento con cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

Fig. 59. pág 191

Esquema en el que se muestra el contenido de fructosa en las hojas a lo largo del experimento con cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

Fig. 60. pág 193

Esquema en el que se muestra el contenido de sacarosa en las hojas a lo largo del experimento en cada uno de los tratamientos de azúcares. La barra superior indica la fase de iluminación y de oscuridad del fotoperiodo.

Fig. 61. pág 197

Nivel de expresión de ARNm de PsTrx *f* a lo largo del experimento bajo los diferentes tratamientos de azúcares.

Fig. 62. pág 198

Nivel de expresión de ARNm de PsTrx *ml* a lo largo del experimento bajo los diferentes tratamientos de azúcares.

Fig. 63. pág 201

Cuantificación de clorofila a y clorofila b en las hojas de guisante en cada uno de los tratamientos.

Fig 64. pág 202

Niveles de glucosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT.

Fig. 65. pág 203

Niveles de fructosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT.

Fig. 66. pág 204

Niveles de sacarosa en las hojas tratadas con las soluciones de azúcares y DTT

Fig. 67. pág 206

Niveles de expresión de ARNm de PsTrx *f* con los diferentes tratamientos de azúcares.

Pág. 332

Fig. 68. pág 207

Niveles de expresión de PsTrx *mI* en los diferentes tratamientos de azúcares.

Fig. 69. pág 207

Contenido de proteína de PsTRX *f* determinado mediante *western blot* en plántulas de guisante tratadas con las disoluciones de azúcar y DTT.

Fig. 70. pág 209

Contenido de proteína de PsTRX *mI* determinado mediante *western blot* en plántulas de guisante en cada uno de las disoluciones de azúcar y DTT.

Fig. 71. pág 212

Figura que muestra la secuencia de DOF7-(His)₆-tag. En mayúscula se indica la secuencia de aminoácidos de DOF7. En **rojo** se muestran los aminoácidos del dominio Z-DOF implicados en la unión al ADN (Shimofurutani, N., y cols. 1998). En *cursiva* y subrayado se muestra la extensión resultante de la fusión de DOF7 en el vector pET28b. En **azul** se resalta la cola de histidina utilizada en la purificación de la proteína recombinante y en la detección mediante *western blot*.

Fig. 72. pág 213

Gel de acrilamida en los que se muestra la purificación del fragmento DOF7 tras la expresión en *E. coli*. En la parte superior, la tinción con *Coomassie* de los extractos de cada una de las etapas de la purificación. En la parte inferior se muestra el resultado de la detección por *western blot* utilizando un anticuerpo frente His-tag o

cola de histidina. Mw: Peso Molecular, Ppdo: Precipitado, Sol: Soluble, Lav: Lavado, E1-E5: Eluciones 1 a 5.

Fig. 73. pág 215

Fragmentos de ADN LumrF y Lum2FD de la secuencia reguladora de PsTrx *f* utilizadas como sonda en la reacción de unión con el factor DOF7. En verde se resalta el sitio de reconocimiento de las proteínas DOF.

Fig. 74. pág 213

Reacción de unión entre el fragmento LumrF con el factor DOF7: Calle 1: Sonda libre, Calles 2-5: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda específica no marcada radioactivamente. Sonda mutada, Calle 8: Sonda Lum2FD libre, Calle 9: Sonda Lum2FD + DOF7.

Fig. 75. pág 215

Fragmentos de ADN Lum2M y Lum2MD de la secuencia reguladora de PsTrx *ml* utilizadas como sonda en la reacción de unión con el factor DOF7. En verde se resalta el sitio de reconocimiento de las proteínas DOF.

Fig. 76. pág 217

Reacción de unión entre el fragmento Lum2M con el factor DOF7: Calle 1: Sonda libre, Calles 2-5: con competidor inespecífico poli dI/dC, Calles 6-8: con sonda específica no marcada radioactivamente. Sonda mutada, Calle 8: Sonda Lum2MD libre, Calle 9: Sonda Lum2MD + DOF7

