



*Universidad de Buenos Aires,
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica*

*Estudio funcional de las Tiorredoxinas m y f
cloroplásticas en Arabidopsis thaliana*

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE
BUENOS AIRES EN EL AREA DE QUIMICA BIOLOGICA**

AUTOR: Lic. FABIANA GISELA STOLOWICZ

DIRECTOR: Dr. RICARDO A. WOLOSIUK

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dr. ISRAEL ALGRANATI

LUGAR DE TRABAJO: FUNDACION INSTITUTO LELOIR

Buenos Aires, 2007

RESUMEN

Las tiorredoxinas (Trx) son proteínas pequeñas (ca. 12 KDa) y ubicuas que en los cloroplastos de las plantas exhiben dos isoformas, Trx-m y Trx-f, implicadas en la regulación lumínica de las enzimas. Aunque la mayoría de los trabajos realizados analizaron bioquímicamente las Trxs cloroplásticas, las técnicas de proteómica y genómica asociaron recientemente estas proteínas con una variedad de procesos novedosos. Sobre estas bases, estudiamos *in vivo* la vinculación de las Trx-m y Trx-f con las funciones biológicas.

Para ello, construimos 4 y 6 líneas transgénicas que sobre-expresaban la Trx-m y la Trx-f de colza (*Brassica napus*), respectivamente, en *Arabidopsis*. Aunque los niveles de proteínas recombinantes en estas líneas independientes y homocigotas fueron de 2 a 10 veces superiores a la variedad nativa, no observamos características fenotípicas distintivas, ni variaciones significativas en la biomasa y el tenor de clorofilas. Sin embargo, cuanto mayor el nivel de Trxs, mayor era el contenido de almidón y azúcares solubles.

Por otra parte, las respuestas a las condiciones ambientales adversas variaron con los perturbantes utilizados. Mayores niveles de Trx-m y Trx-f incrementaron la respuesta antioxidante cuando el estrés oxidativo era generado por H₂O₂ mientras que, ante el metil viológeno, la tolerancia fue (i) persistente en todas las líneas sobre-expresantes de Trx-m y (ii) ambigua para las contrapartes de Trx-f. Las plantas transgénicas exhibieron un comportamiento similar a la variedad nativa frente a otros inductores del estrés oxidativo (e.g. Rosa de Bengala).

Los resultados obtenidos muestran *in vivo* que el incremento de las Trxs cloroplásticas capacitó a las plantas para una mayor asimilación fotosintética de CO₂ y tolerancia a los perturbantes asociados al estrés oxidativo.

Palabras claves: Tiorredoxina-m, Tiorredoxina-f, cloroplastos, ciclo Benson Calvin, estrés oxidativo, estrés salino, metales pesados,

SUMMARY

Thioredoxins (Trx) are small (ca. 12 KDa) and ubiquitous proteins that in higher plant chloroplasts exhibit two isoforms, Trx-m y Trx-f, implied in the light-dependent regulation of enzymes. Although most of previous studies analyzed biochemically chloroplast Trxs, proteomic and genomic techniques associated recently these proteins with a variety of novel processes. On this basis, we studied *in vivo* the linkage of Trx-m and Trx-f with biological functions.

To this end, we constructed 4 and 6 transgenic lines that overexpressed rapeseed (*Brassica napus*) Trx-m and Trx-f, respectively, in *Arabidopsis*. Although the levels of recombinant proteins in these independent and homozygous lines were 2 to 10 higher than the native variety, neither distinctive phenotypic features nor significant changes in biomass and chlorophylls were observed. However, the higher the levels of Trxs the higher the content of starch and soluble sugars.

On the other hand, the responses to adverse environments changed with the perturbants. Higher levels of Trx-m and Trx-f enhanced the antioxidant response when the oxidative stress originated from H₂O₂ while, confronted with methyl viologen, tolerance was (i) persistent in all lines that overexpressed Trx-m and (ii) ambiguous for Trx-f counterparts. The response of transgenic plants challenged with other elicitors of oxidative stress (e.g. Rose Bengal) was similar to the native variety.

Our results showed *in vivo* that the enhancement of chloroplast Trxs levels endowed plants for higher both photosynthetic CO₂ assimilation and tolerance to perturbants associated to oxidative stress.

Keywords: Thioredoxin-m, Thioredoxin-f, chloroplasts, Benson Calvin cycle, oxidative stress, saline stress, heavy metals.

Agradecimientos

Quisiera agradecer al Dr. Wolosiuk, por la posibilidad de trabajar en su laboratorio, con confianza y libertad, animándonos a experimentar nuevos caminos. Por su apoyo incondicional y estímulo para completar mi tesis de Doctorado.

A mis compañeros amigos del 206, del ayer y del hoy, de quienes aprendí los primeros pasos en la investigación y con quienes compartimos momentos muy lindos durante éstos tantos años.

A mis compañeros amigos de los pasillos, con quienes compartimos tantas vivencias y de quienes recibí siempre la mejor colaboración.

A Tamy, por acompañarme con su apoyo técnico, su gran predisposición y excelente actitud para realizar los experimentos, generando un espacio ameno de trabajo.

A Ale Huber, Edith y Jime (allá lejos), por su buena predisposición y soporte en el cuidado de las plantas.

Al Dr. Staneloni por facilitarnos los plásmidos PBI121 y a Pablo Cerdán por enseñarme el ABC de la transformación de plantas mediante *Agrobacterium*.

A Carlos Bartoli y Juan Guiamet, por su generosa y desinteresada colaboración en las determinaciones de la fluorescencia de las hojas.

A Susana Perelmann por su buena predisposición y colaboración en la resolución de los análisis estadísticos.

Al Dr. Algranati, por aceptar y ejercer la tarea de ser mi consejero de estudio, acompañandome durante mi tesis de doctorado y estimulando su finalización.

A cada una de las personas de Campomar, de recepción, administración, del droguero, de HPLC, de mantenimiento y limpieza, por hacer que este trabajo sea más grato cada día.

A Caro carrillo, Marie, Silvia, Junior, Pau y Santiago, que fueron una ayuda enorme y así hicieron posible que terminara la escritura de la Tesis. También a Tincho y a Daniel por el estímulo constante.

A mis compañeros de Bio, por la paciencia, el estímulo y la comprensión.

A mis amigos de siempre, y los que fui cosechando en los últimos años, por todo.

A mi familia.

Esta Tesis de Doctorado fue posible gracias al apoyo financiero de El Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Fundación Instituto Leloir y la Universidad de Buenos Aires.

Índice

Resumen.....	I
Summary	II
Agradecimientos.....	III
Índice.....	IV
Abreviaturas.....	VI
INTRODUCCIÓN	
I-Proteínas Disulfuro Oxido-reductasas (PDOR).....	2
II-LAS TIORREDOXINAS.....	3
• II.I-La estructura de las Trxs.....	3
• II.II-La función fisiológica de las Trxs	5
II.II.I-Las Trx en organismos no fotosintéticos.....	5
II.II.I.i-Isoformas de las Trxs	5
II.II.I.ii-Sistema de Reducción NADPH Trx reductasa.....	6
II.II.I.iii-Funciones de las Trxs citoplasmáticas.....	6
II.II.I.iv--Funciones de las Trxs mitocondriales.....	10
II.II.II-Las Trx en organismos fotosintéticos oxigénicos.....	10
II.II.II.i-Isoformas de las Trxs.....	11
II.II.II.ii-Evolución de las Trxs.....	12
II.II.II.iii-Localización subcelular de las Trxs.....	13
II.II.II.iv-Sistema de Reducción de las Trxs.....	14
II.II.II.v-Sistema extra cloroplástico.....	14
II.II.II.vi-Sistema cloroplástico.....	17
III Arabidopsis thaliana.....	22
OBJETIVOS.....	24
RESULTADOS Y DISCUSION	
CAPITULO I PREPARACION DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS	
1-DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES.....	27
2-PREPARACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENETICAS.....	29
3-Transformación de las plantas3-Transformación de las plantas.....	32
• 3A-Transformación de explantos de raíz y regeneración somática.....	32
• 3B-Transformación por inmersión Floral.....	34
4-Análisis y caracterización de las plantas.....	36
• 4A-Identificación del ADNc de la Trx mediante PCR.....	36
• 4B-Determinación de la abundancia de proteína Trx mediante Western blot.....	37
Plantas que sobre-expresan Trx-m (OE-6 pTrx-m).....	38
Plantas que sobre-expresan Trx-f (OE-1 pTrx-f).....	40
Plantas antisentido para la Trx-f y Trx-m.....	42
• 4C-Análisis de la segregación del gen nptII en las líneas transgénicas.....	43
5-CONCLUSIONES-CAPITULO I.....	44
CAPITULO II ANALISIS DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS	
Parte I-Plantas que sobre-expresan Trx-m	
I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas.....	48
• I.1-Germinación de las semillas.....	48

• I.2-Biomasa vegetal.....	48
• I.3-Contenido de almidón y azúcares solubles.....	50
• I.4-Contenido de clorofila.....	51
• I.5-Actividad fotosintética.....	52
II-Estudio de las plantas transgénicas OE-6 Trx-m en condiciones de estrés.....	53
• II.1-Estrés oxidativo.....	53
Metil viológeno.....	53
Hidroperóxido de Cumeno.....	54
Rosa de Bengala.....	57
Dietilmaleato y Diamida.....	59
Metales Pesados.....	60
Estrés salino.....	62
Estrés lumínico.....	63
Parte II-Plantas que sobre-expresan Trx-f	
I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas.....	67
• I.1-Germinación de las semillas.....	67
• I.2-Biomasa vegetal.....	67
• I.3-Contenido de almidón y azúcares solubles.....	69
• I.4-Contenido de clorofila.....	69
II-Estudio de las plantas transgénicas OE-1 Trx-f en condiciones de estrés.....	70
• II.1-Estrés oxidativo.....	70
Metil viológeno.....	70
Hidroperóxido de Cumeno.....	72
Rosa de Bengala.....	73
Dietilmaleato	75
Metales Pesados.....	75
Parte III-Plantas antisentido para la Trx	
I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas.....	78
• I.1-Germinación de las semillas.....	78
• I.2-Morfología de las plantas.....	78
• I.3-Biomasa vegetal.....	79
• I.4-Contenido de almidón y azúcares solubles.....	79
• I.5-Contenido de clorofila.....	80
• I.6 Actividad enzimática de enzimas de Benson Calvin.....	81
• I.7 Actividad Trx-f.....	81
CONCLUSIONES.....	85
MATERIALES Y METODOS	
I-PREPARACION DE PLANTAS TRANSGENICAS.....	90
Análisis y caracterización de las plantas.....	97
II-ANALISIS DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS.....	99
Apéndice	
I Análisis de la expresión de las Trx-s cloroplásticas de Arabidopsis.....	104
II Medios Utilizados.....	105
III Algunos aspectos de la biología de Agrobacterium tumefaciens.....	106
BIBLIOGRAFIA.....	109

Abreviaturas

S-H:	tiol
S-SR:	disulfuro
S-OH:	ácido sulfénico
S-NO:	S-Nitrosotiol
PDOR:	Protein Disulfuro óxido reductasa
Trx:	Tiorredoxina
Grx:	Glutarredoxinas
PDI:	Proteína Disulfuro Isomerasa
PEP:	ciclo de pentosas fosfato
ADN	ácido desoxirribonucleico
NTR	NADP Tiorredoxina reductasa
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
ESTs	Expressed Sequence Tags
cFBPasa	fructosa-1,6-bisfosfatasa de cloroplastos
NADP-MDH	NADP malato deshidrogenasa
FTR	Ferredoxina tiorredoxina reductasa
SBPasa	Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
NR	Nitrito reductasa
GS	Glutamina sintasa
Fd-GOGAT	Ferredoxina: Glutamato sintetasa
ACCasa	Acetil-coa carboxilasa
AGPasa	ADP-Glucosa pirofosforilasa
APS	5`-adenililsulfato reductasa
RB60	PDI implicada en regulación por luz del ARNm de pbsA
e.g	exempli gratia, latín
ca.	circa, latín
ADN-T	ADN de transferencia
ABA	ácido abscísico

INTRODUCCION

I-Proteínas Disulfuro Oxido-reductasas (PDOR)

Las proteínas presentan aminoácidos modificados covalentemente por pequeños grupos químicos, que generalmente afectan la estabilidad, localización intracelular, función catalítica y la habilidad para interaccionar con otras proteínas. Mientras la fosforilación de residuos serina, treonina o histidina, la oxidación de metionina, la metilación de lisina y la hidroxilación de prolina no tienen la flexibilidad para adoptar más de dos estados, la transformación de los grupos sulfhidrilos en las cisteínas es una notable excepción.

Los grupos sulfhidrilos en las cisteínas son capaces de adquirir diferentes estados redox desde el tiol (-S-H) con un número de oxidación del sulfuro de -2, a formas más oxidadas como el disulfuro (-S-SR), el ácido sulfénico (-S-OH) y el S-nitrosothiol (-S-NO) que presentan un número de oxidación de 0, 0 y -1, respectivamente. De esta manera diferentes modificaciones post-traduccionales en un único residuo cisteína llevan a la proteína a múltiples regulaciones [5].

En este contexto la reacción redox más analizada de átomos de azufre en las proteínas es la formación (oxidación), escisión (reducción) y reordenamiento (isomerización) de las uniones disulfuro vía el intercambio tiol/disulfuro catalizado por un grupo de enzimas especializado denominado proteínas disulfuro óxido reductasas (PDOR). Dentro de este grupo, se encuentran, entre otras, las Tiorredoxinas (Trx), las Glutarredoxinas (Grx) y Proteínas disulfuro isomerasas (PDI). Aunque estas enzimas difieren en la secuencia aminoacídica, comparten dos características distintivas. Primero las cisteínas implicadas en el intercambio tiol-disulfuro con las proteínas sustrato están separadas por dos aminoácidos, C-Xaa-Xaa-C, que definen a su vez una familia particular (e.g -C-G-P-C caracteriza a las Tiorredoxinas). Segundo la estructura terciaria presenta una disposición particular que recibe el nombre de plegamiento o motivo Tiorredoxina. [6].

II-LAS TIORREDOXINAS

Las Trxs son proteínas pequeñas (ca 12 KDa) acídicas y termoestables, universalmente distribuidas en los seres vivos. La proteína madura (ca 110 residuos de aminoácido) contiene una secuencia muy conservada en el sitio activo, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-[7], cuyas cisteínas forman un puente disulfuro en el estado oxidado o permanecen como ditioles en la forma reducida [4]. Inicialmente fueron descritas en *E. coli* como dadores de hidrógenos para la reducción de ribonucleótidos, y posteriormente se encontró que suministran el poder reductor para una gran variedad de reacciones celulares. En células fotosintéticas oxigénicas reducen, y así regulan la función de importantes proteínas implicadas en la asimilación del carbono.

Dependiendo de la localización intracelular, las Trxs son reducidas por diferentes sistemas dadores de electrones. El poder reductor para la reducción de las Trxs de tejido no-fotosintético, de mitocondrias, o del citoplasma de las células fotosintéticas proviene del NADPH a través del sistema NADP/Trx. En cambio, las Trxs de cloroplastos de células vegetales, algas y procariones fotosintéticos oxigénicos son reducidas a través del sistema Ferredoxina/Trx con electrones provenientes de la cadena transportadora de electrones fotosintéticos.

II.I-La estructura de las Trxs

II.I.I-Estructura primaria, secundaria y terciaria

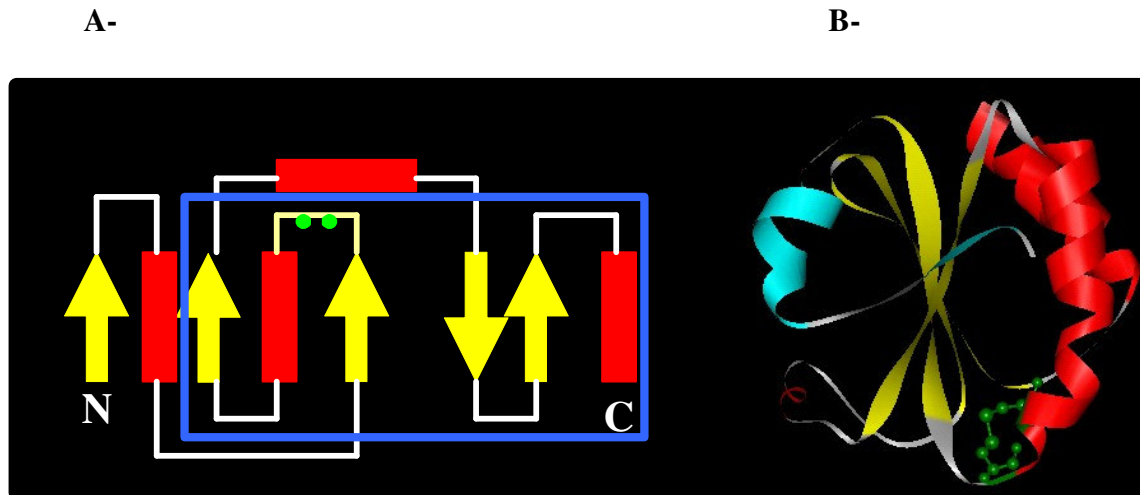


Figura 1. Estructura terciaria de la Trx.

A-Molécula de Trx, B-Estructura tridimensional de la Trx. Las flechas o cintas amarillas representan láminas β , y los rectángulos rojos o tirabuzones α hélices. El cuadrante azul limita el plegamiento Trx. La posición de las cisteínas funcionales (32 y 35) está remarcada en verde.

El plegamiento Trx presenta una disposición tridimensional, organizada en dos dominios estructurales conectados por una α hélice (Figura 1A): el dominio N-terminal contiene dos hojas β paralelas ($\beta\alpha\beta$) y el dominio C-terminal ($\beta\beta\alpha$) presenta dos hojas β antiparalelas. La disposición espacial de las estructuras secundarias origina un núcleo hidrofóbico de cuatro láminas β rodeado por tres α hélices. Las α -hélices de los motivos N y C-terminal se ubican a un lado y al otro de las hojas β , en tanto la α -hélice que conecta los dos motivos está orientada perpendicularmente a las

primeras (Figura 1B). Esta disposición característica, denominada plegamiento o motivo Trx por ser la Trx la primera estructura descrita, constituye la estructura terciaria de las proteínas que catalizan el intercambio tiol/disulfuro y conduce a su agrupamiento en la llamada familia Trx [6, 8]. Sobre el módulo básico del plegamiento Trx, la molécula de Trx agrega en la región N-terminal una hoja β , seguida de una α -hélice (Figura 1A).

La mayoría de los residuos de las Trxs forman parte de elementos de estructura secundaria que integran un único dominio compacto y generan una estructura muy estable cuya temperatura de fusión excede los 80 °C [8].

La longitud de la cadena polipeptídica es aproximadamente la misma para las Trxs de las distintas especies. Aunque el porcentaje de identidad entre las secuencias aminoacídicas y la de *E. coli* varía desde 26 % hasta 67 %, las estructuras tridimensionales conservan el plegamiento Trx [9]. Muchos de los residuos importantes para mantener la estructura terciaria y la función están conservados. En general se mantienen los mismos núcleos hidrofóbicos y las sustituciones de aminoácidos en éstos son conservativas. La estructura tridimensional de la Trx oxidada de *E. coli* [10-13], la Trx humana, [14-17] y las Trx de *Chlamydomonas reinhardtii* [18], *Bacillus acidocaldarius* [19], *Anabaena* sp. y plantas superiores [20] fue establecida por cristalografía de rayos X y por NMR. Las Trxs, tanto en su estado oxidado como reducido, exhiben gran similitud en las estructuras secundarias y terciarias, observándose pequeñas diferencias en la estructura cercana al sitio activo. Esta característica es consistente con la cinética en las reacciones de intercambio tiol-disulfuro, porque diferencias conformacionales significativas entre las dos formas modifican la velocidad de la reacción [13].

II.I.II-El sitio activo de las Trxs

El sitio activo en la Trx de *E. coli* abarca la secuencia entre los residuos cisteína 32 y 35 (Cys32-Gly-Pro-Cys35), que está localizada en el extremo amino de la hélice α -2 (Figura 1A). La Cys32 expuesta al solvente posee un pKa menor que la Cys35, reclusa en el interior de la proteína. Esta disposición estructural condujo a postular el siguiente mecanismo para la actividad óxido-reductasa de las Trxs (Figura 2):

El primer evento lo constituye la interacción proteína-proteína entre la Trx-SH₂ reducida y la proteína sustrato oxidada. En este contexto proteico ocurre el segundo paso que implica el ataque nucleofílico de la Cys32 sobre el disulfuro en la proteína blanco para formar un heterodisulfuro transitorio entre ambas moléculas. La tercera reacción es el ataque del anión tiolato en la Cys35 sobre el disulfuro mixto generando un ditiol en la proteína sustrato y un disulfuro en la Trx. Finalmente la cuarta etapa comprende la separación de las proteínas transformadas.

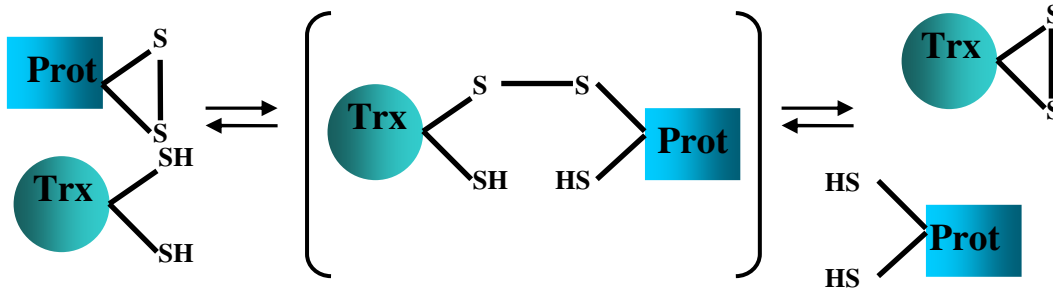


Figura 2. Intercambio tiol/disulfuro entre la Trx y una proteína sustrato

La Trx reducida (Trx-SH₂) interacciona con una proteína sustrato oxidada. La cys nucleofílica de la Trx-SH₂ ataca al disulfuro de la proteína blanco conformando un heterodisulfuro transitorio. Luego el anión tiolato de la segunda cys de la Trx reacciona con el disulfuro mixto generando un ditiol en la proteína sustrato y un disulfuro en la Trx, que finalmente se separan.

II.II-La función fisiológica de las Trxs

Las Trxs intervienen en diferentes eventos celulares utilizando dos posibles mecanismos: el intercambio tiol/disulfuro (Figura 2) y la interacción no-covalente con otras proteínas. Básicamente, las propiedades biológicas residen en su habilidad para transferir equivalentes de reducción a puentes disulfuro en las proteínas sustrato. La eficiencia de este proceso, descubierto hace 40 años, le ha ido atribuyendo a la Trx innumerables funciones. Sin embargo los estudios realizados fueron en su mayoría bioquímicos y moleculares, y poco se sabe de las funciones de esta proteína *in vivo*, principalmente en organismos pluricelulares.

Teniendo en cuenta este defecto en la diversidad de función revisaremos la variedad de isoformas de Trxs presentes en los diversos organismos, el sistema de reducción que permite completar el ciclo redox y el tipo de funciones a las que fueron vinculadas las Trxs. Para facilitar el análisis nos concentraremos primero en los organismos no-fotosintéticos y luego en los organismos fotosintéticos, principalmente plantas superiores.

II.II.I-Las Trx en organismos no fotosintéticos

II.II.I.i-Isoformas de las Trxs

El número de isoformas de las Trxs es bajo en bacterias (2), levaduras (3), y en células animales (2) (Tabla 1). Los genes *trxA* y *trxC* de *E. coli* codifican para la Trx-1 y la Trx-2 respectivamente [21]. En cambio el genoma de levaduras codifica para dos Trxs citoplasmáticas (Trx-1 y Trx-2) que no son indispensables para su crecimiento en condiciones normales, y una Trx mitocondrial (Trx-3). En organismos pluricelulares como los mamíferos existe tan sólo una isoforma de Trx en citoplasma y una mitocondrial, las cuales han sido implicadas en varias funciones celulares, no sólo en el citoplasma y en las mitocondrias, sino también indirectamente en el núcleo y fuera de la célula. Como observaremos luego, esto es contrario a lo que ocurre en plantas superiores, donde la diversidad de isoformas de las Trxs es enorme (19).

Tabla 1. Isoformas de las Trxs en los diversos organismos

Localización	Bacterias	Levaduras	Mamíferos	Plantas superiores
Citoplasma	Trx-1 (1gen) [22] Trx-2 (1gen) [21]	Trx-1 (1gen) Trx-2 (1gen) [23]	Trx (1gen)	Trx-h (8 genes) [24]
Mitocondria		Trx-3 (1gen) [25]	Trx (1gen) [26]	Trx-o (2 genes) [27]
Cloroplasto				Trx-m (4 genes) [24] Trx-f (2 genes) Trx-x (1 gen) [28] Trx-y (2 genes) [29]

II.II.I.ii-Sistema de Reducción NADPH Trx reductasa

Las isoformas de Trxs de organismos heterotróficos descritas previamente son reducidas, vía el sistema NADP-Trx reductasa, por el NADPH generado en procesos catabólicos como la degradación de hidratos de carbono. La NADP-Trx reductasa (NTR) es una flavoproteína homodimérica presente en citosol y en mitocondrias [27, 30] que está codificada en el ADN nuclear. Por este motivo el precursor de la enzima mitocondrial contiene un péptido tránsito que la direcciona a la organela, y es escindido una vez producida la incorporación a la matriz mitocondrial. La subunidad (35 KDa) presenta un dominio que contiene el grupo prostético FAD y otro de unión al NADPH. Una secuencia altamente conservada –CACV– [31] contiene el puente disulfuro de NTR que enfrenta al anillo de isoalloxazina del FAD. Esta particular disposición de la estructura terciaria facilita la cesión del poder reductor desde el NADPH hacia el FAD, y de éste a su vez hacia el puente disulfuro. Finalmente los tioles de la enzima reducen el puente disulfuro de la Trx (Figura 3).

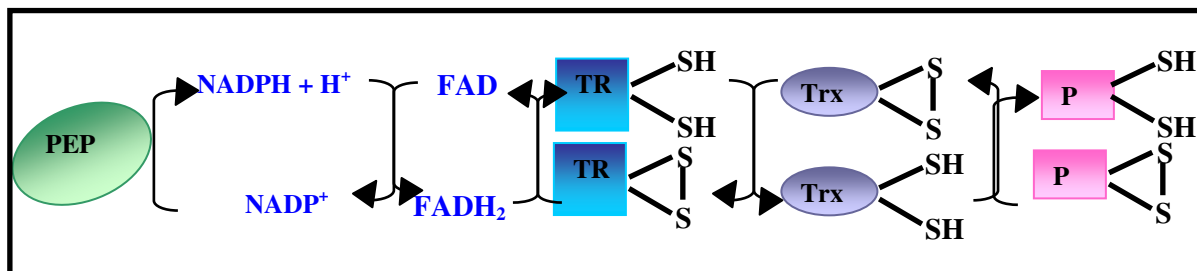


Figura 3. Sistema de reducción de las Trxs heterotróficas.

En el ciclo de las pentosas fosfato (PEP) se genera NADPH que reduce el puente disulfuro de la enzima Tiorredoxina reductasa (TR o NTR) gracias a la presencia y localización del grupo FAD. Luego los tioles de esta enzima reducen a la Trx y ésta luego a la proteína sustrato (P).

II.II.I.iii-Funciones de las Trxs citoplasmáticas

En bacterias, levaduras y células animales, las Trxs participan en numerosas funciones cuya complejidad aumenta conforme avanza el nivel evolutivo de dichos organismos. Para facilitar el análisis agrupamos las funciones en dos categorías: A-Mantenimiento de la homeóstasis celular y B-Rol en condiciones de estrés biótico y abiótico.

A-Mantenimiento de la homeóstasis celular:

Bajo condiciones normales, la Trx participa directa o indirectamente como PDOR en variados procesos celulares vitales:

Reducción, formación e isomerización de puentes disulfuro

La Trx tiene una función general como óxido-reductasa de disulfuros en células procariontes y eucariontes [32]. Reduce eficientemente *in vitro* los puentes disulfuro de moléculas de bajo (e.g DTNB) y alto peso molecular (e.g. insulina.[33], coriogonadotropina humana [34], fibrinógeno [35], y factores de coagulación sanguínea [36, 37]). Cumple estas mismas funciones *in vivo* en varios procesos bioquímicos. Por ejemplo, en *E. coli* la Trx citoplasmática reduce a través de la proteína DsbD, a una proteína periplasmática DsbC, encargada de la isomerización de puentes disulfuro mal plegados [38].

La Trx juega un papel fundamental en la formación de los puentes disulfuros en las proteínas intracelulares y con ello constituye un paso esencial en la vía de plegamiento (e.g inhibidor de la Tripsina de páncreas bovino) o simplemente refuerza la estabilidad de la proteína (e.g β -lactamasa) [39].

Síntesis de ADN

Se ha comprobado en los microorganismos y en células animales, que las Trxs y las Grxs participan en la síntesis de los dNTPs, precursores necesarios en la síntesis de ADN.[22] [40]. Ambas proteínas proveen los hidrógenos para que la enzima ribonucleótido reductasa catalice la reducción de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos [41]. Además, su acción abarca otros eventos celulares por cuanto la delección de las Trxs citoplasmáticas de levaduras (*trx1/trx2*) no afecta el nivel de dNTPs endógeno pero altera su ciclo celular generando una fase S prolongada con un acortamiento del intervalo G1. Estos efectos son revertidos por una Trx con su sitio activo intacto y no por una mutante de cisteínas [42, 43].

Metabolismo del azufre

Los microorganismos y células animales requieren la reducción del sulfato para su utilización en la síntesis de compuestos orgánicos azufrados, e.g. la cisteína y la metionina. En este proceso, la PAPS reductasa cataliza la reducción de 3'fosfoadenosina 5'fosfosulfato (PAPS) a sulfito utilizando la Trx reducida. Esta función es congruente con la incapacidad de las doble mutantes de levaduras *trx1/trx2* para crecer utilizando sulfato como única fuente de azufre [44] [42].

Reducción y mantenimiento de aminoácidos esenciales

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) pueden oxidar los residuos de cisteína o metionina formando puentes disulfuro o metionina sulfóxido, respectivamente, que producen la pérdida de funciones vitales. Los microorganismos son capaces de reducir a ambos grupos directa o indirectamente a través del sistema Trx. La Trx-1 cede hidrógenos a la enzima Metionina sulfóxido reductasa para restaurar la metionina en las proteínas [42, 45, 46]. En otros procariontes (eubacteria *acidaminofilum*) la Trx es un componente del sistema de reducción de glicina y arsenato [47-51].

Formación de vacuolas en la división celular

Las células de levadura presentan de 1-5 vacuolas durante el crecimiento exponencial. Las vesículas que protruyen de ellas conforman la nueva organela en las células hijas. La reducción de un residuo cisteína en una proteína de la superficie de la membrana vacuolar constituye una etapa esencial en este proceso por cuanto la delección de ambas Trxs inhibe la herencia de vacuolas [52].

Propiedades inmunomodulatorias

Las Trxs pueden ser liberadas de las células animales por un mecanismo desconocido [53]. La Trx extracelular humana exhibe efectos correspondientes a (i) factores de crecimiento autócrino [54, 55], y (ii) actividad co-citoquina estimulando con ello el reclutamiento y proliferación de linfocitos y el crecimiento de células tumorales [56-59]. La Trx extracelular también tiene efectos proinflamatorios potenciando la liberación de citoquinas de fibroblastos y monocitos (TNF, IL-I,

IL-2, IL-6, e IL-8). Recientemente se encontró que la Trx actúa como una proteína quimiotáctica, para lo cual se requiere su actividad redox [59, 60].

Señalización intercelular

Existen evidencias que sugieren que las Trxs constituyen una señal intercelular:

Las Trxs participan en la división celular [61] y ciclo celular [62, 63], en el control de receptores de interleucina, hormonas, cadena de transducción de señales [64-68] y pegado de factores de transcripción en la Trx humana (NF- κ B y AP-1) [69]. En la respuesta inmunológica del organismo su secreción al suero por los linfocitos T es muy abundante [70], participa en la activación, diferenciación y proliferación de linfocitos, potencia el sistema de defensa inespecífico aumentando la migración y citotoxicidad de eosinófilos [71, 72].

B- Rol de la Trx en condiciones de estrés biótico y abiótico.

Bi-La Trx en condiciones de estrés abiótico: estrés oxidativo

La evolución de procesos metabólicos aeróbicos, como la respiración y la fotosíntesis, conlleva a la producción de ROS en mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos. Una característica común de las ROS es su capacidad para dañar oxidativamente a las proteínas, el ADN y los lípidos. Esta propiedad citotóxica produjo en los organismos vivos la evolución de complejos mecanismos de detoxificación tanto enzimáticos como no enzimáticos. La Trx provee el poder reductor para restablecer los grupos sulfhidrilo en los residuos de cisteína modificados oxidativamente (e.g ácido sulfénico, ácido sulfínico) y reduce proteínas dañadas por estrés oxidativo [73, 74].

Tolerancia al estrés oxidativo. Reducción de hidroperóxidos

Los grupos sulfhidrilos actúan en la respuesta al estrés oxidativo manteniendo la homeóstasis redox de la célula. En este contexto, los sistemas NADPH/Trx y GSH/Grx juegan un rol importante. Por otro lado la principal propiedad antioxidante intracelular de las Trxs radica en su habilidad para actuar como cofactor y mantener a diversas Peroxirredoxinas (PRXs) en su forma reducida y consecuentemente activas para eliminar al peróxido de hidrógeno. Sumado a esto la síntesis y reducción de Trxs como TRX-2 y TRR1, y de otros genes relacionados como isoenzimas de la Trx peroxidasa: TSA1, TSA2, YDR453c, y YBLO64c [75-77], son inducidas en respuesta a condiciones de estrés oxidativo [78, 79].

En bacterias se encontró la enzima AhpC, ortóloga de TSA, que tiene actividad peroxidasa para destruir hidroperóxidos (H₂O₂, alquil peróxidos). Esta peroxidasa, desprovista del grupo prostético hemo, reduce el ROOH generando un grupo sulfénico en una cisteína conservada evolutivamente. La Trx reducida participa posteriormente en la restitución del grupo sulfhidrilo a dicho residuo de cisteína. Una isoforma de la AhpC se encuentra en el periplasma para remover el peróxido exógeno y la otra AhpC en el citoplasma de la célula para eliminar el peróxido endógeno [80].

En células animales la Trx es un dador de electrones muy eficiente para las enzimas glutathion peroxidasa y miembros de la superfamilia Trx peroxidasa (PRXs) humanas, encargadas de remover el peróxido de hidrógeno de la célula. En el citoplasma de células animales la Trx *per se* puede actuar como un eliminador de radicales generados por estrés oxidativo como oxígeno singulete, radical hidroxilo, y peróxido de hidrógeno. La potente actividad reductora de la Trx es la implicación más importante de su actividad como una proteína anti apoptótica [81]. AskI, proteína de unión a Kinasa I de señalización de apoptosis es liberada cuando la Trx se oxida por ROS y la kinasa es activada para transducir la señal de apoptosis [82]. Además, en la placenta protege al huevo fertilizado y al trofoblasto frente a especies tóxicas de radicales oxígeno. [83].

Un mecanismo complementario a estos procesos lo constituye la regulación del nivel de proteínas glutationiladas formadas en respuesta al estrés oxidativo. En condiciones oxidativas se generan

disulfuros mixtos entre los residuos cisteína de las mismas y el glutation. Esta reacción de glutationalización previene la oxidación irreversible de grupos SH y subsecuente degradación de la proteína [84].

Regulación del estado redox del GSH en la célula

La proporción de GSH/GSSG determina en buena medida el estado redox intracelular. Las Trxs participarían en este proceso proveyendo el poder reductor suministrado por el NADPH. Congruente con esta idea la doble mutante de Trxs en levaduras no sólo acumula altos niveles de GSSG oxidado (10 veces mayor), sino que también aumenta el contenido de glutation total [85].

Regulación genética en respuesta a condiciones de estrés

En células animales, en condiciones de estrés oxidativo, la Trx es translocada al núcleo por un mecanismo desconocido donde regula selectivamente la actividad de pegado al ADN de varios factores de transcripción por modificaciones postraduccionales redox. NF- κ B, AP-1, CREB, PEBP2/CBF, Myb, receptor de estrógenos, receptor de glucocorticoides [86], factor I inducible por hipoxia (Hif I) [87] y p53 son blanco de regulación redox por la Trx. La activación del pegado al ADN del factor NF- κ B ocurre en el citosol por la degradación de la proteína inhibitoria I- κ B, proceso inducido por oxidación y prevenido por antioxidantes como la Trx.

Implicaciones clínicas

Se observan variaciones en los niveles de Trx en plasma/suero en varios desórdenes asociados a estrés oxidativo como cancer, infecciones virales, enfermedades cardíacas, vejez, y heridas de isquemia-reperusión [88][89][90]. La Trx parece tener un rol dual en enfermedades malignas, enfermedades cardíacas, y en general protege el daño de isquemia-reperusión, la vejez y enfermedades neurodegenerativas [91]. Es necesario entender el balance entre los efectos positivos y negativos que genera la Trx antes de introducir una terapia con Trx en la práctica clínica convencional. El cancer parece ser un campo para el tratamiento con inhibidores de Trx, mientras que la administración intravenosa de Trx atenua la herida por isquemia –reperusión en modelos animales resultando en una terapia beneficiosa [92][90, 93].

Bii- La Trx en condiciones de estrés biótico: infección de bacteriófagos

Los fagos sintetizan proteínas estructurales para ensamblar las nuevas partículas virales que colonizan las bacterias vecinas. Para tal fin deben replicarse, transcribirse y traducirse correctamente utilizando la maquinaria celular y proteínas virales. Durante el proceso de infección de fagos a bacterias, las Trxs contribuyen al proceso de infección participando en eventos que son característicos de los fagos.

Síntesis de ADN viral

La Trx reductasa del hospedador reduce a la Trx del fago T4 que actúa como dador de hidrógenos para la Ribonucleótido reductasa viral, mejorando su replicación [94, 95].

Maduración de fagos

La Trx es esencial para el ensamblado de fagos filamentosos m1 y m13 [96].

Replicación de Bacteriófagos

La Trx-SH₂ del hospedador forma un complejo 1:1 con una proteína codificada por el gen 5 del fago T7, constituyendo la DNA polimerasa del fago [97, 98]. Esta asociación le confiere alta procesividad a la enzima y utiliza a la Trx-1 para dicha función.

II.II.IV-Funciones de las Trxs mitocondriales

En las mitocondrias ocurren procesos vitales como el metabolismo de lípidos y la respiración aeróbica (fosforilación oxidativa). Durante la respiración se producen ROS que promueven el estrés oxidativo y conllevan a la peroxidación de lípidos, inactivación de proteínas, y ruptura del ADN. Hace unos años se identificó el sistema de Trx (Trx-o) en mitocondrias y se las vinculó con el proceso de Tolerancia al estrés oxidativo. En este caso, la Tiorredoxina reductasa mitocondrial tiene una importante función antioxidante, ya que la cepa de levaduras que posee este gen bloqueado resulta más sensible al H_2O_2 [25]. A su vez la Trx-3 de levaduras funciona en la protección contra el estrés oxidativo generado durante el metabolismo respiratorio. Su función no puede ser reemplazada por las Trxs citoplasmáticas [99, 100].

En células animales la Trx podría participar en la regulación redox de la enzima oxidasa alternativa que reduce el oxígeno molecular sin la producción de ATP. Además, participaría en la remoción de ROS (H_2O_2) a través de la PRX [101, 102]

II.II.II-Las Trx en organismos fotosintéticos oxigénicos

La fotosíntesis es el único proceso con relevancia biológica que permite a los organismos fotosintéticos fijar la energía solar, para proveerlos de la energía necesaria para efectuar la biosíntesis de sus componentes estructurales; Así facilita la función y mantenimiento celular. La capacidad de vivir en forma fotosintética-autotrófica apareció temprano en la evolución en organismos actualmente muy alejados filogenéticamente pertenecientes a los tres reinos: Archaea (e.g las halófitas extremas), Eubacteria (e.g bacterias no sulfurosas y sulfurosas, Cyanobacteria) y Eukaria (e.g algas y plantas “superiores”). En las algas y plantas superiores, este proceso ocurre en los cloroplastos. Nos concentraremos de aquí en adelante en el reino Eukaria.

II.II.II.i-Isoformas de las Trxs

atf1	-----MPLSLRLSPSPALSPPTGGFGPSRQCRIPYSGVPTTKIGFCSLDSRKRGDSSVVRCSLETVNVVSVGVQTEVDKDTFWPI-----VKAAGEK	88
atf2	-----MPLSLRLAPSPSTFRYSPITSTGAGGFSVVKQHCIRPNISGVAAT-KIGFCSGGGVLDGRRIGSCVVRCSLETVNVVTVGVQTEVDKDTFWPI-----VKAAGDK	99
ato1	MKGNMIVRKVLHRQFSTLRSSTPSSRLSTIRPLVLAPNISISSLIARNSLFTASNIGPSIDFNFSNTSLPHRRSLCSSEAGGNGVVLKSEEFINAMS-----KAQDGS	107
ato2	-----MKSQWSNFHQIGRNSFLAASVTVVSNFNLPLNTSLNRRSFCFAEGDRSSFFVLKSEAEFNSALS-----KARDGSL	72
ath3	-----MAAEGEVIACHTVEDWTEKLL-----AANESKK	28
ath5	-----MAGEGEVIACHTLEVWNEKVK-----DANESKK	28
ath4	-----MAAEGQVIACHTNDVWTVQLD-----KAKESNK	29
ath1	-----MASEBQVIACHTVETWNBQLQ-----KANESKT	29
ath9	-----MGSCVSKGKGDDSDVHNVFSGGNVHLITTKESWDDKLA-----EADRDK	46
atCXXS1	-----MARVVKIDSAESWNFYVS-----QAKNQNC	25
ath7	-----MGSNVSSVHDVHSSMEITSNGFVVEIBSRQWKSLLFD-----SMKGSNK	44
ath8	-----MGANVSTPDQRFQVTHFRSTKPTWTPRPEIYPFKVNSPCIVEIKNMQWKSRLN-----ALKDTNK	60
ath2	-----MGGALSTVFGSGEDATAAGTESEPSRVLKFSSSRWQLHFN-----EIKESNK	48
atm1	-----MAAYTCTSRPPISIRSEMRIASSPTGFSFTRQMFVLPPESSGLRTRVLSLSSKNSRVSLRRGVICAEQDTATGIPVNV-----DSTWDSLVLKADE	93
atm2	-----MAAFCTSRPPISLRSETRIVSSSPSASSLSSRRMFVLPPESSGLRIRLSLSPASLTSIHQPRVSRLLRAVCEAQETTTDQVNV-----DSTWDFLVKATG	99
atm4	-----MASLLDSVTVTRVFLPIAAVSSSSAAPSVSRRRISPARLEFRGLKSSRSLVTQASLGNRRTRIARGRIACEAQDTAAAEVFNLSDSSEWQTKVLESDV	105
atm3	-----MAISSSSSICFNPTRHPTARHISSPRLFPVTSFSPRLRFSDRRLSSSASRLRLS-PLCVRDSRAAEVTRQS-----WEDSVLKSET	86
aty1	-----MAISLATAYISPCPTPESS-NSASPSRSLTSSVRLPSQIRRFSGVQSPSSSTRFAPLTVRAAKQTFN-----SFDLLQNSDK	78
aty2	-----MASISLSSSTVPLNSKESGVSFAFASRSISAVKQFPVRRIEAKKQTFD-----SPEDLLVNSDK	61
atx	-----MRSYLTTPVRSVSPATSVSKPLSSVQVTSVAANRHLSSLSSGARTRKSSSVIRCGGIEKIGESEFS-----STVLESAQ	77
atz	-----MALVQSRTFPHLNTPLSPILSSLHAPSSIFRREIRPVAAPFSSSTAGNLPFSPLTRPKLCLPPRGRKFVRREDVYLKVLKLSAQELQE-----LVKGRKV	95

atf1	89	LVLVDMYTCWCGPCKVIAPKYKALSEKYDD--VVFLLKDCNPDNRLPKELGIRVVPTFKILKDNKVV--KEVTGAKYDDLVAAIETARSAASG-----	178
atf2	100	IVVLDMYTQWCGPCKVIAPKYKELSEKYD--MVFLKDCNQDNKPLAKELGIRVVPTFKILKDNKVV--KEVTGAKYEDLLAAIEAARS-----	186
ato1	108	PSVFFYTAANCWGPGRFISPVIVELSKQYPDVVTYKVDIDEG-GISNTISKLNITAVPTLHFFKGGGSKK--GEVVGADVTKLKNLMEQLYK-----	194
ato2	73	PSVFFYTAANCWGPGRISPVILELSNKYPDVVTYKVDIDEG-GLSNAIGKLNVSAVPTLQFFKGGVKK--AEIVGVDVVRKLSVMEQLYK-----	159
ath3	29	LIVIDFTAVWCGPGRFIAPVFADLAKKHL--VVFVKVDV--ELNTVAEEFKVQAMPTFIKKEGEIK--ETVVGAKKEEIANLEKHKHTVAAA-----	118
ath5	29	LIVIDFTASWCGPGRFIAPVFAEMARKFTN--VVFVKIDV--ELQVAQEFKVEAMPTFVFMKEGNI--DRVVGAKKDEINEKLMKHGGLVASA-----	118
ath4	30	LIVIDFTASWCGPGRMIAPIFNDLAKKFMSS-AIFFKVDV--ELQSVAKFEGVEAMPTFVFKAGEVV--DKLVGANKEDLQAKIVKHTGVTVVNVQFEA	125
ath1	30	LIVIDFTASWCGPGRFIAPVFADLAKKLPN--VFLFKVDV--ELKSVASDWAIQAMPTFMFLKKGKIL--DKVVGAKKDELQSTIAKHLA-----	114
ath9	47	IIVANFATWCGPCKIIVAPFFIELEKHS--LMFLKVDV--ELSDFSSWDIKATPTFFFLKNGQI--GKLVGANKPELQKVTISIDSVPEPQR--	140
atCXXS1	26	PIVAHTALWCGPGRMIEPAIHAMADKFN--VDFVKLDV--ELPDVAKEFNVTAMPTFVLVKGKEL--ERIVGAKKDELEKVKSLRA-----	118
ath7	45	LLVIDFTAVWCGPCKAMEPRVREIASKYSE--AVFARVDV--RLMDVAGTYRAITLPAFVFKRGEI--DRVVGAKPDELVKKIEQHRV-----	129
ath8	61	LLVIEFTAKWCGPCKTLEPKLEELAAYTD--VEFVKIDV--VLSVWMEFNLSLPAIVFMKRGREV--DMVVGKVDLELRLKLNKYTSFF-----	149
ath2	49	LLVDFASWCGPGRMIEPAIHAMADKFN--VDFVKLDV--ELPDVAKEFNVTAMPTFVLVKGKEL--ERIVGAKKDELEKVKSLRA-----	133
atm1	94	PVVFDFWAPWCGPCKMIDPIVNELAQKYAG-QKFYKLNVD--ESPATPGQYGVRSIPTIMIFVNGEKK--DTIIGAVSKDTLATSINKFL-----	179
atm2	100	PVVFDFWAPWCGPCKMIDPIVNDLAQHYTG-KIKFYKLNVD--ESPNTPGQYGVRSIPTIMIFVNGEKK--DTIIGAVPKTTLTSSLDKFLP-----	186
atm4	106	PVLVEFVATWCGPGRMIEPAIHAMADKFN--VDFVKLDV--ELPDVAKEFNVTAMPTFVLVKGKEL--ERIVGAKKDELEKVKSLRA-----	193
atm3	87	PVLVEFYTSWCGPGRMVHRIIDEIAGDYAG-KLNCYLLNED--NDLPVAEVEIKAVPVVLLFKNGEKR--ESIMGTMPKPEFYISAIERVLNS-----	174
aty1	79	PVLVDYATWCGPQQLMVPILNEVSETLKD-IIAVVKIDTE-KYPSLANKYQIEALPTLILFKDGLW--DRFEGALPANQLVERIENSLQVQK-----	168
aty2	62	PVLVDYATWCGPQCFMVPILNEVSETLKD-KIQVVKIDTE-KYPSLANKYQIEALPTLILFKDGEPC--DRFEGALTAQLIQRIEDSLKVKP-----	152
atx	78	PVLVEFVATWCGPCKLIYPAMEALSQEYGD-KLTIKVIDH--ANPKLIAEFKVGYPHILFKDGEVPSRREGAITKAKLKEYIDGLLNSISVA-----	171
atz	96	PLIVDFYATWCGPILMAQLEMLAVEYES-NAIVKVDV--DEYEFARDQVRGLPTLFFISPDPSKDAIRTEGLIPLQMMHDIIDNEM-----	184

Figura 4. Comparación de secuencia de aminoácidos de las Trxs de *A. thaliana*.
 El alineamiento fue realizado con ClustalW [4] ath1: At3g51030 ; ath2: At5g39950; ath3: At5g42980; ath4: At1g19730 ; ath5: At1g45145; ath7: At1g59730; ath8:At1g69880; ath9: At3g08710; ato1: At2g35010; ato2: At1g31020; atm1: At1g03680; atm2: At4g03520; atm3: At2g15570; atm4: At3g15360; atf1: At3g02730; atf2: At5g16400; atx: At1g50320; Aty1: At1g76760; Aty2: At1g43560; AtCXXS1: At1g11530. En amarillo se resalta el sitio activo, en verde los aminoácidos estrictamente conservados y en lila el aminoácido 101 importante en la clasificación de la Trx-h

El alineamiento y análisis de la estructura primaria de las Tiorredoxinas encontradas en *Arabidopsis thaliana* lleva a clasificar a las isoformas vegetales en los siguientes grupos: Trx-f, Trx-h, Trx-m, Trx-o, Trx-x y Trx-y (Tabla 1, Figura 4).

Luego del análisis de ESTs (Expressed Sequence Tags) presente en la base de datos se encontró que las diferentes isoformas de Trxs están distribuidas en todas las plantas superiores estudiadas (Alamo, Pino, Tomate, Soja y demás) sugiriendo que la diversidad de Tiorredoxinas encontradas en *Arabidopsis* es representativa de todas las plantas superiores.

II.II.II.ii-Evolución de las Trxs

En base a la estructura primaria de la secuencia de aminoácidos de las Trxs se puede construir un árbol filogenético utilizando el programa ClustalW [4]. La comparación de las mismas con las secuencias de Trx procariotas y eucariotas sugiere que la Trx-m, Trx-x y Trx-y presentarían un origen procarionte [24, 29], mientras que las Trx-f, Trx-h y Trx-o tendrían un origen eucarionte [24, 27, 103] (Figura 5).

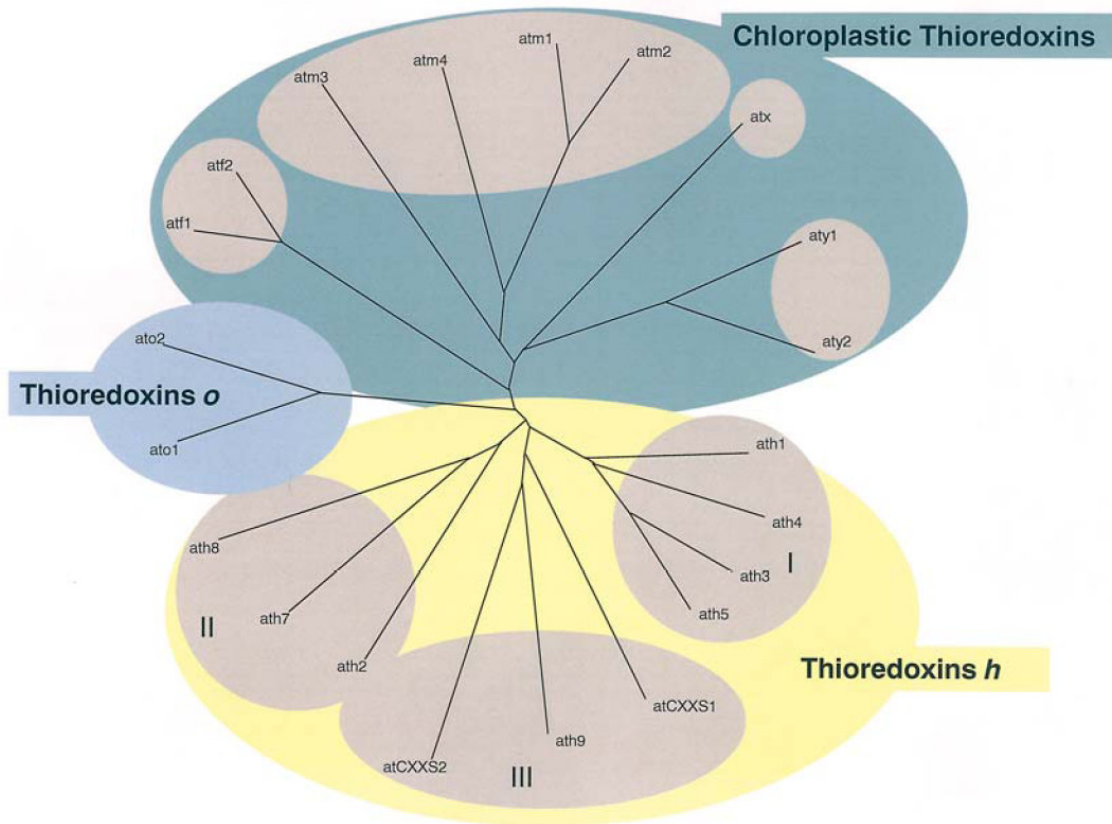


Figura 5. Árbol filogenético de las isoformas de Trx de *A. Thaliana*.

El árbol filogenético fue construido utilizando Clustal W [4] utilizando las secuencias descritas en la Figura 4.

La Trx-m forma un grupo homogéneo semejante al grupo de las Trxs bacterianas. Esto sugiere que este gen tendría un origen procarionte, descendiente de un simbionte fotosintético que dió origen a los cloroplastos [104]. Durante la evolución el gen traslocó al núcleo, adaptándose a codificar una proteína precursora para ser llevada al cloroplasto.

La secuenciación del genoma de *Synechocystis*, una cianobacteria ancestro del cloroplasto, mostró la presencia de cuatro secuencias para Trx [105]. Todas las Trx-m de algas y plantas superiores están relacionadas a una de las Trx de *Synechocystis* (orf s1r0072), ambas presentan diferentes características bioquímicas y estructurales. En *anabaena* (cianobacteria) dos Trx fueron identificadas previamente. La primera similar a la Trx-m y la segunda similar al marco de lectura abierto de *Synechocystis* s1r1139. Es interesante destacar que en algas rojas, la Trx-m está

codificada en el plastoma (genoma cloroplástico) [106, 107]. Desde un punto de vista evolutivo el hecho de encontrarse justo antes de que el gen para la Trx-m se movilice hacia el núcleo, apoya la teoría de su origen procarionte.

La secuenciación de *Arabidopsis* y análisis de ESTs de *Chlamydomonas* permitió identificar en los 2000s dos nuevas isoformas de Trxs cloroplásticas: la Trx-x y Trx-y que compartirían junto a la Trx-m un origen procarionte y están presentes en todos los organismos fotosintéticos, incluyendo cianobacterias [29] [108].

La Trx-f y la Trx-h de plantas se originarían a partir de un ancestro eucariota común a plantas y animales. La Trx-h es un poco más variable y presenta un alto número de copias en un único organismo. La divergencia de las secuencias de esta proteína en *Arabidopsis* parece ser antigua, precediendo la divergencia entre plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas.

La Trx-o fue encontrada en levaduras, mamíferos y recientemente en plantas. La variante de hongos parece pertenecer al grupo eucariótico mientras que las dos restantes parecerían formar un grupo independiente

II.II.II.iii-Localización subcelular de las Trxs

El análisis de la localización subcelular de las diversas Trxs muestra que el cloroplasto contiene a la Trx-f (inicialmente descrita como activador selectivo de la FBPasa), Trx-m (activador de la cMDH) Trx-x y Trx-y recientemente encontradas en *A. thaliana* [28] y *Chlamydomonas reinhardtii* respectivamente [29]. Las secuencias de aminoácidos correspondientes poseen una extensión amino terminal que corresponde a un péptido tránsito de translocación al cloroplasto. La localización cloroplastídica de la Trx f, Trx-m y Trx-x fueron confirmadas en experimentos de fusión con la proteína verde fluorescente utilizando las isoformas de *A. thaliana* [109].

Recientemente se demostró que la Trx-o1, está presente en las mitocondrias. Esto no sólo se basa en la presencia de un péptido tránsito que le permite translocar a dicha organela, sino que también fue confirmado en experimentos de importación *in vitro* a mitocodrias [27] y en experimentos de fusión con la proteína verde fluorescente [109].

En *A. thaliana*, las Trxs-h (inicialmente descritas en tejido heterotrófico) constituyen un grupo muy grande y heterogéneo. Aunque algunas de sus isoformas contienen un péptido señal, la predicción de localización subcelular las presenta como citosólicas. Sin embargo esta característica no coincide con estudios que purifican variantes de este grupo a partir de mitocondrias [110, 111], retículo edoplásmico [110], o sugieren una localización nuclear [112].

II.II.II.iv-Sistema de Reducción de las Trxs

A- Sistema NADPH Trx Reductasa

Dependiendo de la localización subcelular las Trxs son reducidas por diferentes sistemas dadores de electrones. Las Trx de mitocondria o del citoplasma de las células fotosintéticas son reducidas con electrones que provienen del NADPH a través del sistema NADP/Tiorredoxina reductasa (descrito previamente para organismos heterotróficos) (Figura 3). Estudios *in vitro* muestran que la NTR vegetal tiene una reactividad notablemente mayor con Trx-h su blanco específico) que con Trx-m y Trx-f [30].

B-Sistema Ferredoxina Tiorredoxina reductasa (FTR)

Las Trxs de cloroplastos de células vegetales y algas y las Trx de procariotes fotosintéticos oxigénicos, son reducidos a través del sistema Ferredoxina-Tiorredoxina Reductasa (FTR) con electrones provenientes de la cadena transportadora de electrones fotosintéticos. Esta enzima transfiere electrones provenientes de la ferredoxina fotorreducida a la Trx cloroplastídica, y está presente exclusivamente en organismos fotosintéticos oxigénicos, desde cianobacterias a plantas superiores [113-115] (Figura 11). Es un heterodímero conformado por a) una subunidad β catalítica conservada (ca 13 KDa), que contiene un centro de hierro azufre 4Fe-4S y un puente disulfuro reactivo y b) una subunidad α de tamaño variable (ca 7-11 KDa). La subunidad catalítica además posee en el polipéptido maduro siete cisteínas conservadas, seis de las cuales están ordenadas en dos motivos CPC y un motivo CHC. Estas cisteínas forman el puente disulfuro activo y unen el centro hierro azufre. Ambas subunidades están codificadas en el núcleo en dos genes y son traducidas y trasladadas al cloroplasto [116].

La FTR es una enzima peculiar ya que convierte una señal monoelectrónica proveniente de la ferredoxina (que sólo transfiere un electrón), en una señal dielectrónica necesaria para la reducción del puente disulfuro de la Trx. Se postula que la enzima primero captura un electrón proveniente de la ferredoxina y luego utiliza otra molécula para completar la reducción total del puente disulfuro [117]. El potencial redox para el centro hierro azufre es alto (+340 mV) [118] y sólo contribuye a estabilizar la forma semireducida, mientras que el potencial redox del puente disulfuro (-230 mV) hace posible la reducción de la Trx (-210 mV). Estudios *in vitro* muestran que la enzima es muy eficiente en reducir a la Trx de *E. coli*, Trx-m, Trx-f y Trx-h sin discriminar [30].

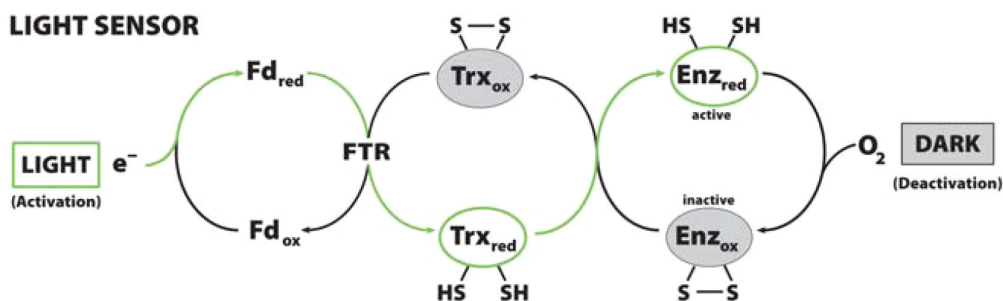


Figura 6. Sistema de reducción de las tiorredoxinas cloroplásticas y de procariontes fotosintéticos.

La Ferredoxina (Fd) se reduce y activa por la luz a través de la cadena de electrones fotosintéticos y transfiere los mismos a la Ferredoxina Tiorredoxina reductasa (FTR). Luego reduce a la Tiorredoxina (Trx) que transfiere el potencial reductor a la enzima blanco (Enz), Ox: oxidada, Red: reducida. Figura tomada de [2].

II.II.II.v-Sistema extra cloroplástico

II.II.II.v.1-Funciones de Trxs citoplasmáticas

El genoma de *Arabidopsis* contiene ocho isoformas de Trx-h. La Trx-h1 h3, h4 y h5 presentan la secuencia WCPPC en el sitio activo y son las Trxs más estudiadas hasta el momento, mientras que las Trx-h2, h7, h8 y h9 presentan la clásica secuencia WCGPC y una extensión en el amino Terminal (Figura 4). La importación de una proteína de fusión entre la PtTrx-h2 (relacionada a la Trx-h7 y Trx-h8 de *Arabidopsis*) y la GFP mostró que esta isoforma está asociada con las mitocondrias [119]. Congruente con esta amplia diversidad de localización, la Trx-h no parece estar únicamente en especies monocotiledóneas y dicotiledóneas [120] sino también en diferentes

compartimientos celulares[110] (e.g parénquima de maíz [121], el núcleo de semillas en desarrollo de trigo [112], y la savia del floema del arroz [122]). En general se vinculó a las Trx-h con diversos procesos biológicos, detallados a continuación:

Maduración y germinación de la semilla

En cereales la proteína Trx-h está ampliamente distribuida en la mayoría de los órganos y estadios de desarrollo. El patrón de localización de Trx-h sugiere su participación en dos procesos importantes para el desarrollo de la semilla (i) la transferencia de compuestos de la planta a la semilla durante la ontogenia y (ii) la tolerancia al estrés oxidativo durante la desecación y germinación de la semilla [112].

En las semillas, las proteínas de reserva contienen generalmente puentes disulfuro. Ello implica que las mismas se sintetizan en la forma reducida (SH) y luego son oxidadas (S-S) aumentando su estabilidad durante la maduración y deshidratación. Durante la germinación, las proteínas son convertidas nuevamente a la forma reducida (SH) para facilitar la movilización. Esto provoca un aumento en la solubilidad, la susceptibilidad a las proteasas, la sensibilidad al calor y cambios en la actividad enzimática. Esta transformación reductiva opera sobre la proteína específica (acción directa) o inactivación de inhibidores de proteínas específicos (acción indirecta) (Figura 7).

La Trx facilitaría la movilización de nitrógeno y carbono en el endosperma mediante:

- la reducción de las proteínas de reserva gliadinas y glutenina (98), aumentando la susceptibilidad y solubilidad de las mismas.
- la inactivación de inhibidores proteicos de enzimas de la degradación del almidón [123]
- la activación directa por reducción de diversas enzimas hidrolíticas (e.g proteasa Tioalasinina muy temprano luego de la imbibición promoviendo la degradación de gliadinas y glutenina [124]. Complementando esta actividad, estudios con semillas transgénicas de cebada que sobre-expresan la Trx-h de trigo en el endosperma, exhiben un aumento de la actividad de la enzima Pullulanasa (cliva uniones α -1,6 en el almidón) y acelera la aparición de amilasa y la tasa de germinación.

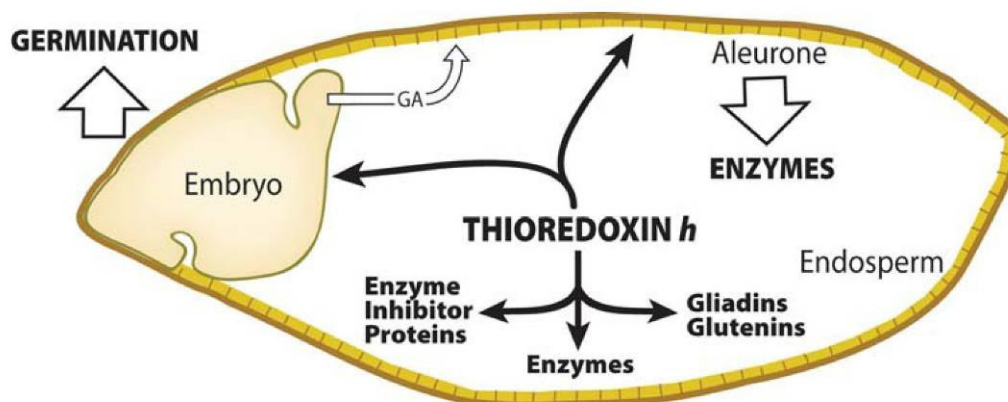


Figura 7. Funciones de la Trx-h en semillas.

La Trx-h actúa directamente reduciendo proteínas hidrolíticas o de reserva e indirectamente reduciendo y así inactivando inhibidores de la actividad de las proteínas de reserva.

En conjunto estos estudios indican que la Trx-h participaría en la comunicación entre el embrión, el endosperma y la aleurona. Recientes investigaciones con proteómica, han permitido identificar por distintas aproximaciones 70 blancos potenciales de Trx-h en semillas.

Asimilación del sulfato

Al igual que en microorganismos y células animales, se postula una posible participación de la Trx-h en la asimilación del azufre, dado que la Trx-h2 vegetal complementa la doble mutante *trx1/trx2* de levaduras auxótrofas para metionina transformándolas en fotótrofas [125]. Sin embargo este resultado no asegura que dicho proceso ocurra en la planta *in vivo*.

Transducción de señales

Una serie de evidencias experimentales sugieren que al igual que en células animales, las Trxs-h actuarían en tejidos vegetales como moléculas señalizadoras aprovechando su capacidad de regulación redox para interactuar con receptores específicos.

- a) La Trx-h constituye el componente mayoritario en la savia de monocotiledóneas (arroz y trigo) [122] y en dicotiledóneas (*Ricinus* y cucurbita) [120].
- b) Es transferida al floema a través de los plasmodesmos [126], e interacciona con dominio Kinasa del locus S del receptor Kinasa [127], luego de ser sintetizadas en las células acompañantes. De esta manera regularía receptores vegetales tipo kinasas asociados a membrana, y/o modularía el equilibrio redox en el sistema vascular.

Auto-incompatibilidad

La auto-incompatibilidad, un mecanismo ampliamente extendido en los vegetales, previene la auto-fertilización en plantas con flor. Un receptor quinasa en el estigma del pistilo se auto-fosforila al contactar una proteína de superficie de polen incompatible, iniciando una cascada de señalización que produce el rechazo del polen. En este proceso, la Trx-h unida al pistilo, actúa como un regulador negativo de la quinasa y bloquea la auto-fosforilación en ausencia de polen incompatible [128]

Ciclo celular y desarrollo

La Trx-h se asoció al desarrollo y ciclo celular en base a evidencias indirectas obtenidas a nivel molecular. El gen de la Trx-h presenta una secuencia Tef1 box, implicada en la activación transcripcional de genes relacionados con la división celular. Estudios de regulación génica mostraron que la expresión de la AtTRXh1 y AtTRXh2 presenta un máximo en la fase G2 del ciclo celular, mientras que la AtTRXh4 lo hace en la fase M. Estas evidencias sugieren que estas proteínas podrían estar involucradas en el control redox de la proliferación celular [129].

Defensa antioxidante

Reacciones metabólicas como la respiración producen ROS. Para reducir estas especies reactivas la planta posee un sistema de defensa antioxidante que funciona particularmente durante la deshidratación y germinación de la semilla. Diversas evidencias demuestran la participación de la Trx-h en la defensa antioxidante:

- a) La Trx-h se encuentra principalmente en el núcleo de células de la capa de Aleurona y del escutulum [112].
- b) Es un dador de electrones para las enzimas PRX, metionina sulfóxido reductasa y glutathion reductasa involucradas en la respuesta antioxidante [130-132]. Esta idea se fundamenta en estudios que muestran la interacción de mutantes de monocisteína para la Trx-h3 con la PRX [133]. Además, la activación de la PRX de cianobacterias está acoplada al sistema transportador de electrones fotosintéticos [134].

- c) La Trx-h3 vegetal complementa una doble mutante *trx1/trx2* de levaduras previamente sensible a hidróperóxido. [125].
- d) La Trx-h5 aumenta su expresión durante procesos de herida, abscisión, senescencia, interacciones incompatibles con un patógeno bacteriano, Menadiona (droga generadora de anión superóxido), hierro, cobre, UV-C, ABA y ácido salicílico, procesos que llevan directa o indirectamente a la formación de ROS.
- e) En *Chlamydomonas reinhardtii* (alga unicelular), la transcripción de una Trx-h citosólica es activada en presencia de metales pesados (Hg y Cd²⁺) [135].

Modulación de diversas actividades enzimáticas

Las enolasas de *Arabidopsis* y plantas escarchadas (“ice-plants”) poseen un puente disulfuro sensible a regulación redox, el cual confiere a la enzima una mayor actividad que su forma reducida. Aunque esta cistina es accesible a las Trxs citoplasmáticas, puede tener un rol regulatorio y trabajar junto a la oxidasa alternativa para proteger a las plantas de la producción de productos indeseables del metabolismo anaeróbico, o por el contrario un rol estructural y que el disulfuro estabilice a la proteína. Otras enzimas citosólicas sensibles a redox son la fructosa 1,6-bisfosfatasa, NAD-gliceraldehído-3-P dehidrogenasa, Lactato dehidrogenasa de cebada, etc [136]

II.II.II.v.2-Funciones de Trxs mitocondriales

En mitocondrias se han identificado recientemente dos variantes para la Trx-o. Por analogía con las mitocondrias de levaduras y animales, las mismas participarían en los siguientes procesos biológicos [25]:

Regulación de la respiración resistente a cianuro

Podría participar en la regulación redox de la enzima oxidasa alternativa que reduce el oxígeno molecular sin la producción de ATP [137].

Defensa antioxidante

Participaría en la detoxificación de ROS a través de la PRX [101, 102, 138].

Otras funciones

En un trabajo reciente en el que utilizan columnas de afinidad unidas a la Trx-m (C40S) y proteómica, aislan distintos supuestos blancos solubles de mitocondrias que participarían en distintos procesos como fotorespiración, ciclo de ácido cítrico, metabolismo de lípidos, nitrógeno y azufre, transporte de electrones y de membrana, síntesis y transformación de ATP, ensamblado y plegamiento de proteínas, síntesis de hormonas, reacciones relacionadas al estrés y directa o indirectamente la comunicación interorganelar [139]. Sin embargo estas funciones no están corroboradas bioquímicamente.

II.II.II.vi-Sistema cloroplástico

El sistema de Trxs cloroplásticas es más complejo que el sistema citosólico mencionado anteriormente. Incluye dos tipos mayoritarios, Trx-m y Trx-f, y dos tipos identificados recientemente, Trx-x y Trx-y [29]. En particular el genoma de *Arabidopsis* contiene dos Trx-f, cuatro Trx-m, una Trx-x y dos Trx-y (Tabla 1). Esta amplia diversificación conduce a preguntar sobre la especificidad y función fisiológica de las distintas isoformas.

El sistema cloroplástico, dependiente de Ferredoxina, regula *in vitro* la función de varias proteínas involucradas en diferentes procesos:

Asimilación Fotosintética de CO₂ y Regulación del ciclo de las pentosas fosfato oxidativo

Todos los eucariotas fotosintéticos desde las algas hasta las angiospermas más avanzadas reducen el CO₂ atmosférico a carbohidrato con un mecanismo básico: el ciclo de Benson-Calvin (ciclo reductivo de las pentosa fosfato). Este camino metabólico puede dividirse en tres fases: a)-carboxilación de la ribulosa-1,5-bisfosfato, b)-reducción del 3-fosfoglicerato y c)-regeneración de la molécula aceptora de CO₂. El ciclo es autocatalítico (i.e un incremento en el nivel de intermediarios aumenta la velocidad del ciclo) y está regulado para evitar ciclos fútiles (la operación simultánea de un proceso sintético y otro degradativo).

Las Trxs controlan la actividad de diversas enzimas del estroma de cloroplastos actuando como un interruptor cambiando el metabolismo oxidativo en la oscuridad a reductivo en la luz. Esta característica confiere al sistema Ferredoxina-Trx, la capacidad de unir los procesos lumínicos en las membranas tilacoides con el metabolismo general en el estroma cloroplástico. En esta función la Trx reducida modula selectivamente la actividad catalítica de enzimas de vías biosintéticas: Fructosa-1,6-bisfosfatasa (cFBPasa) [140], Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa (SBPasa) [141, 142]. Fosforibulokinasa (PRK), Gliceraldehido-3-fosfato Dehidrogenasa (G3PDH) (Trx-f) [143, 144], y degradativas: Glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH) (ciclo de las pentosas fosfato) [145] (Figura 5).

Activación de Rubisco

La enzima Rubisco activasa media en la activación lumínica de la enzima Rubisco, catalizadora de la etapa carboxilativa de la fotosíntesis [146]. La carbamilación de un residuo lisina de la rubisco permite la unión de Mg²⁺ catalíticamente esencial, que estabiliza la forma activa de la misma. Pero in vivo, azúcares fosfato inhibitorios (RuBP) y en algunas plantas 2-carboxiarabinitol-1-fosfato (CAIP), se unen fuertemente a la enzima nativa impidiendo este proceso. La Rubisco activasa permite liberar de la rubisco estos azúcares y facilita el acceso del CO₂ y el Mg²⁺ para la carbamilación. Alternativamente la rubisco activasa está regulada por la tasa de ADP/ATP y la reducción de dos cisteínas regulatorias vía Trx-f [147]. Por otra parte, la Trx reducida o el glutathion, pueden activar a la CAIP fosfatasa, una enzima implicada en la hidrólisis de CAIP, un inhibidor natural de Rubisco en la oscuridad [148].

CP12

Otra proteína que puede ser regulada por óxido-reducción es CP12, una proteína pequeña codificada en núcleo capaz de unirse a PRK y a NADP-GPDH a través de sus cisteínas conservadas para formar un complejo supramolecular [149].

Válvula de malato

En la válvula de malato, la MDH funciona en cloroplastos sintetizando malato a partir de oxalacetato, mediante la utilización del NADPH fotosintético:



La salida del malato al citosol y su posterior oxidación a oxalacetato permiten la exportación de equivalentes de reducción del cloroplasto al citosol. La activación de la MDH está mediada por el sistema cloroplástico FTR. Esta enzima funciona como catalizador esencial del mecanismo para transporte y acumulación de CO₂ en células del mesófilo de ciertas plantas C₄, y como tal inactiva en ellas la vía C₄ en la oscuridad [143, 144, 150].

Síntesis de ATP

La transferencia de electrones a través de la cadena fotosintética de la membrana tilacoide, está acoplada con la traslocación de protones a través de la misma, responsable de la formación de un gradiente protón utilizado por la enzima ATP Sintetasa para sintetizar ATP. La Trx reduce la

subunidad γ de la porción CF1 de la H⁺ ATPasa, provocando un cambio conformacional y subsecuente activación de la enzima [143, 144].

Regulación de la biosíntesis de almidón

Estudios *in vitro* han mostrado que la Trx-f es dos veces más eficiente que la Trx-m en la estimulación de la ADP-Glucosa pirofosforilasa (AGPasa), enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de almidón, en presencia de su principal activador el 3-fosfoglicerato [151]. Este estudio sugiere que el sistema FTR estaría involucrado en la regulación fina de la síntesis de almidón en cloroplastos.

Biosíntesis de ácidos grasos/ Acetyl CoA carboxilasa

Existen dos formas de la enzima acetyl-CoA carboxilasa, una de origen eucariótico en el citoplasma y otra procariótico en plástidos. En los cloroplastos la síntesis de ácidos grasos se realiza principalmente en presencia de luz. Ensayos *in vitro* muestran que la enzima aumenta su actividad 10 veces en presencia de Trx-f y un poco menos con Trx-m. Además al igual que otras enzimas cloroplásticas, la actividad aumenta 90 veces con el pH y la concentración de Mg²⁺ [152]. Es interesante destacar que las moléculas de ácidos grasos dan origen a los isoprenoides (e.g carotenoides, clorofila y plastoquinona), estableciendo con ello una nueva conexión entre las etapas biosintética y lumínica de la fotosíntesis.

6-Metabolismo del nitrógeno

Las enzimas cloroplásticas que participan en la asimilación de nitrato son la Nitrito reductasa (NR), Glutamina sintetasa (GS) y Ferredoxina-Glutamato sintetasa (Fd-GOGAT). Los iones nitrito son reducidos a iones amonio que son fijados por la acción concertada de la GS y Fd-GOGAT. Esta última muestra una activación dependiente de Trx-m, en cloroplastos de espinaca y soja [153, 154].

Partición del flujo de energía entre ambos fotosistemas

Ambos fotosistemas (PSI y PSII) con diferentes propiedades en la absorción de luz deben estar regulados de manera de que el flujo de energía sea similar en ambos. Al parecer existe una proteína quinasa en la membrana tilacoidal del cloroplasto que fosforila un residuo treonina en el complejo proteína-pigmento del LHCII y de esta forma, migra hacia regiones donde la membrana no constituye sacos. Esta migración lateral modifica el balance energético a favor del PSI, que se ubica en la lamela del estroma [155-159]. Un modelo propuesto establece que la reducción del complejo plastoquinona y citocromo b₆f por baja-media irradiancia (i.e cuando el PSII ha sido activado más frecuentemente que el PSI) provoca un cambio conformacional en la quinasa tilacoidal que fosforila LHCII, ocultando el puente disulfuro presente en la misma y activándola para fosforilar proteínas de LHCII. En alta irradiancia se expone el puente disulfuro de la enzima por un mecanismo desconocido que es reducido por el sistema FTR u otros tioles estromáticos (i.e exceso de equivalentes de reducción) inactivando a la quinasa y anulando la fosforilación de proteínas en LHCII [160].

Señalización redox

Los cloroplastos utilizan la luz y el estado redox para iniciar procesos a nivel transcripcional o traduccional.

Transcripción:

En cianobacterias cuando el pool de plastoquinonas está reducido, activa a una proteína histidina-quinasa específica RppB [161-163], que fosforila a una proteína reguladora RppA que estimula la expresión de genes del PSI, y disminuye la expresión de genes del PSII (e.g psbA y Lhcb) (Figura 8).

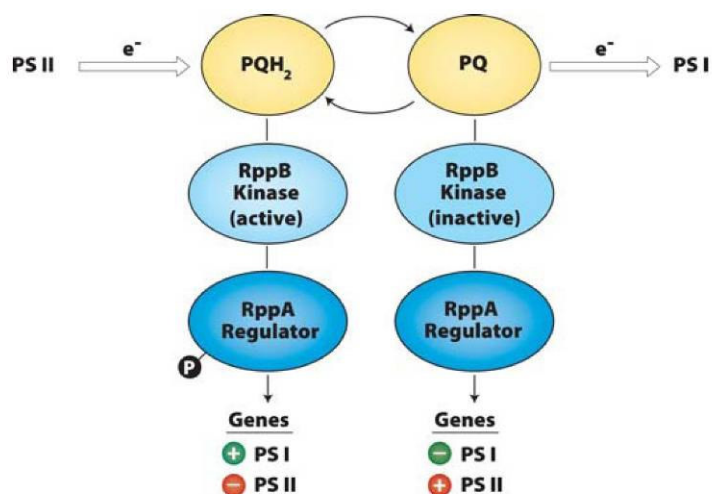


Figura 8. Regulación reductiva de genes de la cadena transportadora de electrones

Traducción:

La luz también tiene una importante participación en la traducción de varios ARNm codificados en el plastoma (e.g. *psbA* y *psbD*, que codifican para las proteínas D1 y D2 del PSII, *rbcL*, para la subunidad grande de rubisco). En este caso actúa a través de dos señales: una señal "priming" del PSII generada por el pool de plastoquinona, y una señal "ditiol" del PSI proveniente de la Trx [164]. Parecería ser que el balance entre la plastoquinona oxidada y la Trx reducida controla el estado redox de la proteína RB60, que forma un complejo proteico que se une al ARNm *psbA*, regulando la traducción de la proteína D1. En plantas la fosforilación de ciertas proteínas del PSII (D1, D2, LHCII) depende del estado redox de la plastoquinona, y de la presencia de tioles que estimulan la fosforilación en D1 y D2 cuando están reducidos y en LHCII cuando están oxidados [165]. Se propuso que esta regulación está bajo el control del sistema FTR.

Síntesis de bacterioclorofila

En *Rhodospseudomonas spheroides*, bacterias purpuras que pueden crecer en condiciones anoxigénicas u oxigénicas, la Trx participaría en la síntesis de bacterioclorofila, pigmento esencial para la realización de la fotosíntesis, a través de la activación de la enzima ácido 5 aminolevulinico (ALA), primer enzima de la ruta biosintética [166].

Organización del aparato fotosintético

Participa en la organización del aparato fotosintético en *Rhodobacter sphaeroides* [167]. Parecería tener un rol dual: activando a la sintetasa del ácido aminolevulinico y regulando la transcripción de *puf* (un operón que codifica para proteínas que unen pigmentos del LHC y el complejo del centro de reacción)

Estrés oxidativo

Las Trx-m1, -m2, -m4 y -x de *Arabidopsis*, pero no las Trx-f1 y Trx-f2 confirieron tolerancia a H_2O_2 y alquil hidroperóxidos generada en la levadura doble mutante para las Trxs citoplasmáticas [168] y por lo tanto, podrían ser dadores de hidrógenos eficientes para la Trx peroxidasa *in vivo*. Estas diferencias encontradas entre las Trxs pudieron ser producto de la ineficiencia de este tipo

particular de Trx en interaccionar con los diferentes blancos de levaduras. Pero no se puede excluir la posibilidad de que la NTR citosólica de levaduras sea ineficiente para reducir a estas Trxs.

La peroxiredoxina Q, estaría localizada en cloroplastos, principalmente en células de la guarda, y su expresión se vería incrementada luego de una infección en la respuesta hipersensible de la planta (para mantener la concentración de peróxido baja fuera de los sitios de infección). Varias Trx citosólicas, cloroplásticas y mitocondriales sirven como dadores de hidrógeno para esta enzima. El potencial redox medio para esta enzima es -320 mV. Esto explica porque puede ser reducida por las Trxs pero no por las Grxs [169].

III *Arabidopsis thaliana*.

Características que la definen como un buen modelo de estudio en plantas

A. thaliana es una pequeña hierba dicotiledónea miembro de la familia de las mostazas o *Brassicaceae* junto al brócoli, repollo, colza y nabo. Aunque carece de la importancia agronómica de las últimas, es considerada un modelo de estudio vegetal muy utilizado ya que presenta varias ventajas desde el punto de vista de la genética y biología molecular:

- 1-Contiene un genoma diploide pequeño (114.5-125 Mb total), completamente secuenciado [170] (<http://www.arabidopsis.org/info/agi/jsp>).
- 2-Existen numerosos mapas físicos y genéticos de sus cinco cromosomas (<http://www.arabidopsis.org/tools/MapView>).
- 3-Posee un ciclo de vida rápido, que comprende seis semanas desde la germinación hasta la producción de semillas maduras.
- 4-Su pequeño tamaño permite cultivarlas en un espacio restringido.
- 5-Fructifica con una prolífica producción de semillas.
- 6-Existen numerosos métodos de transformación eficientes que utilizan *Agrobacterium tumefaciens* (<http://www.arabidopsis.org/protocols.jsp>).
- 7-Están disponibles una gran cantidad de líneas mutantes (*Arabidopsis* Biological Resource Center Stocks <http://www.arabidopsis.org/abrc>).

OBJETIVOS

El sistema cloroplástico de Trxs descubierto hace 30 años era relativamente simple. Estas organelas contenían dos Trxs (Trx-m y Trx-f), implicadas en la regulación dependiente de la luz de varias enzimas relacionadas principalmente al metabolismo del carbono y procesos asociados. Sin embargo las técnicas de proteómica y genómica (i.e Arabidopsis) permitieron expandir recientemente el campo de la regulación por óxido-reducción permitiendo:

- a) asociar la proteína con una amplia variedad de funciones inimaginables en los años 80.
- b) Identificar dos secuencias para la Trx-f y cuatro secuencias para la Trx-m.
- c) Secuenciar nuevos tipos de Trxs cloroplásticas: una Trx-x y dos Trx-y

Esta enorme diversificación de formas, con diferentes orígenes evolutivos y el incremento de las funciones vinculadas a las Trx conduce a indagar sobre la especificidad y la función fisiológica de las distintas isoformas. Aunque las características multifuncionales de las Trx sugieren su participación en numerosos eventos biológicos, paradójicamente son escasos los estudios fisiológicos realizados con plantas salvajes y con plantas transgénicas que contengan una proporción variable de las diferentes Trxs. En base a ello nos propusimos estudiar la contribución de las Trx-f y Trx-m en la planta *in vivo* y su vinculación con las funciones biológicas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Para profundizar este estudio, decidimos desarrollar plantas con los niveles alterados en la expresión de Trxs (Trx-f o Trx-m), de modo de establecer su contribución a diferentes procesos biológicos. Con estos fines procedimos a:

1-Diseñar y preparar las construcciones genéticas para la transformación posterior de las plantas. Para ello prepararemos las formas precursora de Trx-m o Trx-f para obtener plantas con mayor expresión de dichas proteínas, y por otro lado las formas precursora o madura de las Trx-m o Trx-f para disminuir su expresión por ARN antisentido. Para ello empleamos los precursores de la Trx-m, Trx-f clonados a partir de una biblioteca de ADNc de hojas de colza (*Brassica napus*) previamente realizado en nuestro laboratorio.

Elegimos *Arabidopsis thaliana* como planta huésped para construir plantas transgénicas porque

- (1) al igual que *B.napus*, pertenece a la familia de las *Brassicaceas*
- (2) la comparación de las respectivas secuencias aminoacídicas de Trx-m y Trx-f mostró un elevado porcentaje de identidad y
- (3) la incorporación de genes heterólogos no presenta inconvenientes técnicos.

2-Transformar plantas de *Arabidopsis* con las construcciones genéticas para obtener varias líneas transgénicas homocigotas e independientes para cada construcción. Analizamos las líneas minuciosamente para determinar la integración adecuada y homocigosis del transgén en el genoma vegetal y la expresión de la Trx respectiva.

3-Estudiar las plantas transgénicas con los niveles de expresión modificados en procesos relacionados al metabolismo del carbono como fotosíntesis, crecimiento y desarrollo de la planta.

4-Analizar la contribución de las Trxs a la respuesta antioxidante al estrés oxidativo generado por diferentes agentes (Metil viológeno, Hidroperóxido de cumeno, rosa de bengala, Dietilmaleato, Diamida, metales pesados y NaCl).

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO I

PREPARACION DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS

1-DISEÑO DE LAS CONSTRUCCIONES

En nuestro laboratorio fueron clonadas las Trx-m y Trx-f a partir de una biblioteca de ADNc de hojas verdes de colza (*Brassica napus*) [171][172]. La comparación de las mismas con las Trxs de *Arabidopsis* reveló que la estructura primaria de las respectivas proteínas presentaba un alto porcentaje de identidad con las Trx-m1 (81.4 %) y Trx-m2 (68.9 %) y con las Trx f1 (87.1 %) y Trx-f2 (72 %) (Figura 1-A y B). Esta alta homología de ambas secuencias con las Trx de *Arabidopsis* fue ligeramente superior cuando se compararon las secuencias nucleotídicas; la Trx-m y la Trx-f mostraron una elevada identidad de bases con la Trx-m1 (81 %) y Trx-m2 (72 %) y con la Trx-f1 (85%) y Trx-f2 (79 %), respectivamente. Este estrecho parentesco entre *Arabidopsis* y *B. napus* -ambas *Brassicaceae*-, permitió utilizar los ADNc de colza para transformar las plantas de *Arabidopsis*, y en consecuencia, aprovechar ventajosamente las técnicas genéticas y de biología molecular disponibles para esta última (Ver Introducción, pg 22).

La gran mayoría de las proteínas cloroplásticas son codificadas por el genoma nuclear. En consecuencia, estos genes expresan precursores de proteínas cuyo péptido señal es procesado luego del reconocimiento por el sistema de traslocación de proteínas al cloroplasto. Un claro ejemplo son las Trxs cloroplásticas, que se traducen en el citoplasma y luego son transportadas al estroma de la organela. En base a ello utilizamos la secuencia de la proteína precursora (incluyendo el péptido señal) en la construcción de las líneas que sobre-expresan la respectiva Trx con el objetivo de facilitar la biosíntesis en el citosol, luego el procesamiento en la cubierta cloroplástica y finalmente la traslocación al estroma.

Es ampliamente conocido que la región N terminal del polipéptido precursor de las proteínas estromáticas contiene generalmente las estructuras primarias más variables mientras que la región C terminal es más conservada. Congruente con esta idea, el alineamiento de las Trxs de *B. napus* y *Arabidopsis* confirmó la escasa identidad en las secuencias del péptido tránsito; 7.4% y 14.7% para la Trx-f y Trx-m, respectivamente (Figura 1). Por este motivo, las secuencias del precursor o de la proteína madura (más conservada) fueron utilizadas alternativamente para producir el ARN antisentido de las Trxs que redujera posteriormente la traducción de la proteína correspondiente.

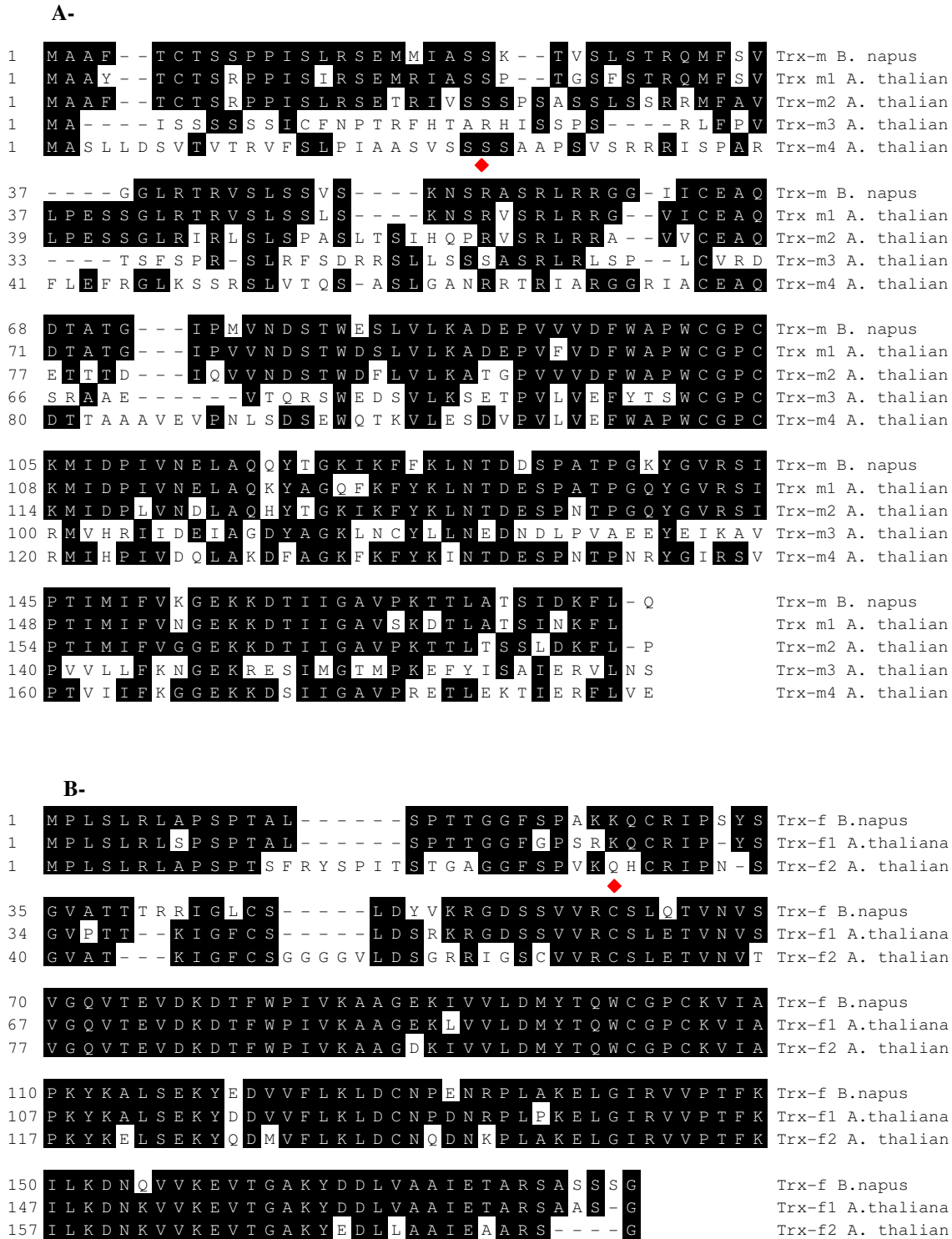


Figura 1. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las Trx-m y Trx-f de *B. napus* y *Arabidopsis*.

La alineación fue realizada con el programa MegAlign (DNA STAR Inc Madison USA). Los aminoácidos idénticos fueron remarcados en negro. **A-Trx-m:** *B. napus* (BNU76831), Trx-m1 (AF095749), Trx-m2 (AF095750), Trx-m3 (AF095751) y Trx-m4 (AF095752). **B-Trx-f:** *B. napus* (AF018174), Trx-f1 (AF144385) y Trx-f2 (AF144386), ♦: Comienzo de proteína madura según ChloP.

Es destacable en este contexto que, aunque todas las Trxs presentan un motivo de plegamiento común denominado “Trx-fold”, las secuencias aminoacídicas de las diferentes isoformas de Trxs (Trx-m, Trx-f, Trx-o, Trx-h) difieren ampliamente (identidad cercana al 20 %) (Tabla 1). Esta característica posibilita obtener plantas con contenidos variables de una de las Trxs cloroplásticas sin afectar sensiblemente la expresión de las demás isoformas, y de esta manera estudiar la contribución de cada una en los distintos procesos fisiológicos.

Tabla 1: Porcentaje de similitud de aminoácidos entre las Trxs de *B. napus* y *Arabidopsis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
1	█	81.4	68.9	27.7	44.6	19.2	19.2	19.2	27.5	25.4	21.6	21.2	29.1	21.0	18.2	1	Trx-m <i>B. napus</i>
2	14.3	█	73.7	27.7	44.1	20.7	20.2	20.7	25.1	27.2	22.4	21.2	30.0	19.3	18.9	2	Trx-m1 <i>A. thaliana</i>
3	24.4	23.5	█	27.2	43.0	20.3	20.2	18.4	23.4	27.2	23.1	21.2	28.2	17.6	18.2	3	Trx-m2 <i>A. thaliana</i>
4	66.3	67.1	69.0	█	34.7	17.9	17.3	16.8	22.8	21.9	22.4	15.3	20.0	15.1	17.6	4	Trx-m3 <i>A. thaliana</i>
5	50.8	51.4	51.9	67.4	█	17.6	17.4	18.4	25.1	28.9	23.9	25.4	30.9	24.4	20.1	5	Trx-m4 <i>A. thaliana</i>
6	78.4	77.4	79.2	78.7	80.1	█	87.1	72.0	20.5	28.1	24.6	25.4	29.1	21.8	19.5	6	Trx-f <i>B. napus</i>
7	79.9	78.9	80.6	78.8	79.7	9.0	█	75.3	20.5	28.1	25.4	25.4	28.2	21.0	18.2	7	Trx-f1 <i>A. thaliana</i>
8	78.9	79.2	81.1	78.3	79.6	17.2	16.8	█	19.9	27.2	23.1	25.4	29.1	21.0	19.5	8	Trx-f2 <i>A. thaliana</i>
9	70.3	71.8	73.8	77.0	69.1	76.6	75.0	76.7	█	21.1	26.9	21.2	20.9	20.2	19.5	9	Trx-x <i>A. thaliana</i>
10	66.4	65.1	65.4	72.8	66.1	66.1	65.2	66.4	69.9	█	43.0	60.5	57.3	59.6	28.9	10	Trx-h1 <i>A. thaliana</i>
11	74.8	72.1	74.6	75.0	74.0	72.0	71.2	73.5	67.8	55.8	█	39.0	42.7	42.9	25.4	11	Trx-h2 <i>A. thaliana</i>
12	70.1	70.5	70.1	75.0	71.7	70.7	70.4	69.9	70.1	37.2	58.0	█	58.2	73.7	28.0	12	Trx-h3 <i>A. thaliana</i>
13	66.3	67.0	69.2	74.0	67.0	65.4	65.4	64.8	70.7	39.4	53.2	36.1	█	58.2	23.6	13	Trx-h4 <i>A. thaliana</i>
14	71.0	71.4	73.8	78.8	73.5	71.6	72.2	72.6	72.0	36.1	50.9	26.3	37.0	█	25.2	14	Trx-h5 <i>A. thaliana</i>
15	74.1	73.3	70.7	77.2	74.8	77.0	77.2	76.3	73.8	67.3	72.9	68.8	69.7	72.3	█	15	Trx-o <i>A. thaliana</i>
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		

La tabla fue realizada con el programa MegAlign (DNA STAR Inc Madison USA) y compara la similitud (extremo derecho) o divergencia (extremo izquierdo) de la secuencia de aminoácidos de cada Trx respecto a las demás: 1-Trx-m *B.napus* , 2-Trx-m1 *A.thaliana*, 3-Trx-m2 *A.thaliana*, 4-Trx-m3 *A.thaliana*, 5-Trx-m4 *A.thaliana*, 6-Trx-f *B.napus*, 7-Trx-f1 *A.thaliana*, 8-Trx-f2 *A.thaliana*, 9-Trx-x *A.thaliana*, 10-Trx-h1 *A.thaliana*, 11-Trx-h2 *A.thaliana*, 12-Trx-h3 *A.thaliana*, 13-Trx-h4 *A.thaliana*, 14-Trx-h5 *A.thaliana*, 15 Trx-o *A.thaliana*. Los óvalos rojos señalan la similitud con las Atm1 y Atm2, mientras que los óvalos azules señalan la similitud con la Atf1 y Atf de *Arabidopsis*.

2-PREPARACIÓN DE LAS CONSTRUCCIONES GENÉTICAS

De acuerdo a las consideraciones planteadas en el punto 1 (Diseño de las construcciones, pg 27), fueron preparados seis plásmidos para la transformación de las plantas (Tabla 2):

Tabla 2. Construcciones genéticas para la transformación de las plantas

Denominación	Descripción
OE 1 pTrx-f	Precursor de la Trx-f sentido
OE 6 pTrx-m	Precursor de la Trx-m sentido
AS 2 pTrx-f	Precursor de la Trx-f antisentido
AS 3 Trx-f	Trx-f madura antisentido
AS 4 pTrx-m	Precursor de la Trx-m antisentido
AS 5 Trx-m	Trx-m madura antisentido

OE: over express (sobre expresión del precursor sentido), AS: antisense (orientación antisentido).

Las construcciones fueron realizadas sobre el vector binario pBI121 por su capacidad para replicar en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* (Ver Materiales y Métodos, Apéndice III pg 106). Los fragmentos del ADNc del precursor de la Trx-f o Trx-m de colza, fueron subclonados en orientación sentido para obtener posteriormente la sobre-expresión de la proteína respectiva. En cambio, los fragmentos del ADNc de la forma precursora o madura de la Trx-f o Trx-m fueron subclonados en orientación antisentido para disminuir el tenor del ARNm codificante. En todos los casos los fragmentos fueron ubicados en fase con el promotor del gen 35S del virus del mosaico del Coliflor (CaMV) porque su característica de promotor fuerte y constitutivo permitiría obtener un alto nivel de transcripción para los ADNc (Figura 2).

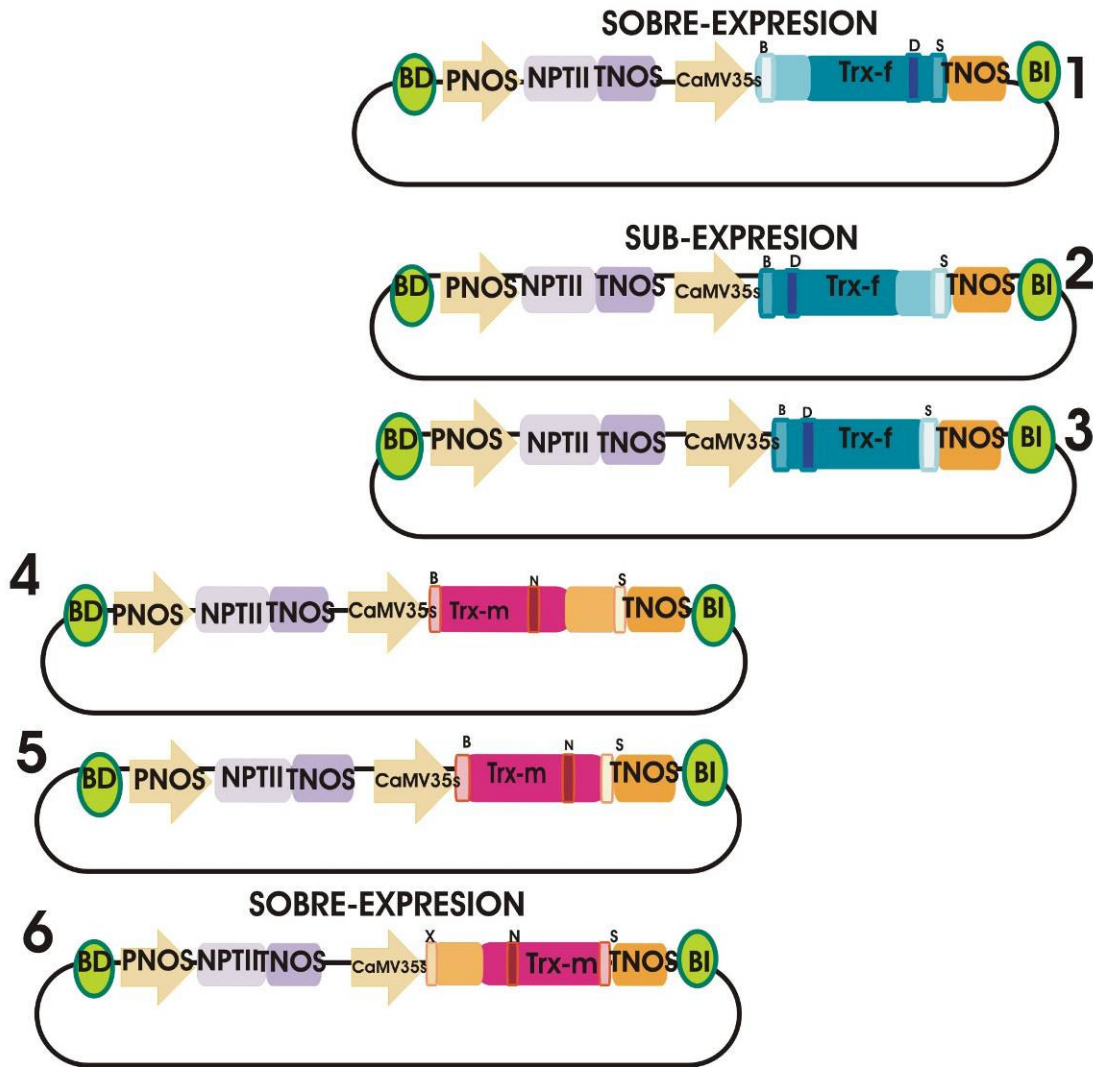


Figura 2. Construcciones genéticas en el plásmido pBI121.

Los fragmentos del ADNc de la forma madura o precursora de la Trx-f o Trx-m de colza, fueron subclonados en fase con el promotor del gen 35S del virus CaMV en el plásmido binario pBI121, en orientación sentido o antisentido. (1) OE-1 pTrx-f, (2) AS-2 pTrx-f, (3) AS-3 Trx-f, (4) AS-4 pTrx-m, (5) AS-5 Trx-m y (6) OE-6 pTrx-m. N: NcoI; D: DraI; X: XbaI; B: BamHI; S: SstI; PNOS: promotor nopalina sintetasas; NPTII: neomicina fosfotransferasa II; TNOS: terminador nopalina sintetasas; BD: borde derecho y BI: borde izquierdo del ADN-T; : Péptido señal de Trx-f y Trx-m respectivamente.

Una vez obtenidas las construcciones, se transformaron bacterias y se seleccionaron por resistencia a Kanamicina. El ADN plasmídico de las colonias obtenidas fue purificado y analizado por PCR y digestión enzimática para verificar la orientación e integridad del ADNc. Los plásmidos correspondientes a las construcciones OE-1 pTrx-f, AS-2 pTrx-f, AS-3 Trx-f, AS-4 pTrx-m y AS-5 Trx-m fueron digeridos con las enzimas BamHI/SstI. El plásmido de la construcción OE-6 pTrx-m fue analizado por digestión con las enzimas XbaI/SstI. Fueron seleccionadas las colonias que liberaron fragmentos de ca. 550 pb para los precursores sentido y antisentido de la Trx y ca. 350 pb para la forma madura de la Trx antisentido (resultados no mostrados). En particular para el caso de las colonias transformadas con las construcciones AS-3 Trx-f y AS-4 pTrx-m fueron seleccionadas aquellas colonias cuyos plásmidos liberaron luego de la digestión enzimática fragmentos de ca. 350 pb y 530 pb (Figura 3-A).

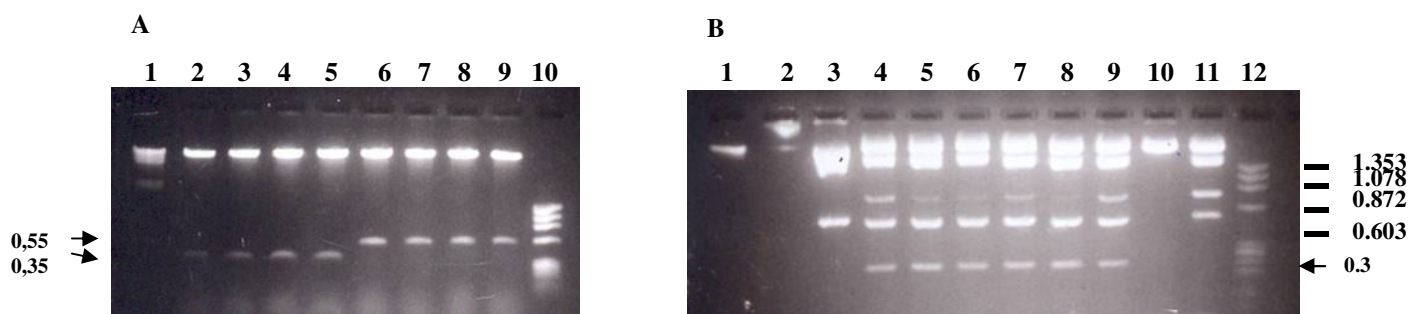


Figura 3. Análisis por restricción de las construcciones genéticas.

Los plásmidos de colonias transformadas con las construcciones AS-3 Trx-f y AS-4 pTrx-m fueron purificados mediante una minipreparación de ADN y digeridos con A-BamHI-SstI o B-XbaI-NcoI. El producto de la digestión fue analizado en geles de agarosa 1 y 2 % (p/v) respectivamente. A: 1- λ /HindIII, 2-5 colonias de construcción AS-3 Trx-f, 6-9 colonias construcción AS-4 pTrx-m, 10: ϕ X174/ HaeIII. B: 1- λ /HindIII, 2-pBI121, 3-pBI121 XbaI-NcoI, 4-9: Colonias de la construcción AS-4 pTrx-m, 10: pBI121 XbaI, 11: pBI121 NcoI, 12: ϕ X174/ HaeIII.

Para profundizar en el análisis, se realizó una segunda digestión que incluyó una enzima de restricción cuyo sitio de corte era interno al ADNc; i.e. DraI y NcoI para las construcciones que contienen Trx-f y Trx-m respectivamente. En el primer caso la digestión permitió discriminar la orientación del ADNc en el pBI121, liberando un fragmento de 488 pb sólo cuando la orientación era sentido (resultados no mostrados). En el segundo caso permitió ratificar el patrón de digestión adecuado para la Trx-m (Figura 3-B). Esto se pudo observar en las colonias transformadas con la construcción AS-4 pTrx-m, la presencia del ADNc en la construcción permitió la aparición de nuevos fragmentos de ca. 300 pb (calle 4-9, Figura 3-B) que no se obtendrían al digerir el plásmido pBI121 con las mismas enzimas (calle 3, 10 y 11, Figura 3-B).

Mediante estos procedimientos confirmamos la correcta orientación de los fragmentos subclonados, obteniéndose así seis plásmidos que codifican para el precursor de Trx-f (OE-1 pTrx-f), el precursor de Trx-m (OE-6 pTrx-m), y el ARN antisentido de la Trx-f (AS-2 pTrx-f, AS-3 Trx-f) y la Trx-m (AS-4 pTrx-m, AS-5 Trx-m) (Tabla 2). Luego de verificar la integridad de los fragmentos de ADN por secuenciación automática (resultados no mostrados), las construcciones fueron utilizadas para transformar via electroporación a cepas competentes de *A. tumefaciens*. Las colonias resistentes a la Kanamicina fueron aisladas, identificadas adecuadamente y utilizadas posteriormente en la transformación vegetal.

3-Transformación de las plantas

La transferencia de los genes a las plantas fue realizada mediante infección con cepas de *A. tumefaciens*, un patógeno natural de algunas plantas dicotiledóneas, transformadas con los seis plásmidos generados en el vector binario pBI121 (Ver Apéndice III, pg 106). Implementamos dos métodos alternativos con el objetivo de alcanzar una transformación eficiente de *Arabidopsis*:

A-Transformación de explantos de raíz y regeneración somática

B-Transformación por inmersión floral.

3A-Transformación de explantos de raíz y regeneración somática

La estrategia de transformación inicialmente elegida fue la infección de explantos axénicos de raíces de *A. thaliana*, ecotipo Landsberg erecta con las cepas de *A. tumefaciens* LBA4404, y posterior regeneración de la planta por organogénesis somática indirecta [173]. Luego del cocultivo del material vegetal con *A. tumefaciens*, fueron seleccionados los callos resistentes a Kanamicina e inducidos para la formación de distintos órganos secuencialmente mediante el uso de concentraciones variables de factores de crecimiento vegetal.

Inicialmente la formación de callos fue llevada a cabo cultivando los explantos 5 días en medio CIM (callus inducing medium), con alta relación auxinas: citocininas (0.5/0.05). La posterior exposición a la luz de los mismos en un medio con una relación alta de citocininas: auxinas (5/0.15) produjo brotes luego de 45-60 días (Figura 4).

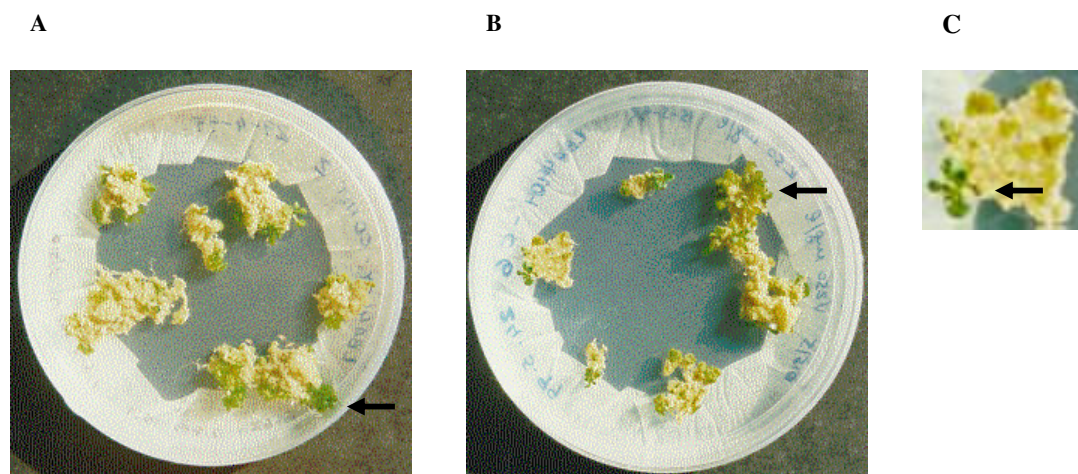


Figura 4. Inducción de brotes transgénicos en callos resistentes a Kanamicina.

Los callos infectados con las cepas de *A. tumefaciens* electroporadas con las seis construcciones fueron cultivados en medio SIM (shoot inducing medium) (suplementado con Kanamicina y Vancomicina) para permitir el desarrollo de brotes. Fotografía de callos transformados con **A-AS-2 pTrx-f** y **B-OE-6 pTrx-m**. **C** Detalle de un brote proveniente de la transformación con OE-6 pTrx-m. Las flechas señalizan los brotes.

Los brotes resistentes a Kanamicina que exhibían un aspecto saludable fueron cultivados en el medio RIM (root inducing medium) conteniendo ácido naftalenacético para inducir la generación del sistema radicular (Figura 5).

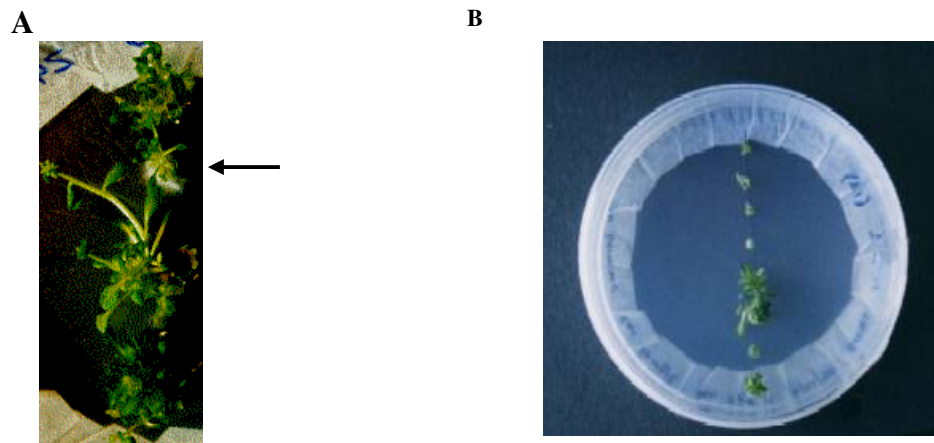


Figura 5. Inducción del sistema radicular en brotes transgénicos.

Brotes resistentes a Kanamicina infectados previamente con las cepas de *A. tumefaciens* electroporadas con los diferentes plásmidos fueron cultivados en medio RIM para permitir el desarrollo de raíces. Fotografía de brotes **A**-OE-6 pTrx-m, y **B**-OE-1 pTrx-f. La flecha señala la aparición de raíces.

Al aparecer las primeras raíces entre la primera y segunda semana, el tejido vegetal fue transferido a medio de germinación (MG) para continuar con su desarrollo (Figura 6).



Figura 6. Desarrollo de líneas transgénicas en medio de cultivo suplementado con Kanamicina.

Los brotes enraizados fueron cultivados en medio MG suplementado con Kanamicina y Vancomicina a 22° C y fotoperíodo prolongado (16 hs luz/ 8 hs oscuridad). Fotografía de una línea que sobre-expresa el precursor de la Trx-f (OE-1 pTrx-f).

Aunque el crecimiento en cajas magenta permite el intercambio de gases a través de las tapas (diámetro filtro: 2 cm), las plantas no concluyeron su desarrollo por cuanto carecían de silículas o las mismas eran abortivas (Figura 6). Asumiendo que la acumulación de etileno y/o la elevada humedad en el recipiente interrumpían el desarrollo, implementamos las siguientes variantes:

i-Las plántulas fueron transferidas a macetas (rusticación) y cubiertas inicialmente con “film”. Este intento no resultó ya que el cambio brusco en la humedad relativa generado por el pasaje del crecimiento *in vitro* a macetas, provocaba el marchitamiento prematuro de las plantas sin completar su desarrollo.

ii-Las plántulas fueron transferidas a Erlenmeyers de 500 ml con tapones que permitían un mayor intercambio gaseoso. Aunque el crecimiento mejoró, las plantas presentaron

silículas sin semillas (Figura 7). Por este motivo, procedimos a la tercera variante para disminuir la concentración de etileno en el recipiente.

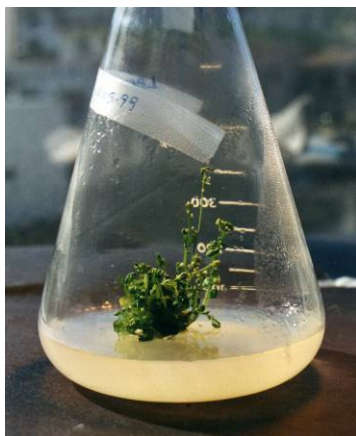


Figura 7. Desarrollo de líneas transgénicas resistentes a Kanamicina con mejor intercambio gaseoso.

Las plantas fueron cultivadas en medio MG, en amplios erlenmeyers con tapones que permitían un mejor intercambio gaseoso. Fotografía de una línea transgénica AS-2 pTrx-f.

iii-El procedimiento escogido para disminuir el contenido de etileno fue mantener las condiciones experimentales descritas en (ii) incorporando al medio de cultivo nitrato de plata, reconocido inhibidor de la síntesis del etileno [174]. Aunque estas modificaciones mejoraron el desarrollo de las plantas adultas, sólo algunas pocas produjeron semillas (Figura 8).



Figura 8. Desarrollo de líneas transgénicas resistentes a Kanamicina en presencia de Nitrato de plata.

Las plantas fueron cultivadas en medio MG suplementado con AgNO_3 0.1 mM, Kanamicina, Vancomicina, en amplios erlenmeyers con tapones que permitían un mejor intercambio gaseoso. Fotografía de una línea transgénica AS-2 pTrx-f.

A pesar de todas las modificaciones ensayadas, el método de infección de explantos de raíces y organogénesis somática, no permitió cosechar cantidades suficientes de semillas de todas las construcciones para los experimentos posteriores. Por este motivo, optamos por un procedimiento alternativo para la transformación de las plantas.

3B-Transformación por inmersión Floral

Para este procedimiento fueron utilizadas plantas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia 0, cultivadas en cámara de cultivo a 21-22° C durante 30-40 días aproximadamente bajo fotoperíodo largo (16 hs luz, 8 hs de oscuridad). Las inflorescencias con primordios florales en distintos estadios de desarrollo, fueron infiltradas con la cepa de *A. tumefaciens* GV3101 portando las distintas construcciones. Luego de 15-30 días las flores fructificaron produciendo silículas con semillas

maduras (F0) (Figura 9, paso 1-2) [175]. Estas semillas fueron desinfectadas y sembradas en medio MG selectivo (Figura 9, paso 3) para permitir su germinación y desarrollo posterior. Las plántulas F0 dotadas de resistencia a la Kanamicina (transformadas) completaron el ciclo de vida hasta producir semillas maduras (F1) (Figura 9, paso 4-5) mientras que las sensibles (sin transformar) detuvieron el crecimiento a las 2-3 semanas. La mayoría de las plántulas transgénicas originadas por la técnica de inmersión floral provienen de eventos de transformación independiente [176].

Método de transformación

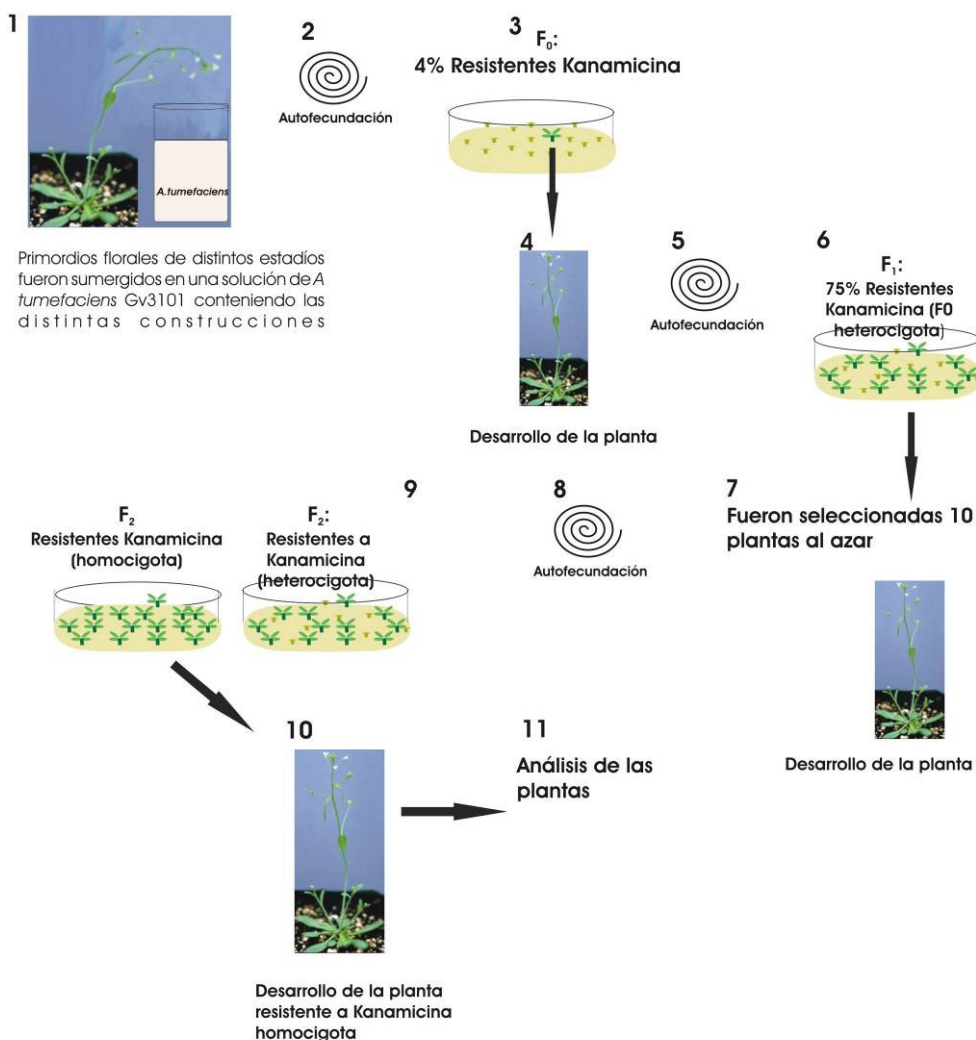


Figura 9. Transformación vegetal por inmersión floral y establecimiento de las líneas transgénicas

Plantas con flores en distintos estadios fueron sumergidas en medio de infiltración con *A. tumefaciens* portando las distintas construcciones (paso 1). Las semillas maduras (F0) (Paso 1-2) fueron desinfectadas y sembradas en medio MG selectivo (paso 3). Sólo las plántulas F0 resistentes a Kanamicina (transformadas) pudieron completar el ciclo de vida hasta producir semillas F1 (paso 4-5), mientras que las sensibles (sin transformar) detuvieron el crecimiento a las 2-3 semanas. Estas semillas F1 fueron desinfectadas y sembradas en medio MG selectivo para permitir el desarrollo de las plantas resistentes. Sólo fueron seleccionadas las semillas F1 cuyo desarrollo exhibiera un 75% de plantas resistentes a Kanamicina (transformadas). Es decir que el transgén se incorporó en una sola copia del genoma nuclear de las plantas F0 (heterocigotas) y por lo tanto la segregación del mismo en la siguiente generación F1 fue del 75% (relación 3:1) (paso 6). De estas progenies F1 fueron seleccionadas al azar 10 plantas resistentes a Kanamicina (paso 7) que se desarrollaron hasta producir semillas maduras F2 (paso 8). Para identificar las plantas homocigotas en su resistencia a Kanamicina, las semillas F2 fueron desinfectadas, sembradas en medio MG selectivo y cultivadas hasta permitir el desarrollo de las plantas resistentes al antibiótico. Finalmente fueron seleccionadas las plantas F1 cuya progenie F2 exhibía un 100 % de resistencia al antibiótico (homocigotas) (paso 9 y 10).

4-Análisis y caracterización de las plantas

4A-Identificación del ADNc de la Trx mediante PCR

Para confirmar la presencia del gen que codifica para las Trxs en las plantas resistentes a Kanamicina, el ADN genómico fue extraído y el fragmento de interés amplificado mediante PCR utilizando oligonucleótidos que hibridizan con (i) el terminador de la nopalina sintetasa y (ii) el promotor del 35S del CaMV, ambos presentes en el ADN-T a cada lado del gen correspondiente (Figura 2). Adoptamos esta estrategia porque la integración del borde izquierdo del ADN-T (cerca del gen de interés) en el genoma vegetal es mucho menos eficiente que la integración del borde derecho (cerca del gen *npII*). Congruente con una transformación eficiente, la amplificación por PCR de las plantas portando las construcciones OE-1 pTrx-f, OE-6 pTrx-m, AS-2 pTrx-f y AS-4 pTrx-m produjo un fragmento de 1,6 kb en la electroforesis en gel de agarosa mientras que las líneas transformadas con las construcciones AS-3 Trx-f y AS-5 Trx-m exhibieron un fragmento de 1.4 kb (Figura 10).

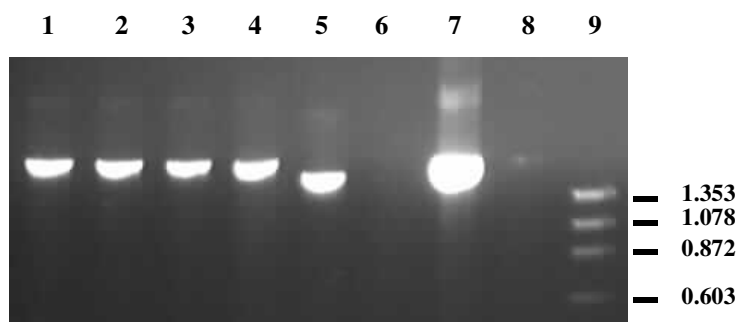


Figura 10. Amplificación de un fragmento de ADN-T que contiene los ADNc del precursor de Trx-m

La reacción de PCR fue realizada con los oligos (1201/ 1224) y ADN genómico de las líneas transgénicas. 1-OE 6 pTrx-m1, 2-OE 6 pTrx-m2, 3-OE 6 pTrx-m3, 4-OE 6 pTrx-m4, 5-OE 6 pTrx-m7, 6-Columbia salvaje, 7-ADNc precursor de Trx-m, 8-Control negativo y los oligos 1201 y 1224 que amplifican un fragmento del ADN-T que contiene al ADNc de la Trx de interés. 9-ØX174/HaeIII. La electroforesis de los productos obtenidos fue realizada en gel de agarosa 1% (p/v).

Cuando las líneas vegetales OE 6 pTrx-m1, -m2,-m3, -m4 (transformadas con el precursor de la Trx-m) suministraron el ADN molde, la PCR produjo un fragmento 1,6 Kb (calle 1-4, Figura 10), idéntico al obtenido con el vector binario utilizado en la transformación (OE-6 pTrx-m) como molde (calle 7, Figura 10). En línea con nuestras expectativas, el fragmento de 1,6 kb no fue observado cuando utilizamos como molde el ADN genómico de plantas salvajes (calle 6, Figura 10). En cambio, la línea OE-6 pTrx-m7 fue descartada porque el tamaño del fragmento resultó menor al esperado (calle 5, Figura 10). Estudios similares fueron llevados a cabo con todas las líneas preparadas (resultados no mostrados).

4B-Determinación de la abundancia de proteína Trx mediante Western blot

La correcta transcripción conjuntamente con una adecuada traducción es necesaria para la expresión de las Trx. La inserción del ADNc en el cromosoma vegetal no asegura que ambos eventos ocurran sucesivamente porque las metilaciones del ADN y/o los posicionamientos en diferentes entornos genéticos o mutaciones puntuales de los genes pueden alterar la coordinación necesaria. Por ello, para establecer la correcta expresión y la abundancia de las Trx, realizamos los ensayos de “Western-blot” con las líneas transgénicas que sobre-expresan el precursor de la Trx-m (OE-6 pTrx-m), el precursor de la Trx-f (OE 1 pTrx-f) y las líneas antisentido (AS-2pTrx-f, AS-3 Trx-f, AS-4pTrx-m y AS-5 Trx-m).

Plantas que sobre-expresan Trx-m (OE-6 pTrx-m)

En consonancia con el estrecho parentesco de colza con *Arabidopsis*, los primeros ensayos de “Western-blot” utilizando extracto de ambas plantas mostraron que el antisuero policlonal producido en conejo contra la Trx-m recombinante de la primera reconoció a su contraparte de la segunda; aunque la intensidad de las bandas era menor, ambas exhibían la misma movilidad electroforética (datos no mostrados).

Este antisuero identificó una banda en las plantas de *Arabidopsis* salvajes (calle 2, Figura 11-A) y plantas transgénicas OE-6 pTrx-m (calle 1, 3, 5 y 6, Figura 11 A) de igual peso molecular que la Trx-m de colza recombinante (calle 4, Figura 11-A). La banda obtenida en las plantas salvajes de *Arabidopsis* seguramente es la Trx-m1 de *Arabidopsis* (81,4 % identidad de aminoácidos), sin descartar que otras isoformas comigren y reaccionen con el antisuero también. La presencia de una banda de igual peso molecular y mayor intensidad en las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m indicaría que el transgén de colza se transcribe y traduce adecuadamente en un sistema heterólogo. Asimismo, la banda con una migración electroforética correspondiente a la Trx madura de colza (ca 12 KDa), revelaría que el producto del gen de la Trx de colza es correctamente importado y procesado en los cloroplastos de las líneas transgénicas de *Arabidopsis*.

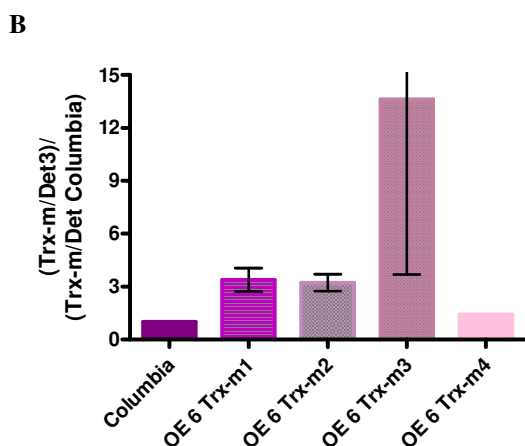
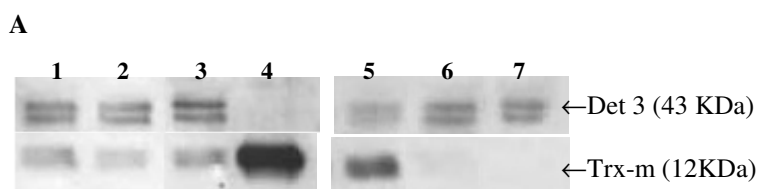


Figura 11. Expresión de la Trx-m en líneas transgénicas OE-6 pTrx-m

A- Proteínas totales (50 µg) provenientes de hojas adultas (30 días); 1:OE-6 pTrx-m1, 2:Columbia, 3:OE-6 pTrx-m2, 4:Trx-m madura recombinante de colza, 5:OE-6 pTrx-m3, 6:OE-6 pTrx-m 4, 7:Columbia, fueron separadas en un gel de poliacrilamida 10 %, electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas en una solución que contenía dos antisueros: i) una dilución 1/300 del AS específico α Trx-m recombinante de colza y ii) una dilución 1/3000 de un AS α Det 3 VAtPasa de *Arabidopsis* (control de carga). Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia, y expuestas en placas de rayos X.

B- Las bandas correspondientes a la Trx-m y a Det3 fueron cuantificadas por densitometría óptica relativa y establecida la relación de Trx-m/Det 3. Luego cada valor obtenido fue normalizado en relación al observado para la planta salvaje en dos experimentos independientes. El gráfico expresa la media \pm SEM para cada línea transgénica.

Para estimar la abundancia de proteína Trx en las diferentes líneas vegetales las imágenes de los “Western blot” fueron cuantificadas por densitometría óptica relativa (software Optic Densitometry). Los valores asignados a la banda correspondiente de la Trx (12 KDa) en cada línea OE-6 pTrx-m fueron relativizados a los valores asignados a Det 3, la subunidad C de la V-ATPasa de *Arabidopsis* (control de carga) (43 KDa) [177] y comparados con los obtenidos para las plantas salvajes de *Arabidopsis*. Estos valores demuestran que la abundancia de Trx-m en las líneas OE-6 pTrx-m1 ($3,4 \pm 0,7$), OE-6 pTrx-m2 ($3,2 \pm 0,5$), OE-6 pTrx-m3 ($13,6 \pm 9,9$) y un poco menos en OE-6 pTrx-m4 (1,4) fue superior a la observada en su contraparte salvaje (Figura 11-B). La variación del nivel de Trx-m entre las diversas líneas transgénicas que surge de la cuantificación es frecuente y se origina por la recombinación al azar del transgén en diferentes entornos genéticos del genoma. Por ello, para establecer si la localización del transgén en las plantas OE-6 pTrx-m condicionaba el contenido de Trx-m, consideramos la expresión de Trx-m (relativizada a Det 3) de todas las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m como un único grupo y lo comparamos con las líneas salvajes. El estudio estadístico de prueba de t demostró que, independiente de la línea considerada, el nivel de Trx-m en las plantas transformadas ($0,31 \pm 0,05$) era superior a la contraparte salvaje ($0,01 \pm 0,003$).

Dado que el anticuerpo utilizado no era muy eficiente para detectar la banda de la Trx-m salvaje de *Arabidopsis*, fue necesario emplear niveles elevados de proteína total y además permitir la saturación en la auto-radiografía para obtener esta cuantificación. (Figura 11-B). Dos nuevas preparaciones en conejos utilizando la Trx-m recombinante de colza suministraron anticuerpos policlonales con títulos cercanos a 1/300. La oscilación de 1,5 a 10 veces en los numerosos “Western-blot” realizados, probablemente debido a la saturación de la placa radiográfica, indicó que el ensayo subestimaba el aumento en el contenido de la Trx-m en las líneas transgénicas y dificultaba la correcta cuantificación de la proteína. No obstante podemos remarcar que obtuvimos varias líneas transgénicas independientes que sobre expresan Trx-m que contienen mayor abundancia de Trx-m madura (12KDa) y representan una herramienta importante para continuar con los estudios posteriores.

Plantas que sobre-expresan Trx-f (OE-1 pTrx-f)

El antisuero producido en conejos contra la Trx-f recombinante de colza reconoció (ca. 12 KDa) en los extractos de hojas de *Arabidopsis* y de colza una proteína cuya migración electroforética era más lenta que la contraparte recombinante (datos no mostrados). Esta misma banda fue observada en las líneas transgénicas de *Arabidopsis*, indicando no sólo que estas plantas transcribieron y tradujeron adecuadamente el transgén de la Trx-f sino también procesaron e importaron a los cloroplastos la proteína respectiva (Figura 12 A).

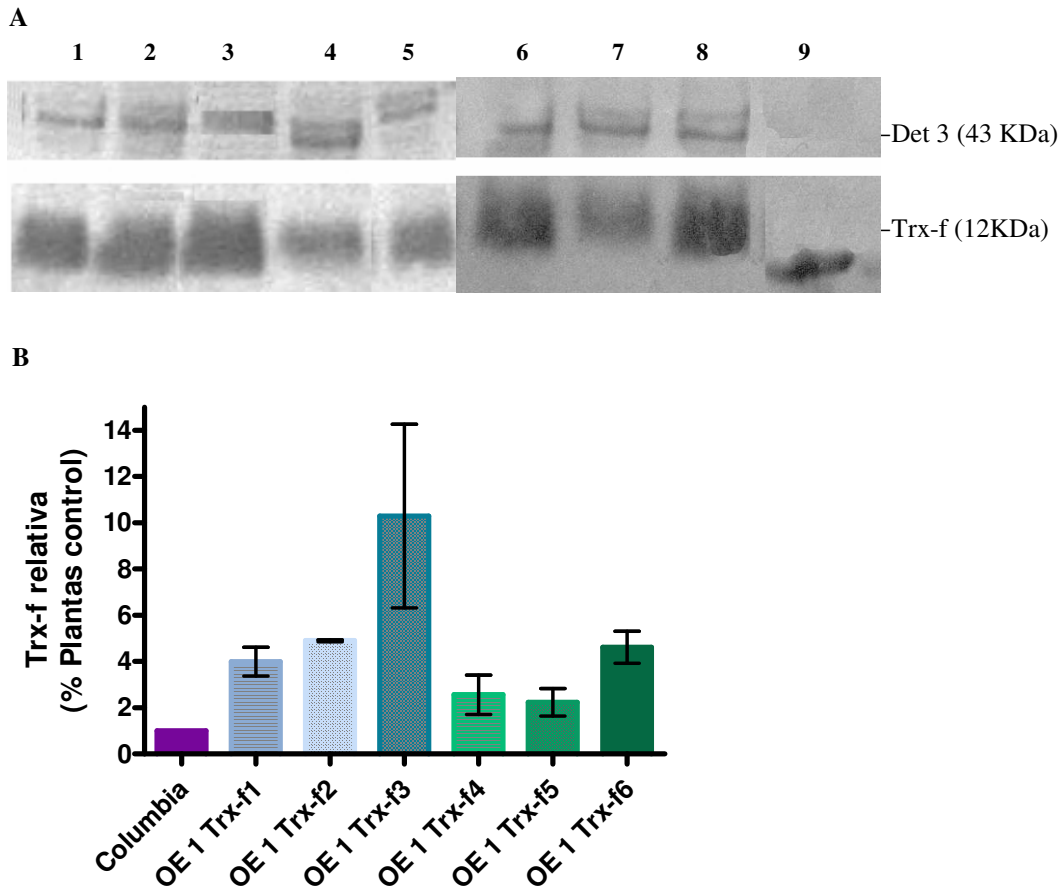


Figura 12. Expresión de la Trx-f en líneas transgénicas OE 1 pTrx-f.

A- Proteínas totales (50 µg) proveniente de hojas adultas (30 días) fueron analizadas en un SDS PAGE 10%. Las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas en una solución que contenía dos antisueros: i) una dilución 1/500 del AS específico α Trx-f recombinante de colza, ii) una dilución 1/3000 de un AS α Det 3 VATPasa de *Arabidopsis* (control de carga). Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia, y expuestas en placas de rayos X. 1:-OE 1 Trx-f 1, 2-OE 1Trx-f 2, 3-OE 1 Trx-f 3, 4-Columbia, 5: OE 1Trx-f 4, 6-OE 1 Trx-f 5, 7: Columbia, 8: OE-1 Trx-f 6, 9: Trx-f madura recombinante de colza.

B- Las bandas correspondientes a la Trx-f y a Det3 fueron cuantificadas por densitometría óptica relativa y establecida la relación de Trx-f/Det 3. Luego cada valor obtenido fue normalizado en relación al observado para la planta salvaje en dos-cuatro experimentos independientes. El gráfico expresa la media \pm SEM para cada línea transgénica.

Llamativamente los ensayos de “Western-blot” presentaron una banda ancha difusa. Este comportamiento electroforético (1)- representaría una doble banda poco definida correspondiente a

las Trx-f1 y Trx-f2 de *Arabidopsis*, o (2) resultaría de modificaciones post-traduccionales en una o ambas isoformas de la Trx-f de *Arabidopsis*.

(1)-La identificación de ambas isoformas en la doble banda, fué descartada luego de analizar la expresión del ARNm de la Trx-f1 (At3g02730) y la Trx-f2 (At5g16400) de *Arabidopsis* mediante GENEVESTIGATOR [1]. En condiciones normales de cultivo, la expresión de la Trx-f1 es 3 veces mayor a la Trx-f2. (resultados no mostrados). De esta manera la doble banda podría ser producto de (2) una modificación post-traducciona. Congruente con ello, estudios *in vitro* demostraron que de todas las Trx-s cloroplásticas, la única sujeta a glutationilación (formación de disulfuros mixtos entre los tioles de la proteína y el GSH) es la Trx-f debido a la presencia de una cisteína extra muy conservada [178]. Sin embargo esta modificación post traducciona (0,3 Kb) fué vinculada al estrés oxidativo y no sabemos si pudiera ocurrir bajo condiciones normales.

Para cuantificar la abundancia de la proteína correspondiente en las diferentes líneas OE-1 pTrx-f, la proporción de Trx-f/Det3 fue estimada por densitometría óptica de los “Western-blot”, en forma similar a las Trx-m. Los datos obtenidos (media \pm SEM) revelaron que la intensidad de las bandas analizadas (ca 12 KDa) en las líneas transgénicas fue claramente superior a la observada en la contraparte salvaje (Figura 12). En 2-4 experimentos independientes, la Trx-f aumentó en las líneas OE-1 pTrx-f1, -f2, -f3, -f4, -f5 y -f6: ($4,0 \pm 0,62$), ($4,9 \pm 0,04$), ($10,30 \pm 3,97$), ($2,57 \pm 0,85$), ($2,24 \pm 0,59$) y ($4,62 \pm 0,69$) respectivamente, al contenido observado en la planta salvaje. Aunque algunas líneas presentaron una gran variabilidad en la medición, todas al menos duplicaron el nivel de Trx-f respecto al control. Para establecer si la localización del transgén en las plantas OE-1 pTrx-f condicionaba el contenido de Trx-f, consideramos la expresión de Trx-f (relativizada a Det 3) de todas las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f como un único grupo y lo comparamos con las líneas salvajes, tal como lo realizamos para las plantas OE 6pTrx-m. El estudio estadístico de prueba de t demostró que, independiente de la línea considerada, el nivel de Trx-f en las plantas transformadas ($3,46 \pm 0,55$) era superior a la contraparte salvaje ($1,47 \pm 0,61$). Si comparamos estos datos con los observados para la Trx-m podemos notar que el nivel de Trx-f/Det 3 resulta 10 veces mayor que el nivel de Trx-m/Det3 en las plantas salvajes. Esta diferencia en la cuantificación podría deberse a una diferencia en la sensibilidad de detección impuesta por el anticuerpo.

Este estudio permitió obtener 6 líneas transgénicas independientes que sobre-expresan Trx-f y exhiben mayores niveles de Trx-f y, por ende, constituían una herramienta importante para encarar los estudios posteriores.

Plantas antisentido para la Trx-f y Trx-m

Fueron analizadas por Western blot 8 líneas AS-2 pTrx-f, 13 líneas AS-3 Trx-f, 7 líneas AS-4 pTrx-m y 15 líneas AS-5 Trx-m. Todas mostraron resultados similares a los observados para las plantas salvajes de *Arabidopsis* (resultados no mostrados), a excepción de una línea antisentido para la Trx-f: AS-3 Trx-f1. Esta línea transgénica fue identificada tempranamente en el estudio debido a que presentaba un fenotipo clorótico llamativo.

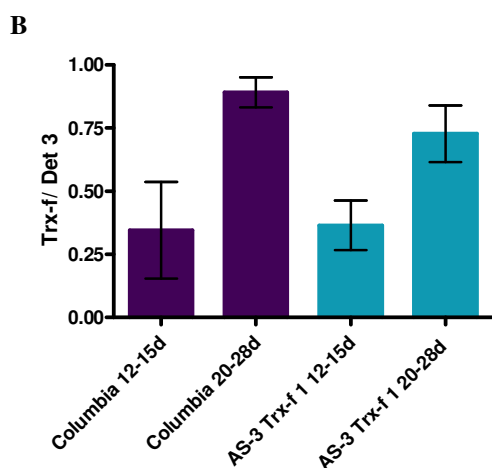
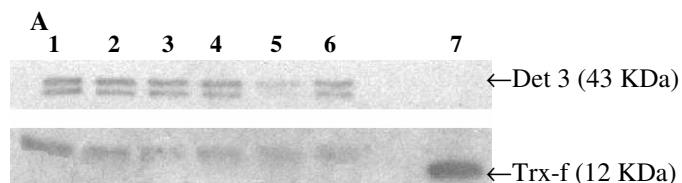


Figura 13. Expresión de la Trx-f en líneas transgénicas AS-3 Trx-f

A- Proteínas totales de hojas (50µg) fueron analizadas en un SDS PAGE 10%, electro- transferidas a una membrana de nitrocelulosa y luego incubadas en SB con i-AS αTrx-f recombinante de colza 1/500 y ii-AS αDet 3 VATPasa de *Arabidopsis* 1/3000 (control de carga). Las bandas fueron reveladas con Luminol, y expuestas en placas de rayos X. **1** y **3**: plantas adultas (20 días) Columbia, **2** y **4**: plantas adultas (20 días) AS 3 Trx-f 1, **5**: plantas jóvenes (12 días): Columbia, **6**: plantas jóvenes AS 3 Trx-f1 y **7**-Trx-f recombinante de colza

B- Las bandas correspondientes a la Trx-f (12 KDa) y a Det3 (43 KDa) fueron cuantificadas por densitometría óptica relativa y establecida la relación de Trx-f/Det 3 en plantas adultas y plantas jóvenes en dos-tres experimentos independientes. El gráfico expresa la media ± SEM para la línea AS-3 Trx-f1 y las plantas salvajes.

Al igual que observamos en el western blot anterior, el antisuero elevado en conejo contra la Trx-f recombinante reconoce en *Arabidopsis* una proteína con una migración electroforética ligeramente más retrasada a la correspondiente Trx-f madura de colza (12 KDa). En este caso no fué identificada la doble banda difusa (Figura 12), a pesar de que la misma fué observada en un 80% de los Western blot realizados (resultados no mostrados).

Aunque parecía mostrar reducción en el nivel proteico, la abundancia de Trx-f en esta línea fue variable. Por ello analizamos plantas jóvenes (12-15 días) y plantas adultas (20-28 días), para verificar si mecanismos de control endógenos dependientes de la edad de desarrollo influenciaban la expresión de proteína en plantas salvajes y/o transgénicas [179-181] (Figura 13 A). La cuantificación de la Trx-f mostró un aumento significativo de la misma con el desarrollo de la

planta (de 15 a 28 días) en líneas vegetales salvajes [(0,35 ± 0,19) a (0,89 ± 0,05)] y transgénicas AS-3 Trx-f 1 [(0,36 ± 0,1) a (0,73 ± 0,11)]. Por otro lado, la comparación de los niveles de Trx-f a los 15 días fué similar en AS-3 Trx-f1 y salvaje [(0,36 ± 0,1) y (0,35 ± 0,19)], mientras que a los 28 días la línea antisentido mostró una ligera reducción en el nivel proteico (0,73 ± 0,11) respecto a la salvaje (0,89 ± 0,05) (Figura 13). El estudio de la expresión de ARNm de las Trx-fs en *Arabidopsis*, mostró que la Trx-f2 nativa presenta una expresión baja y constante durante el desarrollo, mientras que la Trx-f1 presenta niveles máximos de expresión a los 18-21 días, y 25-29 días (resultados no mostrados). Esto sería coherente con la identificación de la diferencia de expresión entre las líneas AS-3 Trx-f1 y salvajes en la planta adulta.

4C-Análisis de la segregación del gen nptII en las líneas transgénicas

Para seleccionar y cosechar líneas transgénicas con un genotipo homogéneo que presenten poca variabilidad entre experimentos, fué estudiada la segregación del gen nptII en la progenie de las plantas que sobre-expresan o plantas antisentido para la Trx. Fueron identificadas aquellas líneas vegetales con un solo evento de integración al genoma y en estado de homocigocis, de manera que el 100% de la progenie posea el mismo genotipo.

Las semillas F1 provenientes de las plantas F0 resistentes a Kanamicina fueron desinfectadas y sembradas en medio MG selectivo para permitir el desarrollo de las plantas resistentes (paso 6, Figura 9). Sólo fueron seleccionadas las semillas F1 que pudieron desarrollarse en plantas resistentes a Kanamicina (transformadas) con un 75%. Es decir que el transgén se incorporó en una sola copia del genoma nuclear de las plantas F0 (heterocigotas) y por lo tanto la segregación del mismo en la siguiente generación F1 fue del 75% (paso 6). De estas progenies F1 fueron seleccionadas al azar 10 plantas resistentes a Kanamicina (paso 7, Figura 9) que se desarrollaron hasta producir semillas maduras F2 (paso 8, Figura 9). Para identificar las plantas resistentes a Kanamicina homocigotas, fueron desinfectadas las semillas F2 sembradas en medio MG selectivo y cultivadas hasta permitir el desarrollo de las plantas resistentes al antibiótico. Finalmente fueron seleccionadas las plantas F1 en cuya progenie F2 el 100 % de las plantas resultan resistentes al antibiótico (homocigotas) (paso 9 y 10, Figura 9).

Es importante trabajar con varias líneas transgénicas independientes para cada construcción debido a que la inserción del transgén en el genoma vegetal es al azar, y por lo tanto su expresión puede verse afectada por su posicionamiento en el genoma, y/o puede afectar la expresión de un segundo gen y así resultar en un fenotipo alterado. Fueron aisladas 6 plantas resistentes a Kanamicina homocigotas que sobre expresan la Trx-f (OE1 pTrx-f), una línea homocigota que sub expresa la Trx-f (AS-3 Trx-f) y 4 líneas resistentes a Kanamicina homocigotas que sobre expresan la Trx-m (OE 6 pTrx-m) (Tabla 3).

Tabla 3. Líneas transgénicas homocigotas obtenidas por el método de inmersión floral

OE 1 pTrx-f	AS 3 Trx-f	OE 6 pTrx-m
1	1	1
2		2
3		3
4		4
5		
6		

OE 1 pTrx-f: sobre-expresan precursor Trx-f, AS 3 Trx-f: Trx-f madura antisentido, OE 6 pTrx-m: sobre-expresan precursor Trx-m.

5-CONCLUSIONES-CAPITULO I

Estudios previos han mostrado no sólo que la sobre-expresión de proteínas es más efectiva con transgenes heterólogos [182] sino también que el silenciamiento de genes endógenos puede llevarse a cabo por transformación con genes con secuencias muy similares pero no idénticas [183]. Por otra parte, numerosas proteínas cloroplásticas de colza (*Brassica napus*) exhiben una alta homología de secuencias con las contrapartes de *Arabidopsis* debido al parentesco cercano entre ambas *Brassicaceae*. Sobre estas bases, fueron preparadas plantas transgénicas transformadas con las construcciones de las Trxs para la expresión (i) correcta (OE-1 pTrx-f y OE-6 pTrx-m) y (ii) antisentido (AS-2 pTrx-f, AS-3 Trx-f, AS 4 pTrx-m y AS-5 Trx-m). La inserción adecuada del transgén fue confirmada mediante PCR. En todos los casos obtuvimos varias líneas independientes resistentes a Kanamicina que exhibían una segregación 3:1 y 1:1 en las progenies F1 y F2/F3, respectivamente. Notablemente, todas las plantas diseñadas para sobre-expresar las Trxs cumplieron con las expectativas. Por ello, las 4 líneas transgénicas OE-6 pTrx-m mostraron niveles de Trx-m 1,4 a 13 veces superiores, mientras que en las 6 líneas transgénicas OE-1 pTrx-f los niveles de Trx-f eran de 2,2 a 10 veces. La disponibilidad de estas líneas transgénicas, no sólo independientes sino también homocigotas, produjo herramientas útiles para estudiar la contribución de la Trx-m y/o Trx-f en la planta bajo distintas condiciones.

En cambio, las plantas AS-2 pTrx-f, AS-3 Trx-f, AS-4 pTrx-m y AS-5 Trx-m, preparadas con las construcciones antisentido de las Trx de colza, no exhibieron diferencias significativas con las plantas control. Una única línea transgénica mostró los niveles de Trx-f ligeramente reducidos (ca. 20 %) en plantas completamente desarrolladas. Este resultado inesperado no provendría de la menor homología en la región 5' que comprende al péptido señal ya que el mismo efecto fué observado con las construcciones AS-3 Trx-f y AS-5 Trx-m. En consecuencia, la ausencia de una disminución en los niveles de las Trxs sería atribuible a dos posibles causas: (1)- una limitación metodológica para detectar pequeñas diferencias en el contenido proteico, principalmente en las líneas AS-4 pTrx-m y AS-5 Trx-m, y (2)- la redundancia genética exhibida por las Trx vegetales. Dos antisueros generados en conejos con las Trx-m recombinante de colza no cambiaron estos resultados. Sobre estas bases, en los estudios posteriores prevalecen las líneas sobre-expresantes de Trx.

CAPITULO II

ANALISIS DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS

En el capítulo I fue detallada la construcción de las plantas transgénicas cuyos niveles de Trx-m o Trx-f estaban modificados. A continuación analizamos el efecto de esa modificación sobre diversos parámetros fisiológicos de la planta en condiciones normales de crecimiento de luz y temperatura o en condiciones de estrés. El capítulo fue dividido en tres partes:

- I-Plantas que sobre-expresan Trx-m
- II-Plantas que sobre-expresan Trx-f
- III-Plantas antisentido para las Trxs

Parte I-Plantas que sobre-expresan Trx-m

I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas. Características generales de las plantas OE-6 pTrx-m en condiciones normales de luz y temperatura

I.1-Germinación de las semillas

El primer paso luego de la preparación de las plantas transgénicas OE-6 pTrx-m, fue estudiar el efecto causado por la manipulación genética sobre la viabilidad de las semillas. Para ello fue estimado el % de germinación luego que las semillas permanecieron 1 hr con luz roja, y 72 hs en oscuridad. Las líneas transgénicas no mostraron diferencias significativas en la germinación ($p > 0,05$). El test de Dunnett demostró que la incorporación del transgén en el genoma de las plantas no afectó la viabilidad de las semillas con un % de germinación de $(89,5 \pm 2,5) \%$, $(95,4 \pm 3,1) \%$, $(90,9 \pm 5,4) \%$, $(97,1 \pm 1,7) \%$ y $(83,3 \pm 10) \%$ para las plantas salvajes, OE 6 pTrx-m1, -m2, -m3 y -m4 respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4. % de germinación de las semillas de las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m.

%Germinación	Columbia	OE6 pTrx-m1	OE6 pTrxm-2	OE6 pTrxm-3	OE6 pTrxm-4
Media	89,5	95,4	90,9	97,1	83,3
Sem	2,5	3,1	5,4	1,7	10

20 semillas de las diferentes líneas OE-6 pTrx-m fueron irradiadas 1 hr con luz roja y luego de 72 hs en oscuridad fue estimado el % de germinación. La media y desviación estandar media (Sem) fueron calculadas con N: 4 para las líneas OE-6 pTrx- m1, -m2 y -m3, N: 2 para la línea OE-6 pTrx-m4 y N: 6 para Columbia salvaje. Fue realizado ANOVA de un factor y test de Dunnett $p > 0,05$.

I.2-Biomasa vegetal

El ciclo de Benson-Calvin es auto-catalítico, es decir un incremento en el nivel de intermediarios aumenta la velocidad del mismo, y en consecuencia, aumenta la producción de fotosintatos. En este ciclo, la modulación de la actividad de diversas enzimas del estroma de cloroplastos, está mediada por la luz, a través de un incremento en el pH y la concentración de Mg^{2+} , cambios en la concentración de efectores (ATP y NADPH), y la activación reductiva de diversas enzimas mediado por la Tiorredoxina (Trx). Por este motivo el aumento de la Trx-m podría afectar el crecimiento y desarrollo de la planta. Una vía indirecta de estudiar este aspecto fue analizando la biomasa vegetal (Figura 14).

En general fue observado un ligero aumento en el peso fresco de las líneas que sobre-expresan Trx-m (Figura 14-A) [OE-6 pTrx-m2 ($132,1 \pm 15,2$ mg), OE-6 pTrx-m3 ($137,5 \pm 10,2$ mg) y OE-6 pTrx-m4 ($149,1 \pm 13,8$ mg)] respecto a la planta salvaje ($117,6 \pm 8,5$ mg). Aunque esta tendencia fue acompañada en el peso seco de las plantas (Figura 14-B) [OE 6pTrx-m2 ($9,4 \pm 1,0$ mg), -m3 ($9,6 \pm 0,8$ mg) y -m4 ($10,3 \pm 0,7$ mg)], no resultó significativa para las líneas analizadas. Una excepción a esta característica fue la línea transgénica OE-6 pTrx-m1 que presentó un peso fresco de $(82,9 \pm 10,7$ mg) ($p < 0,05$) y un peso seco significativamente menor [$4,9 \pm 1$ ($p < 0,01$)] a la planta salvaje ($9 \pm 0,6$ mg) (Figura 14 A-B).

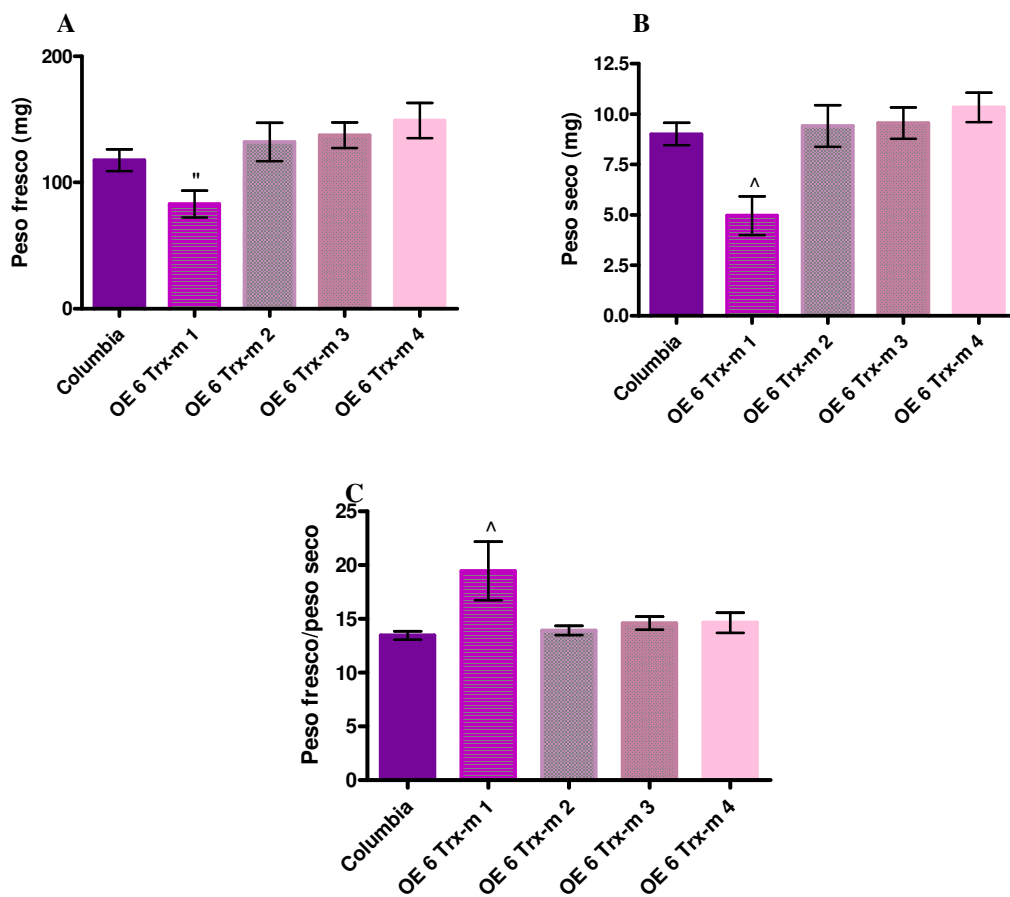


Figura 14. Efecto de la Trx-m en la biomasa vegetal de las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m.

Plantas de 30 días fueron utilizadas para determinar **A**-Peso fresco, **B**-Peso seco, **C**-Relación peso fresco/ peso seco. Fueron analizados los datos mediante ANOVA de un factor (S) ($p < 0.05$) y el test de Dunnett ([#]): $p < 0.05$; ([^]): $p < 0.01$ para $N \geq 11$.

El cociente peso fresco/peso seco se mantuvo constante en las plantas analizadas a excepción de la línea transgénica OE-6 pTrx-m1 cuya relación aumentó aproximadamente un 40% ($p < 0,01$) (Figura 14C). Sin embargo, este aumento proviene de una disminución muy marcada del peso seco (ca. 50 %) respecto a la reducción del peso fresco (ca. 70%). Como este comportamiento se observó en una única línea transgénica (OE- 6 pTrx-m1) y es opuesto a la tendencia observada para las otras tres líneas transgénicas independientes, es posible que este fenotipo sea el resultado de la inserción del ADN-T en un locus determinado en el genoma de *Arabidopsis* vinculado directa o indirectamente a la biomasa. De esta manera, el aumento de la expresión de Trx-m en las líneas transgénicas no se tradujo en una variación significativa de la biomasa vegetal.

En general el efecto que la modificación de una enzima del ciclo de Benson Calvin ejerce sobre la biomasa vegetal es muy variable, desde casi imperceptible (como ocurre en este estudio) a muy marcado. Un leve retardo en el crecimiento vegetal fue observado cuando el contenido de la enzima FBPassa disminuyó un ca. 80% [184] o la Rubisco un ca. 50% [185]. En plantas mutantes para la FTR se observó un leve retraso en el crecimiento en los primeros días, pero al llegar al estadio de seis hojas el crecimiento fue similar a las plantas salvajes [186]. En otras ocasiones esta reducción

del contenido enzimático causó un efecto mayor sobre el crecimiento; la Aldolasa plastídica [187], y la NADP-GPDH [180]. Por otro lado, la disminución tan solo del 30% del contenido de FNR por ARN antisentido, redujo el peso fresco y seco de las plantas [188], mientras que la sobre-expresión de NADP-MDH de arveja en tabaco aumentó el peso fresco y peso seco del vástago luego de 50 días de crecimiento [189].

I.3-Contenido de almidón y azúcares solubles

Siguiendo con el mismo razonamiento planteado respecto a la biomasa vegetal fué estudiado el contenido de almidón y azúcares solubles en las líneas transgénicas que sobre expresan Trx-m. Los niveles de almidón en hojas de las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m1, -m2 y -m3 expuestas 10 hs a la luz, aumentaron [(2 ± 0,2), (2 ± 0,2), (1,5 ± 0,1) (p<0,01)] veces respecto a la planta salvaje (Figura 15-A). Estos datos correlacionaban con los mayores niveles de Trx-m en éstas líneas [(3,4 ± 0,7), (3,2 ± 0,5), (13,6 ± 9,9) (nivel relativo a la planta salvaje)]. En cambio, el contenido de almidón en la línea transgénica OE 6 pTrx-m4 aumentó [(1,4 ± 0,1) (p>0,05)] veces respecto a la línea salvaje, y presentó menor contenido de Trx-m (1,4 veces) en sus cloroplastos.

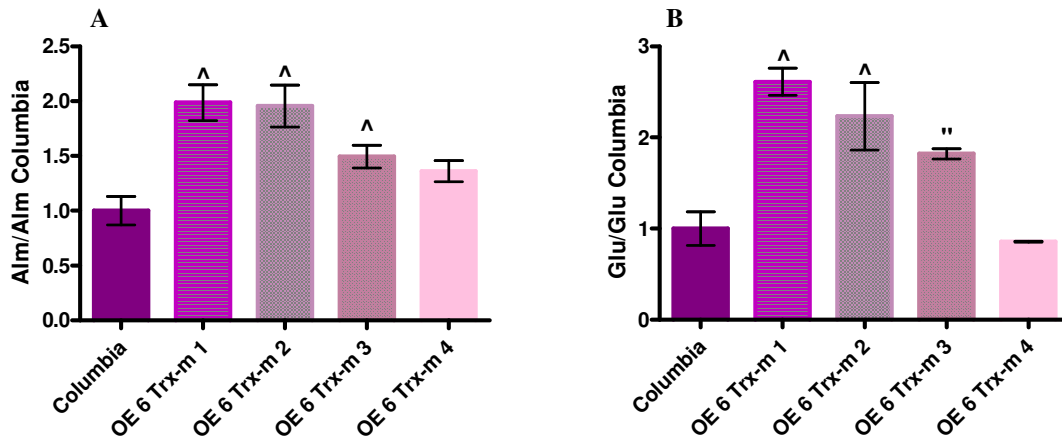


Figura 15: Efecto del aumento de Trx-m sobre el contenido de almidón y azúcares solubles en plantas OE-6 pTrx-m.

Las hojas más grandes de 15-20 plantas de 30 días expuestas 10 hs a la luz fueron cosechadas (50 mg) para determinar el contenido de almidón (Alm) y azúcares solubles (Glu). Luego de la extracción del material fue determinado **A**-El contenido de almidón en la fracción insoluble (μg almidón/mg hoja) (N: 4) y **B**-El contenido de azúcares solubles en el sobrenadante (μg glucosa/mg hoja) (N: 2). En ambos casos los datos fueron relativizados a la planta salvaje y analizados mediante ANOVA de un factor (S) (p<0.05) y el test de Dunnett (^): p<0.0.1, ("): p < 0.05.

El aumento en el contenido de almidón pudo deberse a un incremento de la síntesis o una disminución de la degradación. El aumento de Trx-m observado principalmente en las líneas OE-6 Trx-m1, -m2 y -m3 (Figura 11), pudo incrementar el contenido de triosas fosfato destinadas a la síntesis de almidón en cloroplastos y aumentar el contenido de fosfoglicerato (3-PGA). El primer paso en la vía biosintética de este polímero es la conversión de Glucosa-1-fosfato y ATP a ADPGlc y PPi catalizado por la enzima ADP Glucosa pirofosforilasa. Esta enzima representa un sitio clave para la regulación de la síntesis de almidón en hojas y es activada en presencia del regulador alostérico 3-PGA. Asimismo, esta enzima aumenta cuatro veces su actividad *in vitro* en presencia de Trx y aun mucho más en presencia del efector [151]. De esta manera el aumento de Trx-m *per se*

y el aumento de 3-PGA permitirían casi duplicar el contenido de almidón en las hojas de las plantas OE 6 pTrx-m. En este mismo sentido plantas de arroz que sobre-expresan NADP ME de maíz (enzima vinculada al ciclo reductivo de las pentosas fosfato) exhibieron gránulos de almidón más abundantes y de mayor tamaño que la planta salvaje [190]. Estas consideraciones no excluyen que la Trx-m participe directa o indirectamente disminuyendo la degradación del almidón.

Las plantas transgénicas que mostraron un aumento en el contenido de almidón (OE-6 Trx-m1, -m2, y -m3) también presentaron mayores niveles de azúcares solubles [(2,6 ± 0,1), (2,2 ± 0,4), (1,8 ± 0,1)] respecto a la planta salvaje (Figura 15-B). En cambio, el aumento de Trx-m en la línea transgénica OE-6 pTrx-m4 no fué suficiente para afectar el contenido de almidón ni de azúcares solubles (0,9 ± 0,01) respecto a la planta salvaje. Los resultados aquí presentados muestran que tanto el contenido de azúcares exportables como el de almidón aumentan cuando el incremento de Trx-m estimula el flujo a través del ciclo de Benson Calvin (Figura 15).

I-4-Contenido de clorofila

Para que la fotosíntesis sea eficiente, las plantas han desarrollado mecanismos que le permiten adaptarse frente a variaciones ambientales. En presencia de bajos niveles de luz, deben optimizar la transferencia de energía a los centros de reacción, mientras que en condiciones de alta intensidad lumínica u otras fuentes de estrés, deben equilibrar la velocidad de síntesis de NADPH y ATP con la cadena de transporte de electrones, disipando como calor el exceso de energía para impedir la fotoinhibición. Un aumento del contenido de Trx-m en teoría podría acelerar la activación de varias enzimas del ciclo de Benson Calvin, liberando más aceptores ADP y NADP⁺ y favoreciendo una mayor captación de energía lumínica. Sin embargo las determinaciones que fueron realizadas en discos de hojas de plantas adultas (30 días), no mostraron diferencias significativas en el contenido de Clorofila a y clorofila b en las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m [(3,58 ± 0,12 mg/l), (3,70 ± 0,17 mg/l), (3,61 ± 0,17 mg/l) y (3,68 ± 0,16 mg/l) de clorofila a y [(2,50 ± 0,09 mg/l), (2,81 ± 0,18 mg/l), (2,73 ± 0,22 mg/l) y (2,74 ± 0,14 mg/l)] de clorofila b para la OE-6 pTrx-m1, -m2, -m3 y -m4 respectivamente y la planta salvaje [(3,70 ± 0,12 mg/l) y (2,87 ± 0,13 mg/l)] de clorofila a y b respectivamente (Figura 16).

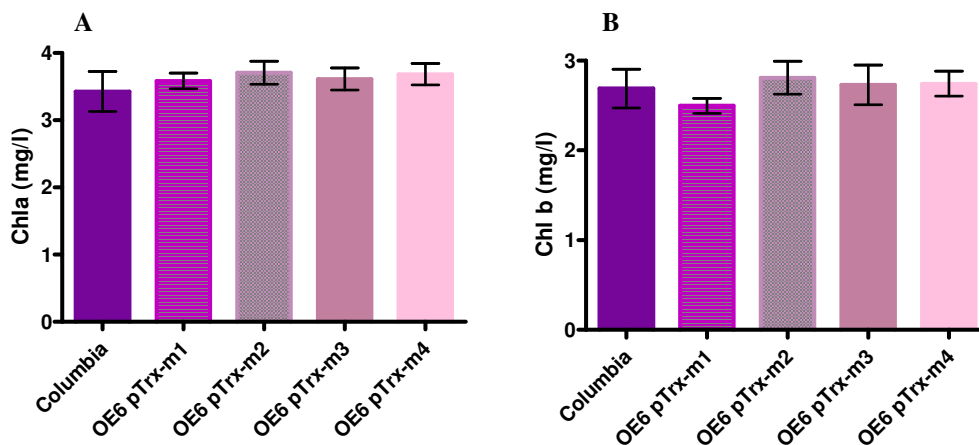


Figura 16. Efecto del aumento de Trx-m en la clorofila de las plantas OE-6 pTrx-m.

El contenido de clorofila fue determinado en 3 muestras de 3 discos de 0.28 cm² de hojas de plantas de 30 días de cada línea vegetal, en dos experimentos independientes. Fueron incubados 24 hs a 4°C en oscuridad en 1 ml de dimetilformamida, determinada la absorbancia a 647 y 664.5 nm y calculadas las concentraciones de **A**-Clorofila a y **B**-Clorofila b (mg/L) según los coeficientes establecidos en [3]. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de un factor (NS p>0.05).

En general, la modificación de una enzima del ciclo de Benson Calvin ejerce un efecto variable sobre el contenido de clorofila total o clorofila a y b yendo desde casi imperceptible (como ocurre en este estudio) a muy marcado. Las plantas transgénicas con niveles de expresión alterados para diversas enzimas relacionadas con el ciclo de Benson Calvin mostraron que el contenido de clorofila total no cambió en plantas antisentido para la aldolasa plastídica, pero disminuyó considerablemente en plantas con niveles reducidos de NADP-GPDH y FNR expuestas a luz saturante y limitante. En cambio, la considerable reducción en el contenido de clorofila b en plantas de arroz que sobre-expresan NADP-ME de maíz aumentó la relación Chla/Chlb [190], mientras que la clorofila total disminuyó paralelamente con el nivel de NADP-FNR disminuido por ARN antisentido por una reducción equivalente de clorofila a y b [188].

I.5-Actividad fotosintética

La modificación de algunas condiciones ambientales altera la fotosíntesis. En respuesta al amplio rango de variaciones ambientales, las plantas han desarrollado diversas estrategias, con el objetivo de mantener la eficiencia fotosintética lo más elevada posible. Una forma indirecta de estudiarla es cuantificar la fluorescencia emitida por la clorofila del PSII. Esto se debe a que la energía lumínica absorbida por las moléculas de clorofila en el P680⁺, puede ser usada para fotosíntesis, disipada como calor o re-emitida como fluorescencia. Estos tres procesos compiten de manera que el incremento de uno de ellos provoca la disminución de los otros dos. Sobre esta base la medición de la fluorescencia de la clorofila en las hojas suministra información sobre los cambios en la fotosíntesis o la disipación como calor. Luego de adaptar las plantas a 50 μ moles de fotones/m²s, ni la eficiencia fotosintética del PSII (Fv/Fm), ni el apantallamiento fotoquímico (photochemical quenching Qp) mostraron diferencias significativas entre las plantas transgénicas y las plantas salvajes (Tabla 5).

Tabla 5. Actividad fotosintética de plantas OE-6 pTrx-m en condiciones normales de luz y temperatura

Líneas	Fv / fm	Qp	Qnp
Columbia	0,771 \pm 0,005	0,9533534	0,07969124
OE6 pTrx-m1	0,775 \pm 0,003	0,9529853	0,0651309
OE6 pTrx-m2	0,734 \pm 0,027	0,91727613	0,3039425 (**)
OE6 pTrx-m3	0,746 \pm 0,015	0,9306959	0,0958457
OE6 pTrx-m4	0,757 \pm 0,002	0,94833097	0,02544202

Determinación de la emisión de la fluorescencia de la clorofila de la superficie superior de una hoja adulta de *A. thaliana* en un fluorómetro FMS2 (Han-satech, King's Lynn, UK) previa exposición (4 hs) de las plantas a 50 μ moles de fotones/m²s. Las mediciones fueron realizadas en plantas salvajes y plantas transgénicas OE 6 pTrx-m. La fluorescencia mínima, F0, y máxima, Fm, fueron determinadas mediante la aplicación de un pulso corto de luz para evaluar la producción fotoquímica máxima: Fv/Fm, Qp: quenching fotoquímico, Qnp: quenching no fotoquímico, N \geq 3, (**) p<0,05.

Sin embargo el apantallamiento no fotoquímico (non-photochemical quenching Qnp) aumentó significativamente en la línea OE-6 pTrx-m2. Un aumento del Qnp está asociado a un incremento en la irradiancia de fotones incidente o una disminución del suministro de CO₂. En estas condiciones aumenta el contenido de ¹O₂ y la energía de esta ROS es absorbida por los pigmentos accesorios del PSII (xantofila, violaxantina, luteína, anteraxantina), con un cambio en su configuración y posterior liberación de calor. Este aumento en Qnp en condiciones lumínicas normales reflejaría un aumento de estrés oxidativo percibido endógenamente por la línea transgénica y consecuentemente un aumento en la disipación de la energía lumínica como calor para evitar la fotoinhibición (Tabla 5) [191].

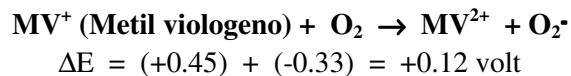
II-Estudio de las plantas transgénicas OE-6 Trx-m en condiciones de estrés

II.1-Estrés oxidativo

Las plantas producen continuamente ROS, predominantemente en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, que al concentrarse dañan las macromoléculas (e.g DNA, proteínas) y metabolitos (e.g lípidos). La remoción de estos compuestos tóxicos para los organismos debe ser estrictamente controlada. Sin embargo, una serie de factores bióticos (infección bacteriana, insectos) y abióticos (alta irradiancia, drogas, alta temperatura, estrés mecánico) perturban el equilibrio entre producción y rescate de ROS. Por ejemplo, un bajo nivel de H₂O₂ (10μM) disminuye un 50% la fijación de CO₂ por inhibición de las enzimas del ciclo de Benson Calvin moduladas por tioles [192, 193]. Para investigar si la Trx-m provee mayor capacidad para disipar las ROS en condiciones de estrés oxidativo fué estudiado el efecto de diversos oxidantes sobre la supervivencia de las plantas transgénicas.

Metil viológeno

El herbicida paraquat (Metilviológeno o MV) actúa en cloroplastos iluminados como un aceptor artificial de electrones del PSI. Luego de la reducción univalente, el MV cede un electrón directamente al oxígeno molecular para formar el radical O₂⁻ y regenerar la molécula de MV, la que es nuevamente reducida por el PSI. Esta capacidad redox cíclica, convierte al MV en un propagador de ROS, por cuanto a partir del O₂⁻ derivan primero otras ROS y finalmente los radicales hidroxilo, agentes causantes de daño en plantas tratadas con el herbicida [194].



Semillas de las distintas líneas vegetales cosechadas simultáneamente fueron desinfectadas superficialmente, sembradas en un medio de cultivo MG conteniendo 2 μM de MV y sometidas a un régimen lumínico alternativo (16 horas de iluminación: 50 μmoles fotones/sm², 8 horas de oscuridad). La proporción de plantas verdes que sobrevivieron al estrés respecto a las plantas que germinaron fue establecida en distintos momentos del desarrollo de las plantas (Figura 17).

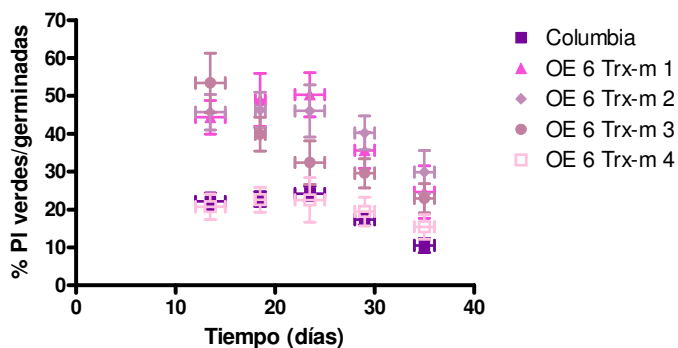


Figura 17. Efecto del tratamiento con Metil viológeno en la supervivencia de plantas OE-6 pTrx-m.

Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo suplementado con 2 μ M MV y a distintos tiempos (12-15, 18-19, 22-25, 28-30 y 34-36 días) fue registrada la proporción de (plantas verdes / plantas germinadas). Fue realizado ANOVA de dos factores y el test de Bonferroni para $N > 6$ o $N > 18$ en el caso de las plantas OE-6 pTrx-m o plantas salvajes respectivamente y (**): $p < 0.05$, (^): $p < 0.01$, (*): $p < 0.001$.

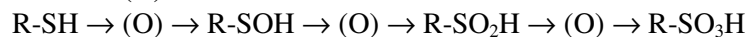
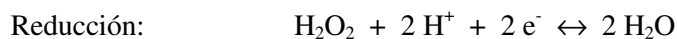
Los controles mostraron severos daños con degradación casi completa de los pigmentos, mientras que las plantas transgénicas resistieron el tratamiento al menos duplicando el % plantas resistentes. Esa resistencia se manifestó temprano en el desarrollo (12-15 días) en las plantas OE-6 pTrx-m1 [(44,34 \pm 4,46 %) ($p < 0,001$)], OE-6 pTrx-m2 [(45,72 \pm 4,67 %) ($p < 0,001$)], OE-6 pTrx-m3 [(53,43 \pm 7,83 %) ($p < 0,001$)] respecto a las salvajes (22,17 \pm 2,20 %). Las plantas se mantuvieron más o menos estables hasta los 25 días, pero a partir de los 28 días la capacidad antioxidante en las plantas disminuyó en general en las plantas OE-6 pTrx-m1 [(35,61 \pm 4,8 %) ($p < 0,001$)], OE-6 pTrx-m2 [(40,23 \pm 4,5 %) ($p < 0,001$)], y OE-6 pTrx-m3 (29,58 \pm 3,8 %) respecto a las salvajes (17,33 \pm 1,4 %). Sin embargo, esta reducción fue mucho más marcada en las plantas salvajes respecto a las líneas OE-6 pTrx-m, siendo muy notoria a los 36 días: OE-6 pTrx-m1 [(24,60 \pm 6,91 %) ($p < 0,01$)], OE-6 pTrx-m2 [(29,91 \pm 5,66 %) ($p < 0,01$)], OE-6 pTrx-m3 [(22,97 \pm 3,86 %) ($p < 0,01$)] y OE-6 pTrxm4 [(15,41 \pm 3,21 %) ($p > 0,05$)] respecto a las salvajes (10,52 \pm 1,86 %). Las líneas con mayor respuesta antioxidante fueron la OE-6 pTrx-m1, -m2 y -m3, y también fueron las que presentaron los niveles de Trx-m más elevados respecto a la línea salvaje [(3,4 \pm 0,7), (3,2 \pm 0,5), (13,6 \pm 9,9)]. Tomados en conjunto estos resultados permitieron inferir que el incremento de la Trx-m aumentó la capacidad antioxidante de las plantas y reforzó la tolerancia al estrés foto-oxidativo.

Aunque los resultados expuestos mostraron claramente que la sobre-expresión de Trx-m aumenta la tolerancia al estrés oxidativo, otras enzimas vegetales también participan activamente en este proceso. La sobre-expresión de la glutatión peroxidasa de *Chlamydomonas* en plantas de tabaco, aumentó la capacidad antioxidante de esas plantas en un tratamiento oxidante con el herbicida con una menor hidroperoxidación de lípidos [195]. El efecto opuesto se observó con la reducción de la CDSP32 (con dominios Trx) cloroplástica en plantas de papa tratadas con MV, que incrementaron la peroxidación de lípidos [196]. Coherente con estos resultados, plantas de *A. thaliana* mutantes para la FTR incrementaron la sensibilidad al MV y el contenido de 2 cys PRX y redujeron la actividad de la NADP-MDH que descarga el exceso de equivalentes de reducción en el cloroplasto vía la válvula de malato [186].

Hidroperóxido de Cumeno

Otros compuestos ejercen efectos deletéreos sobre los sistemas vegetales pero su mecanismo de acción para la generación de ROS es completamente diferente. El H_2O_2 es uno de los más conocidos

y con implicancias fisiológicas por su ubicuidad en los seres vivos. Este hidropéroxido oxida a los grupos sulfhidrilo de las proteínas produciendo tanto uniones disulfuro (número de oxidación: -1) como grupos sulfénico (0), sulfínico (+2) y sulfónico(+4).



Otros hidropéroxidos son utilizados para superar las numerosas precauciones que deben tomarse por la inestabilidad del H_2O_2 . Por ello, analizamos el efecto que produce el Hidropéroxido de Cumeno para extender nuestros estudios a otras ROS.

Las semillas de las distintas líneas fueron cosechadas simultáneamente, desinfectadas superficialmente, sembradas en un medio de cultivo MG suplementado con 650 μM de Hidropéroxido de Cumeno y sometidas a un régimen lumínico alternativo (16 horas de iluminación, 8 horas de oscuridad). Luego de 25 días de tratamiento el % de plantas resistentes fue: OE-6 pTrx-m1 ($9,72 \pm 3,23$), OE-6p Trx-m2 [$16,88 \pm 3,90$] ($p < 0,05$), OE-6p Trx-m3 ($14,23 \pm 4,17$) y OE-6 pTrx-m4 [$15,94 \pm 3,82$] ($p < 0,05$) respecto a las salvajes ($3,51 \pm 3,51$) (Figura 18-A). Estos datos demostraron que las plantas que sobre-expresan la Trx-m fueron más tolerantes a la acumulación de hidropéroxidos orgánicos que las plantas salvajes. Este rasgo fue visualizado en un estadio temprano del desarrollo (12 días) donde el tratamiento con el Hidropéroxido de Cumeno resultó menos dañino en las líneas OE-6 pTrx-m4, -m3, -m1 y un poco más en la línea OE-6 pTrx-m2 que la especie salvaje (Figura 18-B). Llamativamente la línea OE-6 pTrx-m4 que expresa sólo 1,4 veces más Trx-m que la planta salvaje presentó un % (plantas verdes/ geminadas) muy elevado.

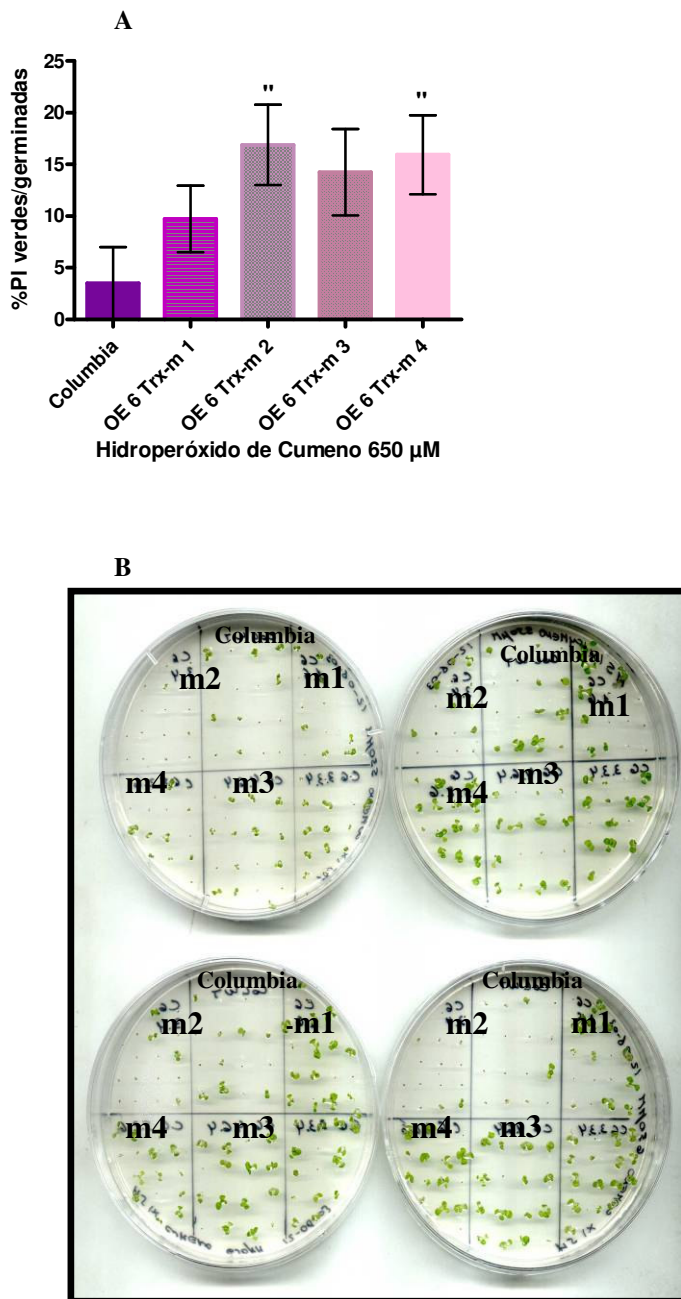


Figura 18. Efecto del tratamiento con Hidroperóxido de Cumeno en la supervivencia de plantas OE-6 pTrx-m.

A: Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 650 μ M de Hidroperóxido de Cumeno y a los 25 días de desarrollo fue registrada la proporción de (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (NS) y el test de Dunnet ("): $p < 0.05$ en dos experimentos independientes con cuatro repeticiones para las líneas transgénicas y 8 repeticiones para la planta salvaje. **B:** Fotografía de plantas OE-6 pTrx-m y plantas salvajes luego del tratamiento con Hidroperóxido de Cumeno durante 12 días. Columbia: especie salvaje, m1, m2, m3 y m4: líneas transgénicas OE-6 pTrx-m.

Rosa de Bengala

Los fotosensibilizadores son compuestos que absorben en el espectro de luz visible (380-900 nm) y exhiben fluorescencia y fosforescencia. Esta característica refleja la capacidad de acceder a dos estados electrónicos separados: el singulete y el triplete. El estado singulete se produce primero por la absorción de la luz pero tiene una vida media corta y por ello decae al estado basal via fluorescencia o, alternativamente por un cruzamiento intersistema al estado triplete. Este último estado decae al estado basal a una velocidad menor vía fosforescencia o reaccionando con una molécula de oxígeno para generar ROS. Numerosos colorantes orgánicos (azul de metileno, Rosa de Bengala, Eosina, Cristal Violeta) poseen esta capacidad y por ello son utilizados en los estudios sobre el estrés oxidativo. Sobre estas bases analizamos la capacidad del Rosa de Bengala para alterar a las plantas transgénicas [197].

Dador de electrón (A)→Fotosensibilizador (B) + Luz→ Aceptor de electrón (C)

(A): Dador de electrones débil: Tiourea, EDTA, semicarbazida

(B): Fotosensibilizadores: proflavina, riboflavina, rosa de bengala

(C): Aceptor de electrones: O₂

La acción del Rosa de Bengala sobre las líneas transgénicas que sobre-expresan Trx-m no exhibió las diferencias apreciables que mostraron los dos perturbantes utilizados previamente. Aunque en una etapa temprana (12 días) la supervivencia de las plantas OE-6 pTrx-m1, -m2 y -m4 fue superior respecto a la planta salvaje (Figura 19-B), esta droga rápidamente llevó las plantas a la muerte y a los 16-17 días las diferencias no resultaron significativas (Figura 19-A).

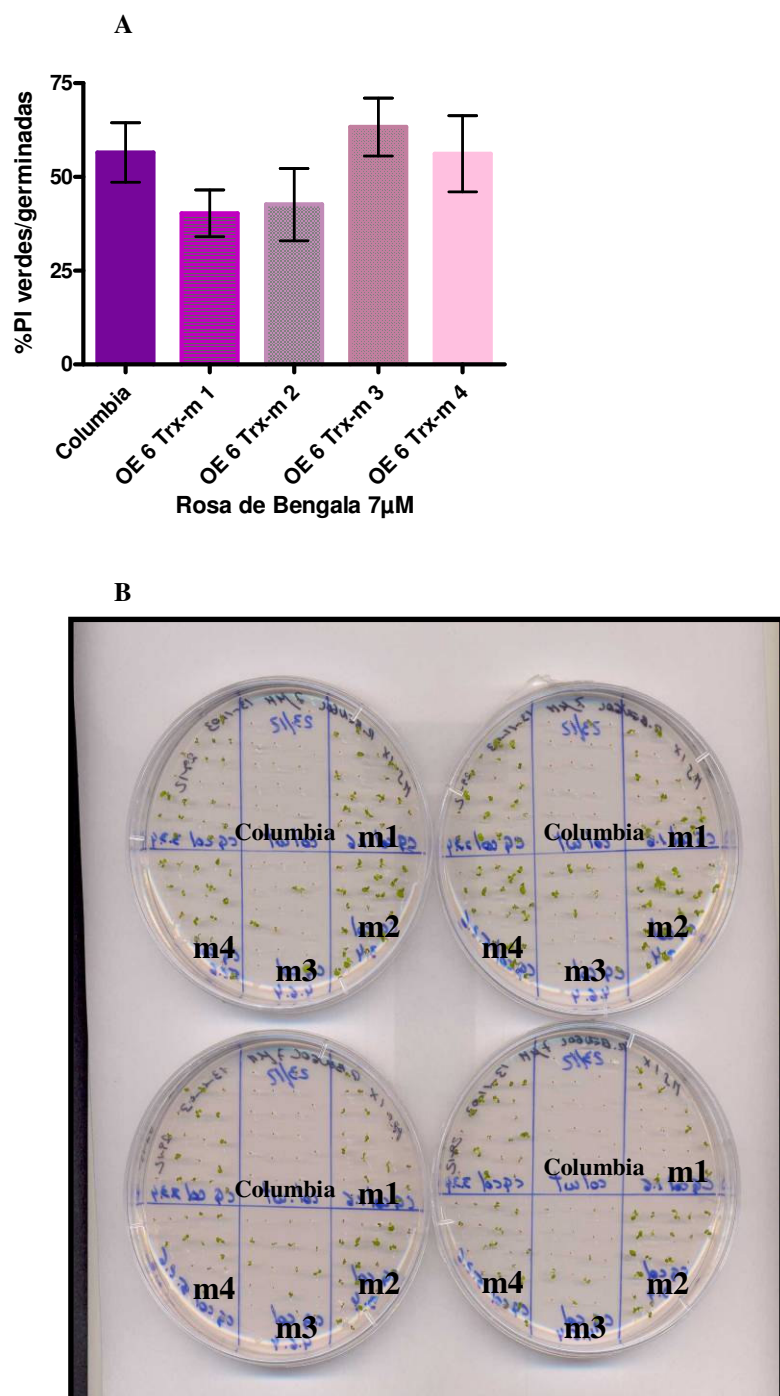


Figura 19. Efecto del tratamiento con Rosa de Bengala en la supervivencia de plantas OE-6 pTrx-m.

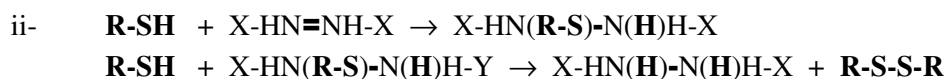
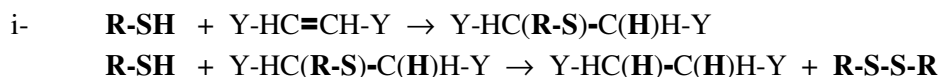
A: Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 7 μ M de Rosa de Bengala y a los 16 días de desarrollo fue registrado N° plantas verdes / germinadas. Fue realizado ANOVA de un factor (NS) para N: 6 para las OE-6 pTrx-m y N: 12 para la línea salvaje. **B:** Fotografía de plantas OE-6 pTrx-m y plantas salvajes luego del tratamiento de Rosa de Bengala durante 12 días. Columbia: especie salvaje, m1, m2, m3 y m4: líneas transgénicas OE-6 pTrx-m.

Dietilmaleato y Diamida

Dos drogas son ampliamente utilizadas en los estudios sobre el metabolismo de ROS,



A nivel de la doble ligadura de ambos reactivos, el tiol forma inicialmente un aducto, el cual por el ataque de otra molécula de tiol genera la forma reducida del reactivo con la concurrente generación del disulfuro correspondiente.



De esta manera ambos reactivos remueven los grupos sulfhidrilo de las proteínas, péptidos (e.g. GSH) y otros compuestos de bajo peso molecular, disminuyendo en consecuencia la capacidad antioxidante de las células.

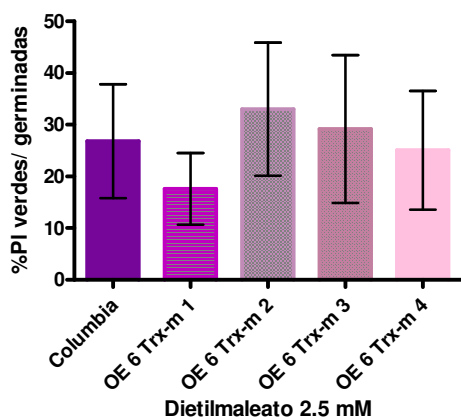


Figura 20. Efecto del tratamiento con Dietilmaleato en plantas OE-6 pTrx-m.

Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 2.5 mM de Dietilmaleato y a los 16 días de desarrollo fue registrada proporción (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (NS) N>6.

Las semillas de las distintas líneas fueron sembradas en un medio de cultivo suplementado con 2,5 mM de Dietilmaleato, y sometidas a un régimen lumínico alternativo (16 horas de iluminación, 8 horas de oscuridad). Luego de 15 días, el % (plantas verdes/germinadas) fue $(17,6 \pm 6,91)$, $(32,98 \pm 12,86)$, $(29,17 \pm 14,28)$, y $(25,07 \pm 11,51)$ en OE-6 pTrx-m1, -m2, -m3 y -m4 respectivamente. Estas plantas que sobre expresan Trx-m no mostraron diferencias pronunciadas respecto a la contraparte salvaje $[26,80 \pm 11,04 \%$ (plantas verdes/ germinadas)] como en los casos anteriores (Figura 20).

Por otra parte, las semillas de las distintas líneas fueron sembradas en un medio de cultivo MG suplementado con 9 mM de Diamida, y sometidas a un régimen lumínico alternativo (16 horas de iluminación, 8 horas de oscuridad). Luego de 16 días, fue establecida la proporción de plantas verdes que sobrevivieron al estrés. Las plantas que sobre-expresan Trx-m mostraron una capacidad antioxidante igual o inclusive menor: $(25,89 \pm 7,17)$, $(16,67 \pm 3,33)$, $(20,83 \pm 2,81)$ % (plantas verdes/ germinadas) en OE-6 pTrx-m1, -m2, -m3 que la planta salvaje $(24,18 \pm 3,67)$ ($p > 0,05$). Llamativamente la línea transgénica OE-6 pTrx-m4 presentó una respuesta antioxidante mayor a las plantas salvajes [$50 \pm 2,62$] $p < 0,05$. Esta línea transgénica exhibió una mayor tolerancia al Hidroperóxido de Cumeno y a la Diamida pero no al MV, Rosa de Bengala y Dietilmaleato.

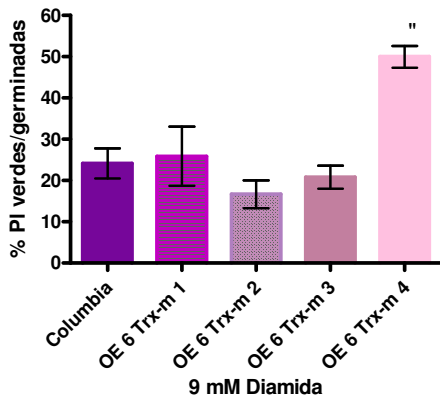
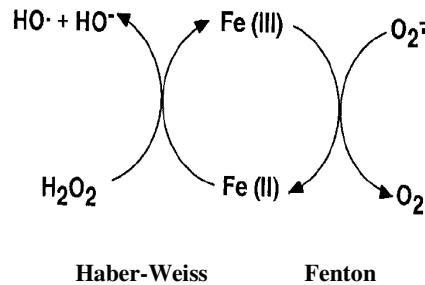


Figura 21. Efecto del tratamiento con Diamida en la supervivencia de plantas OE-6 pTrx-m.

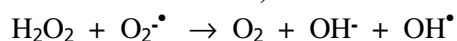
Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo suplementado con 9 mM de Diamida y a los 16 días de desarrollo fue registrada la proporción (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (S) $p < 0.05$ y el test de Dunnett $p < 0.05$ N: 4.

Metales Pesados

Los metales pesados pueden inducir estrés oxidativo en plantas por transferencia de electrones directa al oxígeno o por inhibición de reacciones metabólicas. El Cu^{2+} y el Fe^{3+} median en la reacción del anión superóxido con el H_2O_2 (Haber-Weiss) o reducen el H_2O_2 (Fenton) provocando la generación de ROS (radicales hidroxilo).

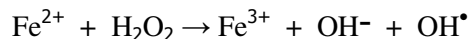


Reacción Haber-Weiss (el Fe cataliza esta reacción)



Peróxido de hidrógeno + anión superóxido → oxígeno + anión hidroxilo + radical hidroxilo

Reacción de Fenton



Dado que,

- a) la Trx-m podría participar en una respuesta general al estrés y no solamente en tejidos verdes por un efecto indirecto, y
- b) las concentraciones tóxicas de los metales inhiben el crecimiento radicular

Analizamos la tolerancia de las plantas que sobre-expresan la Trx-m a los metales de transición estimando la sensibilidad del crecimiento radicular. Las semillas fueron (i) sembradas sobre papel de filtro en una placa de Petri con MS 1/4X, (ii) sometidas a bajas temperaturas para sincronizar la germinación, y (iii) cultivadas verticalmente durante 5 días y (iv) transferidas al mismo medio suplementado con distintas concentraciones de FeSO₄ durante otros siete días. Finalmente fue determinada la longitud de las raíces mediante una lupa.

Al aumentar el contenido de Fe²⁺ (0,1-6 mM) disminuyó el crecimiento radicular en las plantas, principalmente en las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m (resultados no mostrados), siendo la reducción significativa cuando el medio fue suplementado con 1mM de FeSO₄ (Figura 22).

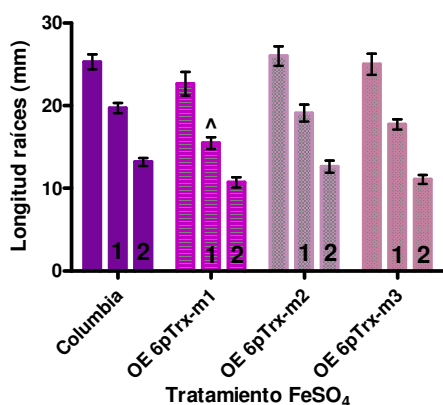


Figura 22. Sensibilidad del crecimiento radicular al tratamiento con Fe²⁺ en plantas OE-6 pTrx-m.

Fueron sembradas semillas en placas con MS 1/4X sobre papel de filtro, incubadas 72 hs en oscuridad a 4°C e incubadas 5 días con luz en dirección vertical. Luego el papel fue transferido a placas con MS 1/4X suplementadas con 1 o 2 mM de Fe²⁺ y cultivados 7 días más en dirección vertical. Finalmente la longitud de las raíces fue estimada bajo lupa. Fueron realizados dos experimentos independientes con N>12, ANOVA de dos factores y el test de Bonferroni (^) p < 0.01

En estas condiciones fue observada una ligera reducción del crecimiento radicular en las plantas salvajes (19,7 ± 0,6 mm), OE 6pTrx-m1 (15,5 ± 0,7 mm) (p<0,05), OE 6 pTrx-m2 (19,1 ± 1 mm) OE-6 pTrx-m3 (17,7 ± 0,6 mm). Este aumento en la sensibilidad hacia el Fe²⁺ no fue muy elevado y las diferencias fueron observadas en una estrecha ventana de concentraciones (ca 1mM). La

diferencia en el crecimiento radicular fue reproducible y significativa para la línea OE-6 pTrx-m1 reflejando otra vez una acción indirecta de la Trx-m a través de un desbalance redox que afectaría el crecimiento radicular. En estos experimentos es necesario destacar que la selección de las variedades vegetales puede enmascarar resultados por cuanto tienen diferente sensibilidad hacia los metales pesados. En particular los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* presentan diferente sensibilidad siendo Columbia menos sensible que Ler-0 [198]. Por otro lado estudios previos en plantas de tabaco que sobre-expresan la flavodoxina bacteriana (homóloga a Ferredoxina) presentan diferencias a la resistencia al Fe cuando el mismo está ausente y un comportamiento similar al salvaje cuando el hierro está en exceso [199].

Estrés salino

La sal es uno de los factores principales que afectan la producción vegetal, debido a que gran parte de los cultivares no son halofitas. La salinidad genera: 1) un déficit de agua que resulta de la alta concentración relativa de soluto en el suelo, 2) un estrés ión-específico producto de la alteración de la tasa de K^+/Na^+ y 3) el aumento de Cl^- y Na^+ que resultan desventajosos para la planta. En adición a estos efectos tóxicos, el estrés salino induce el estrés oxidativo. Aunque intuitivamente esta perturbación no está directamente relacionada con las anteriores, los mecanismos de defensa podrían confluir en mecanismos comunes.

Las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m1 y -m3 presentaron menor crecimiento radicular [(23,6 ± 1,3) y (23 ± 1,1)] mm respectivamente ($p < 0,01$) que la planta salvaje (28,2 ± 0,9 mm) en el medio de cultivo estandar (MS 1/4X). En presencia de NaCl 80 mM el crecimiento radicular disminuyó en todas las líneas vegetales (Figura 23). Sin embargo, si estimamos el % de reducción del crecimiento de cada línea vegetal con el tratamiento salino respecto al crecimiento en condiciones normales, observamos que la mayor reducción está en la planta salvaje (74,2%) seguida de la línea transgénica OE-6 pTrx-m2 (77,79%), OE-6 pTrx-m1 (82,43%) y OE-6 pTrx-m3 (86,30%). Cabe aclarar que el % de germinación no presentó diferencias significativas entre las plantas salvajes y las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m en presencia de NaCl 80 mM (resultados no mostrados).

La sobre-expresión de Trx-m en los cloroplastos de las plantas transgénicas tuvo un efecto indirecto en el crecimiento radicular en condiciones normales provocando una reducción en el alargamiento de las raíces. Sin embargo la exposición de esas plantas a estrés salino condujo a una menor respuesta (menor acortamiento de las raíces en presencia de NaCl). Realizamos estudios cultivando a las plantas en un medio suplementado con distintas concentraciones de NaCl y no observamos diferencias significativas entre las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m y las plantas salvajes (resultados no mostrados). Comparando con otros estudios realizados con otros ecotipos de *Arabidopsis* se puede inferir que Columbia es poco sensible al tratamiento con algunos metales pesados y esto podría trasladarse al NaCl.[198].

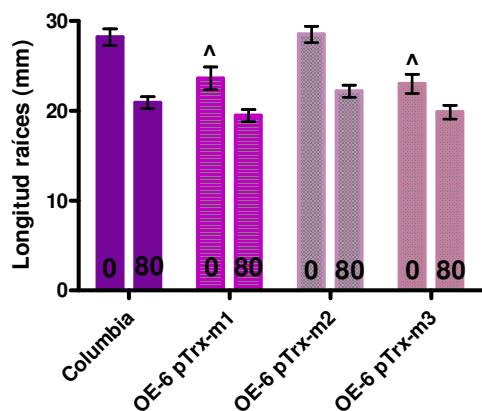


Figura 23. Sensibilidad del crecimiento radicular al tratamiento con NaCl en plantas OE-6 pTrx-m.

Fueron sembradas semillas sobre papel de filtro en placas con MS 1/4X, incubadas 72 hs en oscuridad a 4°C e incubadas en luz 5 días en dirección vertical. Luego el papel fue transferido a placas con MS 1/4X suplementadas con 80 mM de NaCl y cultivados 7 días más en dirección vertical. Finalmente la longitud de las raíces fue estimada bajo lupa. Fue realizado ANOVA de dos factores y el test de Bonferroni (^) $p < 0.01$ para $N \geq 8$ en MS 1/4X y $N \geq 24$ en MS 1/4X NaCl 80 mM.

Estrés lumínico

Como mencionamos anteriormente (I.5 Actividad fotosintética en condiciones normales de luz y temperatura pg 52), la medición de la fluorescencia de la clorofila en las hojas suministra información sobre los cambios en la fotosíntesis o la disipación como calor. Cuando las plantas están expuestas a una intensidad lumínica muy elevada, la presencia simultánea de a) reacciones altamente energéticas y b) elevadas concentraciones de O_2 contribuyen a la formación de una elevada proporción de ROS durante el proceso fotosintético [200]. Esto desencadena la inactivación del PSII y la inhibición de la fotosíntesis. Las plantas utilizan dos estrategias para proteger al aparato fotosintético de la fotoinhibición:

- 1-La disipación térmica del exceso de energía de excitación en el complejo antena del PSII (Qp) y
- 2-La habilidad del PSII de transferir electrones a varios aceptores en el cloroplasto relacionado directamente a la capacidad de los mismos para transferir los equivalentes de reducción en la cadena transportadora de electrones (Qp) [201].

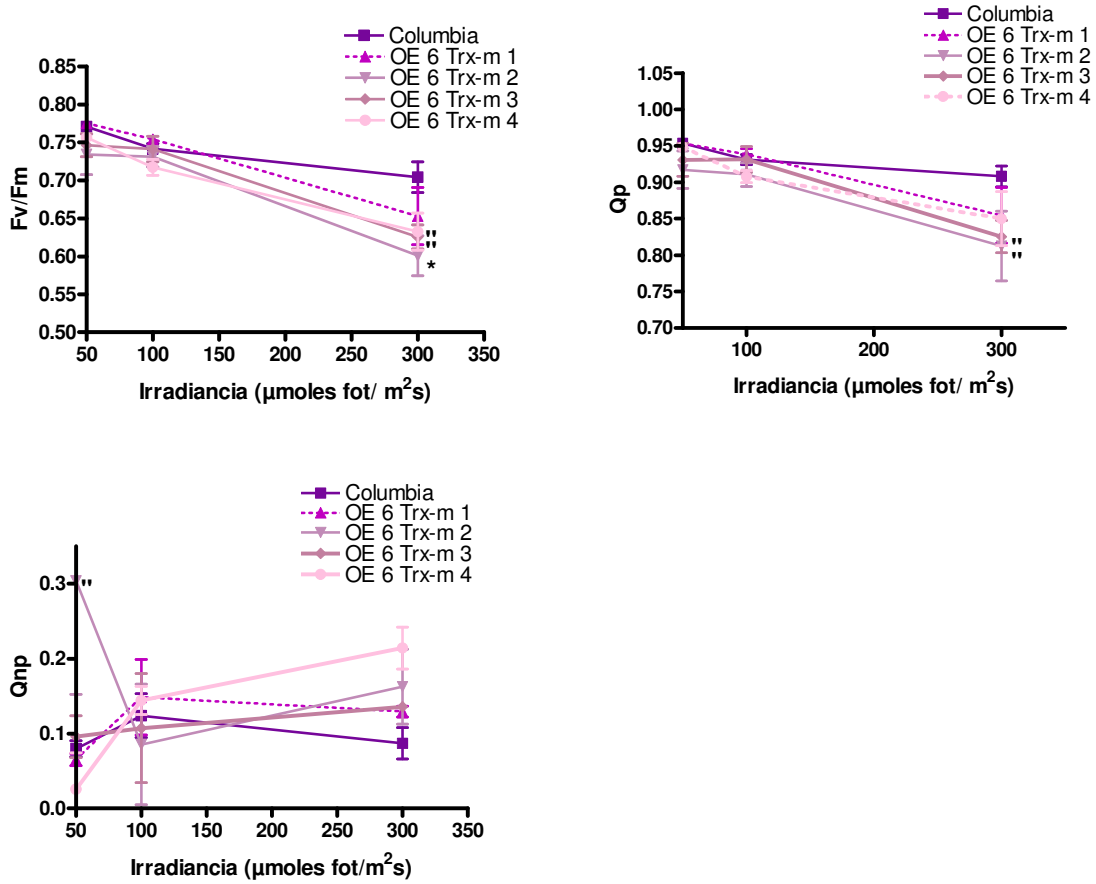


Figura 24. Efecto de la Trx-m en plantas OE-6 pTrx-m con estrés lumínico.

La fluorescencia de hojas de Plantas de 30 días fue estimada con un fluorómetro FMS2 (Han-satech, King's Lynn, UK) luego de adaptarlas a oscuridad o 50, 100 o 300 $\mu\text{moles fot}/\text{m}^2\text{s}$. Luego fueron estimados los coeficientes de A-Fv/Fm, B-Qp y C-Qnp. Fue realizado ANOVA de dos factores y el test de Bonferroni ("") $p < 0.05$, (*) $p < 0.001$ $N \geq 3$.

Para estudiar indirectamente la actividad fotosintética de las plantas en condiciones de estrés lumínico, determinamos la fluorescencia en las hojas de plantas salvajes y transgénicas OE-6 pTrx-m sometidas 4 hs a altas irradiancias. La eficiencia fotosintética Fv/Fm a 300 $\mu\text{moles fotones}/\text{m}^2\text{s}$ se redujo en las líneas OE-6 pTrx-m2 ($0,60 \pm 0,03$) ($p < 0,001$), OE-6 pTrx-m3 ($0,63 \pm 0,02$) ($p < 0,05$), OE-6 pTrx-m4 ($0,63 \pm 0,03$) ($p < 0,05$), OE-6 pTrx-m1 ($0,65 \pm 0,04$) respecto a la planta salvaje ($0,70 \pm 0,02$) (Figura 24 A). Congruente con esto se redujo el apantallamiento fotoquímico (Qp) en las líneas OE-6 pTrx-m2 ($0,81 \pm 0,05$) y OE-6 pTrx-m3 ($0,83 \pm 0,02$) ($p < 0,05$), OE-6 pTrx-m4 ($0,85 \pm 0,04$) y OE-1 pTrx-m1 ($0,85 \pm 0,04$) respecto a la planta salvaje ($0,91 \pm 0,01$) (Figura 24 B) y aumentó aunque no significativamente el apantallamiento no fotoquímico principalmente en las líneas OE-6 pTrx-m4 ($0,21 \pm 0,03$) y OE-6 pTrx-m2 ($0,16 \pm 0,05$) (Figura 24 C). Estos resultados en conjunto demuestran que la sobre expresión de Trx-m reduce la eficiencia fotosintética en plantas sometidas a estrés lumínico, principalmente por una disminución en la habilidad del PSII de transferir electrones a varios aceptores en los cloroplastos de las plantas transgénicas OE-6 pTrx-m.

Estudios previos mostraron que una reducción en el contenido de cFBPasa en plantas aclimatadas a baja temperatura y 50 $\mu\text{moles quanta/m}^2\text{s}$ presenta una reducción e incremento en el apantallamiento fotoquímico y no fotosintético respectivamente [202]. En base a ello y a que la Trx activa a varias enzimas del ciclo de Benson Calvin consumiendo ATP y NAPH, supusimos que un aumento en la expresión de esta proteína llevaría a un incremento del apantallamiento fotoquímico en condiciones de estrés lumínico. Contrario a lo esperado, observamos que el aumento de Trx-m en estas plantas redujo el apantallamiento fotoquímico y aumentó el no fotoquímico. Una posible explicación a esto estaría dada porque la Trx además de participar en la regulación de las enzimas de Benson Calvin también regula el flujo de transporte de electrones a través del PSII y PSI.

Un caso similar ocurrió en plantas de tabaco con la capacidad biosintética del glutathion aumentada que presentaron un incremento de estrés oxidativo (menor Qp) [203] y plantas de arroz con un aumento en la expresión de NADP-ME de maíz (C4) redujeron la tasa de producción Fv/Fm [190].

Parte II-Plantas que sobre-expresan Trx-f

I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas.

Características generales de las plantas OE 1 pTrx-f en condiciones normales de luz y temperatura

I.1-Germinación de las semillas

Las plantas que sobre-expresan la Trx-f fueron analizadas para establecer si la manipulación genética afectó la viabilidad de las semillas. Para ello, las semillas fueron incubadas 1 hr con luz roja y 48 hs en oscuridad. Una vez determinado el % de germinación, fue analizado estadísticamente mediante un estudio de ANOVA de un factor y el test de Dunnett que compara el % de germinación de cada línea con el observado en la planta salvaje (Tabla 6).

Este análisis demostró que la incorporación del transgén en el genoma de las plantas no afectó la viabilidad de las semillas. En este estudio, la excepción fue la línea OE-1 Trx-f3 cuyo % de germinación fue menor (82,7%) ($p < 0,05$), rasgo que fue tenido en cuenta en los experimentos siguientes.

Tabla 6. % Germinación de las semillas transgénicas OE 1 pTrx-f

%Germinación	Columbia	OE1pTrx-f1	OE1pTrx-f2	OE1pTrx-f3	OE1pTrx-f4	OE1pTrx-f5	OE1 pTrxf6
Media	97,5	95	95	82,7	97,5	97,3	97,5
Sem	2,5	5	5	8	2,5	2,7	2,5

20 semillas de las diferentes líneas OE 1 pTrx-f fueron irradiadas 1 hr min con luz roja y luego de 72 hs de oscuridad contado el % de germinación. La media y desviación estandar media fueron calculadas con N: 4 para todas las líneas vegetales. Fue realizado ANOVA de un factor y test de Dunnett $p > 0,05$.

I.2-Biomasa vegetal

El ciclo de Benson-Calvin es autocatalítico y en el mismo las Trx constituyen los moduladores que vinculan el transporte electrónico en las membranas tilacoides con los procesos metabólicos del estroma. Sin embargo, la sobre expresión de Trx-m no provocó un aumento en la biomasa vegetal. Debido a la mayor efectividad de la Trx-f para estimular las enzimas implicadas en la asimilación fotosintética de CO₂ en estudios *in vitro*, existe una tendencia a considerarla el activador fisiológico de las enzimas regulatorias del ciclo de Benson Calvin. Sobre estas bases fué analizada la contribución de mayores niveles de Trx-f en los eventos vinculados a la producción de biomasa vegetal.

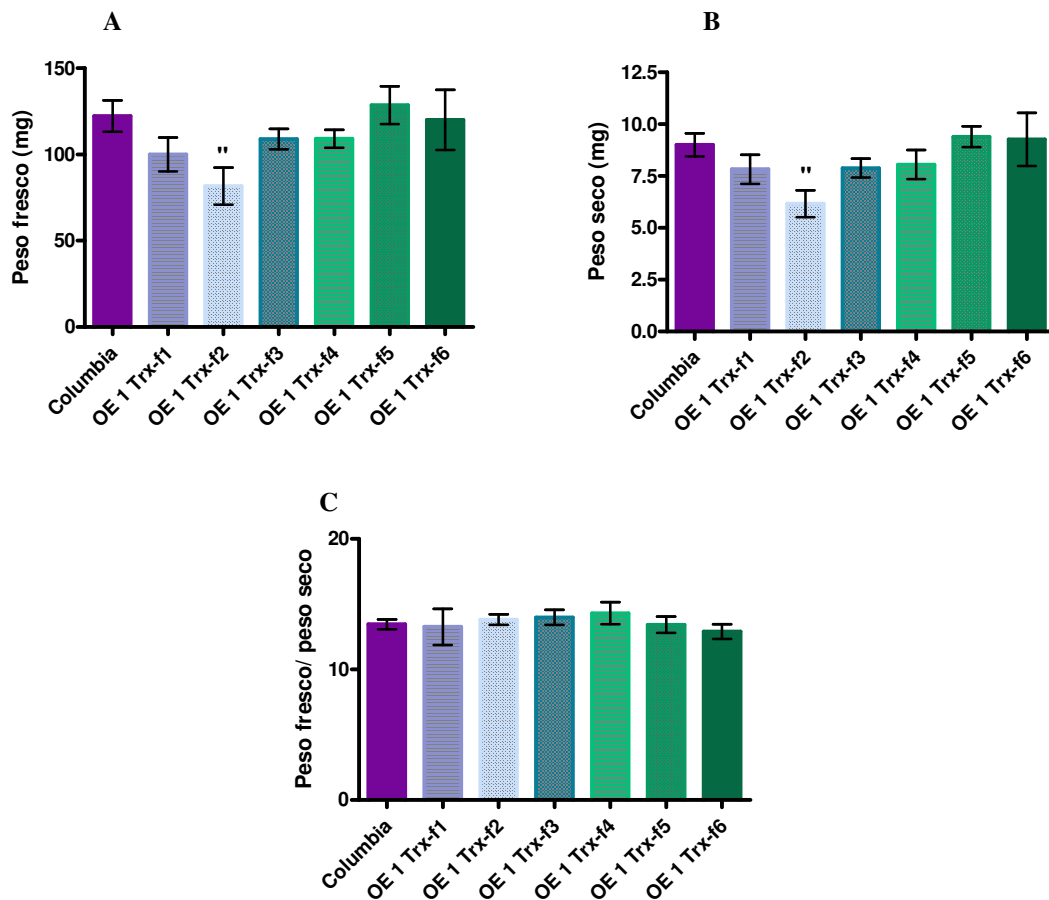


Figura 25. Efecto del aumento de Trx-f en la Biomasa vegetal de las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f.

Plantas de 30 días de desarrollo fueron utilizadas para determinar **A**-Peso fresco, **B**-Peso seco, **C**- Relación peso fresco/ peso seco. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de un factor (S) ($p < 0.05$) y el test de Dunnett ("": $p < 0.05$; (^): $p < 0.01$ para $N \geq 11$).

No fué observada ninguna modificación en el peso fresco [(100,1 ± 9,9 mg), (109 ± 6,0 mg), (109,1 ± 5,2 mg), (128,5 ± 11,0 mg) y (120,1 ± 17,4 mg)] (Figura 25A) ni en el peso seco [(7,8 ± 0,7 mg), (7,9 ± 0,5 mg), (8,1 ± 0,7 mg), (9,4 ± 0,5 mg) y (9,3 ± 1,3 mg)] (Figura 25B) de las líneas que sobre-expresan Trx-f (OE-1 pTrx-f1, -f3, -f4, -f5 y -f6 respectivamente). Una excepción fué la línea OE-1 Trx-f2 que llamativamente presentó un peso fresco (81,7 ± 10,7 mg) y seco (7,8 ± 0,7 mg) significativamente menor ($p < 0,05$) a la planta salvaje [(122,3 ± 9,2 mg) y (9,0 ± 0,6 mg) peso fresco y seco] (Figura 25A y B). Es destacable que el cociente peso fresco /peso seco fué constante para todas las plantas analizadas, aún en la línea OE-1 pTrx-f2, que mostró valores reducidos del peso fresco y peso seco (Figura 25C).

A diferencia de las líneas OE-6 pTrx-m que presentaron un aumento de biomasa, aunque no significativo, las líneas que sobre-expresan Trx-f no mostraron una tendencia clara. De esta manera inferimos que la sobre-expresión de Trx-f o Trx-m (parte I) no afectó en forma directa a la biomasa vegetal. El hecho de observar una reducción en una de las 6 líneas transgénicas independientes fué adjudicado a la posible inserción del ADN-T en un locus del genoma vinculado directa o indirectamente con la producción de biomasa, al igual que ocurrió con la OE-6 Trx-m1.

I.3-Contenido de Almidón y azúcares solubles

Como observamos anteriormente las plantas OE-6 pTrx-m que sobre expresaban mayor contenido de Trx-m mostraron aumento en el contenido de almidón y azúcares solubles. Por ello, fué analizado si la Trx-f, considerada el activador fisiológico de las enzimas del ciclo de Benson Calvin, presentaba un efecto similar o mayor. El análisis de hojas de plantas adultas (30 días) expuestas 10 hs a la luz reveló que los niveles de almidón de las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f1, -f2, -f3, -f4, -f5 y -f6 aumentaron [(1,4 ± 0,2), (1,1 ± 0,1), (1,6 ± 0,2 p<0,05), (1,3 ± 0,1), (2 ± 0,3 p<0,05) y (1,6 ± 0,2 p<0,01)] veces respecto a la planta salvaje (Figura 26). Esto demostró que el incremento en la expresión de Trx-f (igual que para la Trx-m) aumentó el contenido de almidón en hoja. Sin embargo, la cuantificación de la Trx-f en estas líneas transgénicas [(4 ± 0,6), (5 ± 0,1), (10,3 ± 4), (2,6 ± 0,9), (2,2 ± 0,6), y (4,6 ± 0,7)], no correlacionaba con el contenido de almidón en las hojas, probablemente debido una limitación en la activación de dicha proteína.

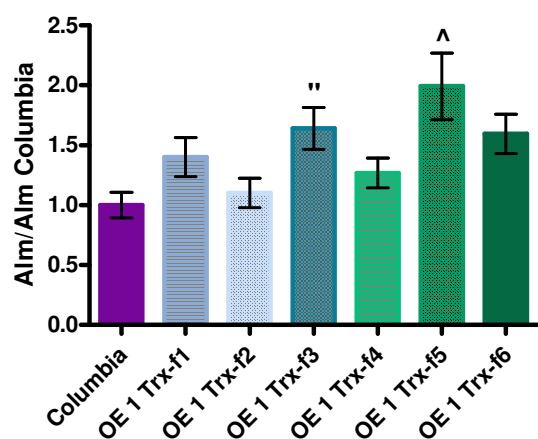


Figura 26. Efecto del aumento de Trx-f sobre el contenido de almidón en plantas OE-1pTrx-f.

Fueron cosechadas 50 mg de las hojas más grande de 15-20 plantas de 30 días de desarrollo expuestas 10 hs a la luz, para determinar el contenido de almidón en las mismas (μg almidón/mg hoja). Los datos fueron relativizados a la planta salvaje y fueron analizados mediante ANOVA de un factor (S) ($p < 0.05$) y el test de Dunnett (^): $p < 0.0.1$, (**): $p < 0.05$ 1 para un único experimento con N: 2.

I.4-Contenido de clorofila

Al igual que ocurrió con las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m, las determinaciones realizadas en discos de hojas de plantas adultas (30 días) en las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f y las plantas salvajes, no mostraron diferencias significativas en el contenido de Clorofila a y clorofila b (Figura 26). El contenido de clorofila a fue $3,43 \pm 0,30$ mg/l, $3,59 \pm 0,19$ mg/l, $3,63 \pm 0,21$ mg/l, $3,64 \pm 0,20$ mg/l, $3,61 \pm 0,16$ mg/l, $3,61 \pm 0,15$ mg/l, $3,48 \pm 0,19$ mg/l para la planta salvaje, OE-1 pTrx-f1, -f2, -f3, -f4, -f5 y -f6 respectivamente (Figura 26-A). El contenido de clorofila b fue $2,69 \pm 0,22$ mg/l, $2,53 \pm 0,20$ mg/l, $2,68 \pm 0,25$ mg/l, $2,68 \pm 0,21$ mg/l, $2,60 \pm 0,13$ mg/l, $2,64 \pm 0,12$ mg/l, $2,35 \pm 0,19$ mg/l para la planta salvaje, OE-1 pTrx-f1, -f2, -f3, -f4, -f5 y -f6 respectivamente (Figura 26-B).

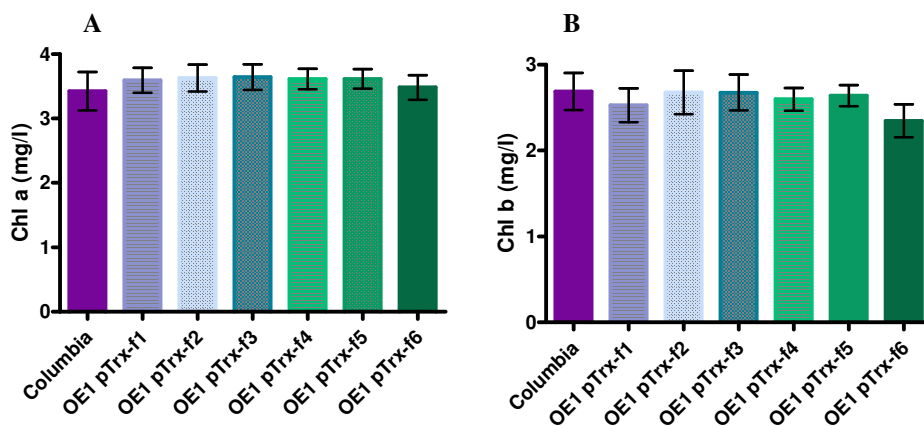


Figura 27. Efecto del aumento de Trx-f en la clorofila de las plantas OE-1 pTrx-f.

El contenido de clorofila fue determinado en 3 muestras de 3 discos de 0.28 cm² de hojas de plantas de 30 días de cada línea vegetal, en dos experimentos independientes. Fueron incubados 24 hs a 4°C en oscuridad en 1 ml de dimetilformamida, determinada la absorbancia a 647 y 664.5 nm y calculados las concentraciones de **A**-Clorofila a y **B**-Clorofila b (mg/L) según los espectros y coeficientes establecidos en [3]. Los datos fueron analizados mediante ANOVA de un factor (NS $p > 0.05$).

II-Estudio de las plantas transgénicas OE-1 pTrx-f en condiciones de estrés

II.1-Estrés oxidativo

Metil viológeno

El comportamiento de las plantas OE-6 pTrx-m frente al tratamiento con MV fue muy claro. Las plantas con mayor contenido de Trx-m (OE-6 pTrx-m1, -m2 y -m3) presentaron un % de supervivencia por lo menos dos veces mayor que las plantas salvajes. En cambio las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f presentaron una respuesta ambigua ante la acción del MV: 1-líneas transgénicas con mayor respuesta antioxidante o 2-mayor sensibilidad al tratamiento con MV que las plantas salvajes (Figura 28).

1-Líneas transgénicas con mayor respuesta antioxidante: La línea transgénica OE-1 pTrx-f1 presentó una marcada respuesta antioxidante desde los 15 días [(39,84 ± 5,57) % (plantas verdes/germinadas) ($p < 0,01$)] hasta los 30 días de tratamiento con MV [(36,35 ± 4,51) % (plantas verdes/germinadas) ($p < 0,001$)]. Comparado con la especie salvaje que se mantuvo relativamente constante hasta los 30 días [(22,17 ± 2,02)-(17,33 ± 1,43 %)] y luego decayó a [(10,52 ± 1,86) % (plantas verdes/germinadas)]. La línea transgénica OE-1 pTrx-f3 presentó una respuesta antioxidante un poco menor que la anterior, significativa hasta los 19 días [(37,58 ± 6,04) y (37,03 ± 4,53) ($p < 0,001$)] de tratamiento y un poco mayor que la planta salvaje hasta los 30 días de tratamiento con MV [(23,44 ± 3,88) ($p > 0,05$)]. La línea transgénica OE-1 pTrx-f5 presentó una respuesta antioxidante un poco menor que la OE-1 pTrx-f3 ($p > 0,05$) aunque mayor que las plantas salvajes entre los 18 [(24,92 ± 6,39) % (plantas verdes/germinadas)] y 30 [(20,14 ± 6,21) % (plantas verdes/germinadas)] días de tratamiento con MV.

2-Líneas transgénicas sin efecto o con mayor sensibilidad al tratamiento oxidativo: La línea transgénica OE-1pTrx-f2 mostró un comportamiento al agente oxidante similar a las plantas salvajes durante el desarrollo de la planta [(18,39 ± 4,93) y (14,36 ± 4,56) % (plantas verdes / germinadas)] a los 15 y 30 días de tratamiento, respectivamente. Aunque la línea transgénica OE-1 p Trx-f4 también mostró una respuesta antioxidante similar a la planta salvaje a los pocos días de tratamiento (18,13 ± 2,33 %), en el transcurso de los días resultó más sensible que ésta [(10,89 ± 2,24 %) (p>0,05)]. Finalmente y contrario a lo esperado la línea OE-1 pTrx-f6 resultó más sensible al tratamiento oxidante que las plantas salvajes desde muy temprano en el desarrollo [(9,127 ± 3,87) % (plantas verdes/plantas germinadas)] hasta los 30 días de tratamiento con el herbicida [(7,513 ± 2,05) % (plantas verdes/plantas germinadas)].

Esta respuesta dual de las plantas transgénicas al MV, demuestra que la misma Trx-f puede generar un aumento a la tolerancia o hipersensibilidad a esta droga. Por otro lado, no se encontró una correlación directa entre los niveles de expresión de Trx-f y la respuesta frente al MV. OE-1p Trx-f1, -f3 y -f5 presentaron niveles de Trx-f de [(4 ± 0,6), (10,3 ± 4) y (2,2 ± 0,6) veces mayor que la línea salvaje. OE-1 pTrx-f2, -f4 y -f6 presentaron niveles de expresión de Trx-f de [(5 ± 0,1), (2,6 ± 0,9) y (4,6 ± 0,7) veces mayor que el control. Es decir que la respuesta diferente, en principio no se la puede adjudicar al diferente contenido de proteína. Sin embargo deberíamos determinar 1- el contenido de Trx-f activa o 2-Trx-f glutationalizada y determinar si existe alguna relación entre estos parámetros y la respuesta antioxidante de las plantas.

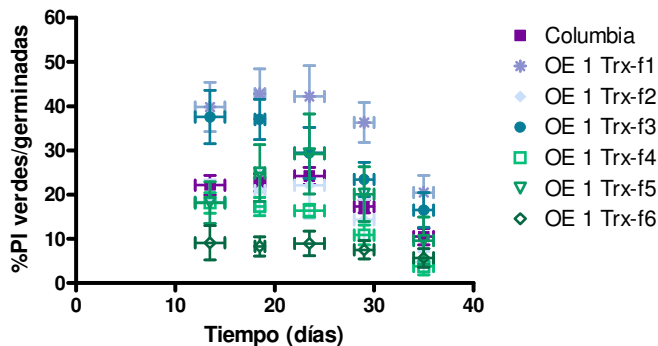


Figura 28. Efecto del tratamiento con MV en la supervivencia de plantas OE-1 pTrx-f.

Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo suplementado con 2 μM MV y a distintos tiempos (12-15 días, 18-19 días, 22-25 días, 28-30 días y 34-36 días) fue registrada proporción (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de dos factores y el test de Bonferroni para N >6 o N >18 en el caso de las plantas salvajes y (**): p < 0.05, (^): p < 0.01, (*): p < 0.001.

II.1.2-Hidroperóxido de Cumeno

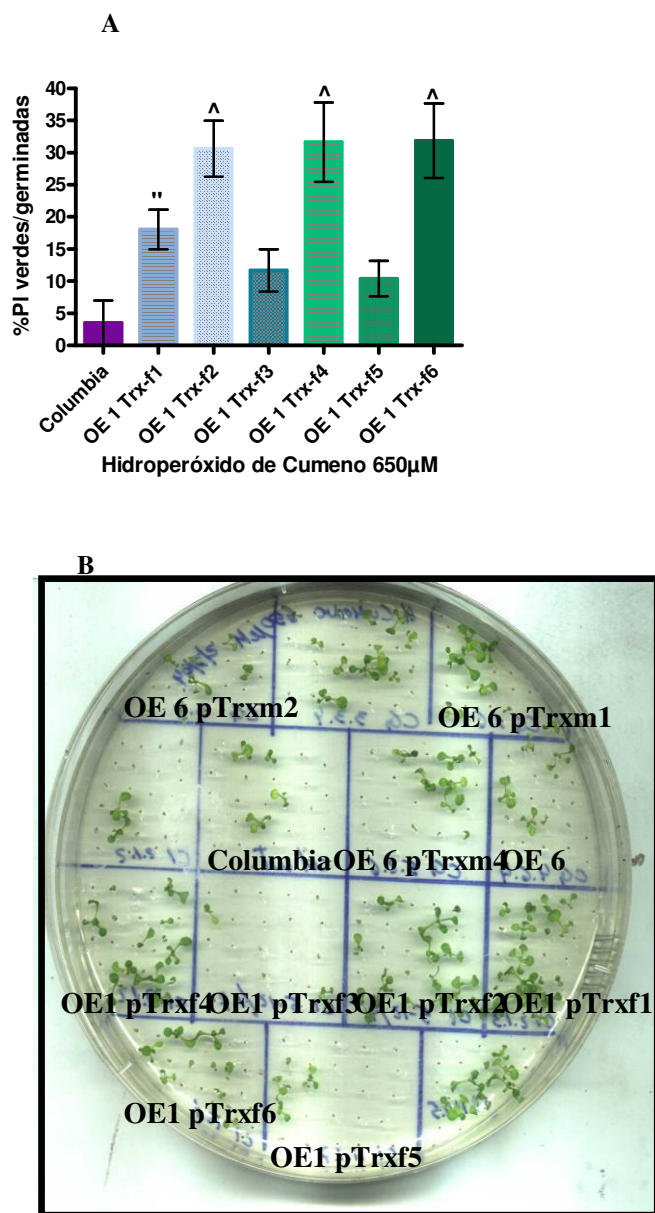


Figura 29. Efecto del tratamiento con Hidroperóxido de Cumeno en la supervivencia de plantas OE-1 pTrx-f.

A: Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 650 μM de Hidroperóxido de Cumeno y a los 25 días de desarrollo fue registrada proporción (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (NS) y el test de Dunnet (**): $p < 0.05$ en dos experimentos independientes con cuatro repeticiones para las líneas transgénicas y 8 repeticiones para la planta salvaje. **B:** Fotografía de plantas OE 1pTrx-f y plantas salvajes luego del tratamiento de Hidroperóxido de Cumeno durante 12 días.

Las líneas transgénicas OE-6 pTrx-m duplicaban y a veces triplicaban el % de supervivencia al Hidroperóxido de Cumeno referidas a la planta salvaje. Congruente con esta respuesta las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f mostraron mayor respuesta antioxidante desde temprano en el desarrollo (12 días) (Figura 29-B) y lo conservaron en los estadios más desarrollados (25 días). Los % (plantas

verdes/ germinadas) fueron: OE-1 pTrx-f1 [(18,04 ± 3,09) (P < 0.05)], OE-1 pTrx-f2 [(30,60 ± 4,36) (P < 0.01)], OE-1 pTrx-f3 [(11,67 ± 3,27) (P > 0.05)], OE-1 pTrx-f4 [(31,62 ± 6,15) (P < 0.01)], OE-1 pTrx-f5 [(10,40 ± 2,74) (P > 0.05)], y OE-1 pTrx-f6 [(31,84 ± 5,80) (P < 0.01)] respecto a la planta salvaje (3,51 ± 3,51) (Figura 29-A). A diferencia de lo que ocurrió en el tratamiento con MV para el cual las plantas OE-1 pTrx-f mostraron una respuesta ambigua, la respuesta antioxidante de las plantas al tratamiento con Hidroperóxido de Cumeno fue homogénea para todas las líneas y significativa para la OE-1 pTrx-f1, -f2, -f4 y -f6. Llamativamente las plantas que tuvieron una respuesta más débil al MV, fueron las que presentaron la respuesta más fuerte con Hidroperóxido de Cumeno (OE-1 pTrx-f2, -f4 y -f6) (Figura 29-A). Nuevamente no existe una correlación entre contenido de Trx-f y respuesta antioxidante al Hidroperóxido de Cumeno.

Rosa de Bengala

Similar a lo ocurrido con las plantas que sobre-expresan la Trx-m, la acción del Rosa de Bengala sobre las plantas que sobre-expresan la Trx-f fue mucho menor que la observada con los dos oxidantes utilizados previamente (MV e Hidroperóxido de Cumeno). Tanto a los 12 como a los 16 días de desarrollo, la sobre expresión de Trx-f en estas plantas no produjo un aumento en la supervivencia de las mismas (Figura 30 A y B).

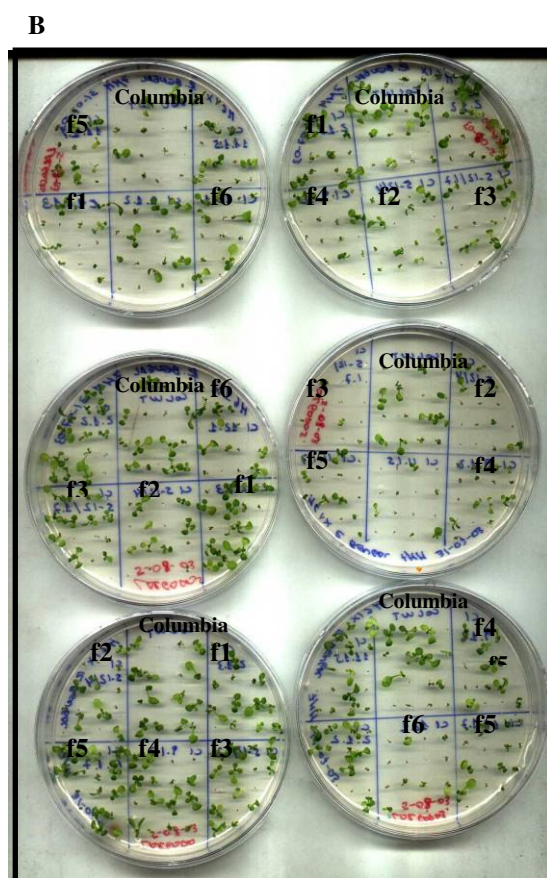
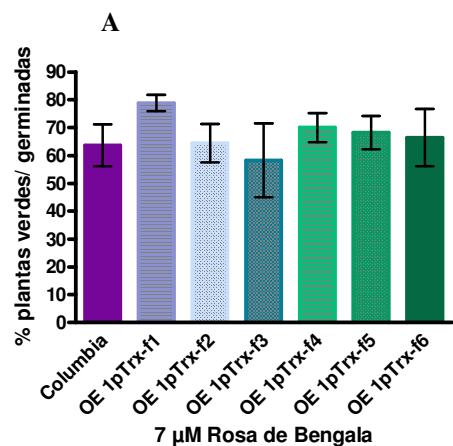


Figura 30. Efecto del tratamiento con Rosa de Bengala en la supervivencia de plantas OE-1 pTrx-f.

A: 20 Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 7 μ M de Rosa de Bengala y a los 16 días de desarrollo fue registrada la proporción (plantas verdes/ germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (NS) con N: 4 para las OE-1 pTrx-f y N: 10 para la línea salvaje. **B:** Fotografía de plantas OE-1 pTrx-f y plantas salvajes luego del tratamiento de Rosa de Bengala (descrito en A) durante 12 días. Columbia: línea salvaje, OE-1 pTrx-f: f1, f2, f3, f4, f5, f6.

Dietilmaleato

Las semillas de las distintas líneas OE-1 pTrx-f fueron sembradas en un medio de cultivo suplementado con 2,5 mM de Dietilmaleato, y sometidas a un régimen lumínico alternativo (16 horas de iluminación, 8 horas de oscuridad). Luego de 15 días, el % (plantas verdes/germinadas) fue $(26,80 \pm 11,04)$, $(19,25 \pm 14,39)$, $(5,26 \pm 5,26)$, $(15,88 \pm 5,96)$, $(14,28 \pm 8,16)$, $(32,50 \pm 7,39)$ y $(27,12 \pm 14,21)$ en plantas salvajes, OE-1 pTrx-f1, -f2, -f3, -f4, -f5 y -f6 respectivamente (Figura 31). Las Trx-f, y anteriormente las Trx-m, son proteínas que han sido vinculadas permanentemente a la reducción de los grupos sulfhidrilo pero, llamativamente la sobre-expresión de las mismas no provee una protección adecuada al dietilmaleato, un reactivo específico para dichos grupos.

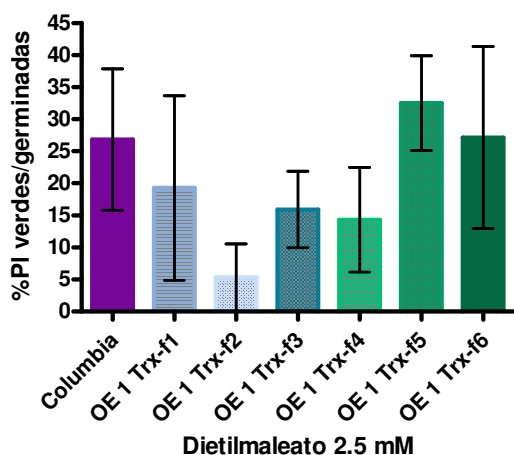


Figura 31. Efecto de la Trx-f en el tratamiento con Dietilmaleato en plantas OE-1 pTrx-f.

Semillas de las diferentes líneas vegetales fueron sembradas en medio de cultivo MG suplementado con 2.5 mM de Dietilmaleato y a los 16 días de desarrollo fue registrada proporción (plantas verdes / germinadas). Fue realizado ANOVA de un factor (NS) $N > 6$.

Metales Pesados

A partir de las plantas transgénicas obtenidas en nuestro laboratorio surgió una colaboración con el grupo de investigación del Dr Pagano (Cátedra de Bioquímica, Fac. Agronomía, UBA). Con ellos analizamos la respuesta de las plantas mencionadas al estrés oxidativo originado por metales pesados. En estos estudios fue utilizado el Cd^{2+} , un metal no redox incapaz de participar en la reacción tipo Fenton. La fitotoxicidad provocada por el Cd^{2+} ha sido atribuida a su reactividad con ligandos que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre, causando en consecuencia estrés oxidativo a través de la generación de ROS.

Dado que, al igual que la Trx-m

- 1-la Trx-f podría participar en una respuesta general al estrés y no solamente en tejidos verdes por un efecto indirecto, y
- 2-las concentraciones tóxicas de los metales inhiben el crecimiento radicular

Fue analizada la tolerancia de las plantas que sobre-expresan la Trx-f al $CdCl_2$ estimando la sensibilidad del crecimiento radicular. Las semillas fueron sembradas en una placa de Petri con medio de cultivo suplementado con 0, 50, 100 y 200 μM de $CdCl_2$, sometidas a bajas temperaturas para sincronizar la germinación, y cultivadas verticalmente durante 7 días para determinar la longitud de las raíces (mm).

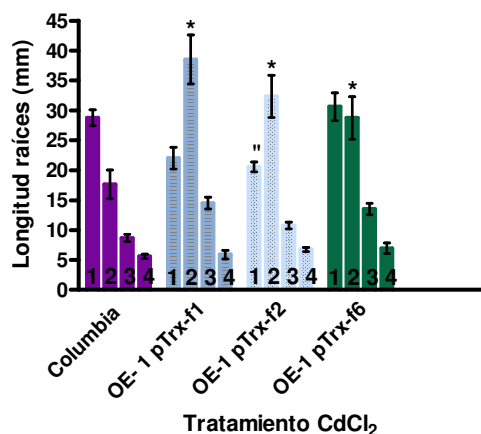


Figura 32. Efecto de la Trx-f sobre la elongación de raíces de las plantas OE-1 pTrx-f tratadas con CdCl₂

20 semillas de cada línea vegetal fueron sembradas en cajas conteniendo medio de cultivo suplementado con 1: 0, 2 50, 3: 100 y 4: 200 μM CdCl₂. Luego del tratamiento de frío, fueron cultivadas 7 días verticalmente para facilitar la posterior cuantificación de la raíz principal en mm.

En ausencia del metal la elongación radicular fue mayor en columbia ($28,8 \pm 1,4$ mm), OE-1 pTrx-f6 ($30,6 \pm 2,34$ mm) y un poco menor en OE-1 pTrx-f1 ($22 \pm 1,8$ mm) y OE-1 pTrx-f2 ($20,6 \pm 2,3$ mm) ($p < 0,05$ mm). Con el suplemento de $50 \mu\text{M}$ Cd²⁺ al medio de cultivo, las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f1 ($38,5 \pm 4,1$ mm) ($p < 0,001$), OE-1 pTrx-f2 ($32,4 \pm 3,5$ mm) ($p < 0,001$), OE-1 pTrx-f6 ($28,8 \pm 3,6$ mm) ($p < 0,001$) desarrollaron mucho mejor que la especie salvaje ($17,7 \pm 2,4$ mm) (Figura 32). El % de crecimiento radicular de cada línea cultivada con y sin Cd²⁺ fué 175 %, 157 % y 93 % respectivamente respecto a la salvaje (61,39 %). Mayores concentraciones de Cd²⁺ disminuyeron las diferencias observadas y afectaron el crecimiento de todas las líneas. Los resultados demostraron que la sobre-expresión de Trx-f en las diversas líneas OE-1 pTrx-f confirió resistencia al Cd²⁺. Los niveles y las diferencias en la resistencia son significativos sólo en una angosta ventana de concentraciones de Cd²⁺.

Parte III-Plantas antisentido para la Trx

I-Rasgos fenotípicos de las plantas transgénicas.

Características Generales de las plantas AS-3 Trx-f1 en condiciones normales de luz y temperatura

I.1-Germinación de las semillas

La manipulación genética de las plantas no afectó la viabilidad de las semillas que presentaron un % de germinación del $(94 \pm 6) \%$ en la línea AS-3 Trx-f1 y $(84 \pm 4) \%$ en las plantas salvajes ($p > 0,05$ análisis t, N: 2).

I.2-Morfología de las plantas

Apenas comenzamos con el análisis de las plantas, fue identificada la línea transgénica AS-3 Trx-f1 debido a su fenotipo particular. Sus hojas eran más pequeñas, delgadas y cloróticas que la planta salvaje durante el desarrollo (Figura 33 A y B).

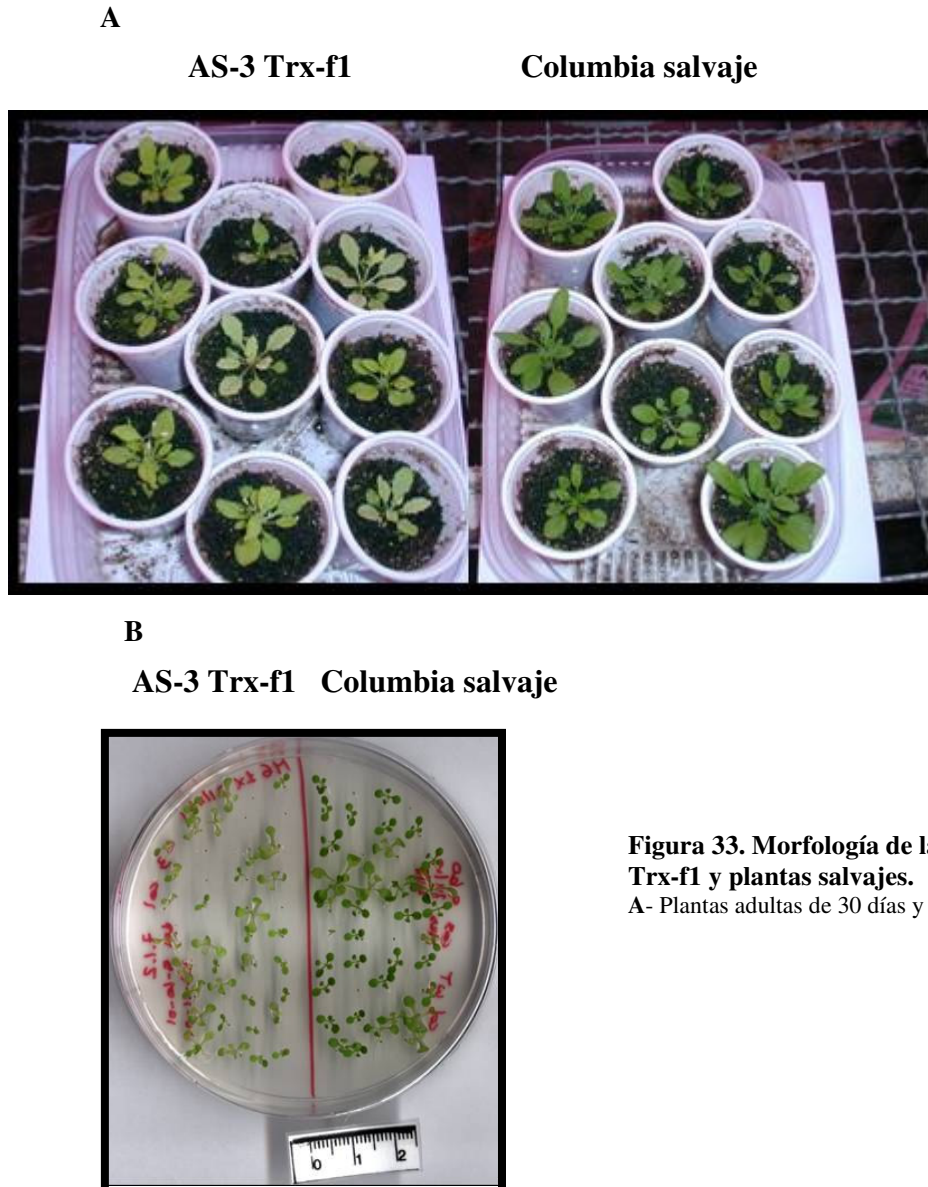


Figura 33. Morfología de la línea transgénica AS-3 Trx-f1 y plantas salvajes.

A- Plantas adultas de 30 días y B-Plantas jóvenes de 12 días.

I.3-Biomasa vegetal

El tamaño menor observado en las hojas de la línea transgénica AS-3 Trx-f1 fué ratificado en un análisis de Biomasa. El peso fresco de la línea transgénica resultó aproximadamente la mitad [(156,8 ± 13,8 mg) (p<0,0001)] que el observado para las plantas salvajes (371,4 ± 27,3 mg) (Figura 34 A). Y la reducción del peso seco fue aun mayor: (13,7 ± 1,2) mg para la línea AS-3 Trx-f1 (p<0,0001) y (38,7 ± 3 mg) para las plantas salvajes (Figura 34 B). Congruente con ello, el cociente peso fresco/peso seco fué mucho mayor en la planta transgénica debido a la mayor reducción en su peso seco (Figura 34 C). Estos resultados sugieren que una pequeña reducción en la expresión de Trx-f limitarían el crecimiento de la planta.

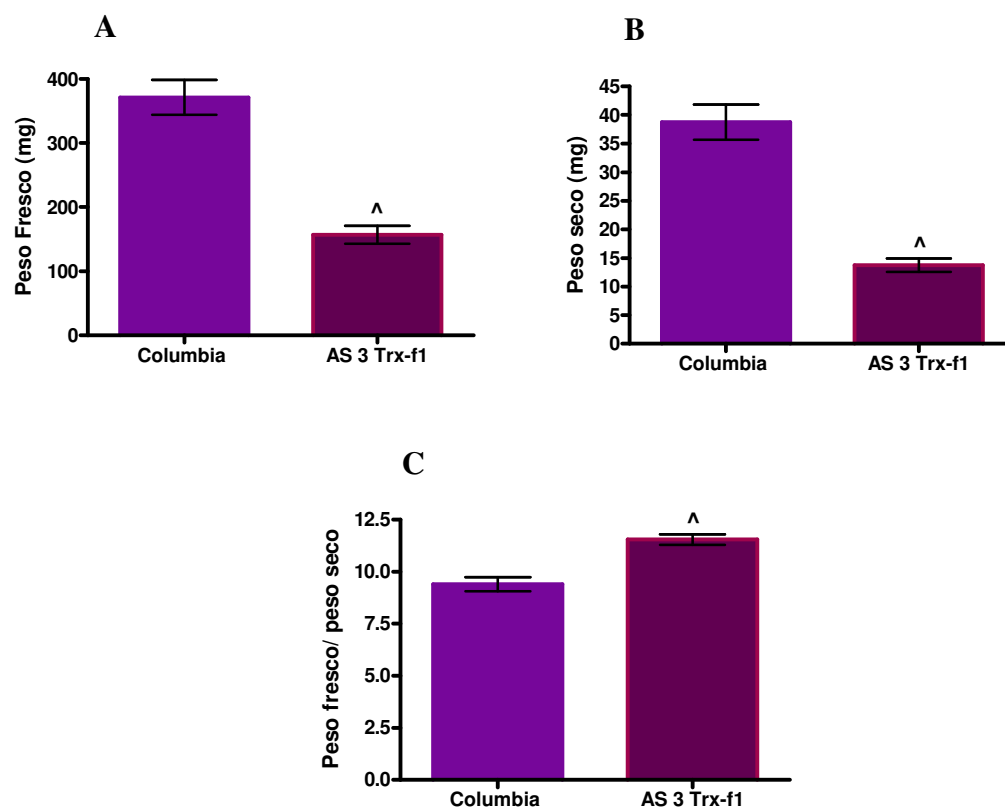


Figura 34. Efecto de la expresión reducida de la Trx-f en la Biomasa vegetal de las plantas AS 3 Trx-f. Plantas de 30 días de columbia salvaje y AS-3 Trx-f1 fueron utilizadas para determinar A-Peso fresco, B-Peso seco, C- Relación peso fresco/ peso seco. Fueron analizados los datos mediante análisis t para muestras desapareadas para N: 4.

I.4-Contenido de almidón y azúcares solubles

Resultados previos de este trabajo (parte I y II) demostraron que la mayor expresión de Trx-m o Trx-f incremenó el contenido de almidón en los cloroplastos de las hojas. Congruente con ello, el contenido de almidón en las hojas de las plantas antisentido para la Trx-f fué casi la mitad del nivel determinado para la planta salvaje (Figura 35 A). Sin embargo este efecto no fué acompañado por el contenido de azúcares solubles, que resultó similar en la línea transgénica y las plantas salvajes (Figura 35 B). Cuando el flujo a través del ciclo de Benson Calvin se reduce debido a la

disminución de una enzima relacionada (en este caso Trx-f), la planta mantiene la tasa de crecimiento y el nivel de azúcares exportables a expensas del contenido de almidón. Esta característica pudo observarse con plantas antisentido para la SBPasa [204] y FBPasa [184], para la Aldolasa plastídica, y la AGPasa (sintetasa de almidón) [205].

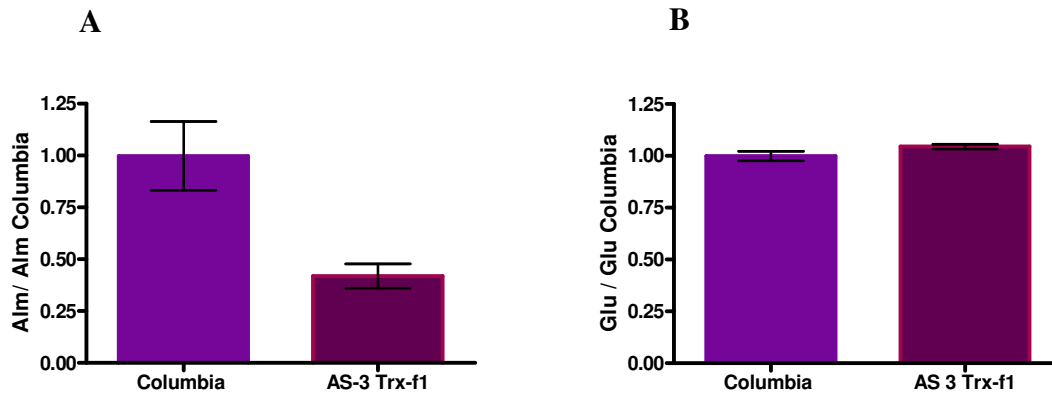


Figura 35. Efecto de la expresión reducida de la Trx-f en el contenido de almidón y azúcares solubles en plantas AS-3 Trx-f1.

Fueron cosechados ca. 15 discos (0.6 cm) de las hojas más grandes provenientes de 15 plantas de 45 días de desarrollo expuestas 10 hs a la luz. Luego de la extracción del material fue determinado: **A**-El contenido de almidón en la fracción insoluble (μg almidón/mg hoja) (N: 2) y **B**-El contenido de azúcares solubles en la fracción del sobrenadante (μg glucosa/mg hoja) (N2). En ambos casos los datos fueron relativizados a la planta salvaje y fueron analizados mediante Análisis de T.

I.5-Contenido de clorofila

La Línea AS-3 Trx-f1 presentó reducción en los niveles de clorofila a (57,7 %) y clorofila b (27,32 %) respecto a la planta salvaje. La relación Clorofila a/ Clorofila b fué 3,67 para AS-3 Trx-f1 y 1,74 para Columbia salvaje. Los niveles de carotenoides de la línea AS-3 Trx-f1 presentaron un 72,19 % respecto a la planta salvaje (resultados no mostrados) Esta reducción en el nivel de carotenoides y clorofila b, estarían reflejando una disminución de la captación de energía lumínica dada por el complejo antena. Este fenómeno es común en plantas que se encuentran en ambientes muy soleados, donde las mismas necesitan reducir la captación de energía lumínica de manera de disminuir la fotoinhibición.

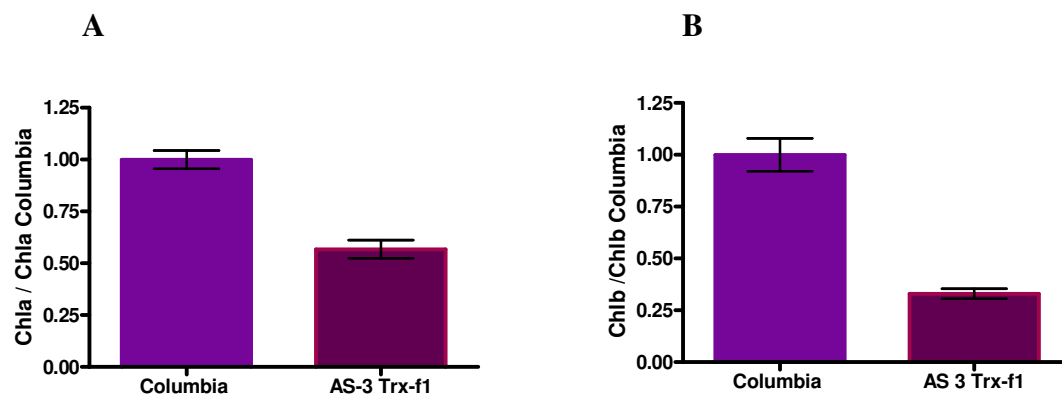


Figura 36. Efecto de la expresión reducida de la Trx-f en la clorofila de las plantas AS-3 Trx-f1.

El contenido de clorofila fue determinado en 3 muestras de 3 discos (0.28 cm²) de hojas de plantas de 30 días, en dos experimentos independientes. Fueron incubados 24 hs a 4°C en oscuridad en 1 ml de dimetilformamida, determinada la absorbancia a 647 y 664.5 nm y calculados las concentraciones de **A**-Clorofila a y **B**-Clorofila b (mg/L) según los espectros y coeficientes establecidos en [3] Los datos fueron expresados por cm² de hoja, relativizados a los valores obtenidos para las plantas salvajes y analizados mediante prueba de T.

1.6 Actividad enzimática de enzimas de Benson Calvin

Debido a que la Trx-f regula la actividad de varias enzimas del ciclo de Benson Calvin, decidimos analizar a dos de estas enzimas (SBPasa y FBPasa) para determinar el efecto de la reducción de la misma sobre sus actividades. Fue observada una pequeña reducción en la actividad de la enzima SBPasa, aunque no muy significativa y similar actividad de la FBPasa endógena en plantas antisentido AS-3 Trx-f1 y plantas salvajes (Figura 37-A y B). Este resultado indica que los niveles de dos enzimas claves del ciclo de Benson Calvin no son afectados por la expresión. Esto es coherente con estudios previos en los cuales la reducción de una enzima de Benson Calvin sujeta a regulación redox, no afecta sensiblemente la actividad de las otras enzimas del ciclo y modifica significativamente los metabolitos intermediarios.

1.7 Actividad Trx-f

Para determinar la actividad de la Trx-f en plantas AS-3 Trx-f1 y plantas salvajes recurrimos a una medición indirecta basada en la capacidad de esta proteína para activar específicamente a la FBPasa. Para ello utilizamos: 1-FBPasa recombinante de colza y 2-extracto dializado y calentado para inactivar a la FBPasa sensible a temperaturas que no modifican la actividad de Trx. Utilizamos distintos volúmenes de este extracto para determinar la capacidad de activación del mismo respecto a la FBPasa comparativamente. Aunque se observa un pequeño incremento en la activación de la FBPasa endógena con el extracto de las plantas salvajes, no resultó significativo.

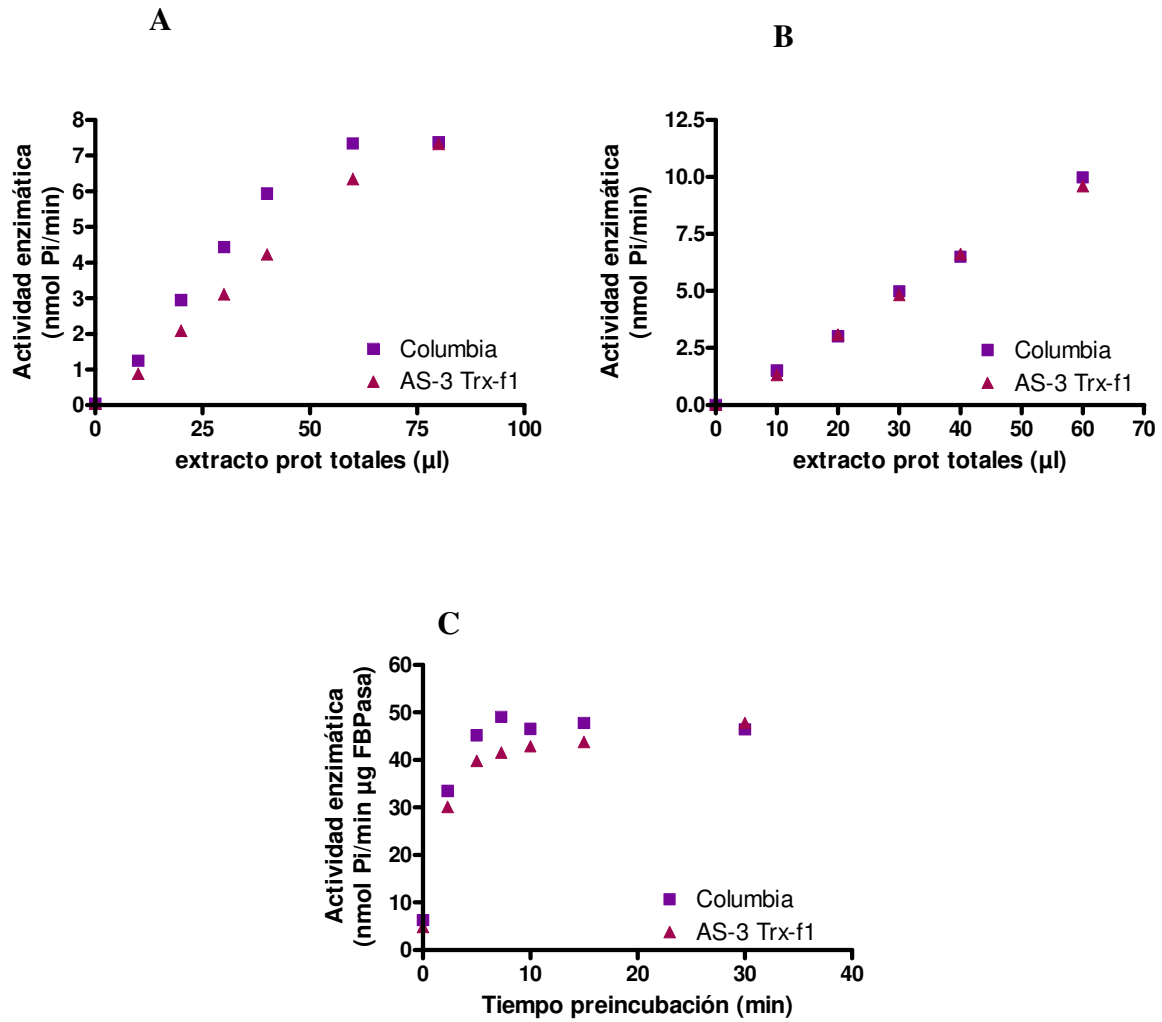


Figura 37. Efecto de la expresión reducida de la Trx-f en la actividad de SBPasa y FBPasa .

Fueron preparados extractos partir de ca. 25 discos de hoja (0.6 cm de diámetro) de plantas de 35 días en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), EDTA 3 mM, βMet 0.05%, y NaCl 50 mM. El homogenato fué centrifugado a 12000g y la fracción sobrenadante dializada (MCWO 6-8KDa) contra Acetato de Sodio 50 mM (pH 5.5), βMet 0.01% y EDTA 0.1 mM.

A-Actividad SBPasa: La actividad fue determinada en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7.9), MgCl₂ 15 mM, DTT 10 mM, SBP 1.5 mM y EGTA 0.5 mM durante 30 minutos a 24°C. La reacción fue frenada con el agregado del reactivo de CHEN (3 minutos a 37°C). Como control se eliminó el SBP de la mezcla de reacción. **B-Actividad FBPasa:** La actividad fué determinada en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), FBP 3 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0.1 mM y DTT 20 mM durante 20 minutos a 23°C. La reacción fue frenada con el agregado de CHEN (3 minutos, a 37°C). Como control fue determinada la actividad en presencia del inhibidor fructosa-6-fosfato 3 mM. **C-Actividad Trx-f:** La FBPasa recombinante de colza (ca 0.7µg) fue preincubada por 10 minutos con distintas concentraciones de Trx (µl extracto) en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7.9), CaCl₂ 0.1 mM FBP 0.75mM y DTT 1mM. La capacidad catalítica de la enzima fue medida con el agregado de una solución de buffer Tris-HCl 100mM (pH 7.9), MgCl₂ 2mM, FBP 1mM y EGTA 0.1mM e incubación de 3 minutos. Las reacciones fueron detenidas por el agregado del reactivo de Chen para la determinación del fosfato liberado.

CONCLUSIONES

El sistema cloroplástico de Trxs conocido a finales de los 1990` era relativamente simple. Estas organelas contenían dos Trxs denominadas Trx-m y Trx-f, involucradas en la regulación dependiente de la luz de varias enzimas relacionadas principalmente al metabolismo del carbono. Inicialmente, fueron implicadas NADP-MDH, cFBPasa, GAPDH, SBPasa, PRK, ATPasa y G6PDH pero luego fueron identificadas nuevas enzimas: ACCasa, AGPasa, Rubisco activasa y sugeridas GS, Fenilalanina amonio liasa, Fd-GOGAT, APS y RB60. Desde su descubrimiento muchos estudios permitieron comprender el mecanismo molecular subyacente de la regulación dependiente de Trx de varias enzimas, clonar los genes involucrados, y obtener las estructuras cristalinas. Sin embargo esta visión simple fue abruptamente modificada a partir de la incorporación de la genómica y proteómica.

La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* reveló la presencia de dos secuencias para la Trx-f, cuatro secuencias para la Trx-m, incluyendo nuevos tipos de Trxs cloroplásticas: una Trx-x y dos Trx-y. La comparación de secuencias de las Trxs vegetales, animales, bacterianas y de levaduras sugirió un origen procariota para las Trx-m, Trx-x y Trx-y, y un origen eucariota para las Trx-f. La multiplicidad de Trxs (con distinto origen evolutivo) planteó la posibilidad de especificidad o redundancia en las mismas. Este problema fue examinado empleando distintas estrategias:

- a-Complementación funcional con las Trxs cloroplásticas en una doble mutante de Trxs citoplasmáticas en levaduras.
- b-Estudios bioquímicos con las proteínas blanco purificadas y las diversas Trxs cloroplásticas.
- c-Aislamientos de nuevos blancos utilizando Trx mutantes de monocisteína acopladas a una matriz para aislar proteínas a partir de extractos cloroplásticos o visualización de tioles reducidos (monobromobimano, Cy5 maleimida, ¹⁴C-Iodoacetamida en proteínas blanco luego de incubación con Trx.

En este trabajo fue abordado el tema de la especificidad o redundancia con dos nuevos enfoques:

1-El primero y más importante fué la preparación de plantas de *Arabidopsis* con los niveles de Trx-m o Trx-f cloroplásticas modificados para observar el efecto provocado en la planta sobre diferentes parámetros fisiológicos y distintas condiciones de cultivo, y

2-Complementar el primer enfoque, analizando la expresión de las isoformas de Trx cloroplásticas en diferentes condiciones de estrés.

Fueron obtenidas en total 10 líneas transgénicas independientes, homocigotas, sobre-expresantes de la Trx-m o Trx-f con niveles de expresión ca.1,4 -10 veces superiores a las plantas salvajes. Por el contrario, a pesar de que analizamos más de 40 líneas transgénicas independientes transformadas con las cuatro construcciones antisentido, fué obtenida una única línea, AS-3 Trx-f1 con niveles de Trx-f reducidos un 20 % (relativo al salvaje) en plantas completamente desarrolladas.

La biomasa vegetal de estas plantas fué modificada en base a una reducción, más que a un aumento en el contenido de Trx. Niveles elevados de Trx-m o Trx-f (hasta 10 veces más) no modificaron apreciablemente el peso fresco y peso seco de las plantas transgénicas. En cambio, una reducción tan sólo del 20 % de Trx-f en las plantas de *Arabidopsis* redujo el peso fresco a la mitad y más aún el peso seco. Estos resultados serían congruentes con una reducción en (i)-el nivel de intermediarios, (ii) la velocidad del ciclo de Benson-Calvin y (iii) el contenido de fotosintatos, a raíz de la menor activación de varias enzimas participantes del mismo por la Trx. En conjunto, los datos coinciden con la reducción en el crecimiento y/o biomasa vegetal en plantas antisentido para las enzimas del ciclo de Benson Calvin reguladas por Trx (FBPasa, SBPasa, Rubisco activasa) aunque el nivel de reducción enzimática para observar el efecto fué variable. Por otro lado, a

diferencia de nuestro trabajo, tanto la reducción como el incremento de la MDH en plantas transgénicas, modificaron la biomasa vegetal.

Sin embargo, la actividad de las enzimas SBPasa, y FBPasa no se modificaron en las plantas AS-3 Trx-f1 y la actividad de la Trx-f es similar a las plantas salvajes a pesar de la reducción del contenido proteico. Estos resultados pueden ser consecuencia de (i)-una baja sensibilidad en la metodología utilizada para detectar pequeños cambios en las determinaciones enzimáticas o (ii) puede ser el resultado de una regulación muy fina que permite ajustar la activación de las enzimas de Benson Calvin con gran plasticidad. Estos resultados coinciden con estudios previos en los cuales la reducción de una enzima de Benson Calvin sujeta a regulación redox, no afecta sensiblemente la actividad de las otras enzimas del ciclo y modifica significativamente los metabolitos intermediarios.

En los cloroplastos de las hojas, el almidón es sintetizado durante el día como una reserva transiente y degradado durante la noche para mantener el metabolismo no fotosintético y la exportación de sacarosa. La AGPasa cataliza el primer paso en la síntesis de este polímero convirtiendo glucosa 1-fosfato y ATP en ADP glucosa y PPi. En este trabajo fué observado que una elevada expresión de Trx-m o Trx-f aumentó el contenido de almidón y azúcares solubles en las hojas de las plantas transgénicas por lo menos al doble. Este resultado es coherente con estudios previos en los cuales 1-la incubación *in vitro* de la AGPasa con Trx-f o Trx-m o 2-estudios con discos de hojas tratadas con DTT aumentaron más de tres veces la actividad de la enzima y el contenido de almidón, respectivamente [151, 206]. En cambio, la disminución del contenido de Trx-f en las plantas antisentido AS-3 Trx-f1, redujo el contenido de almidón a la mitad y no provocó ningún efecto sobre el contenido de azúcares solubles en las hojas. Cuando el nivel de Trx-f disminuye (al igual que ocurre con plantas antisentido para la FBPasa, SBPasa y PRK), para la planta es una prioridad mantener la tasa de crecimiento y el nivel de azúcares exportables a expensas del contenido de almidón.

El aumento en el contenido de almidón observado en las plantas que sobre-expresan Trx pudo deberse a un incremento de la síntesis o una disminución de la degradación. El aumento de Trx pudo incrementar el contenido de triosas fosfato destinadas a la síntesis de almidón en cloroplastos y el contenido de fosfoglicerato (3-PGA). Asimismo, la enzima AGPasa, clave en la síntesis de almidón, pudo activarse concertadamente por la Trx *per se* y por el regulador alostérico 3-PGA. Estas consideraciones no excluyen que la Trx-m y/o Trx-f participen directa o indirectamente disminuyendo la degradación de almidón. Estudios recientes que involucran bioquímica y proteómica han vinculado a las Trx-m y Trx-f con enzimas que participan en la degradación del almidón [207]. Es importante destacar que en las plantas OE-6 pTrx-m el contenido de almidón aumenta proporcionalmente al contenido de Trx-m, efecto que no resulta claro en las plantas OE-1 pTrx-f. Esto podría ser resultado de un cambio post-traducciona que afecte la actividad en la Trx-f y resulte en la falta de correlación del nivel de proteína y niveles de almidón en hoja (ver más adelante).

Al igual que la biomasa, el contenido de Clorofila a y b varió solamente cuando el nivel de Trx en la planta resultó limitante. Aunque las plantas transgénicas expresaron altos niveles de Trx-m o Trx-f, los valores de clorofila a y b fueron similares a los observados para las plantas salvajes. Sin embargo, una pequeña reducción en el contenido de Trx-f disminuyó a la mitad el nivel de clorofila a y más aun de clorofila b y de carotenoides, reflejando una reducción de la captación de energía por el sistema antena. Este fenómeno es común en plantas que se encuentran en ambientes muy soleados, donde las mismas necesitan reducir la captación de energía lumínica para disminuir la fotoinhibición, congruente con una limitación de aceptores NADP^+ y ADP^+ , resultante de la reducción de Trx-f.

Las plantas producen continuamente ROS, predominantemente en cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, que dañan las macromoléculas y metabolitos. Aunque la remoción de estos compuestos tóxicos debe ser estrictamente controlada, factores bióticos (infección bacteriana, insectos) y abióticos (alta irradiancia, drogas, alta temperatura) perturban el equilibrio entre la producción y la degradación de las ROS. En este contexto, es ampliamente conocido que el metil viológeno y el hidroperóxido de cumeno generan O_2^-/H_2O_2 en los cloroplastos iluminados, dañando en consecuencia a las plantas. La sobre-expresión de Trx incrementó la resistencia a ambas drogas oxidantes en las plantas transgénicas. El aumento de Trx-m duplicó o en algunos casos triplicó el % de plantas sobrevivientes a los tratamientos oxidativos. En cambio el aumento de Trx-f no afectó por igual a ambos tratamientos y no observamos una correlación directa entre el nivel de proteínas y la respuesta observada. En presencia de hidroperóxido de cumeno, la supervivencia de las plantas transgénicas (líneas OE-1 pTrx-f1, -f2, -f4, y -f6) fué tres o más veces superior a las plantas salvajes. Esto es coherente con estudios de expresión del ARNm de Trx en plantas tratadas con peróxido de Hidrógeno, los cuales sugieren una respuesta concertada de varias isoformas de esta proteína. Los niveles de expresión de la Trx-m1 (AF095749), Trx-m3 (AF095751), Trx-m4 (AF095752) y Trx-f2 (AF144386) fueron máximos (APENDICE I, pg 104-A) en estas condiciones. En cambio el MV generó una respuesta ambigua: 1-líneas transgénicas con mayor respuesta antioxidante (OE-1 pTrx-f1 y -f3) o 2-mayor sensibilidad al tratamiento con MV que las plantas salvajes (OE-1 pTrx-f4 y -f6). Dado que el MV genera O_2^- que luego dismuta en H_2O_2 , es posible que la elevada acumulación inicial del O_2^- sea suficiente para disparar una vía de señalización particular en respuesta al estrés oxidativo. Estos efectos generados ante la acción de Peróxido de cumeno y en parte MV, no fueron observados cuando se utilizaron Rosa de bengala, Dietilmaleato o diamida tres drogas que generan estrés oxidativo por un mecanismo diferente.

Durante el desarrollo experimental no fue observada una correlación directa entre el nivel de proteína en las plantas sobre-expresantes de Trx-f y la respuesta observada, probablemente debido a una modificación post-traducciona. Estudios recientes, han establecido que en condiciones de estrés oxidativo el GSH participa en una modificación post-traducciona denominada glutationilación, consistente en la formación de disulfuros mixtos entre los tioles de la proteína y el GSH. Entre todas las Trxs cloroplásticas, la única sujeta a glutationilación *in vitro* es la Trx-f debido a la presencia de una cisteína extra muy conservada [178]. Sobre estas bases, si el aumento de glutationilación afecta a la actividad PDOR de la Trx-f, entonces las variaciones en la proporción GSH:GSSG causadas por el estrés oxidativo podrían conducir a un grado diferente en la modificación post-traducciona de las Trx-f en cada una de las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f. Esto no excluye la existencia de otros mecanismos post-traduccionales que limiten la actividad PDOR de la Trx-f en estas plantas.

Para hacer el estudio extensivo a otras ROS, fué estudiado el efecto del aumento de las Trx-m o Trx-f en las plantas sometidas a estrés oxidativo inducido por metales pesados o altos niveles de NaCl en el medio de cultivo. En estos ensayos observamos que la sobre-expresión de Trx en *Arabidopsis* resultó en plantas con un alargamiento de raíces menor a las plantas salvajes, aunque no en todos los casos fue significativo. Este efecto también fue observado al preincubar semillas de tabaco con DTT o GSH [208]. Tanto la incorporación de Fe^{2+} , Cd^{2+} o NaCl al medio de cultivo provocó un acortamiento de las raíces de las plantas salvajes, reflejando la fitotoxicidad de la acumulación de estas sales. Sin embargo el aumento de Trx-m intensificó el acortamiento de las raíces en el medio suplementado con Fe^{2+} respecto al crecimiento en el medio estandar (MS ¼ X). Esto fue contrario a nuestras expectativas, ya que en experimentos previos demostramos el aumento de la capacidad antioxidante en las plantas que sobre-expresan Trx-m y supusimos que la misma podía extenderse al estrés oxidativo generado por la incorporación de Fe^{2+} al medio de cultivo. En varios trabajos fue sugerida la participación del GSH en la tolerancia a metales, aunque se desconocen los blancos directos [209, 210]. Por otro lado, en levaduras se ha correlacionado a las

Trx-s con la reducción del GSH. Sin embargo, un desbalance del buffer redox debido al aumento de Trx-m y aumento de la proporción GSH:GSSG generó contrariamente a lo esperado una débil hipersensibilidad al Fe^{2+} en el crecimiento radicular y no tuvo efecto durante el desarrollo de plantas adultas. En cambio, en las plantas OE-1 pTrx-f, la sobre-expresión de Trx-f revierte la fitotoxicidad del Cd^{2+} sobre el alargamiento radicular con un acortamiento importante en las plantas salvajes y un alargamiento radicular significativo (32-110%) en las líneas transgénicas OE-1 pTrx-f. La Trx-f parece tener una respuesta diferente frente a este metal y no sólo afectaría al crecimiento radicular, como ocurrió con la Trx-m y el Fe^{2+} , sino también al crecimiento de las plantas disminuyendo el contenido de Cd^{2+} en sus hojas. Dos posibles explicaciones sugerimos ante este hecho:

1-Es posible que en condiciones de estrés oxidativo (generado por Cd^{2+}), la Trx-f presente glutationilación disminuyendo la activación de varias enzimas del ciclo de Benson Calvin. De esta manera permite direccionar el poder reductor hacia la detoxificación de ROS a través de la activación de la ascorbato-peroxidasa y glutation-peroxidasa y peroxirredoxinas. Esta suposición es congruente con la variación en el nivel de ARNm de enzimas involucradas en fotosíntesis o respuesta antioxidante en *Chlamydomonas reinhardtii* incubadas en presencia de Cd^{2+} . [211]

2-Otra posible explicación es que la mayor expresión de la Trx-f específicamente afecte la actividad o expresión de alguna/s enzima/s involucradas en la disminución de la incorporación o el aumento del eflujo de Cd^{2+} a través de bombas.

Por otro lado, el % de reducción del crecimiento radicular con el tratamiento salino respecto al crecimiento en condiciones normales, resultó menor para las plantas con mayor expresión de Trx-m que las plantas salvajes. Estos efectos serían indirectos y por eso no muy significativos. En estas condiciones, cambios en el contenido de Trx-m y en el balance GSH:GSSG pudieron activar proteínas regulatorias sensibles a cambios redox que controlan la actividad de enzimas indispensables durante la germinación y el desarrollo de las plántulas sin afectar el crecimiento de la planta adulta.

Cuando las plantas están expuestas a una intensidad lumínica muy elevada, la presencia simultánea de a) reacciones altamente energéticas y b) elevadas concentraciones de O_2 contribuyen a la formación de una elevada proporción de ROS durante el proceso fotosintético [212]. Esto desencadena la inactivación del PSII y la inhibición de la fotosíntesis. Las plantas utilizan dos estrategias para proteger al aparato fotosintético de la fotoinhibición:

1-La disipación térmica del exceso de energía de excitación en el complejo antena del PSII (Qnp) y

2-La habilidad del PSII de transferir electrones a varios aceptores en el cloroplasto debido a su capacidad para transferir los equivalentes de reducción en la cadena transportadora de electrones (Qp) [213].

Para estudiar indirectamente la actividad fotosintética de las plantas en condiciones de estrés lumínico, determinamos la fluorescencia en hojas de plantas salvajes y transgénicas OE-6 pTrx-m sometidas 4 hs a altas irradiancias. La sobre expresión de Trx-m redujo la eficiencia fotosintética en plantas sometidas a estrés lumínico, principalmente por una disminución en la habilidad del PSII de transferir electrones a varios aceptores en los cloroplastos de las plantas transgénicas OE-6 pTrx-m (Qp) y aumentó el apantallamiento no fotoquímico (Qnp), debido a que el exceso de energía originado por la sobre reducción de la cadena transportadora de electrones fotosintéticos se disipó como calor. Por otro lado, el análisis de la expresión del ARNm de Trx-m de *Arabidopsis* muestra que las plantas expuestas a altas irradiancias aumentan la expresión del ARNm de las Atm1 y Atm4 respecto a las plantas control. Este aumento es muy significativo y sugeriría que ambas isoformas son las responsables en la respuesta oxidante en estas condiciones (APENDICE I, pg 104).

Estudios previos mostraron que la reducción en el contenido de cFBPasa en plantas aclimatadas a baja temperatura y 50 $\mu\text{moles quanta/m}^2\text{s}$ presentó una reducción e incremento en el apantallamiento fotoquímico y no fotoquímico respectivamente [202]. En base a ello y a que la Trx activa a varias enzimas del ciclo de Benson Calvin consumiendo ATP y NADPH, supusimos que un aumento en la expresión de esta proteína llevaría a un incremento del apantallamiento fotoquímico en condiciones de estrés lumínico. Paradójicamente el aumento de Trx-m en estas plantas redujo el apantallamiento fotoquímico y aumentó el no fotoquímico. En los últimos años, los estudios de proteómica adjudicaron nuevas funciones a las Trxs cloroplásticas vinculándolas a la regulación del transporte de electrones a través del PSII y PSI, sin conocer evidencias sobre los procesos específicos que ellas regularían.

En plantas vasculares la relación estequiométrica de PSII/PSI: 1.7 junto con el mayor tamaño del complejo antena que acompaña al PSII plantea una mayor absorción de quanta por parte de éste fotosistema. Sin embargo, el flujo de electrones más eficiente entre los PSII y PSI requiere coordinación en la tasa de absorción y utilización de la energía lumínica por ambos fotosistemas. Esto se logra mediante una proteína quinasa en la membrana tilacoidal del cloroplasto que fosforila un residuo treonina en el complejo proteína-pigmento del LHCII y de esta forma, migra hacia regiones donde la membrana no constituye sacos. Esta migración lateral modifica el balance energético a favor del PSI, que se ubica en la lamela del estroma [155-159].

Un modelo propuesto establece que la reducción del complejo plastoquinona y citocromo b_6/f por baja-media irradiancia (i.e cuando el PSII ha sido activado más frecuentemente que el PSI) provoca un cambio conformacional en la quinasa tilacoidal que fosforila LHCII, ocultando el puente disulfuro presente en la misma y activándola para fosforilar proteínas de LHCII. En alta irradiancia se expone el puente disulfuro de la enzima por un mecanismo desconocido que es reducido por el sistema FTR a través de la Trx, HCF164 u otros tioles estromáticos (i.e exceso de equivalentes de reducción) inactivando a la quinasa y anulando la fosforilación de proteínas en LHCII [160]. Un aumento de la Trx-m en las plantas OE-6 pTrx-m en condiciones de alta irradiancia, resultaría en una mayor inhibición de la kinasa y consecuentemente la no fosforilación de proteínas del LHCII impediría su movilización. De esta manera el sistema quedaría desbalanceado y el PSII sobre reducido

En conjunto estos resultados sugieren que las Trx-f y Trx-m: (1) regulan *in vivo* la síntesis de almidón, probablemente a través de la activación de la AGPasa, (2) participan en la respuesta al estrés oxidativo, probablemente a través de mecanismos diferentes dependiendo de las ROS generadas, y (3) participan en la regulación del transporte de electrones fotosintéticos, modificando la eficiencia fotosintética y apantallamiento fotoquímico en estrés lumínico.

Por otro lado, ratifican su participación en el ciclo de Benson Calvin y procesos relacionados (biomasa vegetal) y en la regulación del contenido de pigmentos para regular la captación lumínica.

MATERIALES Y METODOS

I -PREPARACION DE PLANTAS TRANSGENICAS

Preparación de las construcciones genéticas

En general, las técnicas de biología molecular, siguieron los lineamientos sugeridos en los protocolos de los proveedores de los distintos insumos y los descritos en diversos manuales de laboratorio [214, 215].

Subclonado del ADNc de la Trx en el vector binario pBI121 en *E. coli*

El vector binario pBI121 (AF485783), es un plásmido de 14,7, capaz de replicar en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, utilizado ampliamente para la transformación de plantas (Apéndice III, pg 106).

Preparación de los insertos que codifican para la variante de Trx

La preparación de los insertos fue realizada a partir de: a)-ADNc amplificados por PCR o b)-subclonados en forma directa de una preparación de ADN plasmídico del pET-22 b⁽⁺⁾-Trx-m Precursora (534 pb).

a-ADNc amplificados por PCR

El ADNc del precursor de la Trx-f fue amplificado mediante PCR para su sobre-expresión, y el ADNc del precursor y la forma madura de la Trx-f y Trx-m para la sub-expresión de las proteínas. Para una mayor fidelidad en la reacción de síntesis fue utilizada Vent[®]-DNA polimerasa (New England Biolabs), y la concentración final de los reactivos fue 4 mM de MgSO₄, 0,2 mM de cada dNTP (Gibco-BRL), 0,2 μM de cada oligonucleótido (DNAGency) (Tabla 1), 1 unidad enzimática de Vent[®]-DNA polimerasa, y 5-10 ng de molde por reacción. En todos los casos fueron realizados controles negativos que no incluían al ADN. Las reacciones fueron llevadas a cabo en un ciclador térmico (MJ Research) en un volumen final de 50 μl.

Tabla 1. Oligonucleótidos y templados utilizados en la PCR para el subclonado de las Trxs.

ADNc	Oligos	Secuencia 5'→3'	Restricción	Templado
OE-pTrx-f	Sense FN	ACCGGATCCATGCCTCTGTCTCTGC	BamHI	pSPORT-1- pTrx-f
	Sense FC	ACGGAGCTCTCATCCCGAAGAATA	SstI	
AS-pTrx-f	Anti FN	ACGGAGCTCATGCCTCTGTCTCTGC	SstI	pSPORT-1- pTrx-f
	Anti FC	GACGGATCCTCATCCCGAAGAATA	BamHI	
AS-Trx-f madura	AntiFN mad	ACGGAGCTCGTTGGTCAAGTGACGG	SstI	pSPORT-1- pTrx-f
	Anti FC	GACGGATCCTCATCCCGAAGAATA	BamHI	
AS pTrx-m	Anti MN	ACGGAGCTCATGGCTGCTTTTACCT	SstI	pET-22b(+)- pTrx-m
	Anti MC	GACGGATCCTCACTGCAAGAATTTA	BamHI	
AS Trx-m madura	AntiMN mad	AAGGAGCTCGAAGCTCAGGACACTG	SstI	pET-22b(+)- pTrx-m
	Anti MC	GACGGATCCTCACTGCAAGAATTTA	BamHI	
OE pTrx-m	PEP12	CACATATGGCTGCTTTCACTTGTA		OE-6 pTrx-m
	MADC15	GCGGATCCTCACTGCAAGAATTTATC		

AS: antisentido, p: precursor, OE: sobre expresión sentido. El precursor de la Trx-f y Trx-m tienen 563 pb y 534 pb respectivamente. La Trx-f y Trx-m madura tienen 356 pb y 342 pb respectivamente.

El programa de amplificación utilizado fue:

- (1) 3' a 94°C para la desnaturalización inicial
- (2) 30 ciclos de amplificación
 - 50'' de desnaturalización a 94 °C
 - 50'' de hibridización a 53°C
 - 50'' de elongación a 72°C
- (3) 5' a 72°C para terminar la síntesis de las cadenas incompletas.

El producto de la reacción fue analizado en geles de agarosa 1% (p/v) en TBE 0,5 X conteniendo Bromuro de Etidio.

Como molde fueron utilizadas preparaciones de ADN plasmídico pSPORT-1 (INVITROGEN) y pET-22b(+) (NOVAGEN) conteniendo el ADNc del Precursor de la Trx-f (563 pb) y el ADNc del Precursor de la Trx-m (534 pb) respectivamente (Tabla I), clonados a partir de una biblioteca de hojas de colza [172] [171].

Los fragmentos amplificados por PCR (1 µg aproximadamente) fueron incubados 2 horas a 37°C con 10 unidades de BamHI y 10 unidades de SstI en buffer NE I (New England Biolabs), BSA 0,1 mg/ml en un volumen de 40 µl. El producto digerido fue purificado mediante una resina comercial (Wizard DNA-Clean Up, Promega) y resuspendido en 30µl de agua miliQ.

Los productos fueron cuantificados en una electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en TBE 0,5 X por comparación con un marcador de peso molecular de masa conocida. 500 ng de cada preparación fueron precipitados con C₂H₃NaO₂ y 2-propanol, y resuspendidos en 10 µl de agua miliQ

b-ADNc subclonado en forma directa del pET 22b+-Precursor Trx-m

La minipreparación de ADN plasmídico del pET22-b(+)-Precursor de la Trx-m (1 µg) fue incubada 2 horas a 37 °C con 20 unidades de XbaI y 20 unidades de SstI en buffer NE 4 (New England Biolabs), BSA 0,1 mg/ml en un volumen de 30 µl. La preparación fue sometida a una electroforesis preparativa en gel de agarosa low melting point 1% (p/v), y fue identificado y aislado un fragmento de 540 pb en un transiluminador de UV. La banda de ADN fue purificada por Wizard DNA-Clean Up system, (Promega) y resuspendida en 30µl de agua milliQ. Luego fue concentrada por precipitación con C₂H₃NaO₂ y 2-propanol y resuspendida en 10 µl (ca. 200 ng) de agua miliQ.

Preparación del vector binario

Los fragmentos amplificados por PCR -a) y digeridos fueron clonados en el vector binario pBI121. Para ello ADN plasmídico del pBI121 obtenido en una maxipreparación (2µg) fué incubado 1,5 horas a 37°C con 20 unidades de BamHI y 20 unidades de SstI en buffer NE I (New England Biolabs), BSA 0,1 mg/ml en 40 µl de reacción. La preparación fue sometida a una electroforesis preparativa en gel de agarosa low melting point 1% (p/v), y fue observado y aislado un fragmento de ADN de 11,6 kb en un transiluminador de UV. La banda fue purificada por Wizard DNA-Clean Up system, (Promega) y resuspendida en 30µl (20 ng/µl) de agua miliQ.

El ADNc del precursor de la Trx-m previamente digerido-b), fue subclonado en el vector pBI121. Para ello el ADN plasmídico pBI121 obtenido en una maxipreparación (1µg) fue incubado 2 horas a 37°C con 20 unidades de XbaI y 20 unidades de SstI en buffer NE 4 (New England Biolabs), BSA 0,1 mg/ml en 20 µl de reacción. La preparación fue sometida a una electroforesis preparativa en gel de agarosa low melting point 1% (p/v), y se identificó y aisló un fragmento de ADN de 11,6 kb en un transiluminador de UV. La banda fue purificada por Wizard DNA-Clean Up system, (Promega) y resuspendida en 30µl (20 ng/µl) de agua miliQ.

Ligación de los fragmentos en el vector

Los insertos preparados para el subclonado y el vector binario fueron sometidos a una reacción de ligación. La misma fue llevada a cabo con 5 unidades de la enzima T4 DNA-Ligasa (Promega), 1 mM de ATP, una relación molar de inserto a vector de 3:1 en un volumen final de 20 µl e incubada

durante toda la noche a 16 °C. Los productos de la ligación fueron precipitados con $C_2H_3NaO_2$ 3M (pH 5) y 2-propanol, resuspendidos en 5 μ l de agua miliQ autoclavada y utilizados para electroporar bacterias.

Electroporación de las células de *E. coli*

Bacterias competentes *E. coli* DH5 α (40 μ l) fueron electroporadas con la reacción de ligación en un equipo Gene Pulser (Biorad), a 25 μ F, 2500 V/cm, y 200 Ω . Fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC, e incubadas con agitación 1 hora a 37°C para permitir la expresión del gen que confiere resistencia a la kanamicina. Luego fueron sembrados 100 μ l en placas LB-Agar 1,5 % (p/v) / Kanamicina 100 μ g /ml e incubadas toda la noche a 37°C para permitir el desarrollo de colonias.

Preparación de células competentes *E.coli* DH5 α

5 ml de un cultivo saturado de bacterias incubado durante toda la noche a 37°C fue diluído en 500 ml de medio LB, con agitación a 37 °C hasta que OD_{600nm} : 0,4-0,6 (Crecimiento en fase exponencial). Luego el cultivo se centrifugó a 4°C, 15 minutos a 6000 g, y el precipitado fue resuspendido en 250 ml de Glicerol 10% (v/v). La suspensión celular fue centrifugada nuevamente 15 minutos a 6000 g y el precipitado resuspendido en 250 ml Glicerol 10 (p/v). Este proceso fue realizado nuevamente con volúmenes de resuspensión menores de 125 y 25 ml de glicerol 10% (p/v). Finalmente el precipitado bacteriano fue fraccionado (40 μ l) en tubos eppendorf de 0,5 ml y conservado a -80°C.

Identificación de los clones recombinantes

a-PCR a partir de colonia única

Las colonias cultivadas en las placas de LB-agar-Kanamicina fueron resuspendidas en 50 μ l de agua estéril y calentadas 5 minutos a 100°C. La suspensión fue centrifugada a 14000 xg durante 5 min y fueron utilizados como molde para la PCR 2 μ l del sobrenadante.

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP (Gibco-BRL), 0,2 μ M de cada oligonucleótido (DNAGency), y aproximadamente 0,4 unidades de Taq DNA Polimerasa (Instituto), en un ciclador térmico (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer) en un volumen final de 10 μ l. El programa utilizado no se modificó, y el producto de la reacción fue analizado en geles de agarosa 1% (p/v). Los oligos utilizados (Tabla I), amplificaron fragmentos con un tamaño de ~560 y ~360 pb para el precursor y la forma madura de las Trxs.

b-Confirmación de la presencia del ADNc

Los plásmidos de las seis construcciones fueron purificados a partir de una minipreparación de ADN e incubados 2 horas a 37°C con 2 unidades/ reacción de BamHI-SstI en el caso de los productos subclonados a partir de la amplificación por PCR, o XbaI-SstI en el caso de los productos subclonados a partir del PET-22b+. El producto de la digestión fue analizado en geles de agarosa 1% (p/v), y fueron observados los fragmentos de 570 y 530 pb para los precursores sentido y antisentido de la Trx-f y Trx-m y 350 y 340 pb para la forma madura de la Trx-f y Trx-m antisentido.

c-Confirmación de la orientación del fragmento en el plásmido

Los plásmidos fueron aislados a partir de una minipreparación de ADN y fueron incubados 2 horas en un baño a 37°C con 2 unidades de XbaI-NcoI en las construcciones de la Trx-m, y XbaI-DraI en las construcciones de la Trx-f. El producto de la digestión fue analizado en geles de agarosa 1 o 2% (p/v).

Tabla 2: Estudio de la orientación del fragmento subclonado en el vector pBI121.

	DraI/ XbaI	NcoI/ XbaI
Precursor Trx-f sentido	488 pb	
Precursor Trx-f antisentido	82 pb	
Trx-f antisentido madura	82 pb	
Precursor Trx-m sentido		295/45 pb no discrimina
Precursor Trx-m antisentido		245/295 pb no discrimina
Trx-m antisentido madura		245/ 100 pb no discrimina

Las construcciones genéticas obtenidas fueron analizadas en un gel de agarosa luego de una doble digestión. Las enzimas empleadas fueron XbaI y DraI e el caso de la Trx-f y XbaI y NcoI en el caso de la Trx-m. PBI121 tiene otros sitios de corte para NcoI que no fueron incorporados a la tabla.

d-Secuenciación de las construcciones

Finalmente fueron seleccionadas las colonias que mostraron los fragmentos de restricción del tamaño y la orientación deseada en el vector, para verificar la integridad del ADNc. Fue realizada una minipreparación de ADN (500 ng) para el análisis de secuencia en un equipo automático (AlfExpress, Pharmacia) utilizando el primer 1211 (Cy5), cuya secuencia (homóloga al fago m13) está presente en el vector pBI121. En algunos casos fueron utilizados 5-10 µg de ADN para secuenciar a partir del extremo opuesto con primers internos (antiMC) (Tabla1), utilizando los dNTPs (Cy5) o los terminadores (Cy5) fluoresceinados (Pharmacia).

Preparación del plásmido

A partir de 10 ml de cultivos de bacterias transformadas incubados toda la noche en LB 50 µg/ml Kanamicina (Kanamicina sulfato, Sigma), fue centrifugado el cultivo 10 minutos a 7000 g, y el precipitado bacteriano resuspendido en 90 µl de Solución P1 con 100 µg/ml de RNAsa. Fueron agregados 200 µl de Solución P2, mezclado muy bien e incubado 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron agregados 150 µl de Solución P3, mezclado por inversión y fue incubado 10 minutos en hielo. Luego de centrifugar a 4°C durante 10 minutos a 14000 xg, el sobrenadante fue trasvasado a otro tubo eppendorf conteniendo 350 µl de 2-propanol e incubado 15 minutos a temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada durante 15 minutos a 14000 xg, y el precipitado obtenido resuspendido en 200 µl de agua estéril, para luego agregarle 100 µl de CH₃CO₂NH₄ 7,5 M (pH 7,5) con incubación de 15 minutos en hielo. La suspensión fue centrifugado 10 minutos a 4°C, y el sobrenadante fue homogeneizado con 300 µl de isopropanol e incubado 15 minutos a temperatura ambiente. El precipitado fue obtenido por centrifugación a 14000 xg, 5 minutos a temperatura ambiente. El exceso de sales fue eliminado con EtOH 70% por centrifugación y el ADN fue resuspendido en 20-50 µl de agua estéril. En algunas ocasiones fue necesario incubar nuevamente con 100 µg/ml RNAsa 1 hora a 37°C. Cuando fue requerida gran cantidad de ADN fueron realizadas varias preparaciones en simultáneo.

Preparación de la muestras de ADN para su secuenciación

Para secuenciar el ADN plasmídico obtenido e identificado en I.1.5, fue precipitado con un volumen de una solución P4 durante una hora en hielo, centrifugado a 4°C a 14000 xg, 20 minutos, y el precipitado fue resuspendido en 50 µl de agua autoclavada. Luego fue precipitado con Solución PP1. El precipitado fue lavado con EtOH 70% y resuspendido en agua autoclavada.

Cuantificación del ADN

Para cuantificar los ácidos nucleicos se utilizaron 2 metodologías.

1-Comparación de la intensidad de las bandas de las muestras con las de un marcador de peso molecular y masa conocidos en una electroforesis en gel de agarosa.

2-Medición de la absorbancia en la muestra a 260 nm para ADN, 280 nm para proteínas, 230 nm para sales. La relación 260/280 debe ser cercana a 1,8

Construcción del sistema binario

Electroporación de *A. tumefaciens* con el plásmido binario

Bacterias competentes de *A. tumefaciens* GV3101 (pMP90) [216] fueron electroporadas con el ADN de las construcciones previamente secuenciadas (aprox 1 µg), en un equipo Gene Pulser (Biorad), a 25 µF, 2500 V/cm, y 200 Ω. Fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC, e incubadas con agitación 1,5 hora a 28°C para permitir la expresión del gen que confiere resistencia a la kanamicina. Luego fueron sembrados 100 µl en placas LB-Agar, 100 µg /ml Kanamicina, 50 µg/ml Rifampicina, 25 µg/ml Gentamicina y fueron incubadas 72 hs a 28°C para permitir el desarrollo de colonias. Luego fue seleccionada una colonia de cada construcción por análisis del plásmido con mapeo de restricción.

Identificación de los clones recombinantes

Fue seleccionada una colonia de *Agrobacterium* de cada construcción luego de analizar el plásmido por mapeo de restricción.

Preparación de bacterias competentes de *A. tumefaciens* GV3101

100 µl de cultivo saturado de bacterias incubado durante toda la noche a 28 °C fue diluido en 100 ml de LB suplementado con glucosa 0,1 % y fue incubado a 28 °C hasta alcanzar una OD_{600 nm}: 1,2. Luego fue centrifugado a 4°C (600 g, 20 minutos) y el precipitado fue resuspendido en 10 ml de 1 mM Hepes (pH 7). La resuspensión y centrifugación celular fueron repetidas dos veces y finalmente el precipitado fue resuspendido en 10 ml de Glicerol 10 % (v/v). Esta suspensión fue centrifugada y el precipitado resuspendido en 500-750 µl de glicerol 10 % (v/v) y fraccionado (45µl) en tubos eppendorf para conservar a -80 °C.

Transformación de las plantas

La transferencia de los genes a las plantas fue realizada mediante infección con *A. tumefaciens*, un patógeno natural de algunas plantas dicotiledóneas. Para ello fue utilizado un sistema binario en el cual se introdujeron en la misma célula bacteriana un plásmido Ti desarmado que contiene los genes de virulencia (Helper Vir), cuyas proteínas actúan en "trans" sobre el fragmento del ADN-T del segundo plásmido binario presente, el pBI121 (Apéndice III Figura 39, pg 106).

Transformación de explantos de raíz y regeneración por organogénesis somática indirecta [173]

Cultivo de las plantas

Semillas de *Arabidopsis thaliana*, ecotipo Landsberg erecta, fueron desinfectadas superficialmente en una solución de Hipoclorito de Sodio 20% (p/v), Tween 20 0,05 % (p/v) durante 15 minutos, lavadas tres veces con agua estéril, y escurridas sobre un Buchner con filtro autoclavado. Finalmente fueron secadas en flujo laminar y sembradas en cajas magenta con medio de germinación (MG) (sales y vitaminas MS 1X; 10 g/l Sacarosa; 100 mg/l myo-inositol; 0,5 g/l MES; Agar 0,8 % (p/v) (20 semillas) (Tabla 3). Luego de 4 días en oscuridad a 4 °C, fueron cultivadas en

una cámara de cultivo a 21-22 °C y fotoperíodo largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) durante cuatro semanas.

Preparación de las raíces

Fueron separadas las raíces del resto del vástago de las plantas y cultivadas durante tres días en medio de inducción de callos (CIM) (Medio B5 modificado (Tabla 3); 20 g/l glucosa; 0,5 g/l MES; 0,8% (p/v) agar; 0,5 mg/l 2,4-D; 0,05 mg/l Kinetina (Tabla 4) a 21-22 °C y 16 hs luz [217].

Infección con *Agrobacterium*

Cultivos saturados de *Agrobacterium* conteniendo alguna de las seis construcciones preparadas en I.1.6 suplementados con Kanamicina 50 mg/l, Estreptomicina 25 mg/l fueron centrifugados y el precipitado resuspendido en 20 ml de LB. Las raíces pretratadas previamente fueron digeridas en fragmentos de 0,5 cm y mantenida su humedad con medio CIM líquido sin agar (Tabla 4). Las raíces fueron incubadas 10 minutos con 5 ml de la suspensión bacteriana, lavadas con medio CIM líquido, filtradas, secadas sobre papel de filtro y cultivadas 48 hs en placas con medio CIM Agar.

Tabla 3. Composición de los medios B5 Gambourg modificado, Murashige Skoog MS 1X

		B5 Gambourg (mg/l)	MS 1X (mg/l)
Macronutrientes	(NH ₄) ₂ SO ₄	134	-
	KNO ₃	2500	1900
	KH ₂ PO ₄	-	170
	NH ₄ NO ₃	-	1650
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	440
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	370
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	-
Micronutrientes	H ₃ BO ₃	3	6,2
	MnSO ₄ ·H ₂ O	10	22,3
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	8,6
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025
Vitaminas	Acido nicotínico	100	500
	Piridoxina-HCl	100	500
	Tiamina-HCl	1000	100
Fuente de Carbono	Glucosa	20000	-
	Myo-Inositol	-	100
	Sacarosa	-	10000
Buffer	MES	500	500
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	278
	Na ₂ EDTA	----- 37,26	37,26
pH		5,7	5,7

Lavado de los explantos infectados e inducción de brotes

Los explantos fueron lavados con 50 ml de medio CIM líquido, secados sobre papel de filtro e incubados en placas en medio de inducción de brotes (SIM) (Sales y vitaminas medio B5 modificado (Tabla 3); 20 g/l glucosa; 0,5 g/l MES; 0,15 mg/l Acido Indol Acético (IAA); 5 mg/l 2-IP (Tabla 4); suplementados con Vancomicina 500 mg/l, Kanamicina 50 mg/l) durante 2 semanas y

transferidos a una placa nueva reduciendo la cantidad de Vancomicina a 250 mg/l-0 mg/l durante 4-5 semanas.

Enraizamiento y desarrollo de las plantas

Los brotes de aspecto saludable fueron transferidos a medio de inducción de raíces (RIM) (sales y vitaminas MS 1X; 2 mg/l NAA; 50 mg/l Kanamicina) (Tabla 4) y cultivados verticalmente para permitir el desarrollo de las raíces superficialmente. Luego fueron transferidos a MG sin hormonas para permitir el desarrollo posterior.

Rusticación

Las plantas enraizadas fueron transferidas a una mezcla de perlita: vermiculita: turba (1:1:1) autoclavada previamente humedecida con solución de riego y mantenida su humedad con film. Luego de una semana fue descubierto gradualmente.

Tabla 4. Composición de los medios para la organogénesis somática indirecta

Medio	Hormonas	mg/L	Base
CIM	2,4-D	0,5	B5 modificado
	Kinetina	0,05	
SIM	IAA	0,15	B5 modificado
	2-IP	5	
RIM	NAA	2	MS X

CIM: Medio de inducción de callos; SIM: Medio de inducción de brotes; RIM: Medio de inducción de raíces.

Transformación de Planta entera de Arabidopsis por Inmersión Floral [175]

Cultivo de las plantas

Semillas de *A. thaliana*, ecotipo Columbia, fueron desinfectadas superficialmente y sembradas en una placa de Petri Agar-agua 0,8 % (p/v) (20 semillas). Luego de 4 días en oscuridad a 4 °C, fueron cultivadas en una cámara de cultivo a 21-22 °C y fotoperíodo largo (16 horas de luz, 8 horas de oscuridad) por una semana. Las plantas germinadas fueron transferidas a vasitos con la base agujereada conteniendo una mezcla humedecida autoclavada de perlita: vermiculita: turba (1:1:1), cubiertas con rolopac para conservar su humedad por tres días, y regadas con solución nutritiva hasta alcanzar el desarrollo deseado.

Inmersión floral en la solución bacteriana

Fueron infiltradas inflorescencias con primordios florales en distintos estadios preferentemente inmaduros. Cultivos bacterianos saturados preparados en LB 100 µg/ml Kanamicina; 50 µg/ml Rifampicina; 25 µg/ml Gentamicina; fueron cultivados toda la noche con agitación a 28 °C, y preparados partiendo de colonias aisladas de *A. tumefaciens* GV3101 con las diferentes construcciones. Luego de centrifugar el cultivo a 700 g, 15 minutos, el precipitado fue resuspendido en medio de infiltración (MI) hasta obtener una DO_{660nm} de 1,4. Las inflorescencias de *Arabidopsis* fueron sumergidas aproximadamente cinco minutos en esta solución, e incubadas en posición horizontal durante dos días envueltas en rolopac. Finalmente fueron descubiertas y dispuestas normalmente para el desarrollo de las silículas.

Selección de las plantas Transgénicas

Las semillas obtenidas a partir de las silículas transformadas, fueron desinfectadas superficialmente y sembradas en Placas de Petri con MS 1 X-Agar 0,8 % (p/v), 50 µg/ml Kanamicina para seleccionar a las plantas que incorporaron el gen de la enzima neomicina fosfotransferasa II, y Vancomicina 250 µg/ml (bacteriostático) para eliminar el remanente de *A. tumefaciens*. Luego del tratamiento de frío, fueron llevadas a la cámara de cultivo para su germinación y desarrollo, durante

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la Identificación del transgén mediante PCR

Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'	Complementariedad
1201	ACGGAGCTCATGCCTCTGTCTCTGC	promotor del gen 35S del CaMV
1224	GACGGATCCTCATCCCGAAGAACTA	term del gen de la nopalina sintetasa

Análisis de la abundancia de proteína mediante Western blot

Extracción de proteínas totales de *A. thaliana*

Plantas (50-100 mg) incubadas 30 días en cámara de cultivo a 21-22 °C, 16 hs luz / 8 hs oscuridad, fueron homogeneizadas a temperatura ambiente en buffer E (100-200 µl). Luego de centrifugar 10 minutos a 14000 xg, fue conservado el sobrenadante para realizar los ensayos.

Estimación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue estimada mediante el método de Lowry et al, 1951 adaptado a múltiples muestras en placa de ELISA (170 µl totales/pocillo). Para ello fue realizada una curva patrón con BSA 0,05-0,5 µg/µl y fue comparado una dilución 1/20 de las diferentes muestras con la misma.

Electroforesis en geles de Poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Las muestras se disolvieron en buffer de siembra Z 1X, y fueron incubados 5 minutos a 100 °C, centrifugadas y la fase soluble sembrada. Para la electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes fue utilizado el protocolo seguido por Schägger & Von Jagow [219] con alta concentración de Tris y Tricina en el gel y en el buffer de electroforesis. El gel separador fue 10 % T, 1 M Tris-HCl (pH 8,45), SDS 0,1 % (p/v) y Glicerol 8 % (v/v). El gel concentrador fue 4 % T, 0,75 M Tris-HCl (pH 8,45), y SDS 0,1 % (p/v). Se utilizó un buffer para el ánodo y otro para el cátodo (Ver Apéndice-I)

Western blot

Las muestras (50-100 µg) fueron sometidas a un SDS-PAGE 10% (v/v). Al finalizar la electroforesis las proteínas fueron electro-transferidas durante 40 minutos a 100 mA mediante el sistema semi-seco (semi-dry-blotter, techware, SIGMA-ALDRICH) a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm (BIO-RAD), embebida inicialmente en agua y luego buffer de electro-transferencia (BT). Para comprobar la eficiencia en la transferencia fue realizada una tinción reversible con el reactivo Rojo Ponceau.

Luego de varios lavados con agua bidestilada la membrana de nitrocelulosa fue incubada 3 horas a temperatura ambiente con solución bloqueante (SB), para prevenir en los pasos posteriores la unión de proteínas inespecífica a la misma. La incubación con el anticuerpo específico fue realizada durante toda la noche a 4° C en 4 ml de SB y i) una dilución 1/300 del antisuero α Trx-m recombinante de colza o una dilución 1/500 del antisuero α Trx-f recombinante de colza y ii) una dilución 1/3000 de un antisuero α Det 3 (subunidad C de la V-ATPasa de *Arabidopsis*) [177] cedido gentilmente por el Dr Pablo Cerdán. La membrana fue lavada tres veces con 15 ml de TBS, Glicina 2 % (p/v) durante 10 minutos. Luego fue incubada con un segundo anticuerpo (anti-igG de conejo preparado en oveja y conjugado con peroxidasa) en 10 ml de SB durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fue lavada dos veces con 50 ml de TBS, glicina 2 % durante 10 minutos y se repitió de igual manera con TBS. Finalmente la membrana se reveló con 2 ml de Luminol (Santa Cruz Biotechnology), y se expuso en placas de rayos X Biomax MS-1 Film (Kodak).

Las bandas fueron cuantificadas por densitometría óptica relativa con el programa Optic Densitometry realizado por Alvarez Mariano. Se fija un área determinada que ajusta al tamaño de la

banda, y analiza todos los puntos que pertenecen a la región seleccionada y tienen una respuesta significativamente mayor que la respuesta observada para el nivel basal de la placa.

Fue cuantificada en cada línea transgénica la banda correspondiente a la Trx madura (12 KDa) y las bandas correspondientes a la subunidad C de la ATPasa Det 3 (43 KDa). Luego se estableció una relación entre ambas proteínas que fue comparada con la observada en las plantas salvajes de *Arabidopsis* en 2-4 experimentos independientes.

Preparación de antisueros

Los antisueros disponibles fueron realizados previamente inmunizando conejos con las proteínas de Trx-f, PRX y FBPasa de colza recombinantes.

El antisuero de Trx-m fue preparado a partir de inyectar a un conejo con una mezcla de 2 ml de 0,5 mg/ml de Trx-m de colza recombinante disuelta en PBS, y 2 ml de adyuvante de Freund completo. A los 15 días fue inoculado el conejo con una mezcla de 2 ml de 0,5 mg/ml de Trx-m de colza recombinante disuelta en PBS y 2 ml de adyuvante de Freund incompleto. 15 días después fue extraída la sangre y aislado el suero preinmune. El título del antisuero ensayado contra la Trx-m recombinante de colza fue (1/5000), sin embargo para detectar la presencia de la Trx-m de *Arabidopsis* fue necesario utilizarlo mucho más concentrado (1/300). Todos los antisueros fueron preadsorbidos previa utilización con un extracto de proteínas de *E.coli* salvaje. Fue utilizado un antisuero anti det 3 como control de carga [177].

II ANALISIS DE LAS PLANTAS TRANSGENICAS

Determinación del % de Germinación

20 Semillas de las diferentes líneas transgénicas desinfectadas superficialmente fueron sembradas en cajitas con medio MG 1X e incubadas en oscuridad a 4 °C durante 72 hs. Luego de irradiarlas 1 hr con luz roja fueron incubadas 72 hs en oscuridad a 21-22 ° C. Posteriormente fue determinado el % germinación. Fueron determinadas la media y el error estándar medio para Columbia N: 6, líneas transgénicas OE 6 pTrx-m1, 2 y 3 N: 4, línea OE 6 Trx m4 N: 2, líneas OE 1 pTrx-f y las plantas salvajes N: 4 o planta AS-3 Trx-f1 y salvajes N: 2.

Biomasa vegetal

Fue determinado el peso fresco de plantas de 30 días. Luego de secarlas durante 30 días en estufa a 70°C fueron pesadas nuevamente (peso seco). La media y el error estándar medio fueron determinados para N:11-14 para las plantas sobre-expresantes y columbia o N: 24 para las plantas antisentido AS-3 Trx-f1 y columbia.

Contenido de almidón y azúcares solubles en las hojas

Extracción del almidón y azúcares solubles

Fueron cosechadas 2 muestras (50-100 mg) con las hojas más grandes de 15-20 plantas de 30 días, durante el período de luz (10 hs) en dos experimentos independientes. Luego de incubarlas en 450 µl de KOH 33 % (v/v) durante 30 minutos a 100°C, fueron centrifugadas 10 minutos a 14000 xg. El sobrenadante fue incubado toda la noche a 4°C en 750 µl de EtOH. Luego de centrifugar nuevamente a 10 minutos a 14000 xg, se conservó la fracción del precipitado, resuspendió en 97 µl de agua autoclavada, 3 µl de C₂H₃NaO₂ 3 M, y 300 µl de EtOH. Luego de Incubar 4 hs a 4°C, fue separado el precipitado en una centrifugación de 10 minutos a 14000 xg, secado al vacío y resuspendido en 50 µl de agua milliQ (fracción de almidón). El sobrenadante de la centrifugación se evaporó en speed vac y reservó para determinar contenido de azúcares solubles [220].

Cuantificación del almidón

El almidón fue cuantificado según el método de Crisman. C [221]. 20 μ l de las muestras (duplicados) y una curva estandar de almidón soluble 0-80 μ g/100 μ l (triplicados) fueron incubadas con 150 μ l de reactivo (SI) y fué determinada la absorbancia a 655 nm. El contenido de almidón (μ g/mg hoja) o (μ g almidón/cm²) fué relativizado a la planta salvaje y calculada la media y el error estandar medio para N: 10 en plantas OE-6 pTrx-m y N: 2 para las plantas OE-1 pTrx-f y AS-3 Trx-f y controles.

Cuantificación de azúcares en el sobrenadante

200 μ l de una dilución $\frac{1}{4}$ del sobrenadante de dos muestras (50-100 mg) de un único experimento (I.3.1) fueron incubadas con 1 ml de solución de Antrona (SA), durante 10 minutos a 90 °C y determinada la absorbancia a 630 nm por duplicado. El dato fué comparado con una curva patrón realizada con glucosa 0-30 μ g/200 μ l (triplicado) [222]. La media y el error estandar medio fueron determinados para N: 2 para las plantas OE-6 pTrx-m y AS-3 Trx-f El contenido de azúcares en las muestras OE-1 pTrx-f no fue determinado.

Determinación del conteido de Clorofila

Dos experimentos independientes con 3 muestras de 3 discos de 0,28 cm² extraídos con sacabocado de las hojas más grandes de plantas de 30 días, fueron incubados 24hs a 4°C en oscuridad en 1 ml de dimetilformamida, luego fué determinada la absorbancia según los espectros y coeficientes establecidos en (Tabla 6) [3]. En algunos casos la determinación del contenido de clorofila fué realizada en paralelo en 1 ml de acetona 80 % (v/v), centrifugación 5 minutos a 5000 xg y fué determinada la absorbancia en el sobrenadante según [223] (Tabla 6). La media y el error estandar medio fueron determinados para N: 6 en el caso de plantas sobre-expresantes y controles y N: 2 para plantas AS-3 Trx-f1 y controles.

Tabla 6. Ecuaciones para la determinación del contenido de Clorofila a, b y carotenoides

DMF	Acetona 80%
Chl b (mg/l): 20,70 A ₆₄₇ -4,62 A _{664,5}	Chl b (mg/l): 21,5 A _{646,8} -5,10 A _{663,2}
Chl a (mg/l): 12,70 A _{664,5} -2,79 A ₆₄₇	Chl a (mg/l): 12,25 A _{663,2} -2,79 A _{646,8}
Chl total (mg/l): 17,90 A ₆₄₇ + 8,08 A _{664,5}	Chl total (mg/l): 7,15 A _{663,2} +18,71 A _{646,8}
-	Carotenoides (Xantofilas + β -caroteno) (mg/l): 1000 A ₄₇₀ -1,82Chla-85,02Chlb

Chl b: Clorofila b, Chl a: Clorofila a, Chl total: Clorofila total, DMF: Dimetilformamida

Actividad fotosintética y estrés lumínico

Determinación de la fluorescencia de las hojas

Fue determinada la emisión de la fluorescencia de la clorofila de la superficie superior de una hoja adulta de *A. thaliana* con un sistema de monitoreo de fluorescencia FMS2 (Han-satech, King's Lynn, UK) exponiendo a las plantas previamente 4 hs a 50-300 μ moles de fotones/m²s. Las mediciones fueron realizadas en plantas salvajes y plantas transgénicas OE 6 pTrx-m (N: 3). La fluorescencia mínima, F0, y máxima, Fm, fueron determinadas mediante la adaptación de la hoja a oscuridad total o la aplicación de un pulso corto de luz para evaluar la producción fotoquímica máxima Fv/Fm (Tabla 7) [201].

Tabla 7. Ecuaciones para la determinación de la producción fotoquímica máxima, Apantallamiento fotoquímico (Qp) y no fotoquímico (Qnp).

Producción fotoquímica máxima	$F_v/F_m: (F_m-F_0)/F_m$
Apantallamiento no fotoquímico	$QNP: (F_m-F' m)/F' m$
Apantallamiento fotoquímico	$Qp: (F' m-F_s)/(F' m-F' 0)$

F₀: fluorescencia mínima, F_m: fluorescencia máxima, F' m: fluorescencia máxima de hojas iluminadas
F_s: F' 0: Fluorescencia estable de hojas iluminadas

Estudio de las plantas en condiciones de estrés

Estrés oxidativo

Las semillas (20-25) de las distintas líneas fueron desinfectadas superficialmente con EtOH 70 % tween 20 (3 minutos) y luego con EtOH 100 % (10 minutos). Fueron sembradas en placas con MS 1X y diferentes agentes generadores de estrés oxidativo. Las mismas fueron incubadas 72 hs a 4°C en oscuridad y luego se pasaron a la cámara de cultivo. A distintos tiempos fue registrado el número de plantas verdes/número de plantas germinadas. Es para destacar que las semillas de las diversas líneas utilizadas en este estudio fueron cosechadas en el mismo período para reducir la variabilidad entre experimentos.

Tabla 8. Drogas utilizadas para generar estrés oxidativo.

Agentes utilizados	Concentración	N
Metil Viológeno	2 μ M	
Hidroperóxido de Cumeno	650 μ M	
Rosa de Bengala	7 μ M	
Dietilmaleato	2,5 mM	
Diamida	9 mM	

Estudio de la sensibilidad de las raíces al tratamiento con metales pesados y NaCl

Semillas desinfectadas superficialmente fueron sembradas sobre papel de filtro autoclavado dispuesto en placas con MS 1/4X, incubadas 72 hs a 4°C y oscuridad y luego permitido el desarrollo de las raíces durante 5 días en dirección vertical. Luego el papel fue transferido a placas con MS 1/4X suplementadas con diferentes concentraciones de Fe²⁺ o NaCl y cultivados 7 días más en dirección vertical. Finalmente la longitud de las raíces fue estimada bajo lupa con papel milimetrado.

Fueron realizados dos experimentos independientes con N: 12 y N: 6

Actividad enzimática

Preparación de los extractos vegetales para las determinaciones

Fueron preparados extractos a partir de ca. 25 discos de hoja (0.6 cm de diámetro) de plantas de 35 días en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), EDTA 3 mM, β Met 0.05%, y NaCl 50 mM. El homogenato fué centrifugado a 12000g y la fracción sobrenadante dializada (MCWO 6-8KDa) contra Acetato de Sodio 50 mM (pH 5.5), β Met 0.01% y EDTA 0.1 mM.

Actividad de la enzima Sedoheptulosa-1,7-bisfosfatasa

La actividad de la enzima SBPasa fué determinada en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7.9), MgCl₂ 15 mM, DTT 10 mM, SBP 1.5 mM y EGTA 0.5 mM durante 30 minutos a 24°C. La reacción fue frenada con el agregado del reactivo de CHEN (3 minutos a 37°C) [224]. Como control se eliminó el SBP de la mezcla de reacción.

Actividad de la enzima Fructosa 1,6-bisfosfatasa

La actividad de la FBPasa fué determinada en Tris-HCl 50 mM (pH 7.9), FBP 3 mM, MgCl₂ 10 mM, EGTA 0.1 mM y DTT 20 mM durante 20 minutos a 23°C. La reacción fue frenada con el agregado de CHEN (3 minutos, a 37°C). Como control fue determinada la actividad en presencia del inhibidor fructosa-6-fosfato 3 mM.

Actividad Trx

La FBPasa recombinante de colza (ca 0,7µg) fue preincubada por 10 minutos con distintas concentraciones de Trx (µl extracto) en buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7,9), CaCl₂ 0,1 mM FBP 0,75mM y DTT 1mM. La capacidad catalítica de la enzima fue medida con el agregado de una solución de buffer Tris-HCl 100 mM (pH 7,9), MgCl₂ 2 mM, FBP 1mM y EGTA 0,1mM e incubación de 3 minutos. Las reacciones fueron detenidas por el agregado del reactivo de Chen para la determinación del fosfato liberado.

Análisis estadístico

Prueba de t para muestras desapareadas con la corrección de Welch para la cuantificación de proteína de Trx-m y Trx-f.

Estudio de ANOVA para un factor y el Test de Dunnet para las determinaciones de: % germinación, biomasa vegetal, contenido de almidón y azúcares solubles, contenido de clorofila. Estudios con peróxido de Cumeno, rosa de bengala, Etilmaleato y Diamida.

Estudio de ANOVA para dos factores y el test de Bonferroni para los ensayos con metil viológeno

Apéndice

I Análisis de la expresión de las Trx-s cloroplásticas de *Arabidopsis*

Estudiamos los niveles de expresión de ARNm de Trx-s cloroplásticas mediante GENECESTIGATOR, una base de datos de micro arrays de *Arabidopsis* y una interface con herramientas para su análisis [1]. Profundizamos en la expresión de las Trx-s cloroplásticas en condiciones de estrés:

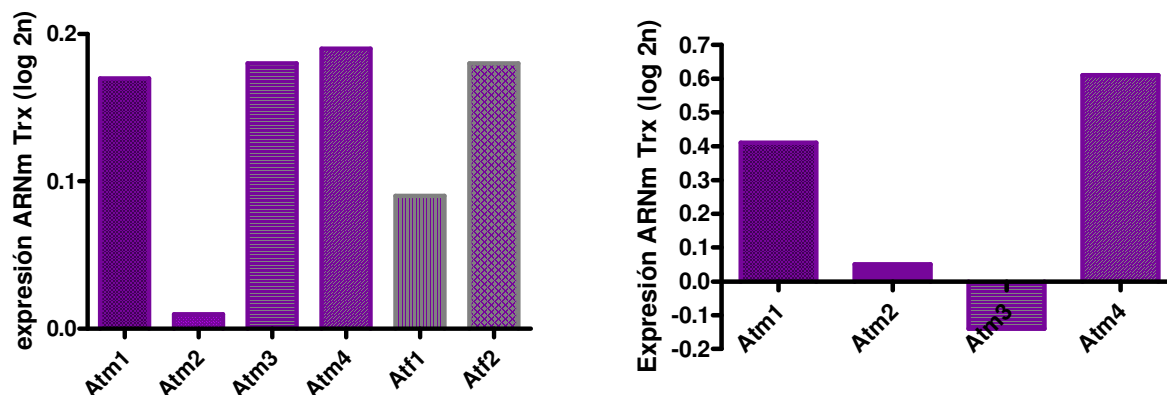


Figura 38. Análisis de la expresión de ARNm de Trx-f y Trx-m de *Arabidopsis* en condiciones de estrés.

Los datos fueron analizados utilizando la base de datos de micro arrays y herramientas de GENEVESTIGATOR [1] en plantas tratadas con **A**-Peróxido de Hidrógeno, **B**-Estrés lumínico.

Las plantas fueron tratadas con peróxido de Hidrógeno y los niveles de expresión del ARNm de cada una de las isoformas fueron comparados con y sin tratamiento. El nivel de expresión de la Trx-m1 (AF095749), Trx-m3 (AF095751), Trx-m4 (AF095752) y Trx-f2 (AF144386) fueron los máximos (Figura 38-A). Por otro lado el estudio de la expresión de estas isoformas en condiciones normales demuestra que durante el desarrollo la Trx-m3 y Trx-f2 se expresan muy poco y en forma constante durante todo el ciclo. Estos resultados demuestran que la expresión de Trx-m3 y Trx-f2 aumenta específicamente en condiciones de estrés oxidativo. Esto puede recordar los estudios realizados en bacterias donde una de ambas Trxs es más importantes en la respuesta oxidativa y es fuertemente inducida por OxyR [225, 226]. Sin embargo, en el caso de las plantas la expresión de ARNm de Trx-s es más generalizada, y esto es coherente con la elevada producción de ROS en los cloroplastos. Por otra parte existe cierta distribución en la expresión del ARNm siendo específica para la Atm3 (pimpollos florales).

Las plantas expuestas a altas irradiancias aumentan la expresión del ARNm de las Atm1 y Atm4 respecto a las plantas control. Este aumento es muy significativo y sugeriría que ambas isoformas son las responsables en la respuesta oxidante en estas condiciones.

II Medios Utilizados

NE I: 10 mM Bis Tris Propano HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, pH 7,9, New England Biolabs).

NE 4: 50 mM C₂H₃KO₂, 20 mM Tris (C₂H₃O₂), 10 mM (CH₃CO₂)₂Mg, 1mM DTT (pH 7,9), pH 7,9 (New England Biolabs),

SOC: 2% (p/v) Triptona, 0,5% (p/v) Extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 0,36% (p/v) Glucosa.

LB (Luria-Bertaini): 1% (p/v) Triptona, 0,5 % (p/v) Extracto de Levadura y 1% (p/v) NaCl. Para la preparación en placas se adiciona 1,5 % (p/v) Agar-Agar.

Solución P1: 25 mM Tris-HCl pH 7,9, 10 mM de EDTA pH 8,

Solución P2: SDS 1% (p/v), 0,2M NaOH

Solución P3: 3M C₂H₃KO₂ de potasio pH 5

Solución P4: PEG 13% (p/v), 1,6 M de NaCl

Solución PP1: 0,1 volúmenes de 3M de C₂H₃NaO₂, 3 volúmenes de EtOH 100 %

Medio de germinación (MG): sales y vitaminas MS 1X; 10 g/l Sacarosa; 100 mg/l myo-inositol; 0,5 g/l MES; Agar 0,8 % (p/v).

Medio de inducción de callos (CIM): Medio B5 modificado; 20 g/l glucosa; 0,5 g/l MES; 0,8% (p/v) agar; 0,5 mg/l 2,4-D; 0,05 mg/l Kinetina

Medio de inducción de brotes (SIM): Sales y vitaminas medio B5 modificado; 20 g/l glucosa; 0,5 g/l MES; 0,15 mg/l Acido Indol Acético (IAA); 5 mg/l 2-IP.

Medio de inducción de raíces (RIM): sales y vitaminas MS 1X; 2 mg/l NAA

Medio de Infiltración (MI): 5 % (p/v) Sacarosa, 10 mM MgCl₂, 0,005 % (p/v) Silwet L-77, 44 nM Bencilaminopurina (BAP).

Buffer de extracción (BE): 200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, y SDS 0,5%.

Buffer E: 125 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 1% (p/v), Glicerol 10% (p/v), 50 mM Na₂ S₂O₅

Buffer para el ánodo: 0,2 M Tris-HCl, pH 8,9

Buffer para el cátodo: 0,1 M Tris base, 0,1 M Tricina, SDS 0,1 % (p/v), pH 8,25

Buffer de siembra Z10 X: Mercaptoetanol 1,5 % (v/v), 62,5 mM Tris-HCl pH 6,4, SDS 6 % (v/v), Glicerol 50% (v/v).

Buffer electrotransferencia (BT): Metanol 20% (p/v), 20 mM, Tris base, 150 mM Glicina, SDS 0,1 % (p/v)

Solución Rojo Ponceau: Rojo Ponceau 0,5 % (p/v), ácido acético 1% (p/v)

TBS: 50 mM Tris-HCl (pH 7,9), NaCl

Solución bloqueante (SB): TBS, leche 3% (p/v), glicina 2% (p/v), tween 20 0,01 % (p/v)

SI: 1 % I₂/IK en C₂H₃NaO₂ 100 mM ~pH 5

Stock SI 2,6 % (p/v): 0,26 g I₂, 2,6g IK

SA: 60 mg Antrona/30 ml ácido sulfúrico concentrado.

III Algunos aspectos de la biología de *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo fitopatógena, que infecta naturalmente algunas angiospermas dicotiledóneas y gimnospermas, incorporándose a través de sus heridas. Las cepas virulentas llevan un megaplásmido de 250 kb llamado plásmido Ti por "tumor inducción", que contiene una región denominada ADN-T que es transferida al núcleo de las células vegetales, donde se integra por recombinación ilegítima, se transcribe y causa la enfermedad de la agalla en sus tallos,

El ADN-T contiene genes oncogénicos, que codifican enzimas involucradas en la síntesis de auxinas y citocininas (reguladores del crecimiento vegetales), responsables del crecimiento tumoral, y genes que codifican para la síntesis de opinas (condensación de aminoácidos y azúcares), fuente de carbón y nitrógeno que es metabolizada por la bacteria. Esta región está flanqueada por dos bordes repetidos e imperfectos de unas 25 pb (borde derecho y borde izquierdo), únicos elementos en "cis" necesarios para la transferencia del fragmento. Sin embargo este proceso requiere la acción cooperativa en "trans" de los genes de virulencia "Vir", codificados fuera del ADN-T, pero dentro del plásmido Ti. Estos genes Vir son necesarios para que se produzca el proceso de infección, y para que el ADN-T se transporte desde la bacteria hacia el núcleo de la célula vegetal,

Las proteínas Vir D1 y Vir D2 son endonucleasas que reconocen los bordes izquierdo y derecho, y escinden una de las hebras del ADN-T del plásmido Ti. Una molécula de Vir D2 permanece unida covalentemente al extremo 5' del fragmento simple cadena, formando un complejo nucleoproteico con cientos de moléculas de VirE2. De esta manera protegen al ADN-T del ataque de las exonucleasas, lo mantienen extendido y lo guían al núcleo, ya que poseen señal de localización nuclear. La integración al genoma vegetal del extremo 5' del borde derecho es más eficiente y no se producen deleciones debido a la presencia de Vir D2, mientras que la integración del borde izquierdo es más imperfecta y se generan deleciones del mismo.

En la práctica de laboratorio se puede utilizar a *A. tumefaciens* como vehículo para la transferencia de genes de interés particular a células vegetales. Una variante es mediante el uso de un sistema binario.

Sistema binario para la transferencia de genes

En un sistema binario coexisten en una cepa de *Agrobacterium* un plásmido Ti “desarmado”, que no contiene al ADN-T pero presenta los genes Vir intactos, y un segundo plásmido que posee los bordes izquierdo y derecho del ADN-T flanqueando los genes de interés que se quieren introducir en la planta. De esta forma los productos de los genes Vir actúan en trans para que el ADN-T sea transferido a las células vegetales. Para que esto ocurra el plásmido que lleva el ADN-T modificado debe ser capaz de replicar en *Agrobacterium tumefaciens*

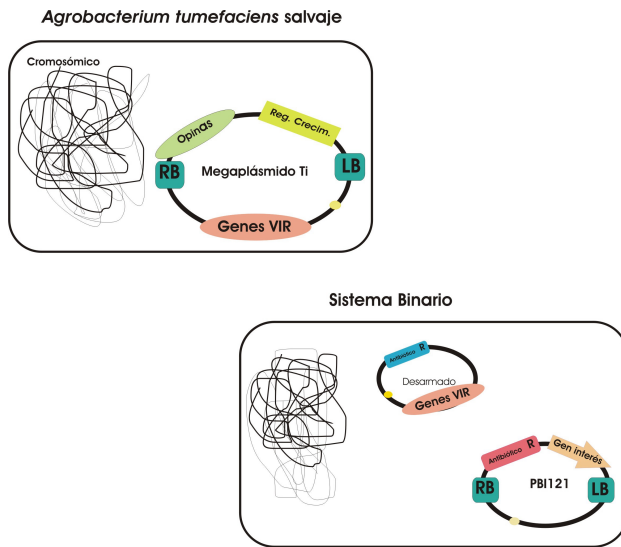


Figura 39. Sistema binario para la transferencia de genes.

RB: borde derecho del ADN-T, LB: borde izquierdo del ADN-T, VIR: genes de virulencia de *Agrobacterium*

BIBLIOGRAFIA

1. Zimmermann.P., H.-H.M., Henning.L., Gruissem.W, *GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray and Analysis Toolbox*. Plant Physiol., 2004. **136**: p. 2621-2632.
2. Buchanan, B.B.a.B.Y., Annu Rev Plant Biol, 2005. **56**: p. 187-220.
3. Inskeep, W.P.a.B., P.R, *Extinction Coefficients of Chlorophyll a and b in N,N-Dimethylformamide and 80% Acetone*. Plant Physiol., 1985. **77**: p. 483-485.
4. Gelhaye, E., Rouhier, N., Navrot, N., Jacquot, J. P., *The plant thioredoxin system*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(1): p. 24-35.
5. Mora-Garcia., S.F., and Wolosiuk, R., *Redox signal transduction in plant metabolism. Control of primary metabolism in plants.*, in *Annu. Plant Rev*, W.a.M. Plaxton, M. eds., Editor. 2005, Blackwell Publishing. Oxford, UK. . p. 150-186.
6. Martin, J.L., *Thioredoxin--a fold for all reasons*. Structure, 1995. **3**(3): p. 245-50.
7. Holmgren, A., *Thioredoxin.6.The aminoacid sequence of the protein from Escherichia coli B*. Eur. J.Biochem, 1968. **6**: p. 475-484.
8. Hiraoki, T., et al., *Structural comparison between oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin. Proton NMR and CD studies*. Biochemistry, 1988. **27**(14): p. 5000-8.
9. Eklund, H., F.K. Gleason, and A. Holmgren, *Structural and functional relations among thioredoxins of different species*. Proteins, 1991. **11**(1): p. 13-28.
10. Holmgren, A., et al., *Three-dimensional structure of Escherichia coli thioredoxin-S2 to 2.8 Å resolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(6): p. 2305-9.
11. Katti, S.K., D.M. LeMaster, and H. Eklund, *Crystal structure of thioredoxin from Escherichia coli at 1.68 Å resolution*. J Mol Biol, 1990. **212**(1): p. 167-84.
12. Dyson, H.J., et al., *Three-dimensional solution structure of the reduced form of Escherichia coli thioredoxin determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Biochemistry, 1990. **29**(17): p. 4129-36.
13. Jeng, M.F., et al., *High-resolution solution structures of oxidized and reduced Escherichia coli thioredoxin*. Structure, 1994. **2**(9): p. 853-68.
14. Weichsel, A., et al., *Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer*. Structure, 1996. **4**(6): p. 735-51.
15. Qin, J., G.M. Clore, and A.M. Gronenborn, *The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin*. Structure, 1994. **2**(6): p. 503-22.
16. Qin, J., et al., *Solution structure of human thioredoxin in a mixed disulfide intermediate complex with its target peptide from the transcription factor NF kappa B*. Structure, 1995. **3**(3): p. 289-97.
17. Qin, J., et al., *The solution structure of human thioredoxin complexed with its target from Ref-1 reveals peptide chain reversal*. Structure, 1996. **4**(5): p. 613-20.
18. Mittard, V., et al., *NMR solution structure of an oxidised thioredoxin h from the eukaryotic green alga Chlamydomonas reinhardtii*. Eur J Biochem, 1997. **243**(1-2): p. 374-83.
19. Nicastro, G., et al., *NMR solution structure of a novel thioredoxin from Bacillus acidocaldarius possible determinants of protein stability*. Eur J Biochem, 2000. **267**(2): p. 403-13.
20. Capitani, G., et al., *Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts*. J Mol Biol, 2000. **302**(1): p. 135-54.
21. Miranda-Vizuete, A., et al., *Cloning, expression, and characterization of a novel Escherichia coli thioredoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(49): p. 30841-7.
22. Laurent TC, M.E., Reichard P., *Enzymatic Synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of Thioredoxin, The Hydrogen donor from Escherichia coli B*. J Biol Chem, 1964. **239**: p. 3436-44.
23. Gonzalez Porque P, B.A., Reichard P., *Purification of a thioredoxin system from yeast*. J Biol Chem, 1970. **245**(9): p. 2363-2370.
24. Meyer, Y., F. Vignols, and J.P. Reichheld, *Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position*. Methods Enzymol, 2002. **347**: p. 394-402.
25. Pedrajas JR, K.E., Miranda-Vizuete A, Gustafsson JA, Wright AP, Spyrou G, *Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 1999. **274**(10): p. 6366-6373.
26. Spyrou, G., et al., *Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2936-41.

27. Laloi, C., et al., *Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14144-9.
28. Mestres-Ortega, D. and Y. Meyer, *The Arabidopsis thaliana genome encodes at least four thioredoxins m and a new prokaryotic-like thioredoxin*. Gene, 1999. **240**(2): p. 307-16.
29. Lemaire, S.D., et al., *Characterization of thioredoxin y, a new type of thioredoxin identified in the genome of Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Lett, 2003. **543**(1-3): p. 87-92.
30. Jacquot JP, R.-M.R., Marinho P, Kollarova M, Le Marechal P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y, *Arabidopsis thaliana NAPHP thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of the recombinant protein in Escherichia coli*. J Mol Biol, 1994. **235**(4): p. 1357-63.
31. Dai, S., et al., *Crystal structure of Arabidopsis thaliana NADPH dependent thioredoxin reductase at 2.5 Å resolution*. J Mol Biol, 1996. **264**(5): p. 1044-57.
32. Holmgren, A., *Thioredoxin and glutaredoxin systems*. J Biol Chem, 1989. **264**(24): p. 13963-6.
33. Holmgren, A., *Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide*. J Biol Chem, 1979. **254**(19): p. 9627-32.
34. Holmgren, A. and F.J. Morgan, *Enzyme reduction of disulfide bonds by thioredoxin. The reactivity of disulfide bonds in human choriogonadotropin and its subunits*. Eur J Biochem, 1976. **70**(2): p. 377-83.
35. Blomback B, B.M., Finkbeiner W, Holmgren A, Kowalska-Loth B, Olovson G., *Enzymatic reduction of disulfide bonds in fibrin-ogen by the thioredoxin system. I. Identification of reduced bonds and studies on reoxidation process*. Thromb Res., 1974. **4**(1): p. 55-75.
36. Hessel, B., et al., *Structure-function relationships of human factor VIII complex studied by thioredoxin dependent disulfide reduction*. Thromb Res, 1984. **35**(6): p. 637-51.
37. Sugo, T., et al., *Calcium binding of bovine protein S. Effect of thrombin cleavage and removal of the gamma-carboxyglutamic acid-containing region*. J Biol Chem, 1986. **261**(11): p. 5116-20.
38. Rietsch A, B.P., Georgiou G, Beckwith J., *Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin*. J Bacteriol, 1997. **179**(21): p. 6602-8.
39. Rietsch A, B.J., *The genetics of disulfide bond metabolism*. Annu Rev Genet., 1998. **32**: p. 163-184.
40. Holmgren, A., *Glutathione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides. Characterization of the enzymatic mechanism of Escherichia coli glutaredoxin*. J Biol Chem, 1979. **254**(9): p. 3672-8.
41. Mao, S.S., et al., *A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: amazing and still confusing*. Biochemistry, 1992. **31**(40): p. 9733-43.
42. Muller, E.G., *Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle*. J Biol Chem, 1991. **266**(14): p. 9194-202.
43. Muller, E.G., *A redox-dependent function of thioredoxin is necessary to sustain a rapid rate of DNA synthesis in yeast*. Arch Biochem Biophys, 1995. **318**(2): p. 356-61.
44. Niehaus A, G.G., Schwenn JD., *Primary structure of the Synechococcus PCC 7942 PAPS reductase gene*. Plant Mol Biol, 1992. **20**(6): p. 1179-83.
45. Gonzalez Porque P, B.A., Reichard P., *The involvement of the thioredoxin system in the reduction of methionine sulfoxide and sulfate*. J Biol Chem, 1970. **245**(9): p. 2371-4.
46. Ejiri SI, W.H., Brot N., *Reduction of methionine sulfoxide to methionine by Escherichia coli*. Reduction of methionine sulfoxide to methionine by Escherichia coli., 1979. **139**(1): p. 161-4.
47. Lubbers, M. and J.R. Andreesen, *Components of glycine reductase from Eubacterium acidaminophilum. Cloning, sequencing and identification of the genes for thioredoxin reductase, thioredoxin and selenoprotein PA*. Eur J Biochem, 1993. **217**(2): p. 791-8.
48. Ji G, G.E., Armes LG, Chen CM, Fuchs JA, Silver S., *Arsenate reductase of Staphylococcus aureus plasmid pI258*. Biochemistry., 1994. **33**(23): p. 7294-9.
49. Holmgren, A.a.B.M., *Thioredoxin and Thioredoxi Reductase*. Methods in Enzymology, 1995. **252**: p. 199-208.
50. Bjornstedt, M., Kumar, S, Holmgren, A, *Selenite and Selenodiglutathione: Reactions with Thioredoxin Systems*. Methods in Enzymology, 1995. **252**: p. 209-219.
51. Giannis Spyrou , M.B., Sushil Kumar and Arne Holmgren, *AP-1 DNA-binding activity is inhibited by selenite and selenodiglutathione*. FEBS Lett, 1995. **368**(1): p. 59-63.
52. Xu, Z. and W. Wickner, *Thioredoxin is required for vacuole inheritance in Saccharomyces cerevisiae*. J Cell Biol, 1996. **132**(5): p. 787-94.

53. NAKAMURA, H., K. NAKAMURA & J. YODOI., *Redox regulation of cellular activation*. Annu. Rev. Immunol., 1997. **15**: p. 351-369.
54. Wakasugi, N., Tagaya, Y., Wakasugi, H., *ADF/Thioredoxin produced by both HTLV-1 and EBV transformed lymphocytes acts as an autocrine growth factor and synergizes with IL-1 and IL-2*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1990. **87**: p. 8282-8286.
55. Yodoi, J. and T. Tursz, *ADF, a growth-promoting factor derived from adult T cell leukemia and homologous to thioredoxin: involvement in lymphocyte immortalization by HTLV-I and EBV*. Adv Cancer Res, 1991. **57**: p. 381-411.
56. Nakamura, H., et al., *Expression and growth-promoting effect of adult T-cell leukemia-derived factor. A human thioredoxin homologue in hepatocellular carcinoma*. Cancer, 1992. **69**(8): p. 2091-7.
57. Biguet, C., et al., *Thioredoxin increases the proliferation of human B-cell lines through a protein kinase C-dependent mechanism*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 28865-70.
58. Schenk, H., et al., *Thioredoxin as a potent costimulus of cytokine expression*. J Immunol, 1996. **156**(2): p. 765-71.
59. Bertini, R., et al., *Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1783-9.
60. Miller, L.A., et al., *Trafficking of neutrophils across airway epithelium is dependent upon both thioredoxin- and pertussis toxin-sensitive signaling mechanisms*. J Leukoc Biol, 2000. **68**(2): p. 201-8.
61. Salz, H.K., et al., *The Drosophila maternal effect locus deadhead encodes a thioredoxin homolog required for female meiosis and early embryonic development*. Genetics, 1994. **136**(3): p. 1075-86.
62. Hartman, H., et al., *Spinach thioredoxin m inhibits DNA synthesis in fertilized Xenopus eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(6): p. 2271-5.
63. Natsuyama, S., et al., *Superoxide dismutase and thioredoxin restore defective p34cdc2 kinase activation in mouse two-cell block*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1176**(1-2): p. 90-4.
64. Tagaya, Y., et al., *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 J, 1989. **8**(3): p. 757-64.
65. Boniface, J.J. and L.E. Reichert, Jr., *Evidence for a novel thioredoxin-like catalytic property of gonadotropic hormones*. Science, 1990. **247**(4938): p. 61-4.
66. Iwata, S., et al., *Signal transduction via Fc receptors; involvement of tyrosine kinase and redox regulation by ADF*. Adv Exp Med Biol, 1995. **371A**: p. 659-62.
67. Patel, J.M., J. Zhang, and E.R. Block, *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, 1996. **15**(3): p. 410-9.
68. Santa-Coloma TA, G.P., Reichert LE Jr., *Sulfhydryl groups are involved in the interaction of FSH with its receptor*. Biochem Biophys Res Commun., 1991. **176**(3): p. 1256-1261.
69. Schenk, H., et al., *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, 1994. **91**(5): p. 1672-6.
70. Rubartelli, A., et al., *Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24161-4.
71. Balcewicz-Sablinska, M.K., et al., *Human eosinophil cytotoxicity-enhancing factor. II. Multiple forms synthesized by U937 cells and their relationship to thioredoxin/adult T cell leukemia-derived factor*. J Immunol, 1991. **147**(7): p. 2170-4.
72. Hori, K., et al., *Regulation of eosinophil migration by adult T cell leukemia-derived factor*. J Immunol, 1993. **151**(10): p. 5624-30.
73. Schallreuter, K.U. and J.M. Wood, *The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis*. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **136**(2): p. 630-7.
74. Fernando, M.R., et al., *Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells*. Eur J Biochem, 1992. **209**(3): p. 917-22.
75. Charizanis C, J.H., Krems B, Entian KD., *The oxidative stress response mediated via Pos9/Skn7 is negatively regulated by the Ras/PKA pathway in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genet, 1999. **261**((4-5):): p. 740-52. Related Articles, Links.
76. Lee, J., et al., *A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 4537-44.

77. Park, C.M., et al., *Chromophore-apoprotein interactions in Synechocystis sp. PCC6803 phytochrome Cph1*. *Biochemistry*, 2000. **39**(21): p. 6349-56.
78. Kuge, S. and N. Jones, *YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides*. *Embo J*, 1994. **13**(3): p. 655-64.
79. Morgan, B.A., et al., *The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 1997. **16**(5): p. 1035-44.
80. Cha, M.K., H.K. Kim, and I.H. Kim, *Thioredoxin-linked "thiol peroxidase" from periplasmic space of Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28635-41.
81. Nishiyama A, M.M., Iwata S, Hirota K, Masutani H, Nakamura H, Takagi Y, Sono H, Gon Y, Yodoi J., *J Biol Chem*, 1999. **274**(31): p. 21645-21650.
82. Saitoh M, N.H., Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H., *Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1*. *EMBO J.*, 1998. **17**(9): p. 2596-606.
83. Kobayashi, F., et al., *Biochemical and topological analysis of adult T-cell leukaemia-derived factor, homologous to thioredoxin, in the pregnant human uterus*. *Hum Reprod*, 1995. **10**(6): p. 1603-8.
84. Pompella.A., V.A., Paolicci .A., De tata.V., Casini.A.F., *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist*. *Biochem. Pharmacol.*, 2003. **66**: p. 1499-1503.
85. Muller, E.G., *A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth*. *Mol Biol Cell*, 1996. **7**(11): p. 1805-13.
86. Hentze, M.R., T.A; Harford, J.B; Klausner, R.D, *Oxidation-Reduction and Molecular Mechanism of a Regulatory RNA-Protein Interaction*. *Science*, 1989. **244**: p. 357-359.
87. Ema, M., et al., *Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300*. *Embo J*, 1999. **18**(7): p. 1905-14.
88. Nakamura, H., et al., *Measurements of plasma glutaredoxin and thioredoxin in healthy volunteers and during open-heart surgery*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **24**(7-8): p. 1176-86.
89. Nakamura, H., et al., *Chronic elevation of plasma thioredoxin: inhibition of chemotaxis and curtailment of life expectancy in AIDS*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(5): p. 2688-93.
90. Isowa, N., et al., *Human thioredoxin attenuates hypoxia-reoxygenation injury of murine endothelial cells in a thiol-free condition*. *J Cell Physiol*, 2000. **182**(1): p. 33-40.
91. Burke-Gaffney. A., C.M.E.J., and Nakamura.J, *Trends in Pharmacological Sciences*, 2005. **26**(8): p. 398-404.
92. Nakamura, H., et al., *Circulating thioredoxin suppresses lipopolysaccharide-induced neutrophil chemotaxis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(26): p. 15143-8.
93. Reddy, P.G., D.K. Bhuyan, and K.C. Bhuyan, *Lens-specific regulation of the thioredoxin-1 gene, but not thioredoxin-2, upon in vivo photochemical oxidative stress in the Emory mouse*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. **265**(2): p. 345-9.
94. Berglund, O. and A. Holmgren, *Thioredoxin reductase-mediated hydrogen transfer from Escherichia coli thioredoxin-(SH)2 to phage T4 thioredoxin-S2*. *J Biol Chem*, 1975. **250**(8): p. 2778-82.
95. Berglund, O., *Identification of a thioredoxin induced by bacteriophage T4*. *J Biol Chem*, 1969. **244**(22): p. 6306-6308.
96. Russel, M. and P. Model, *The role of thioredoxin in filamentous phage assembly. Construction, isolation, and characterization of mutant thioredoxins*. *J Biol Chem*, 1986. **261**(32): p. 14997-5005.
97. Tabor, S. and C.C. Richardson, *DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(14): p. 4767-71.
98. Kunkel, T.A., S.S. Patel, and K.A. Johnson, *Error-prone replication of repeated DNA sequences by T7 DNA polymerase in the absence of its processivity subunit*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(15): p. 6830-4.
99. Draculic, T., I.W. Dawes, and C.M. Grant, *A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 2000. **36**(5): p. 1167-74.
100. Grant, C.M., *Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions*. *Mol Microbiol*, 2001. **39**(3): p. 533-41.
101. Miranda-Vizuete, A., A.E. Damdimopoulos, and G. Spyrou, *The mitochondrial thioredoxin system*. *Antioxid Redox Signal*, 2000. **2**(4): p. 801-10.
102. Rabilloud, T., et al., *The mitochondrial antioxidant defence system and its response to oxidative stress*. *Proteomics*, 2001. **1**(9): p. 1105-10.

103. Sahrawy, M., et al., *Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains*. J Mol Evol, 1996. **42**(4): p. 422-31.
104. Hartman, H., M. Syvanen, and B.B. Buchanan, *Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m*. Mol Biol Evol, 1990. **7**(3): p. 247-54.
105. Mizuno T, K.T., Tabata S, *Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, Synechocystis sp. strain PCC 6803*. DNA Res, 1996. **3**(6): p. 407-412.
106. Ohta, N., S. Kawano, and T. Kuroiwa, *Physical map of the plastid genome of the unicellular red alga Cyanidium caldarium strain RK-1*. Curr Genet, 1994. **26**(2): p. 136-8.
107. Reynolds, A.E., et al., *Chloroplast encoded thioredoxin genes in the red algae Porphyra yezoensis and Griffithsia pacifica: evolutionary implications*. Plant Mol Biol, 1994. **25**(1): p. 13-21.
108. Lemaire, S.D., et al., *Chlamydomonas reinhardtii: a model organism for the study of the thioredoxin family*. Plant Physiol. Biochem, 2003 b. **41**: p. 513-521.
109. Collin, V., et al., *The Arabidopsis plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity*. J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 23747-52.
110. Marcus, F., et al., *Plant thioredoxin h: an animal-like thioredoxin occurring in multiple cell compartments*. Arch Biochem Biophys, 1991. **287**(1): p. 195-8.
111. Konrad.A, B.M., and Follmann.F, *Mitochondria of Plant leaves contain two thioredoxin . Completion of the thioredoxin profile of higher plants*. J. Plant Physiology, 1996. **149**: p. 317-321.
112. Serrato, A.J. and F.J. Cejudo, *Type-h thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress*. Planta, 2003. **217**(3): p. 392-9.
113. Droux, M., et al., *Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron-sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C3, C4, and cyanobacterial species*. Arch Biochem Biophys, 1987. **252**(2): p. 426-39.
114. Huppe, H.C., et al., *The ferredoxin-thioredoxin system of a green alga, Chlamydomonas reinhardtii: identification and characterization of thioredoxins and ferredoxin-thioredoxin reductase components*. Planta, 1990. **180**: p. 341-51.
115. Dai, S., et al., *How does light regulate chloroplast enzymes? Structure-function studies of the ferredoxin/thioredoxin system*. Q Rev Biophys, 2000. **33**(1): p. 67-108.
116. Droux, M., et al., *Ferredoxin-thioredoxin reductase: a catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation*. Arch Biochem Biophys, 1987. **256**(1): p. 372-80.
117. Staples CR, G.E., Stritt-Etter AL, Telser J, Hoffman BM, Schurmann P, Knaff DB, Johnson MK., *Role of the [Fe4S4] cluster in mediating disulfide reduction in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4612-4620.
118. Salamon, Z., et al., *The oxidation-reduction properties of spinach thioredoxins f and m and of ferredoxin:thioredoxin reductase*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1230**(3): p. 114-8.
119. Gelhaye, E., Rouhier,N., Gérard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot,N., Olsson, P-I., Wingsle,G., Hirasawa,M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer,Y., Jacquot , J-P., *Thioredoxin h regulates enzymes of plant mitochondria*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004. **101**: p. 14545-14550.
120. Schobert, C., Baker, L., Szederkenyi,J., Grossmann,P. , Komor,E., Hayashi, H., Chino, M. Lucas, W.J., *Identification of immunologically related proteins in sieve-tube exudate collected from monocotyledonous and dicotyledonous plants*. Planta, 1998. **206**: p. 245-252.
121. Santandrea, G., et al., *Post-phloem protein trafficking in the maize caryopsis: zmTRXh1, a thioredoxin specifically expressed in the pedicel parenchyma of Zea mays L., is found predominantly in the placentochalaza*. Plant Mol Biol, 2002. **50**(4-5): p. 743-56.
122. Ishiwatari, Y., et al., *Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap*. Planta, 1995. **195**(3): p. 456-63.
123. Wong, J.H., K. Kobrehel, and B.B. Buchanan, *Thioredoxin and seed proteins*. Methods Enzymol, 1995. **252**: p. 228-40.
124. Besse, I., et al., *Thiocalcin: a thioredoxin-linked, substrate-specific protease dependent on calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3169-75.
125. Mouaheb, N., et al., *In vivo functional discrimination between plant thioredoxins by heterologous expression in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(6): p. 3312-7.

126. Ishiwatari, Y., et al., *Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata*. *Planta*, 1998. **205**(1): p. 12-22.
127. Bower, M.S., et al., *Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a Brassica S locus receptor kinase*. *Plant Cell*, 1996. **8**(9): p. 1641-50.
128. Cabrillac, D., et al., *The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by pollen coat proteins*. *Nature*, 2001. **410**(6825): p. 220-3.
129. Reichheld, J.P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C., Meyer, Y., *The multigenic family of thioredoxin h in Arabidopsis thaliana: specific expression and stress response*. *Plant Physiol. Biochem*, 2002. **40**: p. 685-690.
130. Gelhaye, E., N. Rouhier, and J.P. Jacquot, *Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction*. *FEBS Lett*, 2003. **555**(3): p. 443-8.
131. Rouhier, N., et al., *Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor*. *Plant Physiol*, 2001. **127**(3): p. 1299-309.
132. Verdoucq, L., et al., *In vivo characterization of a thioredoxin h target protein defines a new peroxiredoxin family*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(28): p. 19714-22.
133. Goyer, A., et al., *Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(1): p. 272-82.
134. Tichy M, V.W., *Accumulation of pre-apocytochrome f in a Synechocystis sp. PCC 6803 mutant impaired in cytochrome c maturation..* *J Biol Chem.*, 1999. **274**(45): p. 32396-32399.
135. Lemaire, S., et al., *Heavy-metal regulation of thioredoxin gene expression in chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 1999. **120**(3): p. 773-8.
136. Anderson LE, L.A., Stevens FJ., *The enolases of ice plant and Arabidopsis contain a potential disulphide and are redox sensitive..* *Phytochemistry.* , 1998. **47**(5): p. 707-712.
137. Rhoads DM, U.A., Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN., *Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. Identification of the cysteine residue involved in alpha-keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation..* *J Biol Chem.*, 1998. **273**(46): p. 30750-30757.
138. Miranda-Vizuete, A. and G. Spyrou, *Genomic structure and chromosomal localization of human thioredoxin-like protein gene (txl)*. *DNA Seq*, 2000. **10**(6): p. 419-24.
139. Balmer, Y., et al., *Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(8): p. 2642-7.
140. Buchanan, B.B., *Role of light in the regulation of chloroplast enzymes*. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 1981. **31**: p. 341-374.
141. Nishizawa, A.N. and B.B. Buchanan, *Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves*. *J Biol Chem*, 1981. **256**(12): p. 6119-26.
142. Raines, C.A., Lloyd, J.C., Dyer, T.A *New insights into the structure and function of sedoheptulose-1,7-biphosphatase; an important but neglected Calvin Cycle enzyme*. *J. Exp. Bot.* , 1999. **50**: p. 1-8.
143. Buchanan, B.B., P. Schurmann, and J.P. Jacquot, *Thioredoxin and metabolic regulation*. *Semin Cell Biol*, 1994. **5**(5): p. 285-93.
144. Buchanan, B.B., et al., *Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine*. *Arch Biochem Biophys*, 1994. **314**(2): p. 257-60.
145. Scheibe, R. and L.E. Anderson, *Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast*. *Biochim Biophys Acta*, 1981. **636**(1): p. 58-64.
146. Portis Jr, A.R., R.M. Lilley, and T.J. Andrews, *Subsaturating Ribulose-1,5-Bisphosphate Concentration Promotes Inactivation of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) (Studies Using Continuous Substrate Addition in the Presence and Absence of Rubisco Activase)*. *Plant Physiol*, 1995. **109**(4): p. 1441-1451.
147. Zhang, N. and A.R. Portis, Jr., *Mechanism of light regulation of Rubisco: a specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(16): p. 9438-43.
148. Heo, J. and G.P. Holbrook, *Regulation of 2-carboxy-D-arabinitol 1-phosphate phosphatase: activation by glutathione and interaction with thiol reagents*. *Biochem J*, 1999. **338 (Pt 2)**: p. 409-16.

149. Emmanuelle Graciet*, S.L.a.B.G., *Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson± Calvin pathway via protein±protein interactions: aglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex*. Journal of Experimental Botany, 2004. **55**(400): p. 1245-1254.
150. Schwarz, O., P. Schurmann, and H. Strotmann, *Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H⁺-ATPase*. J Biol Chem, 1997. **272**(27): p. 16924-7.
151. Ballicora, M.A., et al., *Activation of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase by thioredoxin*. J Biol Chem, 2000. **275**(2): p. 1315-20.
152. Sasaki, Y., A. Kozaki, and M. Hatano, *Link between light and fatty acid synthesis: thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 11096-101.
153. I, L.A.a.H., *A light-Dependent Redox Signal Participates in the Regulation of Ammonia Fixation in Chloroplast of Higher Plants-Ferredoxin: Glutamate Synthase is a Thioredoxin-Dependent Enzyme*. J. Plant Physiol, 1998. **153**: p. 83-90.
154. Lichter, A.a.H.I., *A light-Dependent Redox Signal Participates in the Regulation of Ammonia Fixation in Chloroplast of Higher Plants-Ferredoxin: Glutamate Synthase is a Thioredoxin-Dependent Enzyme*. J. Plant Physiol, 1998. **153**: p. 83-90.
155. Allen JP, W.J., *Photosynthetic reaction centers*. FEBS Lett, 1998. **438**((1-2)): p. 5-9.
156. Allen, J.F., *How does protein phosphorylation regulate photosynthesis?* Trends Biochem Sci, 1992. **17**(1): p. 12-7.
157. Michel H, G.P., Shabanowitz J, Hunt DF, Bennett J, *Tandem mass spectrometry identifies sites of three post-translational modifications of spinach light-harvesting chlorophyll protein II. Proteolytic cleavage, acetylation, and phosphorylation*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17584-91.
158. Bennett, J., *Protein Phosphorilation in green plant chloroplast*. Annu Rev Plant Phys. Plant Mol. Bio, 1991. **42**: p. 281-311.
159. Allen, J.F., *How does Protein Phosphorilation regulate Photosynthesis ?* Trends Biochem.Sci., 1992. **17**: p. 12-17.
160. Aro, E.M. and I. Ohad, *Redox regulation of thylakoid protein phosphorylation*. Antioxid Redox Signal, 2003. **5**(1): p. 55-67.
161. Li. H., S.L.A., *A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium Synechocystis sp Strian PCC 6803*. J.Bacteriol., 2000. **182**: p. 4268-4277.
162. .T., P., *Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes*. Trends Plants Sci, 2003. **8**: p. 33-41.
163. Li.H., S.L.A., *A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium Synechocystis sp Strian PCC 6803*. J.Bacteriol., 2000. **182**: p. 4268-4277.
164. (Treibitsh.T., D.A., *Translation of chloroplast psbA mRNA is regulated by signals initiated by both photosystemII and I*. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 2001. **98**: p. 12289-12294.
165. Carlberg, I., et al., *Thylakoid protein phosphorylation and the thiol redox state*. Biochemistry, 1999. **38**(10): p. 3197-204.
166. Clement-Metral, J.D., *Activation of ALA synthetase by reduced thioredoxin in Rhodopseudomonas spheroides Y*. FEBS Lett, 1979. **101**(1): p. 116-20.
167. Pasternak, C., K. Habertzettl, and G. Klug, *Thioredoxin is involved in oxygen-regulated formation of the photosynthetic apparatus of Rhodobacter sphaeroides*. J Bacteriol, 1999. **181**(1): p. 100-6.
168. Issakidis-Bourguet, E., et al., *Heterologous complementation of yeast reveals a new putative function for chloroplast m-type thioredoxin*. Plant J, 2001. **25**(2): p. 127-35.
169. Rouhier N, G.E., Gualberto JM, Jordy MN, De Fay E, Hirasawa M, Duplessis S, Lemaire SD, Frey P, Martin F, Manieri W, Knaff DB, Jacquot JP., *Poplar peroxiredoxin Q. A thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense..* Plant Physiol., 2004. **134**(3): p. 1027-1038.
170. *Analysis of the genome of the flowering plant Arabidopsis thaliana*. Nature, 2000. **408**(6814): p. 796-815.
171. Duek, P.D. and R.A. Wolosiuk, *Rapeseed chloroplast thioredoxin-m. Modulation of the affinity for target proteins*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1546**(2): p. 299-311.
172. Mora García, S., *Estudio Estructural de in Instituto de Investigaciones Bioquímicas*. 1999, U.B.A: Buenos Aires.

173. Valvekens, D.V.M., M; Van Lijsebettens, M., *Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis root explants using Kanamycin selection* Proc Natl Acad Sci USA 1988. **85**: p. 5536-5540.
174. Beyer, E.j., *A potent inhibitor of Ethylene Action in plants*. Plant Physiol., 1976. **58**: p. 68-271.
175. Clough SJ, B.A., *Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana*. Plant J, 1998. **16**(6): p. 735-743.
176. Ye GN, S.D., Pang SZ, Creely W, Gonzalez K, Hinchee M., *Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation*. Plant J., 1999. **19**(3): p. 249-257.
177. Schumacher, K.V., D; McCarthy, M; Sze, H; Wilkins, T; Chory, J, *The Arabidopsis det3 mutant reveals a central role for the vacuolar H⁺ ATPase in plant growth and development*. Genes & Development, 1999. **13**: p. 3259-3270.
178. Michelet.L., Z.M., Marchand.C., Collin.V., Decottignies.P., Tsan.P., Lancelin.J.M., Trost.P., Miginiac-Maslow.M., Noctor.G., Lemaire.S.D, *Gluthathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants*. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 2005. **102**: p. 16478-16483.
179. Paul.M.J., K.J.S., Habash.D., Parry.M.A.J., Lawlor.D.W., Barnes.S.A., Loynes.A., Gray.J.C *Reduction in Phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO₂ assimilation and growth in low irradiance*. The Plant Journal 1995. **7**: p. 535-542.
180. Price.G.D., E.J.R., Von Caemmerer.S., Yu.J.W., Badger.M.R, *Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose bisphosphate regeneration in transgenic tobacco plants*. Planta, 1995. **195**: p. 369-378.
181. Riesmeier, J.W., et al., *Antisense repression of the chloroplast triose phosphate translocator affects carbon partitioning in transgenic potato plants*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(13): p. 6160-4.
182. Joegensen.R, *Silencing of plant genes by homologous transgenes*. AgBiotech News Info, 1991. **4**: p. 265-273.
183. Elkind.Y., E.R., Mavandad.M., Hedrick.S.A., Ribak.O., Dixon.R.A., Lamb.C.J, *Abnormal plant development and down regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene*. Proc.Natl.Acad. Sci USA, 1990. **87**: p. 9057-9061.
184. Kossmann. J., S.U., and Willmitzer.L, *Reduction of the Chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth*. The Plant Journal, 1994. **6**: p. 637-650.
185. Fitchner.K., Q.W.P., Schulze.E.D., Mooney.H.A., Rodermel.S.R., Bogorad.L., and Stitt.M, *Decreased ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in transgenic tobacco transformed with antisense rbcS.V. Relationship between photosynthetic rate, storage strategy, biomass allocation and vegetative plant growth at three different nitrogen supplies* Planta, 1993. **190**: p. 1-9.
186. Keryer, E., Colli, V., Lavergne, D., Lemaire, S & Issakidis-Bourguet, E., *Characterization of Arabidopsis mutants for the variable subunit of ferredoxin:thioredoxin reductase*. Photosynthesis Research 2004. **79**: p. 265-274.
187. Haake.V., Z.R., Sonnewald.U., and Stitt.M, *A moderate decrease of plastidic aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the level of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants* The Plant Journal, 1998. **14**: p. 147-157.
188. Hajirezaei.M.R., P.M., Tschiersch.H., Palatnik.J.F., Valle.E.M., Carrillo.N., and Sonnewald.U, *Small changes in the activity of chloroplastic NADP⁺dependent ferredoxin oxidoreductase lead to impaired plant growth and restrict photosynthetic activity of transgenic tobacco plants*. The Plant Journal, 2002. **29**(3): p. 281-293.
189. Faske.M., B.J.E., Sendker.M., Singer-Bayrl.M., Scheibe.R and Von Schaewen.A, *Transgenic Tobacco Plants Expressing Pea Chloroplast Nmdh cDNA in Sense and Antisense Orientation*. Plant Physiol, 1997. **115**: p. 705-715.
190. Takeuchi.y., A.H., Kamasawa.N., Osumi.M., Honda.H., , *Aberrant chloroplast in transgenic rice plants expressing a high level maize NADP-dependent malic enzyme*. Planta, 2000. **211**: p. 265-274.
191. Niyogi, K., Annu.Rev.Plant Physiol.Molec.Biol, 1999. **50**: p. 333-359.
192. Kaiser, W.M., *The effect of hydrogen peroxide on CO₂ fixation of isolated intact chloroplast*. Biochim. Biophys. Acta, 1976. **440**: p. 476-482.
193. Takeda, T., Yokota, A., and Shigeoka, S *Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae*. Plant Cell Physiol., 1995. **36**: p. 1089-1095.

194. Babbs CF, P.J., Coolbaugh RC, *Lethal Hydroxyl Radical Production in Paraquat-Treated Plants* Plant Physiol, 1989. **90**(4): p. 1267-1270.
195. Yoshimura, K., Miyao, K., Gaber, A., Takeda, T., Kanaboshi, H., Miyasaka, H and Shigeoka, S., *Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing Chlamydomonas glutathione peroxidase in chloroplast or cytosol*. The Plant Journal 2004. **37**: p. 21-33.
196. Broin, M. and P. Rey, *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, 2003. **132**(3): p. 1335-43.
197. Gallardo, F., G.S., Medina, M.A., and Heredia, A., *A laboratory Exercise for Photochemistry and Photobiology: Production of Hydrogen Peroxide*. J.Chem.Ed. , 2000. **77**(3): p. 375-376.
198. Ezaki, B., G.R.C., Ezaki, Y. and Matsumoto, H *Expression of Aluminium-Induced Genes in Transgenic Arabidopsis Plants Can Ameliorate Aluminium Stress and/or Oxidative Stress*. Plant Physiology 2000. **122**: p. 657-665.
199. Tognetti, V.B., Z.M.D., Morandi, E.N., Fillat, M.F., Valle, E.M., Hajirezaei, M and Carrillo, N., *Enhanced plant tolerance to iron starvation by functional substitution of chloroplast ferredoxin with a bacterial flavodoxin*. PNAS, 2007. **104**(27): p. 11495-11500.
200. Asada, K., *Radical Production and scavenging in the Chloroplast*. Photosynthesis and the environment, ed. N.R. Baker. 1996, Netherlands. 123-150.
201. Maxwell, K., J.G.N., *Chlorophyll fluorescence: a practical guide*. J Exp. Bot 2000. **51**: p. 659-668.
202. Fisahn, J., K.J., Matzke, G., Fuss, H., Bilger, W and Willmitzer, L, *Chlorophyll fluorescence quenching and violaxanthin deepoxidation of FBPase antisense plants at low light intensities and low temperatures*. Physiologia Plantarum, 1995. **95**: p. 1-10.
203. Creissen, G., Firmin, J., Fryer, M., Kular, B., Leyland, N., Reynolds, H., Pastori, G., Wellburn, F., Baker, N., Wellburn, A., and Mullineaux, P., *Elevated Glutathione Biosynthetic Capacity in the chloroplasts of Transgenic Tobacco Plants Paradoxically Causes Increased Oxidative Stress*. The Plant Cell, 1999. **11**: p. 1277-1291.
204. Harrison, E.P.W., N.M.; Lloyd, J.C; Raines, C.A, *Reduced sedoheptulose-1,7-bisphosphatase levels in transgenic tobacco lead to decreased photosynthetic capacity and altered carbohydrate accumulation* Planta, 1998. **204**: p. 27-36.
205. Muller-Rober, B.T., S.U.a.W.L., *Inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in transgenic potatoes leads to sugar-storing tubers and influences tuber formation and expression of tuber storage protein genes*. . Embo J, 1992. **11**: p. 1229-1238.
206. Kolbe, A., Oliver, S., Fernie, A.R., Stitt, M., van Dongen, J.T and Geigenberger, P, *Combined Transcript and Metabolite Profiling of Arabidopsis Leaves Reveals Fundamental Effects of the Thiol-Disulfide Status on Plant Metabolism*. Plant Physiology, 2006. **141**: p. 412-42.
207. Geigenberger, P., K.A.a.T.A., *Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars*. Journal of Experimental Botany, 2005. **56**(416): p. 1469-1479.
208. Roxas, V.P., S.R.K., Allen, E.R and Allen, R.D, *Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress*. Nature Biotechnology, 1997. **15**: p. 988-991.
209. Lee, S., M.J.S., Ko, T.S., Petros, D., Goldsbrough, P.B., and Korban, S.S, *Overexpression of Arabidopsis Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress*. Plant Physiology, 2003. **131**: p. 656-663.
210. Vernoux, T., W.R.C., Seeley, K.A., Reichheld, J.P., Muroy, S., Brow, S., Maughan, S.C., Cobbett, C.S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M.J and Sung, Z.R, *The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE 2 Gene Defines a Glutathione-Dependent Pathway Involved in Initiation and Maintenance of Cell Division during Postembryonic Root Development*. The Plant Cell, 2000. **12**: p. 97-109.
211. Gillet, S., D.P., Chardonnet, S., Le Marechal, P, *Cadmium response and redoxin targets in Chlamydomonas reinhardtii: a proteomic approach*. Photosynth. Res, 2006. **89**: p. 201-211.
212. Asada, K., *Mecanism for scavenging reactive molecules generated in chloroplast under light stress*. In Photoinhibition of Photosynthesis, ed. B.S. Publishers. 1994, Oxford: Bios Scientific Publishers. 131-145.
213. Johnson, G. L., M.K.a., *Chlorophyll fluorescence-a practical guide*. Journal Experimental Botany, 2000. **51**(345): p. 659-668.
214. Sambrook, J.S., Joseph, Maniatis, T. , *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 1982.

-
215. Ausubel, F.M.B., Roger; Kingston, Robert E; Moore, David D; Seidman, J.G; Smith, John A; Struhl, Kevin., *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. E.W. Harkins. 1995.
216. (Koncz, C.a.S., J., *Mol.Gen.Genet*, 1986. **204**: p. 383-396.
217. Gamborg OL, M.R., OjimaK, *Nutrient Requiriments of suspension cultures of soybean root cells*. *Exp Cell Res.*, 1968. **50**: p. 151-158.
218. *Plant Journal*, 1998. **14**: p. 387-392.
219. Jagow.G, S.H.v., *Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1-100 KDa*. *Anal Biochem.*, 1987. **166**: p. 368-379.
220. Crisman. C.R, *a Method for isolation of of glycogen*. *Analytical Biochemistry*, 1962. **4**(1): p. 3-17.
221. Crisman. C.R, *a Method for colorimetric estimation of glycogen with iodine*. *Analytical Biochemistry*, 1962. **4**(1): p. 17-23.
222. (Morris.D.L, *Quantitative Determination of Carbohydrates With Dreywood's Anthrone Reagent*. *Science*, 1948. **107**(2775): p. 254-255.
223. Arnon, D.I., *Chlorophylls and Carotenoids*. *Methods of enzymology*. **34**(1): p. 357-382.
224. Chen.P.S, T.T.Y., and Warner.H and *Microdetermination of Phosphorus*. *Anal. Chem*, 1956. **56**: p. 1756-1758.
225. Prieto-Alamo, M.J., et al., *Transcriptional regulation of glutaredoxin and thioredoxin pathways and related enzymes in response to oxidative stress*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(18): p. 13398-405.
226. Ritz, D., et al., *Thioredoxin 2 is involved in the oxidative stress response in Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2505-12.