



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Facultad de Ciencias Experimentales*

Trabajo Fin de Grado

**Efecto del estrés por  
salinidad sobre las  
modificaciones post-  
traduccionales por óxido  
nítrico mediante  
nitración en cultivos  
celulares de *Arabidopsis  
thaliana***

Lorena Aranda Caño

Junio, 2015



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

GRADO EN BIOLOGÍA  
Trabajo Fin de Grado

Efecto del estrés por salinidad  
sobre las modificaciones post-  
traduccionales por óxido nítrico  
mediante nitración en cultivos  
celulares de *Arabidopsis thaliana*

Lorena Aranda Caño

Jaén, 23 de junio de 2015

## ÍNDICE

1. Resumen/Summary .....	1
2. Introducción .....	1
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	1
2.2. El estrés en plantas.....	3
2.2.1. Estrés abiótico por salinidad.....	3
2.3. Estrés oxidativo.....	5
2.3.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS) .....	6
2.3.2. Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo .....	7
2.4. Metabolismo de óxido nítrico (NO) en plantas .....	7
2.4.1. Producción del NO en plantas.....	8
2.4.2. Funciones fisiológicas del óxido nítrico .....	9
2.4.3. Señalización por óxido nítrico en plantas .....	10
2.4.4. Especies de nitrógeno reactivo (RNS) y estrés nitrosativo.....	11
2.4.4.1. Peroxinitrito .....	11
2.4.5. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por óxido nítrico.....	13
2.4.5.1. S-nitrosilación de proteínas .....	13
2.4.5.2. Nitración de proteínas .....	14
3. Objetivos.....	15
4. Material y métodos .....	16
4.1. Cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
4.2. Inducción de estrés por salinidad en los cultivos celulares .....	17
4.3. Homogeneización de los cultivos celulares.....	17
4.4. Determinación de la concentración de proteínas .....	17
4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-Page).....	18
4.5.1. Preparación de geles y muestras .....	19
4.6. Western-Blot .....	19
4.6.1. Transferencia semiseca de proteínas.....	19
4.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia .....	20
4.6.2.1. Bloqueo .....	20
4.6.2.2. Incubación con el anticuerpo primario .....	21

4.6.2.3.	Incubación con el anticuerpo secundario .....	21
4.6.2.4.	Detección de las proteínas por quimioluminiscencia.	21
5.	Resultados y discusión .....	22
5.1.	Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	22
5.2.	Análisis del patrón endógeno de nitración proteica en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
5.3.	Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> con diferentes cantidades de proteína.....	25
5.4.	Análisis del patrón endógeno de nitración proteica en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> con diferentes cantidades de proteína.....	27
5.5.	Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidos a estrés por salinidad .....	28
5.6.	Análisis del patrón de nitración proteico en cultivos celulares de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidos a estrés por salinidad.....	30
6.	Conclusiones .....	31
7.	Bibliografía.....	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	2
Figura 2. Mecanismos de respuesta a los estreses biótico y abiótico .....	3
Figura 3. Generación de las diferentes especies reactivas de oxígeno.....	6
Figura 4. Síntesis enzimática de NO .....	9
Figura 5. Formación del peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido ....	12
Figura 6. Reacciones del peroxinitrito (ONOO-) y del ácido peroxinitroso (ONOOH).....	12
Figura 7. Mecanismo de S-nitrosilación de proteínas.....	13
Figura 8. Nitración de la tirosina de las proteínas.....	14
Figura 9. Cultivos celulares en suspensión de <i>Arabidopsis thaliana</i> en el incubador.....	16
Figura 10. Gel en gradiente (4-20% de acrilamida) teñido con azul Comassie que representa el total de proteínas presentes en los cultivos celulares control de diferentes días tras el subcultivo .....	22
Figura 11. Membrana teñida con rojo Ponceau perteneciente a un gel de acrilamida al 10%, que representa el patrón de proteínas transferidas, normalizadas a 10µg de proteína/pocillo, en los cultivos celulares de diferentes días tras el subcultivo .....	23
Figura 12. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se encuentran representadas las proteínas nitradas presentes, en los cultivos celulares obtenidos en diferentes días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular .....	24
Figura 13. Gel al 10% de acrilamida teñido con azul Comassie que representa el total de proteínas presentes, cargando diferentes cantidades de proteína en los pocillos, en los cultivos celulares control de 9 días tras el subcultivo .....	25

Figura 14. Membrana teñida con rojo Ponceau que representa el total de proteínas transferidas, cargando diferentes cantidades de proteína por pocillo, en los cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo .....	26
Figura 15. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se encuentran representadas las proteínas nitradas presentes, cargando diferentes cantidades de proteína por pocillo, en los cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo.....	27
Figura 16. Gel en gradiente (4-20% de acrilamida) teñido con azul Comassie que representa el total de proteínas presentes en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl .....	28
Figura 17. Membrana teñida con rojo Ponceau procedente de un gel de acrilamida al 10%, que representa el total de proteínas presentes en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl transferidas a una membrana de PVDF .....	29
Figura 18. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se representan las proteínas nitradas en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl.....	30

## 1. RESUMEN/SUMMARY.

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que participa en un amplio abanico de funciones celulares, estando implicado en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esta molécula puede generarse mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos y, dependiendo de su concentración en la célula, puede actuar como molécula señalizadora o generar efectos tóxicos. El NO y las moléculas derivadas del mismo se conocen como especies de nitrógeno reactivo (RNS) y pueden llevar a cabo modificaciones post-traduccionales de proteínas como la nitración o la S-nitrosilación. En este trabajo se observó el efecto del estrés por NaCl en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, utilizando las técnicas de SDS-Page y Western-Blot para detectar la nitración proteica. Los resultados obtenidos demuestran la existencia de nitración endógena en los cultivos celulares, niveles que se incrementaron como consecuencia del estrés abiótico por salinidad, lo que sugiere que esta situación cursa con un estrés nitrooxidativo.

Nitric oxide (NO) is a gaseous molecule that participates in a wide range of cellular functions, being involved in the growth and development of plants. This molecule can be generated by enzymatic and non-enzymatic mechanisms and, depending on its concentration in the cell, it can act as a signaling molecule or generates toxic effects. The NO and molecules derived from it are known as reactive nitrogen species (RNS) and they can carry out post-translational modifications of proteins as nitration or S-nitrosylation. In this study the effect of NaCl stress in cell cultures of *Arabidopsis thaliana* was observed, using the techniques of SDS-PAGE and Western-Blot to detect the protein nitration. The results show the existence of endogenous nitration in cell cultures, nitration levels increased as a result of abiotic salinity stress, suggesting that this stress causes a nitrooxidative stress.

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. *Arabidopsis thaliana*.

*Arabidopsis thaliana* es una planta herbácea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, concretamente a la especie crucífera (Fig. 1). Este tipo de crucífera es

autóctona de Europa, Asia y del noroeste de África, siendo su hábitat típico los bordes de los caminos y terrenos sueltos y secos.

Es una planta anual con un ciclo corto (inferior a cinco meses) y presenta una altura comprendida entre 1 y 3 dm. Las principales características de esta planta son que presenta un tallo erecto cubierto de pelos ramificados, los cuales van desapareciendo a medida que nos acercamos a las inflorescencias, presenta una ramificación un poco alejada de la base; las hojas son simples, elípticas u ovales con los bordes enteros pudiendo diferenciarse dos tipos de hojas: basales y caulinares; las flores son hemafroditas, normalmente están compuestas de cuatro pétalos blancos y espatulados formando inflorescencias en racimos, situados en los extremos de las ramas o del tallo; finalmente, el fruto es una silicua linear que encontramos en el interior de la flor, este presenta una forma cilíndrica, poco arqueada y sin pelos (Blamey y Grey-Wilson, 1989).

*Arabidopsis* no tiene una gran importancia agronómica, pero ofrece ventajas importantes para la investigación básica en Biología Molecular y Genética, puesto que gracias al proyecto de investigación AGI (Iniciativa para el Genoma de *Arabidopsis*), en el año 2000 se secuenció su genoma constituido por 25498 genes. Otras ventajas por las cuales *Arabidopsis* es considerada una especie modelo en investigación molecular son la existencia de mapas genéticos y físicos de sus 5 cromosomas; tiene un ciclo de vida rápido (sobre unas 6 semanas); gran producción de semillas; cultivo fácil en espacios pequeños; la existencia de una gran colección de líneas mutantes y de recursos genómicos; métodos de transformación eficientes utilizando *Agrobacterium tumefaciens*; y finalmente, la existencia de una comunidad de investigación multinacional de laboratorios académicos, gubernamentales e industriales (Meyerowitz, 1989).



Figura 1. Planta de *Arabidopsis thaliana*



## 2.2. El estrés en plantas.

Las plantas se encuentran sometidas a la influencia de numerosos factores externos en un medio ambiente cambiante, al cual no pueden escapar debido a que son organismos incapaces de desplazarse y, como consecuencia, estos factores externos pueden influir negativamente en su desarrollo óptimo (Tesis doctoral Juan Carlos Begara, 2011).

Por tanto, el estrés se define como el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que son características de un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas (Larcher, 1995).

Los estreses pueden ser de tipo biótico, causados por agentes que pueden resultar patógenos (bacterias, hongos, virus, insectos, nematodos u otras plantas); o de tipo abiótico, causados por las alteraciones físico-químicas producidas en el entorno de la planta por los diferentes factores medioambientales.

Estos tipos de estreses provocan distintas respuestas en las plantas (Fig. 2), que van desde la alteración del metabolismo celular y de la expresión génica hasta cambios en el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Bray *et al.*, 2000). Dicha respuesta va a depender de la especie, de la edad de la planta y del genotipo, aunque también va a depender de la duración y severidad del estrés.

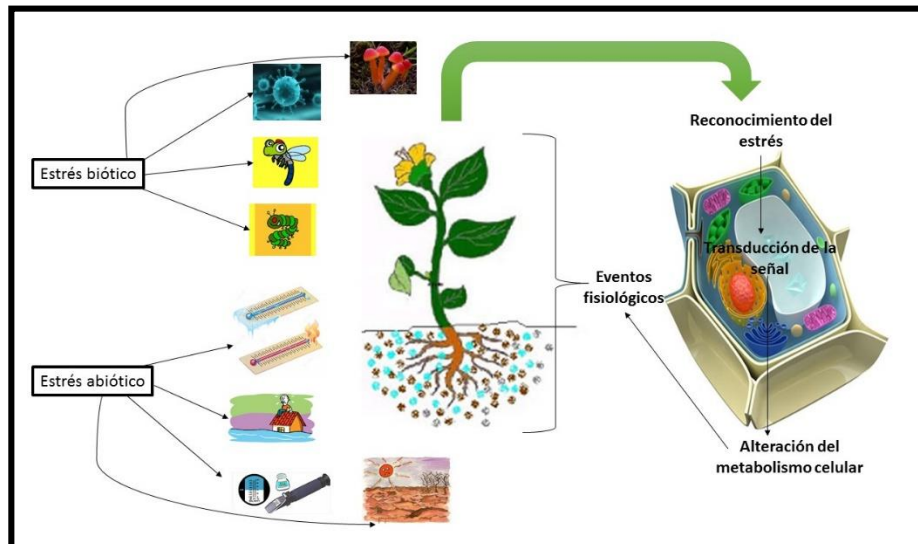


Figura 2. Mecanismos de respuesta a los estreses biótico y abiótico.

### 2.2.1. Estrés abiótico por salinidad.

Más de una quinta parte de las tierras cultivables del mundo se encuentran actualmente bajo la amenaza de estrés salino, las plantas deben ser capaces de

sobrevivir a pesar del estrés por salinidad, conocido también como estrés por cloruro sódico (NaCl) (Li *et al.*, 2011).

Los niveles de salinidad en una tierra de cultivo dependen de varios factores, como son la evaporación, la cual provoca un aumento de la concentración de sal, y las precipitaciones, que disminuyen la concentración de sal. En las tierras agrícolas intensamente regadas se produce un aumento de la salinidad debido a la pérdida masiva de agua por evapotranspiración (combinación de la evaporación y transpiración). Como resultado se obtiene un suelo con una textura alterada debido a la reducción de su porosidad y de la aireación como consecuencia de la conductancia del agua, por tanto, se produce una zona con un potencial hídrico bajo que dificulta la adquisición de agua y nutrientes por la planta. Otras alteraciones causadas por las altas concentraciones de sales presentes en el suelo son un desequilibrio iónico, un potencial osmótico bajo y la inhibición de algunas enzimas (Munns *et al.*, 2006).

El desequilibrio iónico que surge como consecuencia de la salinidad se debe a que el  $\text{Na}^+$  externo afecta negativamente a la entrada de  $\text{K}^+$  a la célula. Este descenso de los niveles de  $\text{K}^+$  intracelular tienen efectos perjudiciales, ya que este ión es requerido en altas concentraciones por la planta para regular el balance osmótico, la apertura y cierre de los estomas, actuando también como cofactor de diferentes enzimas. Por otro lado, el incremento intracelular de  $\text{Na}^+$  altera el potencial de membrana y facilita la absorción  $\text{Cl}^-$  a favor de gradiente químico. Un exceso de  $\text{Na}^+$  es tóxico para el metabolismo celular y tiene efectos nocivos para el funcionamiento de algunas enzimas (Niu *et al.*, 1995), además afecta negativamente la división y expansión celular, provoca la desorganización de la membrana y desajustes osmóticos (Tuteja, 2007), teniendo como consecuencia la inhibición del crecimiento de la planta (Xiong *et al.*, 2002).

Además, el estrés por cloruro sódico afecta al intercambio de gases limitando el abastecimiento de  $\text{CO}_2$  a la hoja, lo que provoca una reducción de la regeneración de  $\text{NADP}^+$  por el ciclo de Calvin, causando la sobrerreducción de la cadena transportadora de electrones fotosintética, dando lugar a la producción de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Shao *et al.*, 2007a,2007b).

Asimismo, también se observa una alteración en la ultraestructura de los cloroplastos y tilacoides (Santos, 1998), dañándose el aparato fotosintético debido a

la toxicidad directa de los iones  $\text{Na}^+$  o al daño oxidativo inducido por la salinidad (Mittler, 2002).

Por tanto, la salinidad del suelo tiene un efecto importante en el crecimiento y desarrollo de la planta y en la productividad de los cultivos (Zhu, 2001).

Para sobrevivir al estrés abiótico causado por salinidad, las plantas han desarrollado varios mecanismos que les permiten percibir las señales externas y mantener la homeostasis iónica intracelular de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Zhu, 2001, 2002, 2003). Uno de estos mecanismos es la vía SOS (sensores del ión calcio), la cual se activa por el estrés salino y se encarga de mantener altos los niveles de iones  $\text{K}^+$  y bajos los niveles de iones  $\text{Na}^+$  para así mantener la homeostasis (Zhu, 2003).

Otras moléculas que también ejercen una función importante para hacer frente al estrés por sal son el ácido abscísico (ABA) y las fitohormonas. Principalmente, los niveles elevados de ABA inducen la expresión de muchos genes que parecen desempeñar un papel multifacético en respuesta a la sal y en la tolerancia a esta (Finkelstein et al., 2002). Los productos de los genes inducidos por ABA incluyen proteínas reguladoras, tales como factores de transcripción, proteínas quinasas y fosfatasas; varios transportadores y enzimas implicadas en la síntesis de osmoprotectores, en la señalización de fosfolípidos, en el metabolismo de los ácidos grasos y en el metabolismo celular (Fujita *et al.*, 2011).

### **2.3. Estrés oxidativo.**

La producción y consumo de oxígeno son funciones esenciales para la vida de las plantas. Sin embargo, en ellas el metabolismo del oxígeno da lugar también a la formación de sustancias altamente tóxicas. Para evitar que estas produzcan daños, las plantas han desarrollado en el curso de la evolución sistemas de defensa antioxidantes que incluyen antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Pero cuando estos mecanismos son desbordados se produce una situación conocida como estrés oxidativo que puede ocasionar graves daños llevando incluso a la muerte de la planta (Asada, 2006). En estas condiciones, las especies reactivas de oxígeno reaccionan con las macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y lípidos) de las células

modificando su estructura y su función, dando lugar a alteraciones que pueden conducir a la muerte celular (Mittler, 2002; Apel y Hirt, 2004).

### 2.3.1. Especies de oxígeno reactivo (ROS).

Los radicales libres se forman cuando una molécula con un par de electrones no apareados en la órbita externa recibe o pierde un electrón. El radical libre más común en la atmósfera es la molécula de oxígeno, la cual tiene dos electrones no apareados en la última órbita, esta distribución de electrones hace al oxígeno un excelente aceptor de electrones. Cuando la molécula de oxígeno diatómico se activa químicamente, puede aceptar un máximo de cuatro electrones y cuatro protones, produciéndose dos moléculas de agua. Pero si la molécula de oxígeno recibe uno, dos o tres electrones, se forman las especies de oxígeno reactivo (Lamb y Dixon, 1997), las cuales son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, respectivamente. Además, el oxígeno puede recibir un exceso de energía y producir un singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ) (Fig. 3) (Mckersie y Leshem, 1994).

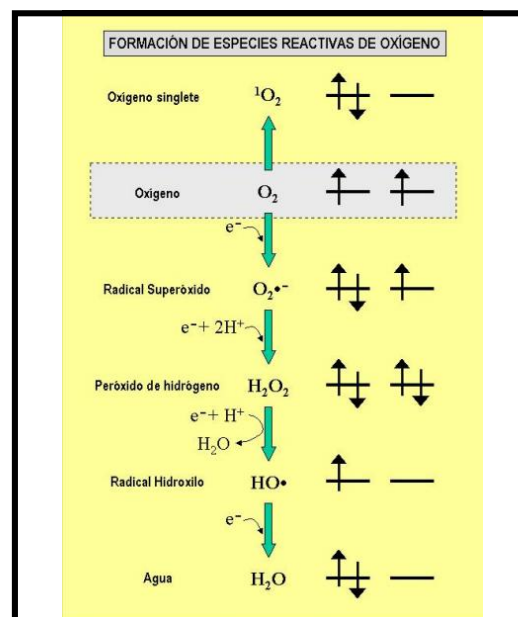


Figura 3. Generación de las diferentes especies reactivas de oxígeno. Imagen tomada de: <http://www.uhu.es/francisco.cordoba/ asignaturas/postgrado/estres/d>

Las ROS son producidas continuamente en las plantas como consecuencia de numerosas rutas metabólicas aeróbicas (respiración y fotosíntesis), apareciendo fundamentalmente en mitocondrias, peroxisomas y cloroplastos (Apel y Hirt, 2004). En condiciones normales, la producción y eliminación de las ROS está estrictamente controlada. Sin embargo, el equilibrio entre la producción y la depuración de éstas puede ser perturbado por diversas situaciones de estrés biótico o abiótico, provocando daños importantes en la célula (Cabrera, 2006).

### 2.3.2. *Mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo.*

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para eliminar el exceso de ROS que son los sistemas antioxidantes, los cuales se encargan de ceder potencial reductor a los compuestos oxidantes capaces de dañar componentes celulares. Estos antioxidantes pueden ser enzimáticos o no enzimáticos, y siendo esta diversidad necesaria porque las ROS se producen en diferentes compartimentos celulares y extracelulares (Perl-Treves y Perl, 2002).

Entre los antioxidantes enzimáticos encontramos las superóxido dismutasas (SOD) (Hassan, 1989), la catalasa (Kirkman y Gaetani, 1978) y las enzimas del ciclo ascorbato-glutación (Foyer y Halliwell, 1976), mientras que los antioxidantes no enzimáticos están constituidos por vitaminas y micronutrientes (Sies y Stahl, 1995).

## 2.4. **Metabolismo del óxido nítrico (NO) en plantas.**

El óxido nítrico, también conocido como monóxido de nitrógeno, es un gas inorgánico de pequeño tamaño que se considera un radical libre porque tiene un electrón desapareado en su orbital externo, lo que explica su gran reactividad (Corpas *et al.*, 2011). Otra característica más de este gas es que presenta naturaleza lipofílica, la cual le permite atravesar las membranas celulares y reaccionar con distintas macromoléculas (Corpas *et al.*, 2009c, 2011).

El NO puede presentarse como tres especies distintas e interconvertibles, ya que puede adoptar una estructura energéticamente más favorable ganando o perdiendo un electrón, dando como resultado la formación de anión nitroxilo ( $\text{NO}^-$ ) o catión nitrosonio ( $\text{NO}^+$ ), los cuales difieren en sus propiedades físicas y en su reactividad química (Astier *et al.*, 2011).

El efecto del óxido nítrico fue observado por primera vez en plantas (Klepper, 1975), pero esta publicación no tuvo importancia hasta que el óxido nítrico fue identificado en sistemas animales como un factor relajante derivado del endotelio (Ignarro *et al.*, 1987).

El NO se encuentra en altos niveles en tejidos en fase de crecimiento como el eje embrionario y los cotiledones, pero sus niveles son bajos en órganos senescentes y maduros (Beligni y Lamattina, 2001).

#### 2.4.1. Producción del NO en plantas.

La producción de óxido nítrico en las plantas puede llevarse a cabo mediante mecanismos enzimáticos y no enzimáticos.

Las vías no enzimáticas de producción de NO son: la reducción de NO<sub>2</sub> a NO que tiene lugar en condiciones de pH ácido (Caro y Puntarulo, 1999), reacción que puede verse favorecida en presencia de reductores como el ácido ascórbico o el glutatión (Bethke *et al.*, 2004); o la reducción mediada por luz del NO<sub>2</sub> a NO en la que intervienen los carotenoides (Durner y Klessig, 1999).

Entre las vías enzimáticas de síntesis de óxido nítrico, que son las que aportan la mayoría del óxido nítrico al organismo vegetal, podemos diferenciar las siguientes:

- La ruta dependiente de arginina (Fig. 4). La información que se tiene sobre esta ruta proviene de los estudios realizados en modelos animales, gracias a los cuales se caracterizaron las óxido nítrico sintasas (NOS), que son las enzimas que catalizan la síntesis de óxido nítrico (Bredt y Snyder, 1990). En plantas se produce L-citrulina a partir de L-arginina mediante un proceso que es dependiente de los cofactores típicos de los NOS de mamíferos (FAD, FMN, BH<sub>4</sub>, calmodulina, Ca<sup>+2</sup>, oxígeno y NADPH) y a partir de L-citrulina se sintetiza el NO (Durner y Klessig, 1999; Corpas *et al.*, 2001) aunque estas proteínas tipo NOS no se han aislado ni secuenciado aún. Esta ruta ocurre durante la regulación de diferentes procesos como el desarrollo (Corpas, 2006; Corpas *et al.*, 2009c), respuesta a estrés por cadmio (Besson-Bard, 2009), respuesta a patógenos (Asai, 2009) y protección contra radiación UV-B (Tossi *et al.*, 2009).
- Las rutas dependientes de nitrito (Fig. 4). En plantas, el nitrito es normalmente reducido hasta amonio por la acción de la nitrito reductasa (NiR) en la

membrana plasmática (Mifflin 1974), pero esta enzima también se encarga de la producción de NO (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.*, 2002). En cambio, otra enzima que puede reducir el nitrito es la nitrato reductasa (NR), pero esta es una enzima bi-funcional que puede reducir el nitrato a nitrito y, en menor proporción, el nitrito a NO (Klepper, 1990). El NO producido por la nitrato reductasa está implicado en el cierre de los estomas (Neill *et al.*, 2008), en la respuesta de la planta a patógenos (Wu *et al.*, 2009), en la respuesta al estrés osmótico (Sang *et al.*, 2008) y en procesos de desarrollo como la floración (Seligman *et al.*, 2008) o la inducción de raíces laterales (Kolbert *et al.*, 2008). Además, en el peroxisoma encontramos otra enzima denominada xantina-óxido-reductasa (XOR) que también reduce el nitrito a NO (Godber *et al.*, 2000).

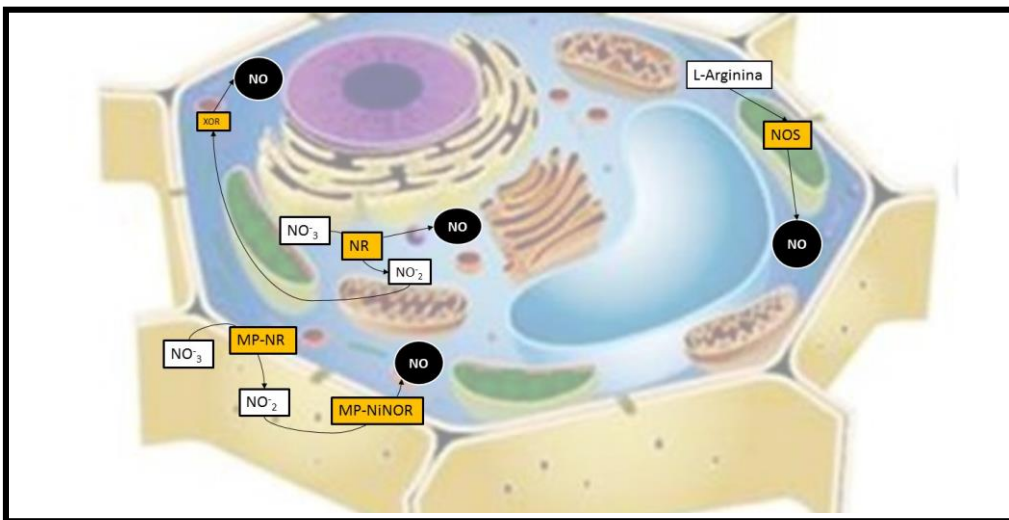


Figura 4. Síntesis enzimática de NO. En esta figura, NR: Nitrato reductasa; MP-NR: nitrato reductasa unida a membrana plasmática; MP-NiNOR: nicotiana-óxido nítrico reductasa (NiNOR) unida a membrana plasmática; XOR: xantina óxido reductasa; tipo NOS: óxido nítrico sintasa de plantas.

#### 2.4.2. Funciones fisiológicas del óxido nítrico.

Las funciones fisiológicas del óxido nítrico dependen de su concentración en la célula, pudiendo tener efectos tóxicos o actuar como molécula señal (Neill, 2003; Del Rio *et al.*, 2004).

Su principal función es intervenir en el crecimiento y desarrollo de la planta (Corpas, 2006). Pero, además el óxido nítrico participa en otros procesos como la

inducción de la germinación y la reducción de la dormancia de la semilla (Zheng, 2009), la regulación del metabolismo de la planta y la senescencia (Guo y Crawford, 2005), la inducción de la muerte celular (Pedroso y Durzan, 2000), la regulación del movimiento estomático (García-Mata y Lamattina, 2007), la regulación de la fotosíntesis (Takahashi y Yamasaki, 2002), el gravitropismo (Hu *et al.*, 2005), la regulación del tiempo de floración (He *et al.*, 2004), el desarrollo floral y la dominancia apical (Kwon *et al.*, 2012) y la orientación del crecimiento del tubo de polen (Prado *et al.*, 2004).

Sin embargo, los niveles elevados de NO tienen la capacidad de dañar las membranas y el ADN (Pedroso y Durzan, 2000; Romero-Puertas *et al.*, 2004), reducen la fotosíntesis en avena y alfalfa (Hill, 1970) y la respiración en suspensiones celulares de zanahoria (Zottini *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito la participación del NO en la respuesta de la planta frente a diferentes situaciones de estrés abiótico (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2008; Chaki *et al.*, 2011a; Corpas *et al.*, 2011; Chaki *et al.*, 2011b).

#### 2.4.3. Señalización por óxido nítrico en plantas.

A pesar de su naturaleza reactiva, el NO es capaz de actuar como molécula señalizadora en numerosos procesos biológicos (Del Río *et al.*, 2004; Shapiro, 2005), concretamente en procesos relacionados con la respuesta de la planta frente a diferentes situaciones de estrés o en la codificación de proteínas relacionadas con la transducción de señales como pueden ser proteínas quinasas y fosfatasa, también interfiere en la expresión de algunos genes relacionados con el estrés oxidativo (Begara-Morales *et al.*, 2014).

Algunos ejemplos de la actuación del NO como molécula señalizadora son: su actuación durante la inducción y desarrollo de la respuesta hipersensible de la planta en la interacción planta-patógeno (Durner *et al.*, 1998); su implicación en la resistencia sistémica adquirida durante el estrés biótico (Krasylenko, 2010) y su importancia en la lignificación de la pared celular (Hong *et al.*, 2008). Además, su presencia aumenta los niveles de ácido salicílico (SA), que es una molécula señal de la resistencia sistémica adquirida (SAR) (Klessig *et al.*, 2000), por tanto, tanto el NO como el SA tienen la capacidad de inhibir de forma reversible la catalasa y la ascorbato peroxidasa, regulando de esta manera los niveles de peróxido de hidrógeno durante



la respuesta de la planta a situaciones de estrés (Clark *et al.*, 2000). El NO también activa genes de defensa (fenilalanina amonio liasa, PAL) y de proteínas relacionadas con la patogénesis en tabaco y en *Arabidopsis* (Durner *et al.*, 1998; Klessig, 2000); esta involucrado en las respuestas de defensa de la planta relacionadas con el ácido jasmónico (Huang *et al.*, 2004); participa en las respuestas de las plantas a estreses abióticos como son el estrés osmótico, la salinidad, la exposición a altas y bajas temperaturas, la radiación ultravioleta, la exposición al ozono, metales pesados y las heridas (Neill, 2003; Huang *et al.*, 2004; Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2008; Chaki *et al.*, 2011a); participa en la regulación, junto con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, del cierre del estoma inducido por ABA (Neill *et al.*, 2008); y esta relacionado con la muerte celular programada (Neill *et al.*, 2003).

#### 2.4.4. Especies de nitrógeno reactivo (RNS) y estrés nitrosativo.

Las especies de nitrógeno reactivo (RNS) se forman por la interacción del óxido nítrico (NO) con otros radicales y con oxígeno, siendo las principales RNS el NO, el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el trióxido de dinitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), el dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>) y el catión nitrosonio (NO<sup>+</sup>) (Halliwell y Gutteridge, 2007).

Las RNS son altamente reactivas y pueden dañar y matar las células por distintos mecanismos tales como la inactivación de los diferentes complejos de la cadena respiratoria (Brown, 1999), el daño a proteínas y lípidos (Prescott, 1999) y la inhibición de la síntesis proteica o del ADN (Bundy *et al.*, 2000).

Por consiguiente, se considera que una planta se encuentra en una situación de estrés nitrosativo cuando hay una sobreproducción de NO y/o sus especies derivadas que pueden conllevar efectos tóxicos (Valderrama *et al.*, 2007). En este tipo de situaciones, es preciso definir un marcador fiable de estrés nitrosativo (Corpas *et al.*, 2007), el cual puede ser el aumento de la nitración de tirosina en las proteínas (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2007; Chaki *et al.*, 2011a; Chaki *et al.*, 2011b).

##### 2.4.4.1. Peroxinitrito.

El peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) es un potente oxidante procedente de la reacción no enzimática entre el NO y el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Fig. 5) (Squadrito y Pryor, 1998), este compuesto juega un papel importante en diferentes procesos fisiológicos tanto en células animales como vegetales (Halliwell y Gutteridge, 2007).



Figura 5. Formación del peroxinitrito a partir de óxido nítrico y anión superóxido.

En los sistemas biológicos el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ), se encuentran en equilibrio (Ferrer-Sueta y Radi, 2009) pudiendo llevar a cabo reacciones directas sobre diferentes biomoléculas.

El peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) reacciona con el dióxido de carbono, mediante una reacción rápida, generando radicales carbonato ( $\text{CO}_3^-$ ) y dióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ), los cuales ejercen diferentes efectos sobre las macromoléculas celulares como con la oxidación y nitración de tirosinas de proteínas y la oxidación y nitración del ADN (Fig. 6) (Radi, 2013).

Por otro lado, el ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ) es capaz de atravesar las membranas celulares y de descomponerse mediante una reacción más lenta que la anterior, en los radicales  $\text{OH}$  y  $\text{NO}_2$ , que se encargan de iniciar la peroxidación lipídica y la nitración de proteínas y lípidos (Fig. 6) (Carballal *et al.*, 2014).

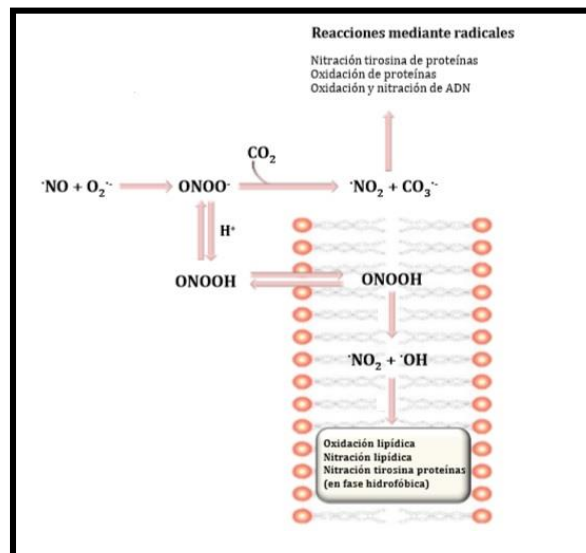


Figura 6. Reacciones del peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y del ácido peroxinitroso ( $\text{ONOOH}$ ). Imagen tomada de la Tesis doctoral de Capilla Mata Pérez (2015).

#### 2.4.5. Modificaciones post-traduccionales de proteínas por óxido nítrico.

Gracias a los avances realizados en modelos biológicos de plantas, está bien documentado que el NO es un mediador de diferentes modificaciones post-traduccionales. Estas modificaciones pueden ser: la unión a centros metálicos de las proteínas; la nitrosilación de grupos tiol y amina; la nitración de residuos de tirosina, triptófano y fenilalanina y la oxidación de grupos tiólicos o de tirosinas (Gow *et al.*, 2004).

##### 2.4.5.1. S-nitrosilación de proteínas.

También conocida como nitrosilación de cisteínas, consiste en la unión de NO con el grupo tiol de un residuo de cisteína lo que ocasiona variaciones en la función de diferentes proteínas (Stamler y Toone, 2002). Estas proteínas cubren un rango amplio de actividades, incluyendo quinasas, canales iónicos, factores de transcripción, proteínas estructurales y proteasas, entre otras (Stamler *et al.*, 2001).

Este proceso de nitrosilación requiere de la reacción del NO con el O<sub>2</sub> para formar óxidos de nitrógeno (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), los cuales se disocian generando cationes nitrosonio (NO<sup>+</sup>) que serían los encargados de llevar a cabo el ataque nucleofílico del grupo tiol de las proteínas (Fig. 7) (Astier *et al.*, 2011).

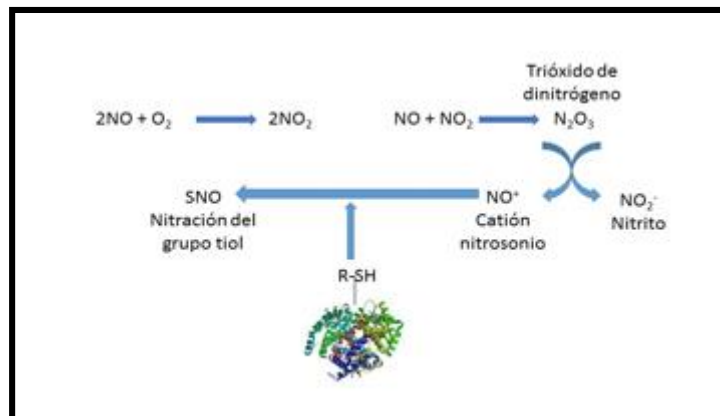


Figura 7. Mecanismo de S-nitrosilación de proteínas.

La S-nitrosilación de proteínas es una modificación reversible y específica, la cual modula diversas funciones fisiológicas y biológicas además, dependiendo de la proximidad y la orientación de los grupos tiol, se puede inducir o inhibir la formación de puentes de disulfuro dentro o entre proteínas. Este proceso es específico, puesto

que los residuos de cisteína susceptibles a la S-nitrosilación son aquellos que están flanqueados por aminoácidos ácidos y básicos (Lindermayr y Durner, 2009).

En plantas, las funciones fisiológicas de las proteínas S-nitrosiladas aún son bastantes desconocidas. Estudios recientes, han desvelado proteínas S-nitrosiladas relacionadas con el estrés y con el estado redox celular, implicadas en la señalización (Lindermayr *et al.*, 2006) e involucradas en la respuesta hipersensible durante la interacción planta-patógeno (Palmieri *et al.*, 2010).

#### 2.4.5.2. Nitración de proteínas.

Este proceso, también conocido como nitración de tirosinas, consiste en la modificación covalente que resulta tras la adición de un grupo nitro ( $\text{NO}_2$ ) en uno de los dos carbonos orto equivalentes del anillo aromático de los residuos de tirosina (Fig. 8) (Ischiropoulos, 2003), actuando de esta manera el NO como fuente de nitrógeno (Ischiropoulos, 1998).

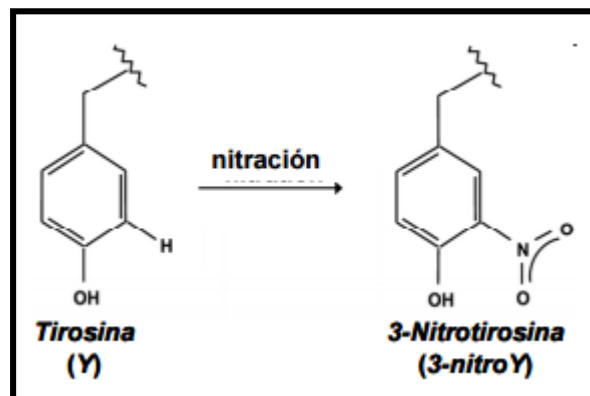


Figura 8. Nitración de la tirosina de las proteínas.

Generalmente, este proceso es llevado a cabo por diferentes radicales. El proceso se inicia con la oxidación de un residuo de tirosina para formar un radical tirosil, cuya oxidación es producida por especies reactivas derivadas del peroxinitrito como el  $\text{CO}_3$  y el OH. A continuación el radical tirosil se nitra por su interacción radical-radical con el  $\text{NO}_2$  (Prütz *et al.*, 1985; Radi, 2013). Otro mecanismo de nitración de proteínas es llevado a cabo por las hemoperoxidasas en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{NO}_2$  (Carballal *et al.*, 2014).

La nitración de tirosinas en las proteínas altera su actividad catalítica, su solubilidad, su susceptibilidad a la agregación y aumenta su tendencia a la degradación (Radi, 2012).

Normalmente, en tejidos y células los niveles de nitración de proteínas son bajos, lo cual es debido básicamente al consumo de los agentes nitrantes, la acción de diversas enzimas que atenúan la formación de oxidantes o por la reparación del radical tirosil (Petruk *et al.*, 2012).

El proceso de nitración se define como un proceso selectivo, ya que solo afecta a un pequeño grupo de proteínas y a pocas tirosinas dentro de cada proteína (Corpas *et al.*, 2009a; Radi *et al.*, 2012).

La nitración de tirosinas puede causar tanto pérdida como aumento en la función de las proteínas aunque, en otras ocasiones, no altera la funcionalidad de la proteína (Radi, 2004). Estudios recientes, han demostrado que la nitración fisiológica de proteínas participa en procesos como la fotosíntesis, la ruta del proteosoma, en el metabolismo de carbohidratos y nitrógeno y en la fotorrespiración. También, se han descrito cambios en la nitración de proteínas bajo diferentes condiciones de estrés biótico y abiótico en plantas, encontrándose un incremento de los niveles de proteínas nitradas en respuesta al estrés abiótico por salinidad (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2009b), luz continua, alta intensidad luminosa, altas y bajas temperaturas (Corpas *et al.*, 2008), heridas mecánicas (Chaki *et al.*, 2011a; Chaki *et al.*, 2011b) y como consecuencia de la exposición a materiales pesados como el arsénico (Leterrier *et al.*, 2012). Igualmente, se ha demostrado un incremento de las proteínas nitradas en la respuesta de la planta frente al estrés biótico provocado por la interacción planta-patógeno (Chaki *et al.*, 2009).

### **3. OBJETIVOS.**

El objetivo principal del presente trabajo fue la caracterización bioquímica y molecular en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, del efecto del estrés por salinidad sobre la participación de modificaciones post-traduccionales por óxido nítrico

mediante nitración. Para llevar a cabo este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos parciales:

- Determinación del patrón de nitración endógeno de proteínas de los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.
- Detección del patrón de nitración de proteínas en los cultivos celulares sometidos a estrés por salinidad y comparación con la situación control.

#### 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

##### 4.1. Cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

Para la realización de este trabajo se utilizaron cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Fig. 9), de los que disponía el grupo BIO-286 del área de Bioquímica y Biología Molecular.

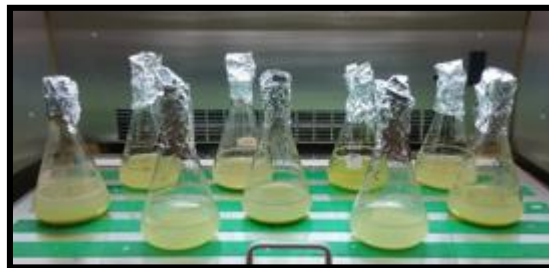


Figura 9. Cultivos celulares en suspensión de *Arabidopsis thaliana* en el incubador.

Estos cultivos se mantuvieron en 200 ml de un medio específico para el crecimiento de estas células basado en el medio JPL (JP y C, 1967) con algunas modificaciones para adaptarlo a los cultivos de *Arabidopsis thaliana* (Axelos *et al.*, 1992) y se subcultivaron cada 7 días con una dilución del medio de 1/20 en condiciones estrictas de esterilidad utilizando para ello una campana de flujo laminar. Estos cultivos celulares se mantenían en agitación continua (140 rpm), con una temperatura constante de 23,9 °C y bajo iluminación con luz blanca fotosintética durante las 24 horas (Fig.9).

#### **4.2. Inducción de estrés por salinidad en los cultivos celulares.**

Para someter a los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* a un estrés por salinidad se utilizó un diseño experimental similar al descrito por Fares *et al.*, (2011). Para provocar el estrés por salinidad se trataron los cultivos celulares con una disolución de NaCl 100mM. Se utilizaron 4 matraces, cada uno de los cuales contenía un volumen de 20ml de cultivo celular, a tres de ellos se les añadió NaCl 100mM y al restante se le adicionó el mismo volumen de agua milli Q. Los tres matraces que contenían NaCl 100mM se expusieron al estrés durante: 5, 30 y 60 minutos. Durante ese tiempo los cuatro matraces se mantuvieron en las condiciones de cultivo anteriormente indicadas. Tras el periodo de incubación, se recogieron las muestras y se procesaron para los diferentes estudios bioquímicos.

#### **4.3. Homogeneización de los cultivos celulares.**

A los 20ml de cultivos celulares previamente tratados con agua milli Q o NaCl se les extrajo el medio líquido mediante vacío. Tras retirar el medio, las células se homogeneizaron en mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, después a este se le añadió el tampón de homogeneización (Tampón Tris-HCl 0,1mM pH 7,6; sacarosa 5%; triton X-100 0,05%; EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,1mM; PVPP (polivinilpolipirrolidona) 7%; DTT (ditiotreitól) 15mM; inhibidores de proteasas 2x (Sigma) y PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1mM) en proporción 1/2. A continuación, el homogenado pasó por una capa de Miracloth, con el objeto de eliminar restos sólidos, el cual fue previamente humedecido con tampón Tris 0,1M pH 7,6. Después se llevó a cabo una centrifugación durante 10 minutos a 3000xg y 4°C y se recogió el sobrenadante, que sería utilizado para la determinación de la concentración de proteínas y para los ensayos de inmunoblot.

#### **4.4. Determinación de la concentración de proteínas.**

Esta determinación se llevó a cabo por el método de Bradford (1976) utilizando albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 0,6 mg/ml para elaborar la recta patrón. Se realizaron cuatro diluciones de cada muestra con un volumen final de 800µl a los que se le añadían 200µl del reactivo de Bradford comercial, se agitaron los tubos

y se dejaron reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se analizó la absorbancia a 595nm interpolando las absorbancias experimentales en la recta patrón.

#### **4.5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).**

Este método se basa en someter el extracto que contiene las proteínas a electroforesis sobre geles discontinuos de poliacrilamida constituidos por dos zonas distintas: el gel concentrador y el gel separador. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida comercial, con la participación del persulfato amónico y TEMED. En este tipo de geles al aplicar un campo eléctrico, el complejo SDS-proteína debido a su carga negativa migra hacia el ánodo.

Este tipo de electroforesis en condiciones desnaturalizantes minimiza la agregación molecular y asegura la completa disociación de las proteínas en sus subunidades, además, permite separar las proteínas de acuerdo a sus masas moleculares debido a la selección de tamaños impuestos por los poros del gel.

La masa molecular de la proteína se determina sometiendo a una misma electroforesis una proteína problema junto con varios patrones de proteínas de masas moleculares conocidas.

##### ➤ Reactivos.

- Tampón gel concentrador: Tris-HCl 0,5M, pH 6,8.
- Tampón gel separador: Tris-HCl 1,5M, pH 8,8.
- Persulfato amónico 10%.
- Tampón de electroforesis: Tris-HCl 0,025M, pH 8,3; glicina 0,192M y SDS 0,1%.
- Tampón de tratamiento de muestra 4x (Sample buffer 4x): Tris-HCl 0,425M, pH 6,8; glicerol 40%; SDS 8%; azul de bromofenol 0,4% y DTT 0,04M.
- Solución colorante para geles: azul Comassie 0,0025%, metanol 50% y acético 7%.
- Solución decolorante para geles: metanol 50% y acético 7%.



#### *4.5.1. Preparación de geles y muestras.*

Se utilizaron geles de 6,5 x 8 cm y con un grosor de 1mm. El gel separador se preparó al 10%. En este estudio también se utilizaron geles en gradiente comerciales, (4-20% de acrilamida), que permiten una mayor separación de las proteínas.

Las muestras se trataron con sample buffer 4x, después fueron calentadas a 95°C durante 5 minutos para asegurar la desnaturalización proteica.

Para realizar la electroforesis se normalizó la cantidad de proteínas de cada muestra. Además se cargaron los patrones de peso molecular y albúmina sérica bovina nitrada (BSA-NO) (Sigma), la cual es utilizada como control positivo de proteínas nitradas.

La electroforesis se realizó con el tampón de electroforesis anteriormente mencionado, iniciándose con un voltaje de 100V, el cual después se aumentaba a 200V cuando las muestras alcanzaban el límite del gel separador.

Tras finalizar la electroforesis, se teñía el gel con una solución de azul de Comassie en agitación durante 30 minutos y después se realizaron varios lavados con la solución decolorante. Esta tinción se realizó para corroborar que había habido una correcta separación de las proteínas.

### **4.6. Western-Blot.**

#### *4.6.1. Transferencia semiseca de proteínas.*

Tras la SDS-PAGE, se realizó la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de PVDF (6,5 x 8 cm), utilizando para ello, un sistema de transferencia semiseco Trans-Blot SD (Bio-Rad).

- Reactivos.
  - Tampón de transferencia: Tris-base 48mM, glicina 39mM, SDS (dodecilsulfato sódico) 0,037% (v/v), metanol 15% y pH 8,9.
  - Solución de tinción de membranas: rojo Ponceau 0,1% y acético 5%.

- Técnica.

Primero se activaron las membranas durante 15 segundos con metanol 100%, después se lavaron durante dos minutos en agua milli Q y finalmente se equilibraron en el tampón de transferencia.

Para este proceso también se utilizaron papeles Whatman cortados con las mismas dimensiones del gel (6 papeles para cada gel), los cuales también fueron equilibrados en tampón de transferencia. Tras finalizar la transferencia se lavaron las membranas con agua milli Q para eliminar posibles restos de acrilamida adheridos a ellas.

La transferencia se realizó a una intensidad de  $1,5\text{mA}/\text{cm}^2$  de membrana durante dos horas.

Como control de la eficacia del proceso de transferencia, las membranas se tiñeron de manera reversible con una solución de rojo Ponceau. Estas membranas se mantuvieron durante 10 minutos en agitación con la solución de rojo Ponceau, y después se realizaron varios lavados con agua mili Q para eliminar fondo.

#### *4.6.2. Inmunodetección por quimioluminiscencia.*

##### *4.6.2.1. Bloqueo.*

El bloqueo de la membrana evita la unión inespecífica de los anticuerpos a ella.

- Reactivos
  - TBS (tampón fosfato salino) 10x: Tris-HCl 20mM pH 7,8 y NaCl 1,8M.
  - Solución de bloqueo: TBS 1x; leche 1,5% y tween 0,1%.
  - Solución de lavado: TBS 1x y tween 0,01%.
- Técnica

Tras lavar con agua milli Q las membranas procedentes de la transferencia, estas se sumergieron en la solución de bloqueo durante 2 horas, en agitación y a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$ .

Tras finalizar el bloqueo se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con la solución de lavado.

#### *4.6.2.2. Incubación con el anticuerpo primario.*

A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario  $\alpha$ -NTyr de Sigma diluido 1/1000 en TBS 1x y tween 0,05%. Esta incubación se realizó en agitación y a 4°C durante toda una noche.

Posteriormente, la membrana se sometió a varios lavados durante un tiempo total de dos horas utilizando para ello la solución de lavado mencionada anteriormente. Este lavado se realiza con la finalidad de eliminar el exceso de anticuerpo no unido de manera específica a las proteínas diana.

#### *4.6.2.3. Incubación con el anticuerpo secundario.*

Después la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-igG (anti-conejo IgG) acoplado con peroxidasa de Biorad diluido 1/10000 en TBS 1x, leche 1% y tween 0,05%, en agitación suave y a temperatura ambiente durante una hora. Por último, la membrana se lavó durante una hora y cuarto con la misma solución de lavado utilizada anteriormente.

#### *4.6.2.4. Detección de las proteínas por quimioluminiscencia.*

Para realizar el revelado se utilizó el kit clarity ECL de Bio-Rad que permite la detección de proteínas por quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron con la solución del kit, produciéndose una señal luminosa como consecuencia de la oxidación llevada a cabo por la peroxidasa, que esta conjugada con el anticuerpo secundario, del sustrato quimioluminiscente (luminol). Además en este kit contiene presente un potenciador que aumenta la longevidad y la intensidad de la luz emitida. Dicha emisión de luz impresionó una película de autorradiografía que se ponía en contacto con la membrana en el interior de un cassette de exposición. Los tiempos de exposición variaron desde segundos hasta una hora, dependiendo de la intensidad luminosa obtenida.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

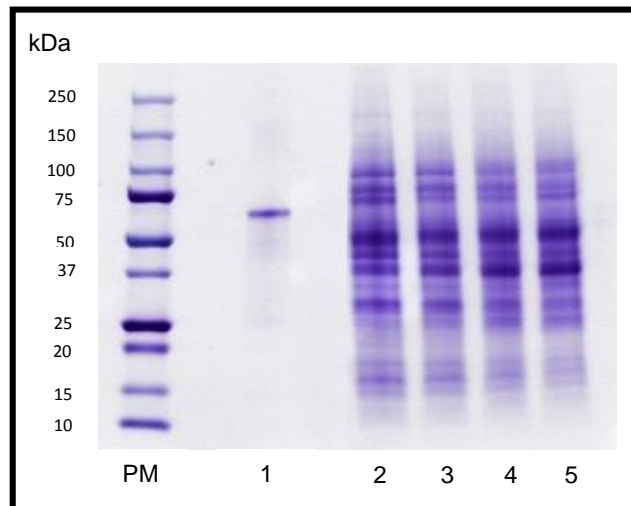


Figura 10. Gel en gradiente (4-20% de acrilamida) teñido con azul Coomassie que representa el total de proteínas presentes en los cultivos celulares control de diferentes días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares con 3 días tras el subcultivo. Calle 3) Cultivos celulares con 6 días tras el subcultivo. Calle 4) Cultivos celulares con 9 días tras el subcultivo Calle 5) Cultivos celulares con 14 días tras el subcultivo. En las calles 2-5 se cargaron 10µg de proteína.

En la figura 10, observamos el patrón de proteínas totales que tenemos en la muestra de cultivos celulares de diferentes días (3, 6, 9 y 14 días) tras el subcultivo en un gel en gradiente (4-20% de acrilamida), no apreciándose cambios en el patrón ni en la intensidad de las bandas.

Tras observar en el gel en gradiente que el rango de proteínas totales de los cultivos celulares control a diferentes días tras el subcultivo, se encontraba entre los 15kDa y los 100kDa, utilizamos para realizar en los siguientes estudios de inmunodetección geles al 10% de acrilamida, donde se produce una correcta separación de las proteínas totales presentes en este rango de pesos moleculares.

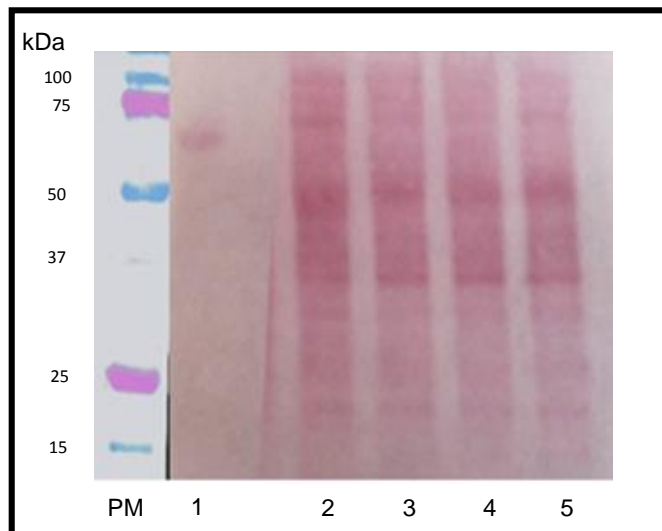


Figura 11. Membrana teñida con rojo Ponceau perteneciente a un gel de acrilamida al 10%, que representa el patrón de proteínas transferidas, normalizadas a 10µg de proteína/pocillo, en los cultivos celulares de diferentes días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares con 3 días tras el subcultivo. Calle 3) Cultivos celulares con 6 días tras el subcultivo. Calle 4) Cultivos celulares con 9 días tras el subcultivo. Calle 5) Cultivos celulares con 14 días tras el subcultivo.

En la figura 11 se observa una membrana de PVDF teñida tras la transferencia para chequear la eficacia del proceso, donde se encuentra representado el patrón de proteínas presentes en los cultivos celulares pertenecientes a los 3, 6, 9 y 14 días tras el subcultivo. Todas estas bandas presentan la misma intensidad en cada una de las calles. Esta membrana procede de un gel al 10% de acrilamida.

## 5.2. Análisis del patrón endógeno de nitración proteica en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*.

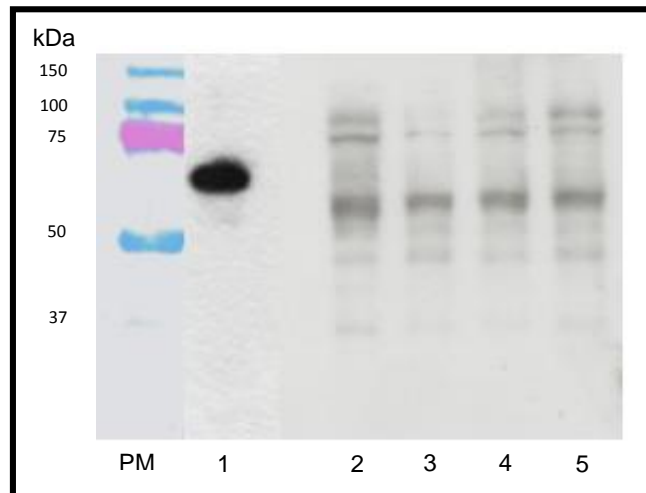


Figura 12. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se encuentran representadas las proteínas nitradas presentes, en los cultivos celulares obtenidos en diferentes días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1 $\mu$ g/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares con 3 días tras el subcultivo. Calle 3) Cultivos celulares con 6 días tras el subcultivo. Calle 4) Cultivos celulares con 9 días tras el subcultivo. Calle 5) Cultivos celulares con 14 días tras el subcultivo. Las calles 2-5 se normalizaron cargando 10 $\mu$ g de proteína.

En la figura 12 observamos el patrón de nitración que presentan los cultivos a 3, 6, 9 y 14 días tras el subcultivo, habiendo normalizado la carga a 10 $\mu$ g proteínas/pocillo.

Los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* presentan un crecimiento exponencial desde el sexto día tras el subcultivo hasta el décimocuarto, alcanzando a partir del décimocuarto día tras el subcultivo una fase de crecimiento estacionaria (Szuba *et al.*, 2015). Por tanto, la existencia de estas fases de crecimiento de los cultivos celulares, tal y como vemos en la figura 12, provocan diferencias en el patrón de nitración endógena.

A los 3 días tras el subcultivo, los cultivos celulares contienen la cantidad máxima de proteínas nitradas con respecto a los demás días, sobre todo en el rango de tamaños comprendidos entre 45kDa y 74kDa. No obstante, podemos decir que el

patrón de nitración endógena se mantiene a lo largo del crecimiento de los cultivos celulares, excepto al 6º día tras el subcultivo, en el que se observa una ligera disminución en la intensidad de las bandas, aunque estas diferencias no fueron significativas.

Concretamente, a los 6 días tras el subcultivo se observa la desaparición de algunas bandas de proteínas nitradas con pesos moleculares alrededor de los 50kDa y 100kDa.

Finalmente, a los días 9 y 14 tras el subcultivo, los cultivos celulares presentan una menor nitración con respecto a los cultivos celulares de 3 días tras el subcultivo y una mayor nitración con respecto a los cultivos celulares de 6 días tras el subcultivo. Por tanto, podemos decir que a los 9 y 14 días tras el subcultivo existe un equilibrio en cuanto a la cantidad endógena de proteínas nitradas, es decir, en estos días se encuentra el patrón de nitración estabilizado de la situación control, por ello, para la determinación del patrón de nitración de proteínas en una situación de estrés abiótico se seleccionaron los cultivos celulares de 9 días.

La presencia de nitración endógena en los cultivos celulares sugiere que la nitración podría modular diferentes procesos fisiológicos y metabólicos de funcionamiento celular.

### 5.3. Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* con diferentes cantidades de proteína.

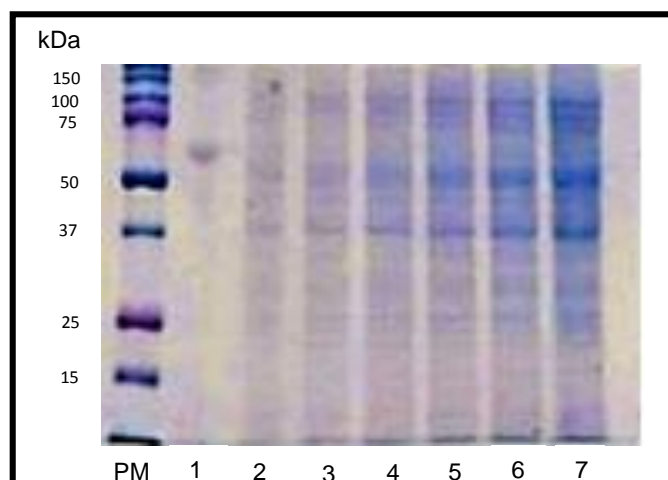


Figura 13. Gel al 10% de acrilamida teñido con azul Comassie que representa el total de proteínas presentes, cargando diferentes

cantidades de proteína en los pocillos, en los cultivos celulares control de 9 días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) 5µg de proteína. Calle 3) 10µg de proteína. Calle 4) 15µg de proteína. Calle 5) 20µg de proteína. Calle 6) 25µg de proteína. Calle 7) 30µg de proteína.

En la figura 13, observamos el patrón de proteínas totales que presenta la muestra de cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo, la intensidad de las bandas aumenta conforme se incrementa la cantidad de proteína cargada pero se mantiene el mismo patrón a lo largo del gel. Además la tinción del gel también nos permitió comprobar que no había habido problemas durante el proceso de electroforesis.

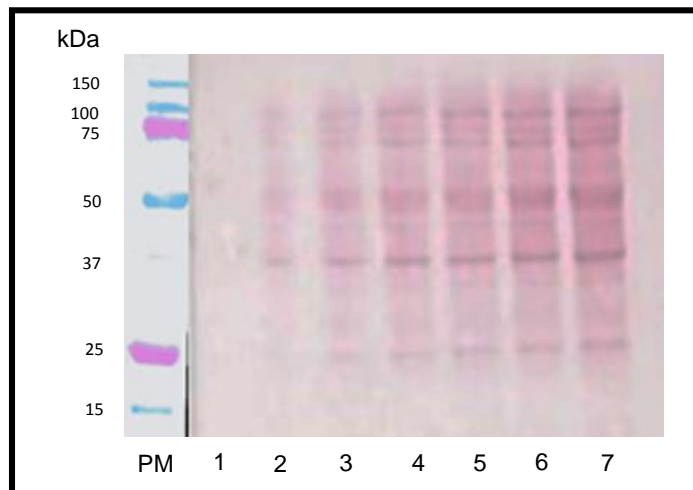


Figura 14. Membrana teñida con rojo Ponceau que representa el total de proteínas transferidas, cargando diferentes cantidades de proteína por pocillo, en los cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) 5µg de proteína. Calle 3) 10µg de proteína. Calle 4) 15µg de proteína. Calle 5) 20µg de proteína. Calle 6) 25µg de proteína. Calle 7) 30µg de proteína.

En la figura 14, observamos el patrón de proteínas totales transferidas en una membrana de PVDF correspondiente a los cultivos celulares de 9 días del subcultivo. La intensidad de las bandas aumenta conforme aumenta la cantidad de proteína



cargada pero se mantiene el patrón de bandas. Esta imagen nos permite corroborar la eficacia del proceso de transferencia.

#### 5.4. Análisis del patrón endógeno de nitración proteica en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* con diferentes cantidades de proteína.

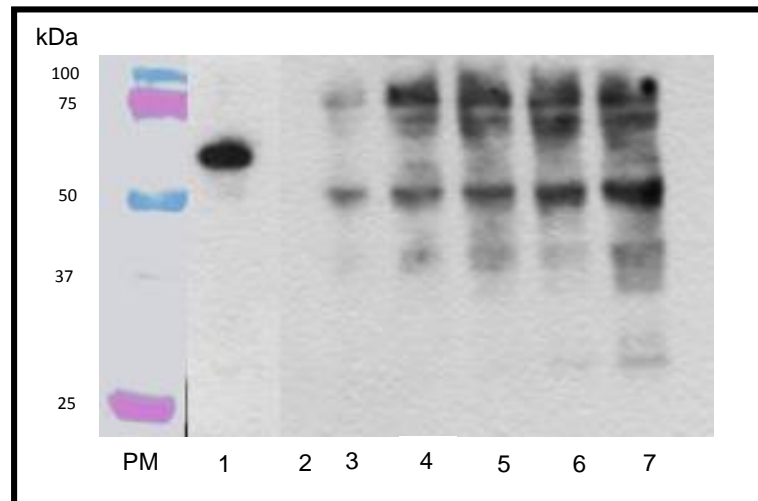


Figura 15. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se encuentran representadas las proteínas nitradas presentes, cargando diferentes cantidades de proteína por pocillo, en los cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1 $\mu$ g/pocillo). Calle 2) 5 $\mu$ g de proteína. Calle 3) 10 $\mu$ g de proteína. Calle 4) 15 $\mu$ g de proteína. Calle 5) 20 $\mu$ g de proteína. Calle 6) 25 $\mu$ g de proteína. Calle 7) 30 $\mu$ g de proteína.

En la figura 15, observamos el patrón de proteínas nitradas que tenemos en la muestra de cultivos celulares control de 9 días. La intensidad de las bandas inmunodetectadas se incrementa a medida que aumenta la cantidad de proteína cargada. Se decidió seleccionar la cantidad de proteína de 10 $\mu$ g/pocillo para realizar las siguientes determinaciones, puesto que cargando esa cantidad se observaba el rango de proteínas nitradas endógenas más representativas de la situación control.

Como se aprecia en la imagen los niveles endógenos de nitración de proteínas son bajos y son debidos básicamente al consumo de los agentes nitrantes, la acción de diversas enzimas que atenúan la formación de oxidantes o a la reparación del

radical tirosil (Petruk *et al.*, 2012). Estos niveles de nitración sugieren que esta modificación post-traducciona pudiera estar relacionada con procesos de señalización.

Observando la figura 13 y 14, donde se encuentran representadas el total de proteínas que presentan un peso molecular entre 10kDa y 150kDa que vamos a encontrar en las células control, y la figura 15, donde se hallan aquellas proteínas nitradas endógenas de las células control, podemos decir que el proceso de nitración no es indiscriminado porque no todas las proteínas observadas en el gel presentan inmunorreactividad positiva en la autorradiografía.

### 5.5. Análisis del patrón proteico en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* sometidos a estrés por salinidad.

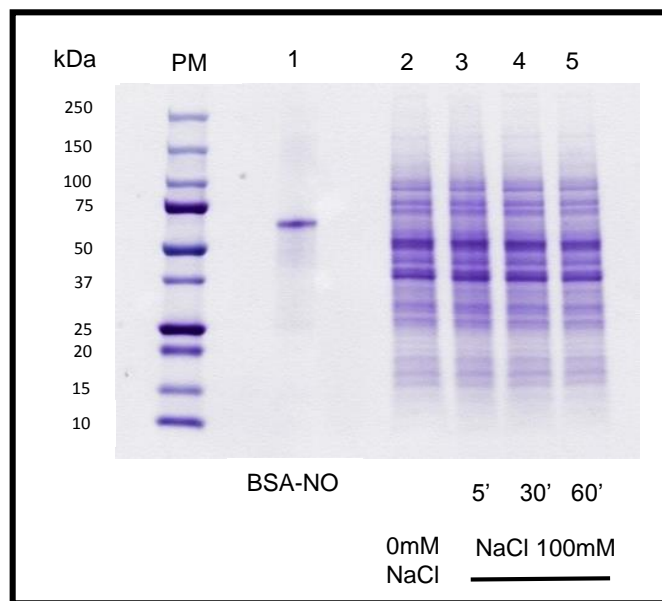


Figura 16. Gel en gradiente (4-20% de acrilamida) teñido con azul Coomassie que representa el total de proteínas presentes en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares control. Calle 3) Cultivos celulares sometidos durante 5 minutos al tratamiento de NaCl 100mM. Calle 4) Cultivos celulares sometidos durante 30 minutos al tratamiento de NaCl 100mM. Calle 5) Cultivos celulares sometidos durante 60 minutos al tratamiento de NaCl 100mM. Calles 2-5 normalizadas a 10µg de proteína.

En la figura 16, tenemos el patrón de proteínas totales que presentan las muestras de cultivos celulares sometidos a un tratamiento con cloruro sódico a diferentes tiempos (5 minutos, 30 minutos y 60 minutos) con respecto a los cultivos celulares control. Todas las muestras corresponden a cultivos celulares de 9 días tras el subcultivo y presentan 10µg de proteína.

Como se desprende de la imagen, podemos afirmar que la inducción de un estrés abiótico por salinidad en cultivos celulares de 9 días no ocasionaba cambios significativos en cuanto al patrón total de proteínas observado en las diferentes muestras.

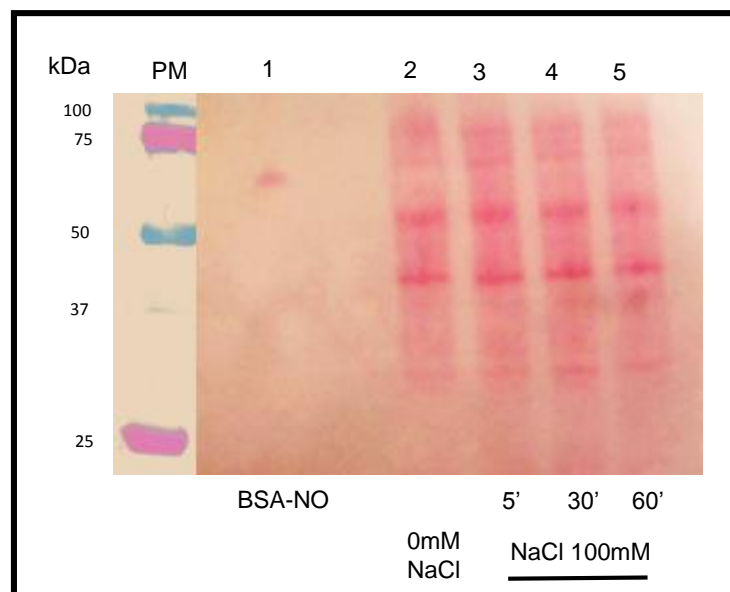


Figura 17. Membrana teñida con rojo Ponceau procedente de un gel de acrilamida al 10%, que representa el total de proteínas presentes en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl transferidas a una membrana de PVDF. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1µg/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares control. Calle 3) Cultivos celulares sometidos durante 5 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calle 4) Cultivos celulares sometidos durante 30 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calle 5) Cultivos celulares sometidos durante 60 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calles 2-5, normalizadas a 10 µg de proteína.

En esta figura, 17, se encuentran representadas el total de proteínas presentes en los cultivos celulares de 9 días tanto en la situación control como en los sometidos

a estrés por salinidad transferidas a una membrana de PVDF. De la imagen se desprende que el proceso de transferencia transcurrió correctamente.

### 5.6. Análisis del patrón de nitración proteico en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* sometidos a estrés por salinidad.

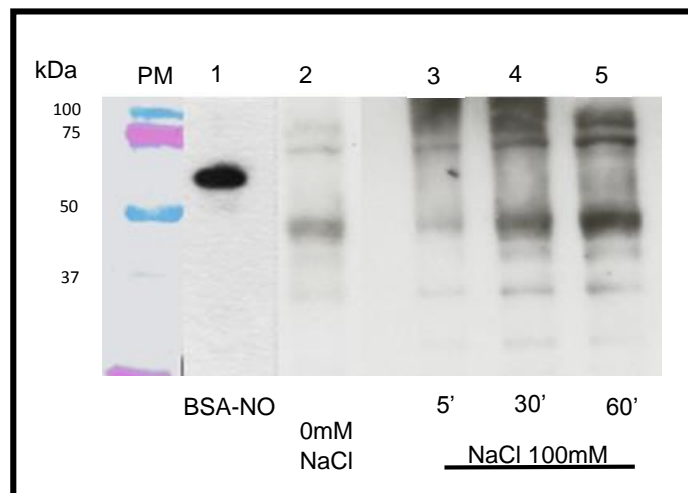


Figura 18. Autorradiografía obtenida tras la inmunodetección donde se representan las proteínas nitradas en cultivos celulares de 9 días sometidos a estrés por NaCl. PM) Marcadores de peso molecular. Calle 1) Albúmina sérica bovina nitrada (control positivo de nitración) (1 $\mu$ g/pocillo). Calle 2) Cultivos celulares control. Calle 3) Cultivos celulares sometidos durante 5 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calle 4) Cultivos celulares sometidos durante 30 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calle 5) Cultivos celulares sometidos durante 60 minutos al tratamiento con NaCl 100mM. Calles 2-5 normalizadas a 10 $\mu$ g de proteína.

En la figura 18 podemos observar que el patrón de nitración de las proteínas cambia a medida que aumenta el tiempo de exposición de los cultivos celulares al estrés por NaCl.

Si se comparan los patrones de nitración de los cultivos celulares control con los cultivos celulares sometidos al estrés por salinidad durante 5 minutos se observa que apenas hay diferencias significativas. En cambio, cuando aumenta el tiempo de exposición al estrés (30 y 60 minutos), los cultivos celulares presentan un aumento en

el patrón de nitración proteico (aumenta la intensidad de las bandas inmunodetectadas).

Por tanto, la situación de estrés por salinidad provoca un aumento en el patrón de nitración de las proteínas de los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* a los 9 días tras el subcultivo. Estos resultados evidencian que el tratamiento de los cultivos con NaCl incrementa los niveles tanto de ROS como de RNS, lo que también ocurre en respuesta a otras situaciones de estrés abiótico, tal y como queda reflejado en la bibliografía consultada (Valderrama *et al.*, 2007; Corpas *et al.*, 2008; Chaki *et al.*, 2011a; Corpas *et al.*, 2011; Chaki *et al.*, 2011b). Como consecuencia del desequilibrio entre los sistemas de síntesis y de eliminación de ROS y RNS, se generan especies nitrantes (fundamentalmente peroxinitrito) que actúan sobre las tirosinas proteicas.

## 6. CONCLUSIONES.

Las conclusiones que se pueden extraer de este estudio son las siguientes:

- En los cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* existe un proceso de nitración endógena de proteínas, lo que indica que esta modificación post-traducciona pudiera estar relacionada con procesos de señalización celular.
- El patrón de nitración de proteínas detectado sugiere la selectividad del proceso, ya que no todas las proteínas observadas sufren nitración.
- A lo largo del tiempo de exposición al estrés por NaCl se produce un aumento en la nitración de las tirosinas proteicas, lo que indica que esta situación provoca un estrés tanto oxidativo como nitrosativo.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

Apel K. y Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.

Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiol.* 141: 391-396.

- Asai S., Yoshioka H. (2009). Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Microbe Interact* 22, 619-629.
- Astier J., Rasul S., Koen E., Manzoor H., Besson-Bard A., Lamotte O., Jeandroz S., Durner J., Lindermayr C., Wendehenne, D. (2011). S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* 181, 527-533.
- Axelos M., Curie C., Mazzolini L., Bardet C., Lescure B. (1992). A protocol for transient gene expression in *Arabidopsis thaliana* protoplasts isolated from cell suspension cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 30, 123-128.
- Begara-Morales J.C. (2011). Análisis y caracterización funcional de dianas celulares de especies de nitrógeno reactivo (RNS) durante el desarrollo y estrés abiótico en plantas. Tesis, Uni. Jaén. España.
- Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., Leyva-Pérez M.O., Leterrier M., Corpas F.J., Barroso J.B. (2014). Differential transcriptomic analysis by RNA-seq of GSNO-responsive genes between *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant and Cell Physiology*, pcu044.
- Beligni M.V. y Lamattina L. (2001). Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* 6: 508-509.
- Besson-Bard A., Astier J., Rasul S., Wawera I., Dubreuil-Maurizi C., Jeandroz M., Wendehenne D. (2009). Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci* 177, 302-309.
- Bethke P. C., Gubler F., Jacobsen J. V. y Jones R. L. (2004). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219(5): 847.
- Blamey, M. & Grey-Wilson, C. *Flora de Bretaña y Norte de Europa*. 1989. ISBN 0-340-40170-2.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E. (2000). Response to abiotic stress. In: Buchanan B., Gruissen W. y Jones R. (eds). *Biochemistry and molecular*

- biology of plants. American Society of plant Physiologists, Rockville, MD, 1158-1203.
- Bredt D. S. y Snyder S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(2): 682.
- Brown G.C. (1999). Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1411: 351-369
- Bundy R.E., Marczin N., Chester A.H., Yacoub M. (2000). A redox-based mechanism for nitric oxide-induced inhibition of DNA synthesis in human vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology* 129: 1513-1521.
- Cabrera Y.A. (2006). Efecto de *Phytophthora capsici* sobre el metabolismo del glutatión en suspensiones celulares de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Univ. Autónoma de Yucatán. Mérida, México. Tesis de Licenciatura.
- Carballal S., Bartesaghi S., Radi R. (2014). Kinetic and mechanistic considerations to assess the biological fate of peroxynitrite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1840, 768780.
- Caro A. y Puntarulo S. (1999). Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radic Res* 31 Suppl: 205.
- Chaki M., Fernandez-Ocana A.M., Valderrama R., Carreras A., Esteban F.J., Luque F., Gomez-Rodriguez M.V., Begara-Morales J.C., Corpas F.J., Barroso J.B. (2009). Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant Cell Physiol* 50, 265-279.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque F., and Leterrier M. (2011a). Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of experimental botany* 62, 1803-1813.
- Chaki M., Valderrama R., Fernández-Ocaña A.M., Carreras A., Gómez-Rodríguez M.V., López-Jaramillo J., Begara-Morales J.C., Sánchez-Calvo B., Luque, F. and Leterrier M. (2011b). High temperature triggers the metabolism of S-

- nitrosothiols in sunflower mediating a process of nitrosative stress which provokes the inhibition of ferredoxin–NADP reductase by tyrosine nitration. *Plant, cell & environment* 34, 1803-1818.
- Clark D., Durner J., Navarre D.A., and Klessig D.F. (2000). Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 1380-1384.
- Corpas F. J., Barroso J. B. y del Rio L. A. (2001). Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6(4): 145.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., León A.M., Sandalio L.M., Del Río L.A. (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta* 224, 246-254.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernandez-Ocana A., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., Del Rio L.A., and Barroso J.B. (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol* 49, 1711-1722.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso J.B. (2009c). Protein tyrosine nitration. A new challenge in plants. *Plant Signal. Behav.* 4:10,1-4.
- Corpas F.J., Chaki M., Leterrier M., Barroso, J.B. (2009a). Protein tyrosine nitration: a new challenge in plants. *Plant Signal Behav* 4, 920-923.
- Corpas F.J., Hayashi M., Mano S., Nishimura M., Barroso, J.B. (2009b). Peroxisomes are required for in vivo nitric oxide accumulation in the cytosol following salinity stress of Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 151, 2083-2094.
- Corpas F.J., Leterrier M., Valderrama R., Airaki M., Chaki M., Palma J.M., Barroso J.B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Sci.* 181: 604-611.
- Del Rio L.A., Corpas F.J., and Barroso J.B. (2004). Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65, 783-792.



- Durner J. y Klessig D. F. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2(5): 369.
- Durner J., Wendehenne D., and Klessig D.F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 10328-10333.
- Fares A., Rossignol M., Peltier J.-B. (2011). Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications* 416, 331-336.
- Ferrer-Sueta G., Radi R. (2009). Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS chemical biology* 4, 161-177.
- Finkelstein R.R., Gampala S.S., Rock C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *The Plant Cell* 14 (Suppl.), 15–45.
- Foyer C.H., Halliwell B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *Journal of Plant Research* 124, 509–525.
- Garcia-Mata C., and Lamattina L. (2007). Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium-and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* 17, 143-151.
- Godber B.L., Doel J.J., Sapkota G.P., Blake D.R., Stevens C.R., Eisenthal R., and Harrison R. (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry* 275, 7757-7763.
- Gow A. J., Farkouh C. R., Munson D. A., Posencheg M. A. y Ischiropoulos H. (2004). Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(2): L262.
- Guo F.Q., and Crawford N.M. (2005). *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 17, 3436-3450.

- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. (2007). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, London.
- Hassan H.M. (1989). Microbial superoxide dismutases. In: *Advances in genetic*. Scandalios J.G. (Ed.): 65-97. Academia Press, San Diego.
- Hill A.C., Bennet J.H. (1970). Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos. Environ* 4, 341-348.
- Hong J.K., Yun B.W., Kang J.G., Raja M.U., Kwon E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y., and Loake G.J. (2008). Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot* 59, 147-154.
- Hu X., Neill S.J., Tang Z., and Cai W. (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137, 663-670.
- Huang X., Stettmaier K., Michel C., Hutzler P., Mueller M.J., Durner J. (2004). Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 938-946.
- Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.C. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 9265-9269.
- Ischiropoulos H. (1998). Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356(1): 1.
- Ischiropoulos H. (2003). Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 776.
- Jp J., C, P. (1967). Growth and synthesis of proteins in cell suspensions of a kinetin dependent tobacco. *Physiologia Plantarum* 20, 834-&.
- Kirkman H.N. Gaetani G.F. (1978). Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4343-4347.
- Klepper L. (1975). Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSAA bst racts*. 184:70.
- Klepper L. (1990). Comparison between NO(x) Evolution Mechanisms of Wild-Type and Mutant Soybean Leaves. *Plant Physiol* 93(1): 26.

- Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J., Shah J., Zhang S., Kachroo P., Trifa Y., Pontier D., Lam E., Silva H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8849-8855.
- Kolbert Z., Bartha B., and Erdei L. (2008). Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of plant physiology* 165, 967-975.
- Krasylenko Y.A., Yemets A.I., Blume Y.B. (2010). Functional role of nitric oxide in plants. *Russian J. Plant Physiol* 57, 451-461.
- Kwon E., Feechan A., Yun B.-W., Hwang B.-H., Pallas J.A., Kang J.-G., and Loake G.J. (2012). AtGSNOR1 function is required for multiple developmental programs in *Arabidopsis*. *Planta* 236, 887-900.
- Lamb C., Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Rev. Of Plant Physiol. And Plant Mol. Biol.* 48: 251-275.
- Larcher, W. (1995). *Physiological Plant Ecology*, Berlin, Heidelberg, Springer Verlag. 506.
- Leterrier M., Airaki M., Palma J.M., Chaki M., Barroso J.B., Corpas F.J. (2012). Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution* 166, 136-143.
- Li D., Zhang Y., Hu X., Shen X., Ma L., Su Z., Wang T., Dong J. (2011). Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* under salt stress identified a novel CBF transcription factor MtCBF4 that plays an important role in abiotic stress responses. *BMC Plant Biology* 11, 109.
- Lindermayr C., Durner J. (2009). S-Nitrosylation in plant: pattern and function. *J Proteomics*. 73, 1-9.
- Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J. (2006). Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *Journal of Biological Chemistry* 281, 4285-4291.

- Mata Pérez, C. (2015). Análisis y caracterización funcional de dianas celulares de lípidos nitrados durante el desarrollo y el estrés abiótico en plantas superiores. Tesis, Uni. Jaén. España.
- Mckersie B.D., Leshem Y.Y. (1994). Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Meyerowitz, E.M. (1989). Arabidopsis, a useful weed. *Cell* 56, 263-269.
- Miflin B. J. (1974). The location of nitrite reductase and other enzymes related to amino Acid biosynthesis in the plastids of root and leaves. *Plant Physiol* 54(4): 550.
- Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend Plant Sci.* 7: 405-410.
- Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quillere I., Leydecker M. T., Kaiser W. M. y Morot-Gaudry J. F. (2002). Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to celular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 215(5): 708.
- Munns R., James R. A., Lauchli A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. Exp. Bot.* 57:489-05.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., and Wilson I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of experimental botany* 59, 165-176.
- Neill, S.J., Desikan R., Hancock J.T. (2003). Nitric signalling in plants. *New Phytol* 159, 11-35.
- Niu X., Bressan R. A., Hasegawa P. M., Pardo J.M. (1995). Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plants Physiol.* 109: 735-742.
- Palmieri M.C., Lindermayr C., Bauwe H., Steinhauser C., Durner J. (2010). Regulation of plant glycine decarboxylase by S-nitrosylation and glutathionylation. *Plant physiology* 152, 1514-1528.
- Pedroso M., and Durzan D. (2000). Effect of different gravity environments on DNA fragmentation and cell death in Kalanchoe leaves. *Annals of Botany* 86, 983-994.

- Perl-Treves R., Perl A. (2002). Oxidative stress: an introduction. En: Oxidative stress in plants. Inzé D. y Van Montagu M. (Eds.): 1-32. Taylor y Francis, London.
- Petruk A.A., Bartesaghi S., Trujillo M., Estrin D.A., Murgida D., Kalyanaraman B., Marti M.A., Radi R. (2012). Molecular basis of intramolecular electron transfer in proteins during radicalmediated oxidations: Computer simulation studies in model tyrosine–cysteine peptides in solution. *Archives of biochemistry and biophysics* 525, 82-91.
- Prado A.M., Porterfield D.M., and Feijo J.A. (2004). Nitric oxide is involved in growth regulation and reorientation of pollen tubes. *Development* 131, 2707-2714.
- Prescott S.M. (1999). A thematic series on oxidation of lipids as a source of messengers. *Journal of Biological Chemistry* 274: 22901.
- Prütz W.A., Mönig H., Butler J., Land E.J. (1985). Reactions of nitrogen dioxide in aqueous model systems: oxidation of tyrosine units in peptides and proteins. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 243, 125-134.
- Radi R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 4003-4008.
- Radi R. (2012). Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects. *Accounts of chemical research* 46, 550-559.
- Radi R. (2013). Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. *Journal of Biological Chemistry* 288, 26464-26472.
- Romero-Puertas M.C., Perazzolli M., Zago E.D., and Delledonne M. (2004). Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6, 795-803.
- Sang J., Jiang M., Lin F., Xu S., Zhang A., and Tan M. (2008). Nitric Oxide Reduces Hydrogen Peroxide Accumulation Involved in Water Stress-induced Subcellular Anti-oxidant Defense in Maize Plants. *Journal of integrative plant biology* 50, 231-243.
- Santos C. (1998). Estudo de alguns mecanismos de regulacao osmótica e da expressao de glutamine sintetase em celulas de *Heliantus annuus* L. snejitus a

- stress salino: Seleccao de células tolerantes a NaCl. Ph.D. thesis, Uni. Aveiro, Portugal.
- Seligman K., Saviani E., Oliveira H., Pinto-Maglio C., and Salgado I. (2008). Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology* 49, 1112-1121.
- Shao H. B., Chu L. Y., Wu G., Zhang J.H., Lu Z.H., Hu Y.C. (2007 a). Changes of some antioxidative physiological indices under soil water deficits among 10 wheat (*Triticum aestivum L.*) genotypes at tillering stage. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 54: 113-119.
- Shao H. B., Jiang S. Y., Li F. M., Chu L. Y., Zhao C. X., Shao M. A., Zhao X. N., Li F. (2007 b). Some advances in plant stress physiology and their implications in the systems biology era. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 54: 33-36.
- Shapiro A.D. (2005). Nitric oxide signaling in plants. *Vitam Horm* 72, 339-398.
- Sies H., Stahl W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr.*62: 1315S-1321S.
- Squadrito G.L., Pryor W.A. (1998). The nature of reactive species in systems that produce peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology* 11: 718-719.
- Stamler J. S., Lamas S. y Fang F. C. (2001). Nitrosylation the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106(6): 675.
- Stamler J.S., Toone E.J. (2002). The decomposition of thionitrites. *Current opinion in chemical biology* 6, 779-785.
- Szuba A., Kasprowicz-Maluński A., Wojtaszek P. (2015). Nitration of plant apoplastic proteins from cell suspension cultures. *Journal of Proteomics* 120, 158-168.
- Takahashi S., and Yamasaki H. (2002). Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS letters* 512, 145-148.
- Tossi V., Lamattina L., Cassia R. (2009). An increase in the concentration of abscisic acid is critical for nitric oxide-mediated plant adaptive responses to UV-B irradiation. *New phytologist* 181, 871-879.

- Tuteja N. (2007). Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Methods Enzymology* 428: 419-438.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque F., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., Del Rio L.A., and Barroso J.B. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* 581, 453-461.
- Wu S.J., Qi J.L., Zhang W.J., Liu S.H., Xiao F.H., Zhang M.S., Xu G.H., Zhao W.G., Shi M.W., Pang Y.J., Shen H.G., and Yang Y.H. (2009). Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant Cell Physiol* 50, 118-128.
- Xiong L., Schumaker K.S., Zhu J.K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell* 14 (Suppl.), 165–183.
- Zheng C., Jiang D., Liu F., Dai T., Liu W., Jing Q., Cao W. (2009). Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environ. Exp. Bot* 67, 222-227.
- Zhu JK. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6, 66–71.
- Zhu JK. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53, 247–273.
- Zhu JK. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 441–445.
- Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., Lo Schiavo F., and Terzi M. (2002). Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS letters* 515, 75-78.

Páginas web consultadas:

- <http://www.uhu.es/francisco.cordoba/assignaturas/postgrado/estre>